

[文章编号] 1007-385X(2003)03-0202-04

重组人 MUC1-MBP 融合蛋白的抗肿瘤作用

台桂香, 张吉凤, 朱 迅 (吉林大学基础医学院免疫教研室, 长春 130021)

[摘 要] **目的:** 研究重组人 MUC1-MBP 的抗肿瘤作用。**方法:** 用重组人 MUC1-MBP 皮下注射途径免疫健康鼠, 采用 MTT 法测定小鼠抗 MUC1 特异的 CTL 活性; 通过免疫鼠成瘤及荷瘤鼠治疗实验检测其对肿瘤的预防和治疗作用。**结果:** MUC1-MBP 免疫鼠 CTL 对 MCF-7 及 Lewis 肺癌细胞的杀伤率分别为(47.7 ± 4.3) % 和(67.5 ± 6.5) % ; 免疫鼠成瘤结果免疫组小鼠共长 5 个肿瘤, 存活时间明显延长, 对照组共长 51 个, 平均生存时间 23 d ; 荷瘤鼠治疗结果显示治疗组小鼠肿瘤平均体积 386 mm³, 对照组小鼠肿瘤平均体积 4 000 mm³。**结论:** 重组人 MUC1-MBP 具有明显的治疗、预防肿瘤和抑制肿瘤转移的作用, 有希望发展成人类抗肿瘤疫苗。

[关键词] MUC1-MBP 融合蛋白; CTL 活性; 肿瘤疫苗

[中图分类号] R730.59 [文献标识码] A

The Anti-Tumor Effect of Recombinant Human MUC1-MBP Fusion Protein

TAI Gui-xiang, ZHANG Ji-feng, ZHU Xun (Department of Immunology Basic Medical Institute, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor effect of recombinant human MUC1-MBP. **Methods:** The C57BL/6 mice were in oculated with MUC1-MBP by subcutaneous. MUC1 specific CTL activity of spleen were determined by MTT; The effects on prevention and treatment of tumor were observed by establishing lewis lung cancer-carrying mice. **Results:** The cytotoxicity of CTL from immunized mice to the MCF7 and Lewis lung cancer cells respectively was (47.7 ± 4.3) % and (67.5 ± 6.5) % ; 5 × 10⁵ lewis lung cancer cells following immunization were injected *iv into* C57BL/6 mice, after three weeks, the number of lung and tail tumor colonies was 51 and 5 for PBS and MUC1-MBP groups respectively and the survival time was significantly delayed in immunized mice. The average volume of tumors in mice with MUC1-MBP was 386 mm³ wherea control group was 4 000 mm³ at tumor treating experiment. **Conclusions:** Recombinant human MUC1-MBP have significantly effects on prevention, treatment and inhibiting metastases of tumor. Our results suggested that the recombinant MUC1-MBP might be used to develop protein vaccine against human carcinoma.

[Key words] MUC1-MBP fusion protein; CTL activity; cancer vaccine

* MUC1 是 Mucins 黏蛋白家族成员, 存在于正常腺管上皮细胞及其来源的肿瘤细胞表面, 由多肽核芯(核芯肽)和侧枝糖链构成。其核芯肽胞外段含有许多 20 个氨基酸(SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT) 的串联重复序列(variable numbers tandem repeats, VNTRs)。正常组织 MUC1 与肿瘤组织不同, 前者分布于腺管上皮细胞分泌极, 与免疫细胞相对隔离, 糖基化丰富; 而后者广泛分布并异常丰富地表达于癌细胞表面, 糖基化不完全, 因此暴露出正常情况下隐蔽的表位, 成为免疫细胞攻击的靶点^[1-2]。MUC1 核芯肽的 PDTRP 表位既能被多种 MUC1 抗体识别, 也可被 CTL 细胞识别和杀伤, 且

不受 MHC 限制。因此 MUC1 是较理想的抗肿瘤靶分子。目前研制的以 MUC1 为基础的疫苗包括糖疫苗、蛋白或多肽疫苗和 DNA 疫苗^[3-5], 但以蛋白疫苗具有临床应用前景。我们以 MUC1 为靶点, 成功构建、表达并纯化了 MUC1-MBP 融合蛋白疫苗, 其免疫活性检测结果表明该融合蛋白诱导了小鼠抗 MUC1 特异的抗体

[基金项目] 国家自然科学基金项目(NO39670686)及教育部跨世纪优秀人才培养计划资助

[作者简介] 台桂香(1964-), 女, 吉林长春人, 博士后, 副教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤免疫研究

[通讯作者] 朱 迅

及 CTL 活性。本文主要目的探讨重组人 MUC1-MBP 融合蛋白的抗肿瘤作用。

1 材料与方

1.1 材料来源

动物 18 ~ 20 g 雌性 C57BL/6 小鼠 45 只购自长春高新动物有限公司; 佐剂 BCG 购自长春生物制品所; IMDM 培养液 ConA, $^3\text{H-TdR}$ 为本室常备; MCF-7(人乳腺癌)细胞系、Lewis 肺癌细胞系和 K562(人红白血病细胞)细胞系为本室常备细胞; MUC1-MBP 由本室重组构建及纯化。

1.2 C57 小鼠免疫

将 C57BL/6 小鼠 25 只分成 4 组, 3 组为对照组: 分别为 PBS, PBS + BCG 和 PBS + BCG + MBP, 一组为实验组: MUC1-MBP + BCG, 颈背部皮下多点及两侧腹股沟皮下注射 MUC1-MBP 20 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{只}$, BCG 2 ~ 5 mg/只, 隔周 1 次共 2 次, 最后免疫的第 2 ~ 10 天眶上静脉采血测定抗体效价。

1.3 小鼠细胞毒活性测定(CTL)

将免疫后的小鼠杀死后无菌取脾, 制备脾细胞悬液, 调制靶细胞 MCF-7 和 Lewis 肺癌细胞浓度, 按照 100:1, 50:1 和 25:1 的效靶比例加入 96 孔板中, 200 $\mu\text{l}/\text{well}$, 轻轻震荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 孵箱培养 4 ~ 10 h, 加入 MTT 5 ~ 20 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 继续培养 4 h, 加 100 ~ 200 $\mu\text{l}/\text{孔}$ DMSO 溶解甲臞, 用酶标仪测定 OD_{490} 。

1.4 免疫鼠成瘤实验

按上述免疫程序 2 次免疫后的第 2 ~ 10 天, 用 3 ~ 7 Gy 射线照射小鼠, 然后给予 Lewis 肺癌细胞尾静脉注射, 注射细胞数为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5/\text{只}$ 。在清洁的环

境下饲养, 观察尾部及全身状态的改变, 3 ~ 5 周后将小鼠处死, 解剖, 计算肺部转移瘤的数目, 尾部肿瘤的大小。

1.5 荷瘤鼠治疗实验

背部皮下注射 Lewis 肺癌细胞给未免疫的 C57 小鼠, $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5/\text{只}$, 当肿瘤长到 0.3 ~ 10 mm 后, 再注射 MUC1-MBP, 观察肿瘤的体积。

1.6 荷瘤鼠生存实验

将免疫的 C57 小鼠, 尾静脉注射 Lewis 肺癌细胞 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5/\text{只}$, 观察其生存时间的长短。

2 结果

2.1 MUC1-MBP 诱导小鼠抗 MUC1 特异的 CTL 反应

通过 MTT 法测定小鼠脾 CTL 活性, 分别用 MCF-7 和鼠 Lewis 肺癌细胞作为靶细胞, 在效靶比例为 100:1 时, BCG 组与 PBS 对照组相比杀伤活性无明显差别; MUC1-MBP 免疫组小鼠脾细胞对 MCF-7 细胞和 Lewis 肺癌细胞杀伤活性分别为 $(47.7 \pm 4.3)\%$ 和 $(67.5 \pm 6.5)\%$, 与 PBS 对照组及 BCG 组相比 ($P < 0.01$), 有显著性差异; 当用 K562 作为靶细胞时, MUC1-MBP 免疫组、BCG 组和 PBS 对照组小鼠脾细胞杀伤活性组间比较 ($P > 0.05$), 无显著性差异。该结果表明, 无论对于人类 MCF-7 还是鼠 Lewis 肺癌细胞, 每只鼠均诱导出 MUC1 特异的 CTL 活性, 并且杀伤率随着效靶比例的增高而增加 (图 1)。该结果表明重组 MUC1-MBP 融合蛋白存在 CTL 表位, 其诱导的人类 MUC1 特异的 CTL 能与鼠 MUC1 蛋白结合, 说明鼠 MUC1 蛋白也存在能诱导人类 MUC1 特异的 CTL 的表位。

图 1 重组人 MUC1 融合蛋白诱导的小鼠脾 CTL 活性

Fig. 1 CTL response of spleen from C57 mice immunized by MUC1

2.2 人类 MUC1-MBP 诱导的主动免疫对肺癌转移及实体瘤的作用

用鼠 Lewis 肺癌细胞建立肿瘤模型, 是因为鼠

Lewis 肺癌细胞表面 MUC1 与人类有一定的同源性, 人类 MUC1 诱导的鼠抗人类 MUC1 抗体及 CTL 都能与鼠 Lewis 肺癌细胞的 MUC1 结合并能诱导特异性杀伤, 因

此采用 Lewis 肺癌细胞做荷瘤鼠实验能够检验人类重组 MUC1 蛋白诱导的抗肿瘤作用。经 MUC1-MBP 免疫 2 次后再注射肿瘤,饲养 32 d 后处死小鼠,结果表明经融合蛋白 MUC1 免疫鼠,仅有 3 只在尾静脉注射尾部长出 14 mm^3 大小的肿瘤共 3 个;对照组每只鼠尾部都生长了大小不等的肿瘤,体积大于 120 mm^3 ,其中一只鼠在臀部尾静脉走行部位共长 5 个肿瘤,体积最大的 250 mm^3 ,有的肿瘤中心破溃,鼠状态消瘦,毛色灰暗无光泽,30 d 后该鼠死亡。MUC1-MBP 免疫组 5 只鼠肺部仅见 2 个转移瘤,而对照组肺部转移瘤共有 40 个(表 1)。统计学处理结果表明实验组与对照组相比有显著性差异($P < 0.01$)。人类重组 MUC1-MBP 融合蛋白诱导的免疫明显抑制了肺部转移瘤及原发瘤的产生。

表 1 MUC1 免疫鼠注射 Lewis 肺癌细胞后肿瘤的生长

Tab.1 The effect of pre-immunization with MUC1 on lewis lung cancer growth

Groups	PBS + BCG		MUC1 + BCG	
	Lung	Tail	Lung	Tail
1	1	1	1	1
2	11	3	0	1
3	12	5	0	0
4	4	1	1	1
5	12	1	0	0
Sum	40	11	2	3

2.3 MUC1-MBP 治疗肿瘤的作用

首先给 C57BL/6 小鼠注射 Lewis 肺癌细胞,当肿瘤生长到 $0.3 \sim 1 \text{ cm}$ 大小时,按常规程序免疫。免疫后 30 d,经 MUC1-MBP 免疫组肿瘤平均体积 386 mm^3 ,直至 60 d 无 1 只死亡;而对照组肿瘤平均体积 4000 mm^3 ,30 d 内小鼠全部死亡。统计学处理结果表明,实验组和对照组有显著性差异($P < 0.01$)。该实验说明 MUC1-MBP 有明显的肿瘤治疗作用(图 2)。

2.4 MUC1-MBP 免疫对荷瘤鼠存活的影响作用

在第 2 次免疫后,给 C57 小鼠注射 Lewis 肺癌细胞,未经免疫的小鼠平均生存时间 23 d;单独 BCG 组生存时间虽较对照组延长,但在 60 d 全部死亡;MUC1-MBP 组其中 2 只分别于 25 d 和 65 d 死亡,而其余 3 只观察至 110 d 仍然存活。该结果表明,MUC1-MBP 免疫的荷瘤小鼠,生存期明显延长。MUC1-MBP 具有抗肿瘤生长的作用(图 3)。

图 2 MUC1-MBP 对 Lewis 肺癌的治疗作用

Fig.2 Treatment of on Lewis lung cancer in C57BL/6 mice by vaccination with MUC1

图 3 MUC1-MBP 免疫的 C57BL/6 小鼠对

Lewis 肺癌的预防和抑制作用

Fig.3 Prevention and inhibition of Lewis lung cancer potential in C57BL/6 mice immunized with MUC1

3 讨论

用 MUC1-MBP 融合蛋白免疫的 C57 鼠产生了强烈的抗 MUC1 特异的 CTL,其针对不同的靶细胞,如人类 MCF7 和鼠 Lewis 肺癌细胞,均表现出明显的杀伤活性。由于我们在实验中使用的材料是脾细胞,因此所测定的杀伤活性可能包含非特异性杀伤(NK),为排除这种可能,我们用 K562 作为对照,结果显示,MUC1 免疫组较 PBS 对照组,对 K562 的杀伤活性略有增高,但无统计学意义,因此可排除诱导 NK 细胞活性的可能。另外,为排除 BCG 诱导的非特异性杀伤,我们用 BCG 单独免疫小鼠,测定脾细胞的杀伤活性也未见增高。上述结果均证实

MUC1-MBP 免疫鼠诱导了 MUC1 特异的 CTL 活性。CTL 特异性杀伤通常受自身 MHC 的限制, 而经 MUC1-MBP 融合蛋白免疫鼠诱导的 CTL 能够杀伤人类乳腺癌细胞, 表明其诱导的杀伤不受 MHC 限制。许多研究表明 MUC1 既可诱导非 MHC 限制性的杀伤, 也可诱导限制性的杀伤^[6-7]。而对 Lewis 肺癌细胞的杀伤说明该重组人 MUC1 融合蛋白序列有与鼠 T 细胞反应的 T 细胞表位存在, 并且对小鼠 Lewis 肺癌细胞杀伤率明显高于对人类 MCF-7 细胞的杀伤, 提示异种同源性蛋白能诱导更强烈的免疫反应。Wei^[8]曾经讨论了用异种同源性分子开发肿瘤疫苗的策略, 我们的结果证实了这种想法的可行性。最近研究表明, 诱导长期持续的 CTL 反应, Th1 的激活非常重要, 而是否能诱导出 T 细胞反应, 与载体、佐剂的种类以及 MUC1 序列的长短有关, 可能较长的序列容易诱导 T 细胞反应。我们发现 MUC1-MBP 免疫鼠的 T 细胞培养上清中 IL-2, IFN- γ 和 TNF- β 明显增高(未发表), 说明 MUC1-MBP 免疫小鼠不仅激活了 MUC1 特异的 CTL, 同时也激活了 Th1 细胞。这可能与 MBP 具有强的免疫原性, BCG 倾向于产生 T 细胞反应有关。由此可见该疫苗具有抗肿瘤的潜能。

在荷瘤鼠实验中, 用 MUC1-MBP 融合蛋白免疫鼠, 注入 Lewis 肺癌细胞后明显抑制了肺部转移, 及局部实体瘤的生长。为了在小鼠体内研究人类的 MUC1 疫苗, 通常采用转染人类 MUC1 的鼠乳腺癌细胞作荷瘤鼠实验。而在我们的实验中所用的是 Lewis 肺癌细胞。因为 Lewis 肺癌细胞来源于 C57BL/6 鼠, 并且通过 ELISA, Western blot 和 CTL 反应均证实了鼠 MUC1 与该重组融合蛋白 MUC1 有共同的抗原决定簇, 即鼠抗人类 MUC1 的抗体以及 CTL 与鼠 MUC1 能发生交叉反应。人鼠 MUC1 氨基酸序列同源性比较结果表明二者有一定的同源性^[9]。因此我们用 Lewis 肺癌细胞做为研究人类重组 MUC1 疫苗的动物模型。将 5×10^5 个 Lewis 肺癌细胞注入免疫 2 周后的 C57 小鼠, 经 MUC1 免疫鼠产生了强烈的抗肿瘤免疫。肿瘤的抑制率达 90% (PBS 组肿瘤数 - MUC1 组肿瘤数) / PBS 组肿瘤数。通过 MUC1-MBP 免疫诱导的免疫应答, 激活了 T 细胞, 因此抑制了肿瘤的生长, 同时免疫鼠的

生存时间明显延长。Finn OJ 的研究小组最近用 MUC1 多肽负载树突状细胞作为疫苗延长了荷瘤鼠的生存时间, 其结果也与我们的结果类似^[10]。

总之, 重组 MUC1-MBP 融合蛋白, 在小鼠体内诱导了 CTL 细胞毒的杀伤活性和 Th1 反应, 预防并抑制了肺癌转移及实体瘤的生长, 具有明显的治疗肿瘤作用, 为研制人用抗肿瘤疫苗提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles DW, *et al.* MUC1 and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1455: 301-313.
- [2] 阎洪彦, 王立顺, 朱 迅. MUC1 黏蛋白-肿瘤生物治疗的新靶点 [J]. *国外医学·免疫学分册*, 2000, 23(2): 113-115.
- [3] Samuel J, Budzynski WA, Reddish MA, *et al.* Immunogenicity and antitumour activity of a liposomal MUC1 peptide based vaccine [J]. *Int J Cancer*, 1998, 75: 295-302.
- [4] Karanikas V, Hwang LA, Pearson J, *et al.* Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunised with mannan MUC1 fusion protein [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(11): 2738-2792.
- [5] Gilewski T, Adluri S, Ragupathi G, *et al.* Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21 [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 5: 1693-1701.
- [6] Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, *et al.* Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient [J]. *J Immunol*, 1994, 153: 2102-2109.
- [7] Apostolopoulos V, Karanikas V, Haurum JS, *et al.* Induction of HLA-A2 restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen [J]. *J Immunol*, 1997, 159: 5211-5218.
- [8] Wei YQ. Immunotherapy of tumor with vaccines based on xenogeneic homologous molecules [J]. *Anticancer Drugs*, 2002, 13(3): 229-235.
- [9] 张吉凤, 台桂香. 人类与小鼠 MUC1 同源性位点的分析 [J]. *免疫学杂志*, 2003, 19(2): 83-85.
- [10] Melina SM, Mehta V, Finn OJ. Three different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wildtype versus MUC1-transgenic mice with different potential for tumor rejection [J]. *J Immunol*, 2001, 18: 6555-6563.

[收稿日期] 2003-03-19

[修回日期] 2003-06-20