

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0263-04

携带 flk1 的重组减毒沙门氏菌的构建及其抗肿瘤血管生成的研究

冯珂珂¹, 赵洪洋¹, 冀予心², 姜小兵¹(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科, 武汉 430022; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院口腔医学中心, 武汉 430030)

[摘要] 目的: 观察携带鼠血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor-2, flk1)的重组减毒鼠伤寒沙门氏菌诱导的 flk1 特异性免疫应答及抗肿瘤血管生成作用。方法: 构建真核表达载体 pcDNA3.1-flk1, 并将其转化到减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 中, 体外感染小鼠巨噬细胞, 用 Western 印迹对表达产物进行鉴定, 将重组菌口服免疫小鼠, 分析免疫后小鼠体内的特异性 CTL 应答。采用藻酸盐微囊实验观察其对体内肿瘤血管生成的影响。结果: 免疫印迹试验表明携带 pcDNA3.1-flk1 表达载体的重组菌感染的小鼠巨噬细胞能表达 flk1 蛋白, 免疫小鼠脾淋巴细胞产生针对 flk1 的特异性 CTL 活性。重组疫苗菌的免疫能够明显抑制小鼠体内肿瘤血管的形成。结论: 携带 flk1 的重组减毒沙门氏菌经口服免疫, 诱导小鼠产生抗 flk1 的特异性免疫反应, 且能明显产生抗肿瘤血管生成作用。

[关键词] 减毒鼠伤寒沙门氏菌; 血管内皮生长因子受体 2; 血管生成

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

Construction of Attenuated Salmonella Typhimurium Carrying flk1 Expression Vector and Priliminary Investigation of Its Inhibition of Tumor Angiogenesis

FENG Ke-ke¹, ZHAO Hong-yang¹, JI Yu-xin², JIANG Xiao-bing¹(1. Department of Neurosurgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Center of Stomatology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the specific anti-flk1 immunity and the anti-angiogenesis effect of attenuated Salmonella typhimurium strain carrying flk1 expression vector encoding flk1 cDNA. **Methods:** Plasmid pcDNA3.1-flk1 was constructed and transformed into live attenuated Salmonella typhimurium strain SL7207. The recombinant bacteria were used to infect murine macrophage *in vitro* and the expressed products were detected by Western blot. C57BL/6J mice were immunized with recombinant bacteria encoding flk1, and CTL activity of the splenocytes derived from the immunized mice was measured by MTT assay. Alginate bead assay was designed to measure *in vivo* angiogenesis induced by tumor cells. **Result:** Murine macrophage infected with recombinant S. typhimurium transformed with plasmid pcDNA3.1-flk1 could express flk1 protein. A strong CTL activity against flk1 was found in pcDNA3.1-flk1 immunized animals. The recombinant S. typhimurium vaccination inhibited tumor-induced angiogenesis *in vivo*. **Conclusion:** Attenuated Salmonella typhimurium strain encoding flk1 cDNA can elicit specific cellular immune response and inhibit tumor-induced angiogenesis *in vivo*.

[Key words] attenuated salmonella typhimurium; flk1; angiogenesis

* 大量研究表明, 新生血管形成对于肿瘤的发生、生长和转移都是必需的, 抑制这个过程就能抑制肿瘤的生长。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是诱导和促进血管形成作用最强, 最专一的生长因子, 它能通过与血管内皮细胞上的血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor re-

ceptor-2, flk1)结合, 引发一系列信号传导, 刺激血管内

[基金资助] 国家青年科学基金项目(30300331)

[作者简介] 冯珂珂(1976-), 男, 山东淄博人, 博士研究生, 主要从事肿瘤生物治疗的研究
E-mail: fengke1976@sohu.com

皮细胞增殖。flk1 是肿瘤血管内皮细胞的分子标志,有高度特异性,在增殖的血管内皮细胞中高表达,而在正常成人血管内皮细胞上几乎不表达,使之有可能成为免疫系统识别的靶标^[1]。Liu 等^[2]用鹤鹑的 flk1 蛋白疫苗免疫荷瘤小鼠,打破了小鼠对自身 flk1 的免疫耐受,产生了抗肿瘤血管作用。本实验中我们将小鼠 flk1 基因克隆入真核表达质粒 pcDNA3.1,再将其导入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207,构建成表达 flk1 的重组减毒鼠伤寒沙门氏疫苗菌,观察了其诱导针对 flk1 的特异性免疫应答及抗肿瘤血管生成作用,为肿瘤基因免疫治疗寻求新途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料

C57BL/6J 纯系小鼠购自同济医学院器官移植研究所,健康 6~8 周龄,雌性。不表达 flk1 的小鼠胶质瘤 G1261 细胞株由匈牙利 Safrany 教授惠赠,G1261-flk1 为转染 flk1 基因并稳定表达 flk1 蛋白的 G1261 细胞,由本室所建。在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中培养,培养条件为 37℃,5% CO₂,饱和湿度。鼠伤寒沙门氏菌 LB5000 和 aroA 基因缺陷的减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 由美国 Stanford 大学的 Stocker 教授惠赠。异硫氰酸荧光素-葡聚糖、G418(Sigma 公司)。lipofectamine 转染试剂(GIBCO 公司)。PCR 试剂盒、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶(MBIFermantas 公司)。纯化 PCR 产物试剂盒(Qiagen 公司)。质粒提取试剂盒(碧云天公司)。兔抗小鼠 flk1 单克隆抗体(武汉博士德公司)。藻酸钠(Sigma Chemica 公司)。其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 构建真核表达质粒 pcDNA3.1-flk1

采用 RT-PCR 法从小鼠胚胎总 RNA 中扩增出一段 flk1 全长 cDNA (上游引物: 5'-ccgtaccatggagagcaag-gcgcgtg-3',下游引物: 5'-cctctagacagcagcacctctctc-3'),将其定向插入到 pcDNA-3.1(+)载体的限制性酶切位点 Kpn1 和 Xba1 之间,构建成 pcDNA3.1-flk1。送北京鼎国公司测序,其中 flk1 基因与 GenBank 中的序列比较完全一致。

1.3 重组表达质粒转化减毒沙门氏菌

参照文献[3],采用氯化钙法将质粒 pcDNA3.1-flk1 及 pcDNA3.1 分别转化鼠沙门氏菌 LB5000,提取质粒,应用电转化法分别导入到减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 中,电转化条件:2 kV 电压、25 uF 电容、200 Ω 电阻、放电时间为 0.5 s。

1.4 重组沙门氏菌感染小鼠腹腔灌洗巨噬细胞的体外实验

取 2 只 C57BL/6J 小鼠,脱颈处死。无菌情况下,用无血清 RPMI-1640 培养基灌洗小鼠腹腔,灌洗液分别收集于 50 ml 细胞培养瓶。37℃ 孵育 2 h,使之贴壁。然后用无抗生素 RPMI-1640 培养基洗涤细胞 2 次,洗去非贴壁细胞,加入含胎牛血清(100 ml/L)的 RPMI-1640 培养基,所得贴壁细胞即为小鼠腹腔灌洗巨噬细胞。分别将 1 × 10⁸/ml 转有 pcDNA3.1-flk1 和 pcDNA3.1 质粒的减毒沙门氏菌加入小鼠腹腔灌洗巨噬细胞中,37℃ 共孵育 30 min,用含庆大霉素(50 mg/L)的无血清培养基洗涤细胞 2 次,杀死胞外菌。加入含胎牛血清(100 ml/L)的 RPMI-1640 培养基,37℃ 孵育 4 h。加入四环素至终浓度为 10 mg/L,继续培养 48 h 后检测目的蛋白表达。

1.5 Western blot 检测小鼠巨噬细胞表达产物

将细胞培养皿置于冰上,加 200 μl 细胞裂解液 [1% NP-40, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris(pH7.6)], 20 min 后将细胞裂解液转移至 1.5 ml 离心管。用 Western blot 检测细胞裂解液中 flk1 的表达,一抗为 1:100 稀释的兔抗小鼠 flk1 抗体,二抗为 1:500 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体。

1.6 重组减毒沙门氏疫苗菌口服免疫小鼠

将重组减毒沙门氏菌 SL7207/pcDNA3.1-flk1 和 SL7207/pcDNA3.1 分别接种于 2 ml 含氨苄青霉素的 LB 中振荡过夜,次日取 50 μl 加入 50 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养基中,4 h 后收集菌体,PBS 清洗后,用 100 g/L NaHCO₃ 溶液悬浮,调整细菌数为 1 × 10⁹/ml, C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组,每组 8 只。(1)免疫组:胃管饲服携带 pcDNA3.1-flk1 的减毒沙门氏菌 0.1 ml,每 2 周 1 次,共 3 次;(2)载体对照组:胃管饲服携带空质粒 pcDNA3.1 的减毒沙门氏菌 0.1 ml,余同第一组;(3)NaHCO₃ 对照组:胃管饲服 100 g/L NaHCO₃ 0.1 ml,余同第一组。

1.7 免疫小鼠脾细胞 CTL 活性测定

各组小鼠第三次免疫 2 周后无菌条件下打开腹腔取脾,分离脾淋巴细胞。以丝裂霉素 C 灭活的 G1261-flk1 细胞刺激,置 37℃,5% CO₂ 孵箱孵育 5 d 后收集活脾淋巴细胞用作效应细胞,以 G1261-flk1 及 G1261 为靶细胞,按效:靶 = 20:1 的比例混合,采用 MTT 法检测杀伤率。

$$\text{杀伤率}(\%) = [1 - \frac{A_{\text{效/靶细胞孔}} - A_{\text{效应细胞}}}{A_{\text{靶细胞}}}] \times 100\%$$

1.8 藻酸盐微囊法测定重组沙门氏菌对肿瘤新生血管形成的影响

参考文献[4]方法进行,将 G1261 肿瘤细胞悬浮于

1.5% 的藻酸钠溶液中,并将其滴入 250 mmol/L 的凝胶剂氯化钙溶液中,滴制工具为 10 ml 的注射器,滴头为处理过的医用 9 号针头,滴距为 8 cm。形成的每个藻酸钙微球大约含有 1×10^5 G1261 肿瘤细胞。小鼠经口服免疫携带 pcDNA3.1-flk1 或 pcDNA3.1 的减毒沙门氏菌,第三次免疫 2 周后,在其背部植入 4 颗藻酸钙微球。12 d 后,每只小鼠经尾静脉注射 100 μ l 浓度为 100 mg/kg 异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-dextran)溶液。20 min 后取出海藻酸钙微球置于含有 2 ml 生理盐水的试管中,试管经振荡 20 s 后离心(1 000 r/min,3 min),用荧光分光光度计测定上清中的荧光强度。

1.9 统计学处理

计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析判断组间差异,所有统计均由 SPSS10.0 统计软件处理完成。

2 结果

2.1 质粒 pcDNA3.1-flk1 的鉴定

提取少量质粒酶切鉴定。采用 Kpn1, Xba1 双酶切鉴定,电泳结果与预期结果完全一致(图 1)。

图 1 质粒 pcDNA3.1-flk1 双酶切鉴定

Fig.1 The electrophoresis result verified construction of the expression vector encoding flk1

M: λ DNA/Hind marker; 1: Kpn1 + Xba1

2.2 小鼠巨噬细胞表达 flk1 的 Western blot 分析

小鼠巨噬细胞的 Western blot 检测结果表明,SL7207/pcDNA3.1-flk1 感染的巨噬细胞能表达 flk1,而 SL7207/pcDNA3.1 感染的巨噬细胞裂解液中未检测出该蛋白条带(图 2)。

2.3 重组疫苗菌诱导的特异性 CTL 效应

pcDNA3.1-flk1 免疫组、载体对照组与 NaHCO₃ 对照组口服免疫小鼠的淋巴细胞经激活,对靶细胞(G1261-flk1)的 CTL 杀伤率在 20:1 的效靶比例下分别为 52.2%, 11.4%, 9.8%, 而 pcDNA3.1-flk1 免疫组、

载体对照组与 NaHCO₃ 对照组效应细胞对对照靶细胞(G1261 细胞)的 CTL 杀伤率在 20:1 的效靶比例下分别为 10.2%, 12.2%, 10.7%(图 3)。提示疫苗菌口服免疫诱导产生了较强的特异性 CTL 应答。

图 2 Western blot 检测小鼠巨噬细胞 flk1 的表达

Fig.2 Western blot analysis of flk1 protein in macrophage cells

1: Macrophages infected with SL7207/pcDNA3.1;
2: Macrophages infected with SL7207/pcDNA3.1-flk1

图 3 携带 flk1 重组疫苗菌诱导的特异性 CTL 效应

Fig.3 Specific CTL against flk1 induced by attenuated Salmonella typhimurium strain encoding flk1 gene

2.4 重组疫苗菌口服免疫抑制体内肿瘤血管生成的作用

采用藻酸盐微囊法测定口服免疫对小鼠体内肿瘤血管生成的影响,通过测量藻酸盐微囊对异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-dextran)的吸收量来定量肿瘤血管密度。在 pcDNA3.1-flk1 免疫组、载体对照组与 NaHCO₃ 对照组小鼠体内的藻酸盐微囊对异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-dextran)的吸收量分别为 5.17, 5.21, 1.98 ng。pcDNA3.1-flk1 免疫对藻酸盐微囊内肿瘤微血管生成的抑制与对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$)。

3 讨论

血管生成在肿瘤的发展阶段是一个限制过程,因

为在缺乏血液供应的情况下,肿瘤只能限制于 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$,超过这个大小,肿瘤经常坏死或凋亡^[5]。开发血管生成抑制剂以治疗肿瘤是当前抗肿瘤研究领域的一大热点。以内皮抑素为代表的血管生成抑制剂必须进行长期应用,一旦停药肿瘤又会迅速增长,而且人体用药量要比动物实验大得多,大量制备具有一定难度,使得治疗费用昂贵,限制了临床的推广。而采用诱导抗肿瘤血管免疫应答的方法可以长期产生作用,克服了以上缺点,成为现在研究的方向。

以减毒鼠伤寒沙门菌为载体构建的口服 DNA 疫苗是一种新型的疫苗,可将 DNA 疫苗直接呈递给抗原提呈细胞(APCs),诱导比其他类型疫苗更加高效的免疫反应。具有运送效率高,免疫方法简单,免疫效果好(包括载体菌本身可作为免疫佐剂),能同时激活黏膜免疫和全身免疫,更能有效地激发 IFN- γ 产生和特异性 CTL 等优点^[6]。美国的 Niethammer 等^[7]研究表明编码人癌胚抗原的重组减毒鼠伤寒沙门氏菌疫苗可以打破外周血 T 细胞对 CEA 转基因 C57BL/6J 小鼠 Lewis 肺肉瘤 CEA 自身抗原的耐受,抑制肿瘤生长。

减毒沙门菌无致病性,但仍有一定的侵袭力。因为它可将质粒 DNA 直接呈递给抗原提呈细胞(APCs),携带质粒 DNA 的细菌在 APC 细胞内发生溶解或以宿主吞噬小体为桥梁进入胞质,并将 DNA 释放到细胞核,使抗原 cDNA 在体内进行表达而诱导相应的免疫反应。我们的研究证实:体外情况下,减毒鼠伤寒沙门菌可以将 flk1cDNA 递呈入小鼠腹腔灌洗巨噬细胞并在其中表达,表明减毒沙门氏菌能有效输送 flk1 至抗原递呈细胞。

本研究将小鼠 flk1 基因重组质粒导入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207,构建成携带表达小鼠 flk1 质粒的重组减毒鼠伤寒沙门氏疫苗菌,观察其诱导针对 flk1 的特异性免疫应答及抗肿瘤血管生成作用。结果显示:携带 flk1 表达载体的重组减毒沙门氏菌免疫小鼠,在 CTL 实验中对对照组小鼠淋巴细胞对 G1261-flk1 及 G1261 细胞均有一定的杀伤作用,但显然是一些非特异性杀伤细胞的作用,而 pcDNA3.1-flk1 免疫组小鼠淋巴细胞对 G1261-flk1 细胞有很强的杀伤作用,对 G1261 细胞无明显效果,从而排除了对 G1261-flk1 杀伤是由 NK 细胞非特异性杀伤所造成的可能。

这表明表达 flk1 的重组减毒鼠伤寒沙门氏疫苗菌经口服免疫,可以诱导小鼠产生抗 flk1 的特异性 CTL 反应,特异性的杀伤肿瘤血管内皮细胞。为进一步验证疫苗菌诱导的特异性细胞免疫能否抑制体内肿瘤血管的生成。我们用藻酸盐微囊实验可观察小鼠体内瘤细胞周围新生血管生成情况,藻酸盐微囊实验是 1990 年 Plunkett 和 Hailey 建立的一种新的肿瘤细胞诱导血管生成的定量研究方法,通过此方法发现 pcDNA3.1-flk1 免疫组藻酸盐微囊内肿瘤血管生成量明显少于对照组。以上结果均证明用减毒沙门氏菌主动免疫法产生针对 flk1 的特异性免疫应答并具有抑制肿瘤血管生成的作用,对其免疫机制的探讨和提高其免疫效果的研究将有助于早日将这一方法应用于临床。

[参考文献]

- [1] Abdollahi A, Lipson KE, Han X, *et al.* SU5416 and SU6668 attenuate the angiogenic effects of radiation-induced tumor cell growth factor production and amplify the direct anti-endothelial action of radiation *in vitro*[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 3755-3763.
- [2] Liu JY, Wei YQ, Yang L, *et al.* Immunotherapy of tumors with vaccine based on quail homologous vascular endothelial growth factor receptor-2[J]. *Blood*, 2003, 102: 1815-1823.
- [3] Huebener N, Lange B, Lemmel C, *et al.* Vaccination with minigenes encoding for novel self antigens are effective in DNA-vaccination against neuroblastoma[J]. *Cancer Lett*, 2003, 197: 211-217.
- [4] Hoffmann J, Schirmer M, Menrad A, *et al.* A highly sensitive model for quantification of *in vivo* tumor angiogenesis induced by alginate-encapsulated tumor cells[J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 3847-3851.
- [5] Folkman J. Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer?[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 398-400.
- [6] Helen SG, Kate FG, Katherine AB, *et al.* Oral immunisation with live aro a attenuated salmonella enterica serovar typhimurium expressing the yersinia pestis V antigen protects mice against plague [J]. *Vaccine*, 2003, 21: 3051-3057.
- [7] Niethammer AG, Primus FJ, Xiang R, *et al.* An oral DNA vaccine against humancarcinoembryonic antigen (CEA) prevents growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in CEA transgenic mice[J]. *Vaccine*, 2001, 20: 421-429.

[收稿日期] 2004 - 07 - 15

[修回日期] 2004 - 10 - 10