

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0009-04

胃癌特异性纳米疫苗的制备及其生物学活性的研究

师 瑞¹, 吴开春¹, 吴道澄², 宁晓暄¹, 林 涛¹, 樊代明¹(1. 第四军医大学西京医院消化病研究所, 西安 710032; 2. 第四军医大学化学教研室, 西安 710032)

[摘 要] **目的:** 以胃癌特异性多肽抗原 MG7 为靶点研制胃癌特异性纳米疫苗, 并观察其对小鼠的免疫效能。**方法:** 人工合成胃癌 MG7-Ag 的模拟表位多肽, 用磁力超声法将其包封于纳米乳剂中, 通过透析纯化, HPLC 检测其包封效率。用包封有 MG7 抗原肽的纳米疫苗免疫健康 Balb/c 小鼠, 以空白纳米疫苗和 PBS 作为对照, 测定其免疫活性, 通过 ELISA 测定血清中抗 MG7 抗体的效价; ELISPOT 测定小鼠脾 CTL 活性。同时, 用表达 MG7-Ag 的小鼠艾氏腹水瘤细胞进行肿瘤攻击 2 周, 观察疫苗对小鼠的保护作用。**结果:** 成功制备了胃癌 MG7-Ag 的纳米疫苗, 并具有较好的包封率和较好的稳定性, 小鼠产生 MG7 抗体, ELISPOT 检测包封组与对照组相比分泌 IFN- γ 的活性淋巴细胞数量明显增高。疫苗免疫组 8 只小鼠中有 2 只未见肿瘤形成, 而对照组 8 只小鼠则全部成瘤。**结论:** 胃癌 MG7-Ag 表位纳米疫苗具有免疫原性, 可以诱导小鼠产生抗肿瘤免疫。

[关键词] 胃癌 MG-7 抗原肽; 纳米乳剂; 纳米疫苗

[中图分类号] R730.2; R735.2 [文献标识码] A

Preparation of Gastric Cancer Specific Nanovaccine and Study of Its Immunocompetence

SHI Rui, WU Kai-chun, WU Dao-cheng, NING Xiao-xuan, LIN Tao, FAN Dai-ming (Institute of Digestive Disease, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[**Abstract**] **Objective:** To develop a peptide vaccine based on MG7-Ag mimotope of gastric cancer using new nanotechnology and evaluate its efficacy and protective effect. **Methods:** Encapsulate synthesized MG7 mimotope peptide into nanoemulsion using magnetic and ultrasonic technique. Dialyse method was used to sterilize, HPLC to determine encapsulation efficiency. Select CpG motif as immune adjuvant, Balb/c mice were immunized intravenously with MG7 nanovaccine, with empty nanoemulsion and phosphate buffered saline (PBS) as control. Serum titer of MG7 antibody was determined by ELISA assay. ELISPOT was performed to test the cytotoxicity of spleen cells. The protective effect of the nanovaccine was evaluated by tumor cell challenge assay. **Results:** MG7 nanovaccine was successfully constructed with high stability and encapsulation efficiency. It could induce both cellular and humoral immune response to MG7-Ag in mice. Tumor cell challenge shown that the tumor masses formed in the mice immunized with nanovaccine markedly smaller than those formed in the mice of control groups. 2 out of 8 immunized mice were tumor free, while none in the control groups was protected. **Conclusion:** Nanovaccine based on the MG7-Ag mimotope is immunogenic which can induce specific immunity response against tumor in mice. And the vaccine is partially protective.

[**Key words**] MG-7 antigen; nanoemulsion; nanovaccine

胃癌是严重威胁我国人民健康的恶性肿瘤之一, 常规疗法效果欠佳。疫苗是肿瘤基因治疗的一个活跃领域。胃癌 MG₇-Ag 是本研究所发现的较好的胃癌标志物, 在胃癌组织中表达较高, 特异性好, 其表位位于糖链上。我们应用噬菌体文库显示技术筛选得到了胃癌 MG₇-Ag 的模拟表位多肽^[1], 实验证实该多肽能较好地模拟原始抗原, 是构建胃癌疫苗的理想候选分

子^[2,3]。多肽类药物显示出优于传统药物的治疗效果, 但多肽类药物由于其易降解等固有的缺点, 限制了它

[基金项目] 国家 863 计划课题(2001AA215421)

[作者简介] 师 瑞(1976-), 女, 西安人, 主治医师, 硕士, 主要从事肿瘤疫苗研究

[通讯作者] 吴开春, E-mail: kaicwu@fmmu.edu.cn

们的临床应用。而纳米载药系统可以较好地克服这些缺点。Kossovsky 等^[4,6]证明,纳米载药系统能够使蛋白抗原的表面充分暴露,能保护抗原,使抗原结构更趋稳定并能促进网状内皮系统的摄取,因此用于免疫制剂相当有效。本研究利用一种新型的药物载体系统纳米乳剂包封 MG7 模拟表位多肽构建胃癌特异性纳米疫苗,观察其性质及体内生物学活性,取得了较好的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

实验抗原、抗体及细胞 MG7 模拟表位多肽 KPH-VHTK 由美国美联(西安)生物科技有限公司合成并纯化。小鼠艾氏腹水瘤细胞、抗 MG7 单克隆抗体由本研究所保存。HRP 标记羊抗鼠单克隆抗体购自美国 Sigma 公司。

ELISPOT 试剂盒购自法国 Diaclone 公司。司盘-80、土温-80、大豆油均购自美国 Sigma 公司。8 000 kD 透析膜购自华美生物工程公司。Balb/c 小鼠,雌性,4 周龄,体重 15~20 g,由本校实验动物中心提供。

1.2 纳米乳剂包封 MG-7 抗原肽制备纳米疫苗

2 ml 双蒸水中分别加入质量分数为 0.4% 的 twen-80 和 span-80,混合均匀得到水相 A,另取一大试管加入 8.0 ml 双蒸水,1.6 ml 大豆油和 1.5 mg MG7 多肽抗原,再加入质量分数为 0.4% 的 span-80,混合均匀,得到油相 B。在 3 000 r/min 搅拌下,将油相 B 逐滴加入到水相 A 中,滴加完毕后将混合物移至真空高速剪切乳化机上,在 0.7 Kpa 真空下,23 000 r/min,高速剪切 40 min,2 次,室温冷却 20 min,得到乳白色带乳光液体,冰浴下超声 3 min 后即得到纳米乳剂^[6]。用 0.22 μm 的膜过滤除菌后 4℃ 保存。

1.3 包封效率的检测^[7]

取 5 ml 制备好的 MG7 纳米乳剂,置于 8 000 kD 透析膜中,4℃ 下去离子水透析 48 h,取透析液,同时配制浓度为 5 μg/ml 的 MG7 标准品,经高效液相色谱(HPLC),在 215 nm 处检测吸收峰。以内标一点法,通过峰面积之比计算包封率,具体计算公式如下:

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{总药量} - \text{游离药量}}{\text{总药量}} \times 100\%$$

1.4 纳米疫苗粒径测定及稳定性研究

粒径测定:取适量 MG7 纳米乳剂分散于生理盐水中,滴网染色,3% 磷钨酸负染,透射电镜观察摄影。性质鉴定:取油性染料苏丹红和水溶性染料亚甲兰各一滴加入乳剂中,观察二者在所制备纳米乳剂中的扩

散速度。稳定性研究:室温下 4 000 r/min 离心 10 min,观察其稳定性。

1.5 Balb/c 小鼠分组与免疫方案

30 只 Balb/c 小鼠随机分为 3 组:MG7 纳米疫苗组 [Nano(MG7)],空白纳米乳剂组 [Nano(-)],PBS 组,每组 10 只。采用小鼠尾静脉注射免疫,MG7 纳米乳剂 1 ml/只,每隔 10 d 用同样方法加强免疫 1 次,共免疫 3 次。

1.6 免疫细胞化学染色确定小鼠艾氏腹水瘤上 MG7-Ag 的表达

收集新鲜腹水中的艾氏腹水瘤细胞,制备成单细胞悬液,用甩片机将细胞甩至载玻片上,冷丙酮室温固定 10 min。采用 SABC 法,一抗为 1:500 稀释的抗 MG7 单抗;以无关单抗小鼠抗 6-His 抗体(1:500 稀释)为阴性对照。

1.7 血清抗 MG7 抗体效价的测定

在每次免疫后 10 d 采小鼠眶上静脉血,将经过证实表达有 MG7 抗原的艾氏腹水瘤细胞^[2]铺于 96 孔板,以抗 MG7-Ag 抗体为阳性对照通过间接 ELISA 法测定血清抗 MG7 抗体效价。每个样品设 3 个复孔。以无关抗体做阴性对照。

1.8 小鼠脾脏 CTL 细胞毒活性检测

用 ELISPOT 法检测免疫小鼠脾淋巴细胞杀伤活性,参照试剂盒说明书进行,以 MG7 抗原肽为刺激物,对照孔为未经刺激效应细胞。反应结束后晾干,于显微镜下计数每孔呈黑蓝色的斑点数,求出三复孔的平均值,用试验孔斑点数减去对照孔斑点数即为 IFN-γ 阳性细胞频数。

1.9 肿瘤攻击实验

免疫 5 周后,取新鲜小鼠腹腔艾氏腹水瘤细胞 100 μl(约含艾氏腹水瘤细胞 1×10^6)皮下接种 PBS 对照组(8 只)、空载体对照组(8 只)和疫苗免疫组小鼠(8 只)。肿瘤攻击 2 周后,颈椎脱臼法处死小鼠,取出瘤体,称重,比较各组小鼠成瘤情况。

1.10 统计方法

采用 SPSS 软件,One-Way ANOVA 进行检验。

2 结果

2.1 胃癌特异性纳米疫苗的制备及其粒径、稳定性研究

所制备 MG7 纳米乳剂大体上呈半透明乳状液,电镜下显示粒径大小约为 20~30 nm,离心 4 000 r/min,室温静置 3 个月未见分层。染色法鉴定显示红色染料苏丹红扩散快于蓝色亚甲兰,证实所制备的纳米乳剂疫苗为 W/O 型(图 1)。

2.2 HPLC 法测定包封效率 MG7 纳米疫苗的包封率达 72%。

2.3 小鼠艾氏腹水瘤细胞 MG7-Ag 的免疫细胞化学染色

收集新鲜腹水中的艾氏腹水瘤细胞,制备成单细胞悬液,用甩片机将细胞甩至载玻片上,常规固定细胞,采用 SABC 法,滴加 1:50 稀释的免疫血清 4℃ 过夜,生物素化羊抗鼠 IgG 37℃ 孵育 1 h, DAB 显色,常规脱水,透明,中性树脂封片(图 2)。

图 1 MG7 Ag 纳米疫苗

Fig. 1 MG7-Ag nanovaccine

表 1 静脉免疫不同次数小鼠血清中抗 MG7-Ag 抗体的检测 OD₄₅₀ ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The detection of serum titer of MG7 antibody in mice after every immunization OD₄₅₀

Groups (n = 3)	10 d (g)	20 d (g)	30 d (g)
Nano(MG7)*	0.2558 ± 0.0204 [▲]	0.3859 ± 0.0117 [△]	0.4337 ± 0.0042 [△]
Nano(-)	0.2163 ± 0.0146	0.2534 ± 0.0095	0.2649 ± 0.0283
PBS	0.2106 ± 0.0158	0.2142 ± 0.0054	0.2472 ± 0.0308

* Compared with Nano(-) or PBS control, on the 10th d after immunization; [▲] P < 0.05, on the 20th d and 30th d; [△] P < 0.01

2.5 MG7 纳米疫苗诱导的 T 细胞反应

显微镜下观察计数各孔形成斑点数,纳米疫苗免疫组显著多于 PBS 对照组以及空白纳米乳剂组(P < 0.01,图 3)。

2.6 MG7 纳米疫苗的抑瘤效果

由表(1)可见,用表达有 MG7 抗体的艾氏腹水瘤对免疫 5 周的 Balb/c 小鼠进行肿瘤攻击试验, MG7 纳米疫苗组肿瘤生长抑制明显,8 只小鼠中 2 只未见肿瘤形成。与空白组及 PBS 对照组相比,成瘤大小具有明显统计学差异(P < 0.01,表 2)。

3 讨论

胃癌的生物学治疗以多肽药物和基因治疗为主,是目前临床研究的热点。基因工程技术的发展,使人们可以大量生产某一肿瘤抗原,为肿瘤疫苗的应用奠定了基础。DNA 疫苗具有成本相对较低、性质较稳定、

2.4 MG7 纳米疫苗诱导的抗体应答

间接 ELISA 法检测 3 次免疫后小鼠血清抗体效价,纳米疫苗组抗体效价明显高于空白组及 PBS 对照组,方差分析比较免疫后不同时间抗体效价,组间有显著性差异(P < 0.01)(以上数据经过正态性检验及方差齐性检验)(表 1)。

图 2 小鼠艾氏腹水瘤细胞 MG7-Ag 的免疫细胞化学染色
Fig. 2 Ehrlich ascites carcinoma cells expressing MG7-Ag identified by immunocytochemical stain

A: MG7-Ag expressed on ehrlich ascites carcinoma cells stained by MG₇mAb(10 × 20);

B: The negative control ehrlich ascites carcinoma cells stained by 6-His mAb(10 × 20)

图 3 ELISPOT 法检测小鼠脾淋巴细胞杀伤活性
Fig. 3 Cytotoxicity of the mice spleen lymphocyte determined by ELISPOT

1: PBS control; 2: Nano(-); 3: Nano(MG7) compared with nano(-) or PBS control group, the mice vaccinated with nano(MG7) got the highest number of IFN-γ secreting lymphocytes △ P < 0.01

表2 各组小鼠瘤体重量

Tab. 2 The tumor weight of mice after tumor attack

Groups (n = 3)	Tumor weight (g)
Nano(MG7)	0.1605 ± 0.1111 [△]
Nano(-)	0.6505 ± 0.1627
PBS	0.6826 ± 0.3176

Compared with Nano(-) or PBS, $\Delta P < 0.01$

便于储运等优点,但其与宿主基因组整合,有可能破坏正常细胞的功能,并且目前基因疫苗依然普遍存在基因表达水平低、诱导的免疫应答不足等缺点。而多肽合成技术的突破性进步,可以使人工合成多肽直接应用于临床治疗,大大推动了肿瘤抗原肽疫苗的发展。与传统疫苗相比,多肽疫苗有一些独特的优点:①抗原肽直接刺激,使疫苗激活的免疫反应特异性高,并且不会引起自身免疫反应或免疫抑制;②疫苗合成方便,纯度高;③疫苗非肿瘤组织提取物,避免了细菌和病毒的感染,安全可靠。因此,多肽疫苗已成为肿瘤治疗性疫苗研究的热点,是一种具有广阔应用前景的肿瘤免疫治疗方法。纳米粒子与生物体有着密切的关系,DNA/蛋白质复合体就在15~20 nm之间,多种病毒颗粒也是纳米级的超微粒子^[8]。多肽抗原需要与适当载体形成复合物才能诱导有效的免疫应答,但载体效应难以避免。纳米佐剂可以避免载体效应的发生,而且还是巨噬细胞、树突状细胞的首选吞噬目标。通过控制纳米粒径的大小以及表面结合特异性的靶向分子可以起到靶向给药的目的^[9]。用纳米技术改善疫苗制备工艺,可以使疫苗产生了一些新的性质,实现有效递呈抗原,缓慢释放抗原,充分加工处理抗原,有效表达抗原,提高抗原生物利用度,最终达到持久免疫的效果。纳米粒子的辅助作用主要在于持久地释放被包裹的抗原,同时加强吸收作用和身体免疫系统对被纳米粒子结合抗原的免疫反应。因此,纳米疫苗的研制已成为生物技术领域的前沿和热点问题^[10-12]。

我们采用胃癌特异性表面标志物MG7模拟表位设计合成抗原多肽,实验证明可以较好的模拟MG7抗原性,将其用理化方法封装于纳米颗粒之中,成功制备了胃癌特异性纳米疫苗,取得较高的封装率,粒径大小均匀,稳定性好。免疫小鼠的体

内免疫取得了较好的效果。肿瘤攻击实验证实纳米疫苗组较空载体组以及PBS对照组小鼠有明显肿瘤抵抗能力。

实验证明,研制的纳米疫苗采用植物油等天然生物原料,具有低毒、高稳定性的特点,有较好的临床应用前景。

[参考文献]

- [1] 韩全利,丁杰,何凤田,等. 胃癌相关抗原模拟表位的筛选及鉴定[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(2): 164-165.
- [2] 郭长存,丁杰,樊代明,等. 胃癌MG7 Ag模拟表位口服DNA疫苗的研制[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 23(22): 2044-2047.
- [3] Xiaoxuan N, Kaichun W, Changcun G, et al. Immunological characterization of a DNA vaccine of gastric cancer-related MG7-Ag mimotope fused with heat shock protein 70[J]. J Tumor Marker Oncol, 2003, 18(1): 53-60.
- [4] Cui Z, Hsu CH, Mumper RJ. Physical characterization and macrophage cell uptake of mannan-coated nanoparticles[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2003, 29(6): 689-700.
- [5] Raghuvanshi RS, Katare YK, Lalwani K, et al. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants[J]. Int J Pharm, 2002, 245(1-2): 109-121.
- [6] Kossovsky N, Gelman A, Hnatyszyn HJ, et al. Surface-modified diamond nanoparticles as antigen delivery vehicles[J]. Bioconjug Chem, 1995, 6(5): 507-511.
- [7] 王执民,吴道澄. HPLC法测定阿霉素毫微粒经肝动脉灌注后大鼠体内的早期动态分布[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(1): 89-91.
- [8] Chaix C, Pacard E, Ellassari A, et al. Surface functionalization of oil-in-water nanoemulsion with a reactive copolymer: Colloidal characterization and peptide immobilization[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, 29(1): 39-52.
- [9] Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL, et al. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size[J]. Pharm Res, 1996, 13(12): 1838-1845.
- [10] Lemarchand C, Couvreur P, Vauthier C, et al. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan[J]. Int J Pharm, 2003, 254(1): 77-82.
- [11] 王晓黎,蒋雪涛. 微乳在药剂学上的应用[J]. 解放军药学报, 2000, 16(2): 88-91.
- [12] 张正全,陆彬. 微乳给药系统研究概况[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(3): 139-142.

[收稿日期] 2004-07-05

[修回日期] 2004-10-16

[本文编辑] 韩丹,王莹