

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2008 )02-0144-05

## Ag85A 和 Ag85B DNA 疫苗对大鼠膀胱癌免疫治疗的效果

刘 晶<sup>▲</sup>, 韩国梁<sup>▲</sup>, 杨晓峰, 田平贵, 王 鹏, 张晓俊\* (山西医科大学第一医院 泌尿外科, 太原 030001)

**[ 摘 要 ]** 目的: 探讨 Ag85A 和 Ag85B DNA 疫苗对大鼠膀胱癌免疫治疗的效果。方法: 致癌剂 N-甲基亚硝基脲( methyl nitrosourea, MNU)膀胱灌注雌性 Wistar 大鼠制备膀胱癌模型。将建模成功的 48 只大鼠随机分为生理盐水组、空白质粒组、卡介苗组、Ag85A DNA 疫苗组、Ag85B DNA 疫苗组、Ag85A + Ag85B DNA 疫苗组( 每组各 8 只), 建模后第 7、14、21 天于大鼠右后肢肌肉内注射相应药物。第 28 天处死大鼠, 流式细胞仪检测各组大鼠脾脏细胞的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群数量并计算 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值; ELISA 法检测大鼠血清中 IFN- $\gamma$  分泌水平; 剥离膀胱肿瘤进行组织病理学检查。结果: 成功建立大鼠膀胱癌模型, 致癌率 100%。经疫苗治疗后, Ag85A 组、Ag85B 组和 Ag85A + Ag85B 组膀胱肿瘤体积均有所减小、病理分级也有所减轻, 但效果不及卡介苗组。Ag85A 组、Ag85B 组、Ag85A + Ag85B 组和卡介苗组 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群数量分别为( 17.27  $\pm$  2.95 )%、( 23.15  $\pm$  1.56 )%、( 30.80  $\pm$  1.83 )%、( 38.05  $\pm$  1.48 )%; CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群数量分别为( 9.03  $\pm$  1.06 )%、( 10.28  $\pm$  0.39 )%、( 11.29  $\pm$  0.74 )%、( 13.14  $\pm$  1.24 )%; CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值分别为( 1.90  $\pm$  0.10 )、( 2.25  $\pm$  0.08 )、( 2.73  $\pm$  0.19 )、( 2.97  $\pm$  0.23 ); 血清 IFN- $\gamma$  含量分别为( 96.94  $\pm$  12.38 )、( 131.03  $\pm$  26.68 )、( 179.20  $\pm$  28.88 )、( 240.53  $\pm$  32.17 )pg/ml; 与生理盐水、空白质粒组相比, Ag85A 组、Ag85B 组、Ag85A + Ag85B 组能够显著提高以上 4 项检测指标(  $P < 0.01$  ), 但均低于卡介苗组; Ag85A + Ag85B 组效果强于 Ag85B 组、更强于 Ag85A 组, 差别有统计学意义(  $P < 0.05$  )。结论: 应用 Ag85A 和 Ag85B DNA 疫苗均可提高膀胱癌大鼠的免疫功能, 其效果为 Ag85A + Ag85B > Ag85B > Ag85A, 但总体上都达不到卡介苗的抗癌免疫效果。

**[ 关键词 ]** 膀胱癌; DNA 疫苗; Ag85A; Ag85B; 卡介苗

**[ 中图分类号 ]** R737.14; R730.54

**[ 文献标志码 ]** A

## Immunotherapeutic effect of Ag85A DNA vaccine and Ag85B DNA vaccine on bladder tumor in rats

LIU Jing<sup>▲</sup>, HAN Guo-liang<sup>▲</sup>, YANG Xiao-feng, TIAN Ping-gui, WANG Peng, ZHANG Xiao-jun\* ( Department of Urological Surgery, the First Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China )

**[ Abstract ] Objective:** To explore the immunotherapeutic effect of Ag85A DNA vaccine and Ag85B DNA vaccine in treatment of bladder tumor in rats. **Methods:** The bladders of female Wistar rats were irrigated with carcinogen methyl nitrosourea ( MNU ) to create the model of bladder tumor. Totally 48 model rats were evenly randomized into 6 groups: normal saline ( NS ), pcDNA3.1, bacille Calmette-Guérin( BCG ), Ag85A DNA vaccine, Ag85B DNA vaccine and Ag85A + Ag85B DNA vaccine groups. The corresponding drugs were injected into the right hind limbs of rats intramuscularly on day 7, 14, and 21 after model establishment. Animals were sacrificed on day 28, and the spleens were removed aseptically. The percentages of CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells in splenocytes were measured by flow cytometry and the value of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> was calculated. Level of serum IFN- $\gamma$  was assayed by ELISA and pathological examination was done. **Results:** The rat model of bladder tumor was successfully constructed, with a tumorigenesis rate of 100%. The bladder tumor sizes in Ag85A DNA vaccine group, Ag85B DNA vaccine group and Ag85A + Ag85B DNA vaccine group were decreased after treatment, and the tumor pathological grades were also improved, but the outcomes were not better than those of the BCG group. The percentages of CD4<sup>+</sup> T cells in the 4 groups were ( 17.27  $\pm$  2.95 )% , ( 23.15  $\pm$  1.56 )% , ( 30.80  $\pm$  1.83 )% , ( 38.05  $\pm$  1.48 )% , respectively; and the percentages of CD8<sup>+</sup> T cells were ( 9.03  $\pm$  1.06 )% , ( 10.28  $\pm$  0.39 )% , ( 11.29  $\pm$  0.74 )% , ( 13.14  $\pm$  1.24 )% , respectively; the relative values of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> were 1.90  $\pm$  0.10 , 2.25  $\pm$  0.08 , 2.73  $\pm$  0.19 , 2.97  $\pm$  0.23 , respectively; the production of IFN- $\gamma$  in Ag85A

**[ 基金项目 ]** 山西省自然科学基金资助项目( NO.20051099 ). Supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province ( NO.20051099 )

**[ 作者简介 ]** 刘 晶( 1981- )男,山西省太原市人,硕士,主要从事膀胱癌方面的研究。韩国良( 1981- )男,山西省大同市人,硕士,主要从事膀胱癌方面的研究。▲两者共同为第一作者

\* Corresponding author. E-mail: yxfylq@163.com

DNA vaccine group, Ag85B DNA vaccine group, Ag85A + Ag85B DNA vaccine group, BCG group were ( $96.94 \pm 12.38$ ), ( $131.03 \pm 26.68$ ), ( $179.20 \pm 28.88$ ), ( $240.53 \pm 32.17$ ) pg/ml, respectively. The above 4 parameters in the Ag85A DNA vaccine group, Ag85B DNA vaccine group and Ag85A + Ag85B DNA vaccine group were obviously improved compared with the pcDNA3.1 and NS groups, but were still poorer than those of the BCG group ( $P < 0.01$ ). The effects of Ag85A + Ag85B DNA vaccine group were better than those of the Ag85A and Ag85B DNA vaccine group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Ag85A DNA vaccine and Ag85B DNA vaccine can improve the immune response of rats with bladder tumor; a combination of both has better outcome than they are used alone, but even the combination can not reach the effect of BCG.

[ **Key words** ] bladder tumor, DNA vaccine, Ag85A, Ag85B, bacille Calmette-Guérin (BCG)

[ Chin J Cancer Biother, 2008, 15(2): 144-149 ]

膀胱癌是我国泌尿外科最常见的肿瘤,手术治疗后易复发,大约有 16% ~ 25% 复发肿瘤的恶性程度增加<sup>[1]</sup>。因此,临床上在手术治疗后辅以膀胱内灌注药物的方法以抑制肿瘤复发<sup>[2]</sup>。卡介苗(bacille calmette-Guérin, BCG)是美国 FDA 唯一批准的膀胱内灌注药物<sup>[3]</sup>,已成为膀胱癌辅助治疗的一种重要药物,但 BCG 膀胱内灌注毒性作用和不良反应较大,患者难以坚持完成整个灌注疗程,从而影响疗效。因此,国内外学者正在寻找一种既能降低其毒性作用又能保证其疗效的方法,而 DNA 疫苗的发现为解决该问题提供了新的研究思路。Ag85 复合体(antigen 85 complex, Ag85)是 BCG 培养滤液中主要的分泌蛋白,是由 Ag85A、Ag85B、Ag85C 等 3 种成分组成<sup>[4]</sup>。本研究首先建立 Wistar 大鼠原位膀胱癌模型<sup>[5]</sup>,再应用 Ag85A DNA 疫苗、Ag85B DNA 疫苗以及 Ag85A + Ag85B DNA 疫苗肌内注射荷瘤大鼠,观察其对膀胱癌的治疗效果和对大鼠细胞免疫功能的影响,从而确认单独或联合应用 Ag85A 和 Ag85B DNA 疫苗是否能够激发有效的抗膀胱癌免疫反应,为合理的临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料与动物

Wistar 大鼠(58 只,6 ~ 8 周,雌性,体重 160 ~ 180 g)由山西医科大学动物实验中心提供,合格证号为 07051,饲养环境为 SPF 级。

含质粒 pcDNA3.1、pcDNA3.1-Ag85A 及 pcDNA3.1-Ag85B 的细菌(*E. coli* JM109)由华中科技大学同济医学院范雄林教授惠赠,质粒大量提取试剂盒(E. Z. N. A Plasmid Maxi Kit)为 OMEGA 公司产品,限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III 和 *Eco*R I 为 MBI 公司产品,DNA Marker 为 Takara 公司产品,冻干 BCG 为卫生部上海生物制品研究所(批号:20070303)产品,N-甲基亚硝基脲(methyl nitro-

sourea, MNU)为 ALFA 公司产品,大鼠 IFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒为上海轩昊科技发展有限公司产品,大鼠 CD4-PE 荧光标记抗体、CD8-FITC 荧光标记抗体为 Biologend 公司产品。

恒温振荡培养箱(THZ-82)为国瑞实验仪器厂产品,核酸蛋白分析仪(DU640)为 Beckman 公司产品,高速低温离心机(5804R)为 Eppendorf 公司产品,自动酶标检测仪为美国 Bio-Rad 公司产品,流式细胞仪(FACS Calibur)为美国 BD 公司产品。

### 1.2 pcDNA-Ag85A, pcDNA-Ag85B 及 pcDNA3.1 的提取与鉴定

按照质粒大量提取试剂盒说明分别从含有相应质粒的细菌(*E. coli* JM109)中提取质粒 pcDNA3.1-Ag85A、pcDNA3.1-Ag85B 及空白质粒 pcDNA3.1,琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

### 1.3 膀胱癌动物模型的制备及判定标准

(1)MNU 溶液的配制:实验前 1 d 将 MNU 置于 4 °C 冰箱中过夜,以 pH 6.0 的枸橼酸缓冲液为溶剂,配成质量浓度为 20 g/L。(2)MNU 膀胱灌注法:1% 的戊巴比妥腹腔注射麻醉(30 mg/kg),仰卧固定,安尔碘消毒尿道外口,无菌的硬膜外导管膀胱灌注 MNU 溶液 0.1 ml/次,每 2 周 1 次,共灌 5 次。共造模 58 只大鼠。

在 MNU 末次灌注后第 14 天,随机剖杀大鼠 10 只,取膀胱,观察肿瘤生长情况并做病理组织学检查,以确定肿瘤模型建立成功。根据临床分级的方法将大鼠膀胱癌分为 3 级:Ⅰ级,肿瘤呈乳头状,具有明显的移行上皮的特征,细胞层次增多,但极性紊乱不明显;Ⅱ级,肿瘤呈乳头状或菜花状,细胞仍具有移行上皮的特征,但异型性较明显。细胞层次明显增多,极性消失;Ⅲ级,肿瘤呈宽底无蒂菜花状或扁平斑块状,细胞分化差,异型性明显,极性紊乱,大小不一。

将剩余 48 只肿瘤大鼠随机分为 6 组,每组 8

只。6组分别为:①生理盐水组(NS),建模后第7、14、21天,于每只大鼠右后肢肌肉内注射生理盐水0.1 ml;②空白质粒组(pcDNA3.1),同上要求注射质粒pcDNA3.1 0.1 ml(100  $\mu$ g);③BCG组,同上要求注射BCG 0.1 ml(100  $\mu$ g);④Ag85A组(Ag85A DNA),同上要求注射pcDNA3.1-Ag85A 0.1 ml(100  $\mu$ g);⑤Ag85B组(Ag85B DNA),同上要求注射pcDNA3.1-Ag85B 0.1 ml(100  $\mu$ g);⑥Ag85A + Ag85B DNA疫苗组(Ag85A + Ag85B DNA),同上要求注射pcDNA3.1-Ag85A + Ag85B 0.2 ml(200  $\mu$ g)。

#### 1.4 Wistar大鼠膀胱癌组织病理检查

建模后第28天处死大鼠,分离膀胱癌,将瘤体组织按下列步骤石蜡包埋:组织块修成0.5 cm  $\times$  0.5 cm大小,中性甲醛固定24 h;80%乙醇3 h;85%乙醇3 h(中间换一次);90%乙醇3 h;95%乙醇,过夜;100%乙醇1 h,重复3次;二甲苯15 min,重复2次;浸蜡1 h,重复2次;包埋。常规切片、H-E染色后光镜下观察。

#### 1.5 膀胱癌模型大鼠脾脏T细胞亚群检测

无菌取脾,用PBS冲洗2次,剪碎成1 mm<sup>3</sup>左右小块,反复吹打数次,用300目尼龙网过滤,滤液缓慢加入含2 ml淋巴细胞分离液的试管中,并形成一界面。常温下2 000 r/min离心20 min,用吸管缓慢取出中间乳白色液体并转移至一个新的离心管中,用2 ml PBS洗涤,1 000 r/min离心5 min,弃上清,重复上步骤一次。调整细胞数为1  $\times$  10<sup>6</sup>/ml,取100  $\mu$ l细胞悬液,加抗体(大鼠CD4-PE荧光标记抗体、CD8-FITC荧光标记抗体)室温避光孵育20 min,加2 ml PBS洗涤一次,避光待上机。采用Cellquest软件获取荧光信号,以对数方式在FL1、FL2两通道上分别获取绿荧光(FITC)及橙荧光(PE)两色荧光信号,并在同一软件下分析大鼠脾T细胞亚群。

#### 1.6 膀胱癌模型大鼠血清IFN- $\gamma$ 含量检测

分离大鼠血清,按ELISA试剂盒说明书进行操作:加入10  $\mu$ l标准品、10  $\mu$ l血清于相应反应孔中;每孔加入40  $\mu$ l Anti rat IFN- $\gamma$  Biotin和40  $\mu$ l Anti rat IFN- $\gamma$  POD,轻轻混匀30 s,封住板孔,室温孵育45 min。洗板:甩尽板内液体,用洗涤液洗涤反应板(每孔加入350  $\mu$ l洗涤液),并去除水滴,反复洗涤5次;每孔加入100  $\mu$ l显色液,轻轻混匀10 s,室温孵育20 min;每孔加入100  $\mu$ l终止液,轻轻混匀30 s,30 min内在450 nm处读D值。以D值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,使用Curve Expert 1.3软件绘制标准曲线。根据血清样品的D值在标准

曲线上查出其血清IFN- $\gamma$ 浓度。

#### 1.7 统计学处理

采用SPSS11.5统计软件包进行处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,做单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 质粒pcDNA3.1-Ag85A及pcDNA3.1-Ag85B的酶切鉴定

将pcDNA3.1-Ag85A质粒用BamHI和EcoRI双酶切反应后电泳,在900 bp处和5 000 bp处出现2条带,与预期结果一致;将pcDNA3.1-Ag85B质粒用HindIII和EcoRI双酶切反应后电泳,在990 bp处和5 000 bp处出现2条带,与预期结果一致(图1)。

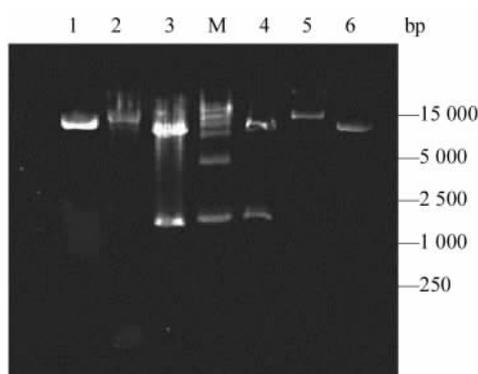


图1 重组质粒pcDNA3.1-Ag85A和pcDNA3.1-Ag85B的酶切鉴定

**Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1-Ag85A and pcDNA3.1-Ag85B by BamHI/EcoRI digestion**  
1: pcDNA3.1; 2: pcDNA3.1-Ag85A without digestion; 3: The product of pcDNA3.1-Ag85A after BamHI/EcoRI digestion; M: DNA marker DL2000; 4: The product of pcDNA3.1-Ag85B after HindIII/EcoRI digestion; 5: pcDNA3.1-Ag85B without digestion; 6: pcDNA3.1

取抽提好的质粒DNA 5  $\mu$ l,加灭菌水95  $\mu$ l稀释后,用核酸蛋白分析仪测定,pcDNA3.1、pcDNA3.1-Ag85A、pcDNA3.1-Ag85B的 $D_{260}/D_{280}$ 分别为1.768、1.745、1.811,质量浓度分别为1.334、2.145、1.092 mg/ml。使用灭菌水调节质粒DNA质量浓度为实验所需的1 mg/ml。

### 2.2 大鼠膀胱癌模型的成功建立

在MNU开始灌注后的建模前期,大鼠动物活动基本正常。在建模后期,绝大部分大鼠出现精神萎靡、食欲减退等现象。其中有11只大鼠出现不同程度血尿,占总数的18%。MNU末次灌注后第14

天,随机剖杀大鼠 10 只,可见 10 只大鼠膀胱内均有结节状或菜花状肿瘤发生。10 只大鼠中有 1 只膀胱癌较大(直径在 0.5 ~ 1.0 cm),6 只中等(直径在 0.2 ~ 0.5 cm),3 只较小(直径在 0.2 cm 以下),致瘤率为 100%。此外 2 只大鼠膀胱腔内肿物旁见一直径约 0.3 cm 的黄色结石。光镜下观察,10 只大鼠膀胱癌分级为 I 级 4 只,II 级 5 只,III 级 1 只(图 2 A、B、C)。

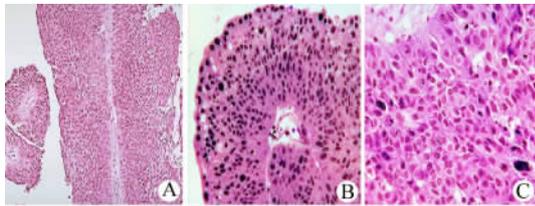


图 2 光镜下观察大鼠膀胱癌组织病理变化(×100)

Fig. 2 Pathological changes of bladder tumor tissue in rats under light microscope (×100)

A: Bladder cancer grade I; B: Bladder cancer grade II; C: Bladder cancer grade III

2.3 疫苗治疗大鼠膀胱癌的疗效

建模后第 28 天,即 3 次疫苗注射治疗 7 d 后处死大鼠,分离膀胱癌,肉眼观察经治疗后肿瘤形态及肿瘤病理分级。结果显示,经 DNA 疫苗治疗后,Ag85A DNA 疫苗组、Ag85B DNA 疫苗组和 Ag85A + Ag85B DNA 疫苗组较生理盐水组及空白质粒组肿瘤体积有所减小,镜下观察可见肿瘤分级有所减轻,但效果均不及 BCG(表 1)。

表 1 疫苗治疗大鼠膀胱癌的疗效

Tab. 1 Therapeutic effect of DNA vaccine on bladder tumor in rats

Group	Tumor size( d/cm )			Tumor grade		
	<0.2	0.2 ~ 0.5	>0.5	I	II	III
NS	2	5	1	2	4	2
pcDNA3.1	3	4	1	3	4	1
BCG	5	3	0	6	2	0
Ag85A DNA	4	3	1	4	3	1
Ag85B DNA	4	4	0	4	4	0
Ag85A + Ag85B DNA	5	3	0	4	4	0

2.4 疫苗治疗致膀胱癌大鼠脾脏 T 细胞亚群改变

应用流式细胞仪分析大鼠脾脏细胞悬液中的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群数量,每份样品分析 10 000 个细胞,记录 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的百分比,计算 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值(表 2)。与生理盐水组、空白质粒组相比,Ag85A DNA 疫苗组、Ag85B DNA 疫苗组和 Ag85A + Ag85B DNA 疫苗组能够提高大鼠脾脏中 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群的百分比以及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值,差别有统计学意义(P < 0.01),但均低于 BCG 组,差别有统计学意义(P < 0.01),且 Ag85B DNA 疫苗组效果比 Ag85A DNA 疫苗组强,但弱于 Ag85A + Ag85B DNA 疫苗组,差别有统计学意义(P < 0.05)。生理盐水组和空白质粒组相比,差别无统计学意义。

表 2 疫苗治疗后膀胱癌大鼠脾脏中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的变化( n = 8,  $\bar{x} \pm s$  )

Tab. 2 Changes of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in splenocytes of bladder tumor rats after DNA vaccine treatment

Group	CD4 <sup>+</sup> ( % )	CD8 <sup>+</sup> ( % )	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
NS	11.00 ± 1.38	6.47 ± 0.51	1.70 ± 0.97
pcDNA3.1	11.15 ± 1.45	6.66 ± 0.48	1.67 ± 0.10
BCG	38.05 ± 1.48	13.14 ± 1.24	2.97 ± 0.23
Ag85A DNA	17.27 ± 2.95 <sup>**△</sup>	9.03 ± 1.06 <sup>**△</sup>	1.90 ± 0.10 <sup>**△</sup>
Ag85B DNA	23.15 ± 1.56 <sup>**△▲</sup>	10.28 ± 0.39 <sup>**△▲</sup>	2.25 ± 0.08 <sup>**△▲</sup>
Ag85A + Ag85B DNA	30.80 ± 1.83 <sup>**</sup>	11.29 ± 0.74 <sup>**</sup>	2.73 ± 0.19 <sup>**</sup>

\*\* P < 0.01 vs BCG; △ P < 0.05 vs Ag85A + Ag85B DNA; ▲ P < 0.05 vs Ag85A DNA

2.5 疫苗治疗后膀胱癌大鼠血清中 IFN-γ 含量的变化

采用 ELISA 方法检测建模后第 28 天经疫苗治

疗的大鼠外周血清 IFN-γ 含量。生理盐水组平均 IFN-γ 含量为( 53.00 ± 7.81 )pg/ml;空白质粒组平均为( 59.58 ± 10.09 )pg/ml;BCG 组为( 240.53 ±

32.17) pg/ml; Ag85A DNA 疫苗组为(96.94 ± 12.38) pg/ml; Ag85B DNA 疫苗组为(131.03 ± 26.68) pg/ml; Ag85A + Ag85B DNA 疫苗组为(179.20 ± 28.88) pg/ml。结果显示,与其他5组相比,BCG 组 IFN- $\gamma$  含量最高,差别有统计学意义( $P < 0.01$ )。与生理盐水组、空白质粒组相比,Ag85A DNA 疫苗、Ag85B DNA 疫苗和 Ag85A + Ag85B DNA 疫苗组均能够促进大鼠外周血清中 IFN- $\gamma$  的分泌,差别有统计学意义( $P < 0.01$ )。Ag85B DNA 疫苗组血清 IFN- $\gamma$  含量高于 Ag85A DNA 疫苗组,但低于 Ag85A + Ag85B DNA 疫苗组,差别有统计学意义( $P < 0.01$ )。生理盐水组和空白质粒组相比,差别无统计学意义。

### 3 讨论

DNA 疫苗是继减毒、灭活疫苗和亚单位疫苗之后的第3代疫苗<sup>[6]</sup>。以质粒为表达载体的 DNA 疫苗亦称基因疫苗,用注射器或基因枪直接注入肌肉、皮下或静脉,抗原编码基因并不与宿主染色体整合,而是通过宿主染色体细胞的转录系统表达蛋白抗原,诱导宿主产生细胞免疫应答和体液免疫应答,从而达到预防和治疗疾病的目的。DNA 疫苗因其免疫原性低、安全、可重复使用、制备和存储方便、免疫途径多样化等优势<sup>[7-9]</sup>而成为肿瘤特异性免疫治疗中一种极具吸引力的新型疫苗。张建华等<sup>[10]</sup>将一种 DNA 疫苗注射到人膀胱癌荷瘤裸鼠体内,结果显示该疫苗对荷瘤裸鼠有抑制作用。Yu 等<sup>[11]</sup>将 BCG 基因片段插入真核表达载体,并采用膀胱灌注的方法治疗膀胱癌小鼠,经检测荷瘤小鼠体内产生高水平的 IFN- $\gamma$ ,并能够抑制肿瘤生长,延长荷瘤小鼠的存活时间。国外一些研究甚至已进入临床实验阶段<sup>[12]</sup>,显示出其具有广阔的发展前景。因而从理论上讲,选取 BCG 治疗膀胱癌的有效基因片段,利用基因工程技术构建 DNA 疫苗,既能减低 BCG 毒性作用和不良反应,又能保证其疗效。

BCG 含有 4 000 多个基因,在这些基因表达的蛋白中,有一些能够引起机体较强的细胞和体液免疫反应。其中 Ag85 复合体是 BCG 培养滤液中主要的分泌蛋白,是由 Ag85A、Ag85B、Ag85C 组成的相对分子质量为 30 000 ~ 32 000 蛋白家族。Ag85 复合体不仅可以刺激产生体液免疫,尚可激发较强 Th1 型细胞免疫,引起 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖和 IL-2 及 IFN- $\gamma$  等细胞因子水平的上升。大量实验证明,Ag85A 及 Ag85B DNA 疫苗可以诱导机体强烈的 Th1 免疫反应和 CTL 的激活,产生大量 IL-2 和

IFN- $\gamma$  等细胞因子<sup>[4,13-16]</sup>,然而研究发现编码 Ag85C 的质粒免疫动物无效。近年来,利用 Ag85A 及 Ag85B 的免疫原性治疗膀胱癌越来越受到关注。有学者<sup>[17]</sup>在动物实验中发现,Ag85B 蛋白对荷瘤小鼠的抑瘤率和存活延长率与 BCG 治疗结果相近。目前认为,肿瘤的发生、发展与 T 细胞介导的细胞免疫功能失调有关。检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群的数量及两者之比在一定程度上可反映机体的细胞免疫水平。而 IFN- $\gamma$  主要由活化的 T 细胞(包括 Th0、Th1 细胞和几乎所有 CD8<sup>+</sup> T 细胞)和 NK 细胞产生。为此本实验同时对大鼠 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值,以及血清中 IFN- $\gamma$  含量进行了检测。

本实验中,病理学检查观察大鼠膀胱癌治疗效果来看,应用 Ag85A DNA 疫苗、Ag85B DNA 疫苗和 Ag85A + Ag85B DNA 疫苗都能有效地抑制肿瘤的生长、降低肿瘤恶性程度,但效果均不及 BCG。大鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的分化和血清内 IFN- $\gamma$  水平的检测结果显示,Ag85A DNA 疫苗、Ag85B DNA 疫苗和 Ag85A + Ag85B DNA 疫苗明显提高了肿瘤大鼠脾脏中 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群的数量及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比值,并明显促进了血清 IFN- $\gamma$  的分泌,但效果均不及 BCG。三者相比,Ag85B DNA 疫苗强于 Ag85A DNA 疫苗水平,但弱于 Ag85A + Ag85B DNA 疫苗。

总之,结核分枝杆菌 Ag85A 和 Ag85B DNA 疫苗均可以通过诱导 Th1 免疫反应,引起 CD4<sup>+</sup> T 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖,增加 IFN- $\gamma$  等细胞因子的分泌,提高肿瘤大鼠的细胞免疫功能,从而达到了抑制肿瘤的作用。联合和单独应用疫苗相比,联合效果优于单独;但作用均不及 BCG。迄今为止,所有关于结核分枝杆菌 DNA 疫苗的动物实验报道还没有获得比 BCG 更高的免疫效力,只是 DNA 联合疫苗或添加佐剂的 DNA 疫苗的免疫效力接近于 BCG。关于这一点,本研究认为这是由于 BCG 发挥多种有效成分联合作用的结果<sup>[18-22]</sup>。下一步,本课题组准备采取多价疫苗、细胞因子插入共刺激序列或联合应用其他免疫佐剂等方法进行研究,以提高 DNA 疫苗的抗肿瘤效果。

### [参考文献]

- [1] 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2004, 965.
- [2] Patrick C, Alan B, Louis R, et al. Campbell's Urology[M]. 8th. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2002, 2785-2804.
- [3] Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, et al. Maintenance ba-

- cillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma *in situ* transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study[ J ]. *J Urol*, 2000, 163: 1124-1129.
- [ 4 ] 范雄林,徐志凯,白光春,等. 结核分枝杆菌 Ag85B 基因的克隆及真核表达载体的构建[ J ]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2000, 16( 4 ): 314-316.
- [ 5 ] 刘红耀,庞东梓,李梦强,等. MNU 诱导的近交系大鼠膀胱肿瘤模型[ J ]. *肿瘤研究与临床*, 2005, 17( 2 ): 89-90.
- [ 6 ] Calarota SA, Kjerrström A, Islam KB, *et al.* Gene combination raises broad human immunodeficiency virus-specific cytotoxicity[ J ]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12( 13 ): 1623-1637.
- [ 7 ] Xing YP, Huang ZH, Wang SX, *et al.* Novel DNA vaccine based on hepatitis B virus core gene induces specific immune responses in Balb/c mice[ J ]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11( 29 ): 4583-4586.
- [ 8 ] Takeda A, Nakamura H, Matano T. Evaluation of simian immunodeficiency virus-specific immune responses induced by a defective proviral DNA vaccine in macaques[ J ]. *Jpn J Infect Dis*, 2003, 56( 4 ): 172-173.
- [ 9 ] Cui FD, Asada H, Jin ML, *et al.* Cytokine genetic adjuvant facilitates prophylactic intravascular DNA vaccine against acute and latent herpes simplex virus infection in mice[ J ]. *Gene Ther*, 2005, 12( 2 ): 160-168.
- [ 10 ] 张建华,杨为民,周四维. PTEN 真核表达质粒对人膀胱癌裸鼠移植瘤的抑制效应[ J ]. *临床泌尿外科杂志*, 2006, 21( 7 ): 542-544.
- [ 11 ] Yu DS, Lee CF, Chang SY. Immunotherapy for orthotopic murine bladder cancer using bacillus Calmette-Guerin recombinant protein Mpt-64[ J ]. *J Urol*, 2007, 177( 2 ): 738-742.
- [ 12 ] Liu MA, Ulmer JB. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines [ J ]. *Adv Genet*, 2005, 55: 25-40.
- [ 13 ] Dubnau E, Fontán P, Manganelli R, *et al.* Mycobacterium tuberculosis genes induced during infection of human macrophages[ J ]. *Infect Immun*, 2002, 70( 6 ): 2787-2795.
- [ 14 ] Lozes E, Huygen K, Content J, *et al.* Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex[ J ]. *Vaccine*, 1997, 15( 8 ): 830-833.
- [ 15 ] Tollefsen S, Tjelle T, Schneider J, *et al.* Improved cellular and humoral immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation[ J ]. *Vaccine*, 2002, 20( 27-28 ): 3370-3378.
- [ 16 ] D'Souza S, Rosseels V, Denis O, *et al.* Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids[ J ]. *Infect Immun*, 2002, 70( 7 ): 3681-3688.
- [ 17 ] 杨登科,靳风烁,江 军,等. 分枝杆菌 Ag85B 蛋白对小鼠膀胱癌抑癌效应的研究[ J ]. *临床泌尿外科杂志*, 2005, 20( 5 ): 298-300.
- [ 18 ] Morales A, Chin JL, Ramsey EW. *Mycobacterial* cell wall extract for treatment of carcinoma *in situ* of the bladder[ J ]. *J Urol*, 2001, 166( 5 ): 1633-1637.
- [ 19 ] 张晓文,王立新,姚茂银,等. 卡介苗有效成分罗莫肽刺激人 PBMCs 表达 IL-12、IL-4 和 GM-CSF 的研究[ J ]. *东南大学学报:医学版*, 2004, 23( 3 ): 169-172.
- [ 20 ] 孙世平,张玉峰,岳晓龙,等. 家兔膀胱黏膜下注射卡介苗多糖核酸的免疫效应[ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14( 5 ): 481-486.
- [ 21 ] Cai H, Tian X, Hu XD, *et al.* Combined DNA vaccines formulated either in DDA or in saline protect cattle from *Mycobacterium bovis* infection[ J ]. *Vaccine*, 2005, 23( 30 ): 3887-3895.
- [ 22 ] Heckelsmiller K, Rall K, Beck S, *et al.* Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model[ J ]. *J Immunol*, 2002, 169( 7 ): 3892-3899.
- [ 收稿日期 ] 2007-11-08 [ 修回日期 ] 2008-02-23  
[ 本文编辑 ] 郁晓路

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori*。(2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3) 限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam*H I、*Sal* I 等。(4) 各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数  $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5) 各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外),例如长度 *L*、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M<sub>r</sub>*、物质的量浓度 *c<sub>B</sub>* 等。(6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基位等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。(7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *et al.*、*vs.*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)