

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2005 )01-0033-04

## γ1neo-hgp100 基因的体外转染表达及体内免疫保护效应

李 昂, 刘荣军, 林 怡, 熊思东, 储以微 ( 复旦大学上海医学院免疫学系, 上海 200032 )

[ 摘 要 ] **目的:** 构建含有黑色素肿瘤相关抗原 hgp100 的 CTL 表位编码基因质粒 γ1neo-hgp100, 观察此质粒的体外表达和表达产物的提呈, 以及体内基因免疫对黑色素肿瘤攻击的保护效应。**方法:** 将编码 hgp100 的 CTL 表位的 DNA 序列插入抗体化抗原的表达质粒 γ1neo 中, 构建 γ1neo-hgp100, 体外转染 J558L, ELISA 检测免疫球蛋白的表达; 转染后的 J558L 与 pmel TCR 转基因 T 细胞共育, 48 h 后 ELISA 检测培养上清中 IFN-γ 的含量。以 γ1neo-hgp100 脾内基因免疫 C57BL/6 小鼠, 以 B16F10 黑色素瘤细胞攻击免疫后小鼠, 定期观察肿瘤的生长情况及大小。**结果:** 所构建的 γ1neo-hgp100 可以在体外表达, 表达产物可以被充分的提呈, 被提呈的 hgp100 CTL 表位能有效的活化 pmel TCR T 细胞分泌 IFN-γ。经 γ1neo-hgp100 免疫的小鼠能显著抵抗 B16F10 黑色素瘤细胞的攻击, 生存时间得以明显延长。**结论:** γ1neo-hgp100 基因可有效的在体外表达并被提呈至 T 细胞, 产生体内免疫保护效应。

[ 关键词 ] hgp100; 基因免疫; pmel TCR 转基因 T 细胞

[ 中图分类号 ] R392.11 [ 文献标识码 ] A

## The Expression and Protective Efficacy of DNA Vaccine Encoding Antibodized hgp100

LI Ang, LIU Rong-jun, LIN Yi, XIONG Si-dong, CHU Yi-wei ( Department of Immunology, Shanghai Medical College of Fudan University, Shanghai 200032, China )

[ Abstract ] **Objective:** To investigate whether the plasmid γ1neo-hgp100 could be expressed and presented *in vitro* and could protect the immunized mice from B16F10 challenge *in vivo*. **Methods:** γ1neo-hgp100 plasmid was constructed in which the DNA sequence encoding hgp100 CTL epitope inserted into CDR3 of γ1-neo vector. The expression of antibodyed antigen and IFN-γ in supernatant was measured by ELISA respectively after transfection J558L with γ1neo-hgp100 and further co-culture of J558L transfected with γ1 neo-hgp100 and pmel TCR transgenic T cell. After intraspleenic inoculation of γ1neo-hgp100, the protective efficacy of the gene vaccine was observed by means of measuring the tumor area every two days. **Results:** γ1neo-hgp100 could be expressed and presented *in vitro*, the immunogenicity of CTL epitope of hgp100 was strong enough and could activate gp100 specific T cell, the mice immunized with the gene vaccine could resist the tumor challenging *in vivo*. The mean survival time was prolonged to 36 days, compared to control group(  $P < 0.05$  ). **Conclusion:** γ1neo-hgp100 could be expressed and presented *in vitro* and protect mice from tumor challenging.

[ Key words ] hgp100; gene immunization; pmel transgenic TCR T cell

Gp100 是胚胎早期出现的分化抗原, 在黑色素瘤发生过程中过度表达, 因此被作为黑色素瘤的肿瘤相关抗原<sup>[1]</sup>。由于其免疫原性较弱, 以小鼠 gp100 ( mgp100 ) 免疫难以诱导出针对小鼠黑色素瘤的抗癌效应。Overwijk 等<sup>[2]</sup>在用多种动物来源的 gp100 免疫小鼠时发现, 人源 gp100 ( hgp100 ) 比小鼠 gp100 ( mgp100 ) 对小鼠有着更强的免疫原性, 能诱导出明显的保护效应。并且, 其中关键性的抗原表位

( hgp100<sub>25-33</sub> ) 与小鼠 MHC I 类分子亲和力要强于 mgp100<sub>25-33</sub>。用 hgp100<sub>25-33</sub> 抗原肽免疫小鼠可获一定的抗癌效应。

[ 基金项目 ] 国家自然科学基金项目( 30170867 ); 上海市科委项目( 04ZR14012, 045407038 )

[ 作者简介 ] 李 昂( 1980- ), 男, 安徽省马鞍山人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤免疫研究

[ 通讯作者 ] 储以微, Email: ywchu@shmu.edu.cn

以抗体化抗原为载体的基因疫苗是新的 DNA 免疫技术<sup>[3]</sup>,它具有以下特点:空间构象限定,表位外显,可使插入其中的抗原表位更加暴露却不影响抗原天然构象。鉴于上述背景,本研究拟将 hgp100 的 CTL 表位编码基因插入可表达抗体化抗原的质粒  $\gamma$ 1-neo 中,通过检测靶基因的体外表达、被提呈及体内保护实验,阐明 hgp100 靶抗原的抗肿瘤效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

6~8 周龄、体重为 18 g 左右的雌性 C57BL/6 小鼠 (H-2Db),购自中科院实验动物中心,随机分组后清洁级饲养。

### 1.2 质粒及细胞

质粒  $\gamma$ 1neo 和 pBS-VH62-ANK 由本教研室保存,质粒 pBS-VH62-ANK 为编码人免疫球蛋白 IgG 重链可变区质粒;质粒  $\gamma$ 1neo 为编码人免疫球蛋白 IgG 重链恒定区质粒。质粒 pcDNA3-hgp100 由美国 OSU 胡红明教授实验室提供。J558L 为小鼠骨髓瘤来源细胞株,仅分泌免疫球蛋白轻链。Pmel TCR 转基因 T 细胞能特异性识别 MHC I : gp100<sub>25-33</sub> 复合物。以上两种细胞均来自美国 OSU 胡红明教授实验室。

### 1.3 质粒 $\gamma$ 1neo-hgp100 的构建、鉴定和制备

以 pcDNA3-hgp100 为模板,根据 hgp100 中一段 H-2Db 限制的 CTL 表位 (KVPRNQDWL) 设计引物,用 PCR 方法得到表达此表位的 DNA 序列,再将此 DNA 序列克隆于质粒 pBS-VH62-ANK 的 CDR3 区得到质粒 pBS-VH62-ANK-hgp100<sub>25-33</sub>。pBS-VH62-ANK-hgp100<sub>25-33</sub> 再经 EcoR I 酶切后得到表达重链可变区的片段,进一步将重链可变区的片段亚克隆于质粒  $\gamma$ 1-neo, 构建成含有 hgp100 CTL 抗原表位,可表达完整免疫球蛋白重链分子的重组质粒  $\gamma$ 1neo-hgp100。重组质粒经 EcoR I 和 XbaI I 双酶切及 PCR 鉴定并测序。质粒的大量提取按照 QIAGEN Plasmid Mega Kit 说明书进行,最后用生理盐水调质粒浓度至 2  $\mu$ g/ $\mu$ l。

### 1.4 重组质粒 $\gamma$ 1neo-hgp100 的体外转染表达

所构建的质粒在体外用脂质体转染仅分泌免疫球蛋白轻链的 J558L 细胞株(转染方法严格按说明书步骤进行),48 h 后收集转染上清,ELISA 法检测上清中免疫球蛋白 IgG 的表达:以 2  $\mu$ g/ml 兔抗人的 IgG 纯品包板,加入待测上清并以正常人血清 IgG 为对照,37 $^{\circ}$ C 1 h 后加入 HRP 标记的二抗,37 $^{\circ}$ C 1 h,接着加底物液,37 $^{\circ}$ C 15 min,以 2 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,酶标仪测 450 nm OD 值。

### 1.5 重组质粒 $\gamma$ 1neo-hgp100 体外表达后的加工和提呈

以  $\gamma$ 1neo-hgp100 体外转染 J558L(转染过程同 1.4),24 h 后与 pmel TCR 转基因 T 细胞共育。培养 48 h 后,收集培养上清液,ELISA 法检测上清液中 IFN- $\gamma$  含量。ELISA 步骤严格按照 pharmingen 公司 ELISA IFN- $\gamma$  Kit 产品说明进行。

### 1.6 基因脾脏免疫和基因肌肉免疫

本研究初次免疫行脾脏免疫,第 4 周后肌肉免疫加强。每次免疫按每只 100  $\mu$ g/50  $\mu$ l 进行。脾脏免疫和肌肉免疫的具体方法见文献[4]。

### 1.7 经 $\gamma$ 1neo-hgp100 免疫小鼠的体内保护试验

末次基因免疫后一周,于小鼠的右侧腹股沟皮下接种 B16F10 黑色素瘤细胞( $5 \times 10^4$  个/只)。接种后,每 2 天观察并测量不同实验组小鼠肿瘤大小,同时记录各实验组小鼠的生存期。

### 1.8 统计学处理

应用 spss10.0 软件做统计分析,所有实验数据做独立样本 *t* 检验或单因素方差分析。 $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 含抗原表位 hgp100<sub>25-33</sub> 抗体化抗原质粒构建

含抗原表位 hgp100<sub>25-33</sub> 抗体化抗原质粒  $\gamma$ 1neo-hgp100 构建按常规方法进行,所构建质粒经 EcoR I 和 XbaI I 酶切和 PCR 鉴定证明插入方向正确,阳性克隆经 DNA 测序表明,抗原表位 hgp100<sub>25-33</sub> 编码基因已被准确插入抗原化抗体的 CDR3 区,基因序列正确,读码框架正确(图 1)。

图 1 重组质粒  $\gamma$ 1neo-hgp100 的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid  $\gamma$ 1neo-hgp100

A: Identification of the recombinant plasmid  $\gamma$ 1neo-hgp100 by enzyme digestion Lane 1:  $\gamma$ 1neo-hgp100 was digested by EcoR I Lane 2:  $\gamma$ 1neo-hgp100 was digested by XbaI and EcoR I; B: Identification of the recombinant plasmid  $\gamma$ 1neo-hgp100 by PCR Lane 1: PCR product of  $\gamma$ 1neo-hgp100 Lane 2: PCR product of  $\gamma$ 1neo Lane 3: primer of hgp100 Lane 4: DNA marker

## 2.2 重组质粒 $\gamma 1$ -hgp100 的体外转染表达

重组质粒  $\gamma 1$ neo-hgp100 是表达人免疫球蛋白重链的载体, J558L 为仅分泌免疫球蛋白轻链的细胞株, 它能与免疫球蛋白重链形成完整的免疫球蛋白, 因此, 如质粒可正确表达, 其分泌的免疫球蛋白重链就能与 J558L 分泌的轻链结合, 通过检测上清中是否存在完整的免疫球蛋白, 可判断质粒正确表达与否。从图( 2 ) 我们可以看出, 经重组质粒  $\gamma 1$ neo-hgp100 转染的 J558L 培养上清中免疫球蛋白 IgG 的含量达到 9. 16 ng/ml, 经质粒  $\gamma 1$ -neo 转染的 J558L 培养上清中 IgG 的含量为 12. 27 ng/ml, 均远远高于未转染对照组 J588L 细胞株 1. 80 ng/ml(  $P < 0. 01$  )。以上结果表明, 我们所构建的重组质粒  $\gamma 1$ neo-hgp100 能够在 B 细胞来源的真核细胞中有效表达。

图 2 转染有  $\gamma 1$ neo-hgp100 的 J588L 表达人 IgG

Fig. 2 Expression of human IgG by J588L transfected  $\gamma 1$ neo-hgp100

## 2.3 重组质粒 $\gamma 1$ neo-hgp100 体外表达后的加工和提呈

为了观察  $\gamma 1$ neo-hgp100 的表达产物能否被加工和提呈以及被提呈的抗原肽 hgp100<sub>25-33</sub> 能否有效的刺激特异 T 细胞的活化, 我们将经重组质粒  $\gamma 1$ -hgp100 转染的 J558L 与能特异识别 H-2Db:gp100 复合物的 pmel TCR 转基因 T 细胞共育, 若表达产物可以在胞内加工提呈并能刺激 pmel TCR 转基因 T 细胞活化, 那么活化后的 T 细胞将分泌 IFN- $\gamma$ 。结果表明( 图 3 ): 转染有  $\gamma 1$ neo-hgp100 的 J558L 可明显刺激 pmel TCR 转基因 T 细胞活化, 促使其分泌的 IFN- $\gamma$  达到 1 530 pg/ml, 与未转染对照组相比( 50 pg/ml )有显著统计学意义(  $P < 0. 001$  ), 提示,  $\gamma 1$ neo-hgp100 的表达产物可以被正确的加工和提呈, 被提呈的抗原肽 hgp100<sub>25-33</sub> 能有效地刺激特异 T 细胞的活化。

## 2.4 经 $\gamma 1$ -hgp100 免疫小鼠的体内保护实验

为了进一步观察  $\gamma 1$ neo-hgp100 是否具有体内的保

护效应, 我们在末次基因免疫后一周, 给小鼠皮下接种恶性黑素瘤细胞 B16F10, 定期观察并测量肿瘤大小。结果显示( 图 4 ):  $\gamma 1$ neo-hgp100 免疫组小鼠无论是开始成瘤时间还是成瘤后肿瘤的生长速度都要迟于或慢于对照组。生存期与对照组相比也得到明显地延长(  $\gamma 1$ neo-hgp100 免疫组平均为 36 d, N. S. 和  $\gamma 1$ neo 免疫组平均生存期分别为 18 d 和 20 d( 图 5 )。提示  $\gamma 1$ neo-hgp100 具有一定的体内保护效应。

图 3 pmel TCR 转基因 T 细胞与转染有  $\gamma 1$ neo-hgp100 的 J588L 共育后分泌的 IFN- $\gamma$

Fig. 3 Level of IFN- $\gamma$  in supernatant released by pmel TCR transgenic T cell after co-cultured with J588L transfected with  $\gamma 1$ neo-hgp100

图 4  $\gamma 1$ neo-hgp100 免疫小鼠后肿瘤在体内的生长情况

Fig. 4 Tumor growth in mice immunized with  $\gamma 1$ neo-hgp100

## 3 讨论

除了传统的手术、放疗、化疗外, 随着一批黑色素瘤相关抗原的确立使得作为肿瘤第四种疗法的生物治疗在治疗黑色素瘤方面取得了令人鼓舞的效果<sup>[5-6]</sup>。但是目前所确立的黑色素瘤相关抗原大多属于胚胎早期曾出现的分化抗原, 免疫原性弱, 难以诱导出有效的免疫应答。因此如何打破机体对表达肿瘤分化抗原的

耐受是黑色素瘤疫苗研究的关键。另外,抗原载体的选取也是疫苗研究中的核心问题。靶抗原免疫原性的强弱直接影响能否激发机体产生有效的免疫应答,抗原载体的效应决定抗原表位是否被充分的提呈。

图5  $\gamma$ 1neo-hgp100 免疫小鼠的生存时间

Fig.5 Survival of mice immunized with  $\gamma$ 1neo-hgp100

本研究选取 hgp100 作为靶抗原是因为:(1) gp100 相对特异地表达于正常黑素细胞内,并在黑色素肿瘤细胞内高表达<sup>[1]</sup>,因此针对它的免疫应答不会影响其他的组织和细胞;(2) Overwijk 等<sup>[2]</sup>在体外实验中证实,人源 gp100(hgp100)CTL 表位(KVPRNQDWL)与 C57BL/6 小鼠的 MHC I 类分子 H-2Db 的亲合力明显高于 mgp100 的 CTL 表位,提示小鼠的 CD8 + TCR 可特异性识别 hgp100 抗原表位,诱导产生针对 hgp100 的特异性 CTL 杀伤活性;(3) gp100 在进化上相对保守,各种属之间同源性较高,其中人 gp100 和小鼠 gp100 在蛋白水平有 76% 同源性<sup>[7]</sup>,且 hgp100 与小鼠 MHC I 类分子有较高亲合力,提示以 hgp100 诱导的免疫应答打破小鼠对 mgp100 的免疫耐受具有一定的可行性。而选取抗体化抗原作为抗原载体是因为在 CDR3 区插有抗原表位的抗体化抗原可完全模拟抗原表位的天然构像,并且可使抗原表位更加外显,同时脾内直接注射编码抗原化抗体的 DNA 疫苗可直接被 B 细胞摄取、表达。表达抗体化抗原的 B 细胞一方面自身可作为抗原提呈细胞,将抗原表位提呈给 T 细胞,另一方面分泌至胞外的抗体化抗原因其带有 Fc 段,所以更容易与 DC 结合并被吞噬、加工,加工抗原表位提呈给 T 细胞<sup>[8]</sup>。

从我们的体外实验结果可以看出, $\gamma$ 1neo-hgp100 的表达产物可以在 B 细胞来源的 J588L 细胞株内被充分的加工、提呈,并能有效的刺激 T 细胞活化;同时也可被完整地分泌至胞外,这为 DC 细胞的摄取提供了条件。而体内实验显示,与对照组相比, $\gamma$ 1neo-hgp100 免疫组肿瘤形成的时间较晚,生长速度较慢;同时生存

期也得到明显延长。这更进一步说明,抗体化抗原基因疫苗的表达产物同样可以在体内表达、提呈,能有效地刺激和活化 gp100 特异的 CD8<sup>+</sup>T 细胞,从而抑制肿瘤细胞在体内生长。

基于上述研究结果,我们认为,以 hgp100 为靶抗原,抗体化抗原为载体的新型疫苗可以被正确而充分的提呈,能使 gp100 特异的 CD8<sup>+</sup>T 细胞得以活化和扩增,并且能诱导出明显的体内保护效应。这为以抗体化抗原为基础的基因疫苗应用于黑色素瘤的生物治疗提供了实验基础。然而由实验结果不难看出,仅在 CDR3 区插入 hgp100CTL 表位的抗体化抗原基因疫苗并没有完全抑制肿瘤的生长,因此通过优化此基因疫苗(如同时在抗体化抗原的 CDR2 区插入可被 CD4<sup>+</sup>T 细胞识别的辅助表位)来进一步增强免疫效果是下一步的研究方向。

#### [参考文献]

- [1] Rosenberg SA. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens[J]. *Immunol Today*, 1997, 18: 175-182.
- [2] Overwijk WW, Tsung A, Irvine KR, et al. gp100/pm17 is a murine tumor rejection antigen: Induction of "self"-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand[J]. *J Exp Med*, 1998, 188(2): 277-286.
- [3] Gerloni M, Xiong S, Mukerjee S, et al. Functional cooperation between T helper cell determinants[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 13269-13274.
- [4] 夏明灿,林怡,熊思东,等. MUC-1 肿瘤表位 PDTRP 基因疫苗体内外的抗肿瘤效应[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2004, 11(3): 170-174.
- [5] Hartmann TB, Bazhin AV, Schadendorf D, et al. SEREX identification of new tumor antigens linked to melanoma-associated retinopathy[J]. *Int J Cancer*, 2005, 114(1): 88-93.
- [6] Benlalam H, Linard B, Guilloux Y, et al. Identification of five new HLA-B\*3501-restricted epitopes derived from common melanoma-associated antigens, spontaneously recognized by tumor infiltrating lymphocytes[J]. *J Immunol*, 2003, 171(11): 6283-6289.
- [7] Zhai Y, Yang JC, Spiess P, et al. Cloning and characterization of the genes encoding the murine homologues of the melanoma antigens MART1 and gp100[J]. *J Immunother*, 1997, 20: 15-25.
- [8] Gerloni M, Rizzi M, Castiglioni P, et al. T cell immunity using transgenic B lymphocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 3892-3897.

[收稿日期] 2004-12-10

[修回日期] 2005-01-16

[本文编辑] 王莹,韩丹