

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.04.008

口服型 VEGFR-2 DNA 疫苗的研制及其对小鼠的免疫效应

王熙才*, 伍治平, 陈艳, 金从国, 刘馨, 周永春, 左曙光(昆明医学院第三附属医院, 云南省肿瘤医院肿瘤研究所, 昆明 650118)

[摘要] 目的: 血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial factor receptor-2, VEGFR-2)在肿瘤生长和转移过程中起着重要作用, 制备口服型 VEGFR-2 DNA 疫苗并研究其生物免疫效应。方法: 采用基因重组技术构建 VEGFR-2 胞外区基因表达载体 pcDNA3.1-VR-2, DNA 序列分析证实后, 脂质体法转染 COS-7 细胞, Western blotting 检测其 VEGFR 蛋白表达; 以氯化钙法将 pcDNA3.1-VR-2 转化减毒沙门菌 SL3261, 制备口服型 VEGFR-2 DNA 疫苗。口服型疫苗免疫 C57BL/6 小鼠, ELISA 法检测免疫后小鼠外周血 VEGFR-2 抗体水平, MTT 法检测小鼠脾淋巴细胞对小鼠血管内皮细胞的体外杀伤活性。结果: 成功制备口服型 VEGFR-2 DNA 疫苗。ELISA 法检测显示, 疫苗组小鼠抗体滴度随着免疫时间和免疫次数的增加而增高, 在免疫 6 周后产生了高水平抗 VEGFR-2 IgG 类抗体 (1.07 ± 0.018), 明显高于生理盐水组 (0.14 ± 0.033) 和质粒对照组 (0.14 ± 0.038), 差异均有统计学意义 ($F = 853.17, P = 0.000$)。MTT 法检测显示, 疫苗组小鼠脾淋巴细胞对靶细胞 MS1 的杀伤率随着效靶比的增加而增加, 在效靶比 8:1 时 CTL 活性 (89.38 ± 1.51) 明显高于生理盐水组 (15.17 ± 2.54) 和空质粒对照组 (12.99 ± 4.31), 差异有统计学意义 ($F = 315.42, P = 0.000$)。结论: 成功制备了口服型 VEGFR-2 DNA 疫苗, 该疫苗可激活小鼠特异性的细胞免疫和体液免疫, 为进一步抗肿瘤研究奠定了基础。

[关键词] 血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2); 减毒沙门菌; 口服型 DNA 疫苗; 细胞免疫; 体液免疫

[中图分类号] R730.51 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2008)04-0336-06

Preparation of an oral DNA vaccine based on VEGFR-2 and investigation of its immune effects in mice

WANG Xi-cai*, WU Zhi-ping, CHEN Yan, JIN Cong-guo, LIU Xin, Zhou Yong-chun, ZUO Shu-guang (Tumor Institute of Yunnan Province, Tumor Hospital of Yunnan Province, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650118, China)

[Abstract] **Objective:** Vascular endothelial growth factor receptor-2 plays an important role in tumor growth and metastasis. This study is to prepare an oral VEGFR-2 DNA vaccine and to evaluate its immune effects in mice. **Methods:** The recombinant plasmid pcDNA3.1-VR-2 targeting the extracellular domains of VEGFR-2 was constructed by gene engineering technique. After confirmed by sequencing the pcDNA3.1-VR-2 vector was transfected into COS-7 cells via lipid; the protein expression of VEGFR was identified by Western blotting. Then pcDNA3.1-VR-2 was transformed into attenuated *Salmonella typhimurium* SL3261 to develop an oral DNA vaccine against the extracellular domains of VEGFR-2. C57BL/6 mice were immunized with the prepared oral vaccine; the serum level of VEGFR-2-Ag specific antibody was detected by ELISA. The cytotoxic T lymphocyte (CTL) was detected by modified MTT assay. **Results:** We successfully prepared VEGFR-2 DNA vaccine. ELISA results showed that the VEGFR-2-specific IgG level in oral vaccine group (1.07 ± 0.018) was significantly higher than those of the empty vector group (0.14 ± 0.038) and saline group (0.14 ± 0.033) ($F = 853.17, P = 0.000$). The titer of serum antibody increased with the immunization period and the immunization times. As shown by MTT assay, the prepared oral vaccine had specific and efficient cytotoxicity against murine endothelium cells (MS1) in a dose-dependent manner *in vitro*. The CTL activity in the oral vaccine group (89.38 ± 1.51) was significantly higher than those of the empty vector group (12.99 ± 4.31) and saline group (15.17 ± 2.54) ($F = 315.42, P = 0.000$). **Conclusion:** We have successfully prepared an oral VEGFR-2 DNA vaccine which can stimulate specific cellular and humoral immune responses in mice, paving a way for further anticancer research.

[Key words] vascular endothelial factor receptor-2 (VEGFR-2); attenuated *Salmonella*; DNA vaccine, oral type;

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医学院联合专项基金资助项目(No. 2007C0024R). Supported by the Joint Foundation of Science & Technology Bureau of Yunnan Province and Kunming Medical College (No. 2007C0024R)

[作者简介] 王熙才(1962-),男,云南省昭通市人,医学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事肿瘤生物免疫治疗的基础研究和临床应用

* Corresponding author. E-mail: wangxc2005323@126.com

cellular immune; humoral immune

大量研究^[1-3]证实,血管生成是肿瘤生长和转移的基础。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知的最重要促血管生成因子。多数肿瘤组织和肿瘤细胞株均过量表达 VEGF,促进肿瘤的生长和转移。血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)是 VEGF 发挥生物学活性的主要功能受体,在成熟血管内皮细胞中表达水平较低,而在肿瘤血管内皮细胞中表达水平则显著升高,是一个理想的治疗靶点^[46]。目前用于阻断 VEGFR/VEGFR-2 信号转导通路的方法通常使用单克隆抗体,小分子酪氨酸激酶抑制剂^[7-8]等。由于核酸疫苗成本低,能同时诱导体液免疫和细胞免疫,被广泛运用于感染性疾病和肿瘤免疫治疗^[9-11]。以减毒沙门菌为载体的 DNA 疫苗兼有裸 DNA 疫苗和 DC 疫苗的优点,免疫方法(口服)简单,效果好^[12]。本实验以 VEGFR-2 为靶点,减毒沙门菌 SL3261 为载体,构建了口服型 VEGFR-2 DNA 疫苗,免疫 C57BL/6 小鼠后检测其抗体滴度和特异性细胞毒性 T 淋巴细胞体外杀伤活性,评价疫苗的生物免疫活性。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株、质粒和实验动物

大肠杆菌 DH5 α 菌株由中国医学科学院医学生物研究所提供。减毒沙门菌 SL3261(芳香族氨基酸营养缺陷菌株)由英国帝国理工医学院 Dunstan 博士和山东大学医学院分子生物学实验室卞继峰教授惠赠。COS-7 细胞(GIBCO 公司)是来源于非洲绿猴肾成纤维细胞并经 SV40 病毒基因转化的细胞系,能表达 SV40 T 抗原,任何复制起始位置带有 SV40 的转染质粒都能够在其中以很高的拷贝数进行复制和表达。小鼠血管内皮细胞株 MS1 由香港大学化学系分子生物学研究所林李家宓教授惠赠。真核表达质粒 pcDNA3.1 购自 Invitrogen 公司。C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SPF 级,合格证号为:SCXK(京)2002-0003]。

1.2 主要试剂

Certified Low-Melt Agarose、Prestained SDS-PAGE standards broad range、DC Protein Assay 购自 Bio-RAD 公司, Tryptone、Yeast Extract 购自 OXOID 公司,限制性内切酶 *Kpn* I、*Xba* I 购自 Promega 公司; Trizol 试剂、脂质体购自 Invitrogen 公司, One Step

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(4): 336-341]

RT-PCR、Qiagen 质粒提取、QIA 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司, DNA 连接试剂盒购自宝生物公司, Anti-mouse VEGFR2 (Flk-1)、Antibody Recombinant Mouse VEGF R2 (Flk-1)/Fc Chimera 购自 R&D 公司; Rabbit Anti-goat IgG 购自 Chemicon 公司, Protein DetectorTM ELISA 试剂盒购自 KPL 公司, 硝酸纤维素膜、ECL 显色试剂盒购自 Biosciences 公司。

1.3 重组质粒 pcDNA3.1-VR-2 的构建

提取总 RNA, 核酸蛋白定量仪(Bio-RAD)测定 RNA 纯度, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性。以 Gene Bank VEGFR-2(GI 57923)胞外区 cDNA 序列第 286 ~ 2 572 碱基为目的基因, 使用 Primer Premier 5.0 引物设计软件, 设计出上游外引物 S1: 5'-GATAACCTGGCTGACCCGATTC-3', 上游内引物 P1: 5'-CCGGTACCATGGAGAGCAAGGCCG-3', 下游外引物 S2: 5'-GCTCTAGATTATCCAAGTTG-GTCTTTTCC-3', 下游内引物 P2: 5'-GCTCTAGAT-TATCCAAGTTGGTCTTTTCTG-3'; P1 的 5' 端所带限制性酶切位点为 *Kpn* I, P2 的 5' 端所带限制性酶切位点为 *Xba* I。RT-PCR 扩增条件: 50 °C 逆转录 30 min, 95 °C 灭活逆转录酶和预变性 15 min, 94 °C 变性 40 s, 54 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 38 个循环后 72 °C 延伸 10 min。回收纯化目的片段, *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切目的片段与 pcDNA3.1, 回收纯化后进行 DNA 连接反应。连接产物转化感受态 DH5 α , 挑取阳性单菌落接种于 5 ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养液中, 37 °C、250 r/min 振荡培养至对数生长期; 提取重组质粒, *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切鉴定后, 送上海 Invitrogen 公司测序证实。

1.4 重组质粒转染细胞及其表达产物的鉴定

将处于对数期的 COS-7 细胞接种于细胞培养瓶和 6 孔培养板, 加入重组质粒 pcDNA3.1-VR-2 与脂质体混合物。置 CO₂ 培养箱中培养 6 h 后, 吸出培养液, 加入新鲜的 DMEM 培养液继续培养 48 h。用 0.25% 胰酶消化 COS-7 细胞, 收集转染细胞, 进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 其中一抗为羊抗鼠 VEGFR-2 单克隆抗体, 二抗为 HRP 标记的兔抗羊 IgG。使用 ECL 显色试剂盒, 加入化学发光试剂后, 显影, 定影并照相。

1.5 重组质粒转化减毒沙门菌制备口服疫苗

氯化钙法将重组质粒 pcDNA3.1-VR-2 转化减毒沙门菌 SL3261, 制备成以减毒沙门菌 SL3261 为

载体的口服 VEGFR-2 DNA 疫苗。分别挑取携带 pcDNA3.1 和重组质粒 pcDNA3.1-VR-2 的 SL3261 单菌落接种于 100 ml 含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 LB 液体培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min, 震荡至对数生长中期, 测菌液 D_{600} 值, 计算细菌的数量。2 400 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, PBS 清洗 2 次, 菌体沉淀用 100 g/L 生理盐水悬浮, 调至 1×10^9 CFU/ml, 携带重组质粒 pcDNA3.1-VR-2 的 SL3261 菌液作为口服疫苗备用。

1.6 免疫小鼠血清抗体滴度的测定

将 36 只体重 15 g 左右、6 周龄 C57BL/6 雌性小鼠分为 2 大组, 每组 18 只, 其中一组用作血清抗 VEGFR-2 IgG 类抗体测定, 另外一组用作小鼠脾淋巴细胞 CTL 活性测定。两大组分别采用随机数字法再分为疫苗组、空质粒组和生理盐水组, 每组 6 只。分别用 100 μl 上述制备的口服疫苗、携带 pcDNA3.1 质粒的 SL3261 液、生理盐水溶液灌胃小鼠。每 2 周 1 次, 共灌胃 3 次。首次免疫后 2、4、6 周从各组小鼠眼眶采血, 每只小鼠采集 300 μl 加入 1 ml 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 3 000 $\times g$ 离心 10 min, 取大约 100 μl 上清, 加入另外一只干净的离心管中备用。

将 mVEGFR-2 蛋白用 0.01 mol/L PBS (pH 7.0) 稀释成 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的溶液, 每管 10 μl 分装后, 保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。取 3 管分装好的 mVEGFR-2 蛋白溶液, 加入 990 μl 包被液, 稀释成浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液, 共 3 ml。取一个 96 孔板, 选取 21 个孔, 每孔加入 100 μl (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 mVEGFR-2 蛋白溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 即为 mVEGFR-2 蛋白包被好的酶标板。按照 Protein DetectorTM ELISA 试剂盒说明操作, 以 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体作为第二抗体, 酶标仪测得光密度值 (D_{490}), 计算小鼠血清 mVEGFR-2 IgG 类抗体滴度。

1.7 免疫小鼠脾淋巴细胞 CTL 活性的测定

各组小鼠第 3 次免疫后 2 周在无菌条件下取脾, 加入 1 ml RPMI 1640 培养液, 将脾组织通过 200 目滤网制成脾细胞液, 用小鼠淋巴细胞分离液分离脾淋巴细胞作为效应细胞。常规复苏靶细胞小鼠血管内皮细胞 (MS1), 加入 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 细胞培养液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱内培养并传代。收集对数期靶细胞, 调整细胞悬液密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 取 3 个 96 孔板, 每孔加入 100 μl 细胞悬液, 即 $1 \times 10^4/\text{孔}$, 培养 24 h, 将每只小鼠脾淋巴细胞悬液调整密度为 $8 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 每孔加入 100 μl , 即效: 靶比为 80:1、40:1、20:1、10:1 的比例混合, 每个浓度设

3 个复孔, 同时设置 3 个调零孔(培养液、MTT、DMSO)和 3 个靶细胞对照孔(靶细胞, 培养液、MTT、DMSO), 培养 48 h。小心吸去上清, PBS 轻轻洗涤 2 次, 每孔加入 180 μl 新鲜 RPMI 1640 培养液, 再加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h, 终止培养, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砜(DMSO)置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的光密度值。用公式计算杀伤率: 杀伤率(%) = (靶细胞对照孔 D_{570} 值 - 效靶细胞孔 D_{570} 值) / 靶细胞 D_{570} 值 $\times 100\%$

1.8 统计学处理

数据应用 SPSS13.0 统计软件, 采用方差分析和 t 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒 pcDNA3.1-VR-2 的成功构建

RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 紫外灯下可见约 2 300 bp 处有一条特异性条带, 与目的片段大小一致(图 1)。

随机挑取转化成功的单菌落, 抽提质粒, 进行 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切鉴定, 电泳后可见约 2 300 bp 的插入片段(图 2)。

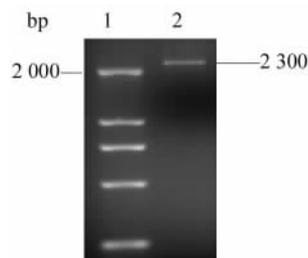


图 1 RT-PCR 扩增目的片段电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

1: DNA marker(DL 2 000); 2: RT - PCR product

测序结果经 GeneBank BLAST 分析, 与已报道的 VEGFR-2 胞外 cDNA 序列相符, 插入片段阅读框正确。

2.2 重组质粒转染 COS-7 细胞后 VEGFR 的表达

重组质粒和 pcDNA3.1 经脂质体转染真核细胞 COS-7, Western blotting 检测发现, 转染重组质粒细胞提取物有一条特异条带, 相对分子质量在 90 000 左右, 而转染空质粒细胞提取物则没有条带(图 3)。

2.3 重组质粒转化减毒沙门菌成功制备口服型 DNA 疫苗

分别挑取 pcDNA3.1-VR-2、pcDNA3.1 转化的

SL3261 单菌落, 提取质粒, 用 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切, 电泳结果显示: pcDNA3.1 仅有 5 400 bp 一条带, 而 pcDNA3.1-VR-2 则有 5 400 bp 和 2 300 bp 两条带 (图 4), 说明口服型 DNA 疫苗制备成功。

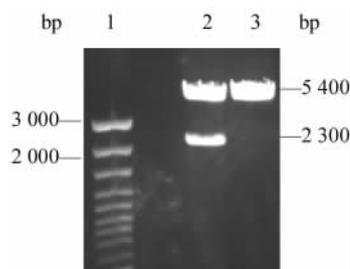


图 2 重组质粒 pcDNA3.1-VR-2 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1-VR-2 by restriction enzyme digestion

1: DNA Marker; 2: Recombinant plasmid pcDNA3.1-VR-2 digested with *Xba* I and *Kpn* I; 3: pcDNA3.1 digested with *Xba* I and *Kpn* I

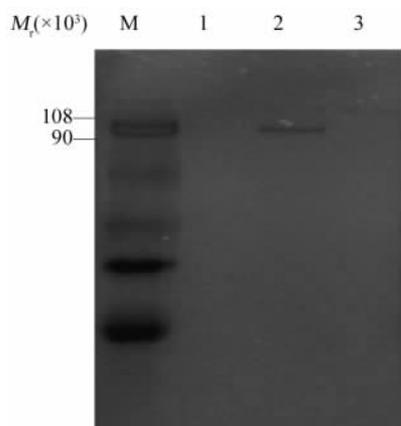


图 3 Western blotting 检测重组质粒转染后 COS-7 细胞 VEGFR 的表达

Fig. 3 Expression of target protein VEGFR in COS-7 cells after transfection by Western blotting assay

M: Marker; 1: Negative control; 2: pcDNA3.1-VR-2 group; 3: pcDNA3.1 group

2.4 疫苗口服后小鼠血清 VEGFR-2 IgG 抗体水平

为研究该疫苗激活机体的体液免疫情况, 将动物分为生理盐水组、空质粒组和疫苗组, 免疫后 2、4、6 周检测小鼠血清抗 VEGFR-2 IgG 类抗体水平。结果显示, 疫苗组抗体水平高于生理盐水组和空质粒对照组 ($P < 0.01$); 生理盐水组和质粒对照组抗体滴度和免疫前没有明显变化, 而疫苗组免疫后小鼠血清抗体滴度逐渐升高, 2、4、6 周的 D_{490} 值差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

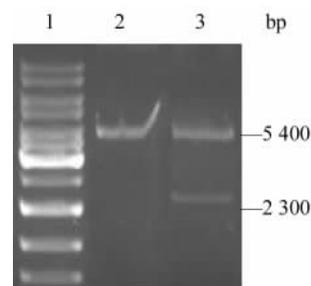


图 4 SL3261 中提取重组质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid extracted from SL3261 by restriction enzyme digestion

1: DNA Marker; 2: pcDNA3.1 digested with *Xba* I and *Kpn* I; 3: Recombinant plasmid pcDNA3.1-VR-2 digested with *Xba* I and *Kpn* I

表 1 疫苗口服后小鼠血清抗体的滴度 ($\bar{x} \pm s, D_{490}$)

Tab. 1 Serum titer of VEGFR-2 specific antibody in immunized mice of different groups

Group	2 weeks	4 weeks	6 weeks
Saline	0.14 ± 0.035	0.14 ± 0.033	0.14 ± 0.033
Empty vector	0.15 ± 0.033	0.13 ± 0.031	0.14 ± 0.038
Vaccine	0.46 ± 0.027**	0.80 ± 0.042	1.07 ± 0.018**

** $P < 0.01$ vs saline or empty vector

2.5 疫苗口服后小鼠脾淋巴细胞的 CTL 活性

在不同的效靶比情况下, 生理盐水组和质粒对照组脾淋巴细胞对靶细胞的杀伤率都没有明显差异 ($P > 0.05$), 而疫苗组脾淋巴细胞对靶细胞的杀伤率随着效靶比的增加, 杀伤率不断增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在同样的效靶比例下, 疫苗组脾淋巴细胞对靶细胞的杀伤率均高于生理盐水组、空质粒对照组 ($P < 0.05$, 图 5)。

3 讨论

血管生成是肿瘤赖以生长和转移的基础。当肿瘤体积超过 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ 时, 肿瘤出现血管生成。以肿瘤血管生成成为靶点的抗肿瘤治疗最初是由 Folkman 教授提出的, 随后被其他的研究者采纳并且用于癌症传统治疗的辅助手段。

VEGF 是诱导肿瘤血管形成作用最强、特异性最高的血管生长因子^[13-15]。目前已发现 VEGF 主要有 3 种酪氨酸激酶受体: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3。VEGFR-2 主要刺激血管内皮细胞的增殖, 是

VEGF 发挥促血管生成效应的主要受体;正常情况下表达水平低,在肿瘤组织中 VEGFR-2 的表达水平显著升高。因此,VEGF/VEGFR-2 信号传导通路在肿瘤新生血管形成过程中起关键性作用,阻断该信号传导通路,可以抑制肿瘤新生血管形成,达到抑制肿瘤生长和转移的目的^[16-17]。

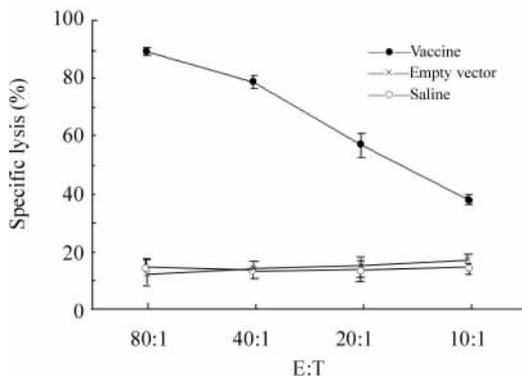


图 5 口服疫苗后小鼠淋巴细胞特异性 CTL 杀伤效应
Fig. 5 Antigen-specific CTL cytotoxicity in mice immunized with the oral vaccine

VEGFR-2 由一个胞外区、一个跨膜区和一个胞浆内酪氨酸激酶区组成。小鼠 VEGFR2 胞外区由 762 个氨基酸组成,含有 7 个免疫球蛋白样环(Ig-like loop),是与配体 VEGF 结合的主要区域^[7]。因此,本实验选择 VEGFR-2 胞外区为治疗靶点构建重组质粒 pcDNA3.1-VR-2,转化减毒沙门菌 SL3261,制备成以减毒沙门菌 SL3261 为载体的口服型 VEGFR-2 DNA 疫苗。

DNA 疫苗在进行体内实验前,必须首先证实其能否在体外真核细胞中表达目的蛋白。COS-7 细胞是来源于非洲绿猴肾成纤维细胞并经 SV40 病毒基因转化的细胞系,能表达 SV40 T 抗原,任何复制起始位置带有 SV40 的转染质粒都能够在其中以很高的拷贝数进行复制和表达。而质粒载体 pcDNA3.1 复制起始位置带有 SV40 启动子,因此,能将克隆至其中的目的片段在 COS-7 细胞中高效表达。本实验以 pcDNA3.1 为载体,构建了重组质粒 pcDNA3.1-VR-2,经脂质体介导转染 COS-7 细胞,Western blotting 检测发现转染细胞提取物有一条特异的条带,提示 pcDNA3.1-VR-2 能在体外真核细胞表达。

C57BL/6 小鼠外周血 VEGFR-2 IgG 抗体检测结果显示,疫苗组与空质粒组、生理盐水组比较,抗体水平均有明显增高($P < 0.05$);而且疫苗组抗体水平随着免疫时间和免疫次数的增加而保持在较高水平,提示以减毒沙门氏菌 SL3261 为载体的口服型

VEGFR-2 DNA 疫苗可以激活机体的体液免疫反应,产生针对 VEGFR-2 的抗体。

C57BL/6 小鼠脾淋巴细胞的杀伤活性试验结果显示,疫苗组小鼠脾淋巴细胞对靶细胞小鼠血管内皮细胞 MS1 的杀伤率随着效靶比的增加而逐渐增加,而空质粒组和生理盐水组没有明显变化。在同样的效靶比例下,疫苗组小鼠脾淋巴细胞对靶细胞的杀伤率明显高于空质粒组、生理盐水组,提示以减毒沙门菌 SL3261 为载体的口服型 VEGFR-2 DNA 疫苗可以打破机体对自身抗原的免疫耐受,引起针对小鼠血管内皮细胞的特异性细胞免疫。

传统的免疫学观点认为,机体免疫系统识别外来抗原而被激活。但是,越来越多的研究结果表明,机体的免疫应答并非只针对“非我”,免疫系统更加关注的是对自身的损伤或者危险,而非外来抗原。目前,关于免疫应答启动的机制尚不清楚。有研究表明,抗原提呈细胞在调控免疫应答的过程中起非常关键的作用。但是抗原提呈细胞对抗原的提呈并没有特异性,因此免疫系统并非只能识别“非我”,而能识别对我不利的“危险信号”。“危险模式”认为,免疫应答的启动并非抗原识别,而是危险信号^[8]。如果增加调控抗原提呈细胞对“危险信号”的识别,那么很有可能引发针对机体自身抗原的免疫应答反应。Li 等^[14]用可溶性的 VEGFR-2 蛋白致敏树突状细胞(DC),打破了机体对自身 VEGFR-2 抗原的免疫耐受,引起了 VEGFR-2 特异性中和抗体和 CD8⁺ CTL 免疫应答。另外,利用异种的 bFGF、MMP-2、VEGF、VEGFR-2 为靶点构建的 DNA 疫苗,也能引起 CD4⁺ T 细胞介导特异性针对靶蛋白的免疫反应^[18-19]。

选用 SL3261 作为 VEGFR-2 DNA 疫苗的抗原载运系统,经口服后,DNA 疫苗可能被肠道中抗原提呈细胞,主要是树突状细胞吞噬。在树突状细胞中,外源基因可以转录成 mRNA 并翻译为蛋白质。外源蛋白 VEGFR-2 在抗原提呈细胞中的表达可能为抗原提呈细胞的激活提供了一种“危险信号”,产生了针对过表达 VEGFR-2 的肿瘤血管内皮细胞的免疫反应。从实验结果可以看出,携带自身抗原基因的 DNA 疫苗可以打破机体的免疫耐受,引发针对自身抗原的免疫反应。然而,有关于疫苗对抗原提呈细胞的激活提供危险信号的机制,还有待进一步研究。

综上所述,本研究以 VEGFR-2 为靶点,减毒沙门菌 SL3261 为载体,成功制备了口服型 VEGFR2 DNA 疫苗,该疫苗可激活特异性的细胞免疫和体液

免疫,为进一步的动物实验和临床应用研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Folkman J. Seminars in medicine of the beth israel hospital, boston: clinical applications of research on angiogenesis [J]. N Engl J Med, 1995, 333(26): 1757-1763.
- [2] Gonzalez FJ, Vicioso L, Alvarez M, *et al.* Association between VEGF expression in tumour-associated macrophages and elevated serum VEGF levels in primary colorectal cancer patients [J]. Cancer Biomark, 2007, 3(6): 325-333.
- [3] Xia C, Meng Q, Liu LZ, *et al.* Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor [J]. Cancer Res, 2007, 67(22): 10823-10830.
- [4] Everson RG, Graner MW, Gromeier M, *et al.* Immunotherapy against angiogenesis-associated targets: evidence and implications for the treatment of malignant glioma [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2008, 8(5): 717-732.
- [5] Tang Y, Borgstrom P, Maynard J, *et al.* Mapping of angiogenic markers for targeting of vectors to tumor vascular endothelial cells [J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(4): 346-353.
- [6] Bazan-Peregrino M, Seymour LW, Harris AL, *et al.* Gene therapy targeting to tumor endothelium [J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(2): 117-127.
- [7] Zhu Z, Hattori K, Zhang H, *et al.* Inhibition of human leukemia in an animal model with human antibodies directed against vascular endothelial growth factor receptor 2. Correlation between antibody affinity and biological activity [J]. Leukemia, 2003, 17(3): 604-611.
- [8] van Beijnum JR, Dings RP, van der Linder E, *et al.* Gene expression of tumor angiogenesis dissected: specific targeting of colon cancer angiogenic vasculature [J]. Blood, 2006, 108(7): 2339-2348.
- [9] He QM, Wei YQ, Tian L, *et al.* Inhibition of tumor growth with a vaccine based on xenogeneic homologous fibroblast growth factor receptor-1 in mice [J]. J Biol Chem, 2003, 278(24): 21831-21836.
- [10] 朱挺,刘霆,贾永前,等.异种血管内皮细胞生长因子重组蛋白质疫苗联合阿霉素治疗淋巴瘤的研究 [J]. 四川大学学报:医学版, 2005, 36(5): 661-675.
- [11] Sun B, Li ZS, Tu ZX, *et al.* Construction of an oral recombinant DNA vaccine from H pylori neutrophil activating protein and its immunogenicity [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(43): 7042-7046.
- [12] Dietrich G, Spreng S, Favre D, *et al.* Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines [J]. Curr Opin Mol Ther, 2003, 5(1): 10-19.
- [13] Ling Y, Yang Y, Lu N, *et al.* Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361(1): 79-84.
- [14] Li Y, Wang MN, Li H, *et al.* Active immunization against the vascular endothelial growth factor receptor flk1 inhibits tumor angiogenesis and metastasis [J]. J Exp Med, 2002, 195(12): 1575-1584.
- [15] Böldicke T, Weber H, Mueller PP, *et al.* Novel highly efficient intrabody mediates complete inhibition of cell surface expression of the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/KDR) [J]. J Immunol Methods, 2005, 300(1-2): 146-159.
- [16] Lamszus K, Brockmann MA, Eckerich C, *et al.* Inhibition of glioblastoma angiogenesis and invasion by combined treatments directed against vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, and vascular endothelial-cadherin [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(13): 4934-4940.
- [17] Camp ER, Yang A, Liu W, *et al.* Roles of nitric oxide synthase inhibition and vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition on vascular morphology and function in an *in vivo* model of pancreatic cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(8): 2628-2633.
- [18] Jimenez X, Lu D, Brennan L, *et al.* A recombinant, fully human, bispecific antibody neutralizes the biological activities mediated by both vascular endothelial growth factor receptors 2 and 3 [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(3): 427-434.
- [19] Miao HQ, Hu K, Jimenez X, *et al.* Potent neutralization of VEGF biological activities with a fully human antibody Fab fragment directed against VEGF receptor 2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345(1): 438-445.

[收稿日期] 2008-05-20

[修回日期] 2008-07-21

[本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》,文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方,均应使用阿拉伯数字。(1) 公历世纪、年代、年、月、日和时、时刻必须使用阿拉伯数字,如 20 世纪 90 年代、2006-02-15、5 h、30 min、30 s、14:36:08 等;年份不能用简称,“1998 年”不能写作“98 年”。(2) 物理量量值必须使用阿拉伯数字。(3) 非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字,如 3 支、5 根等。(4) 数值范围的表达要求:5 万至 10 万应写成 5 万~10 万,不能写成 5~10 万; 3×10^9 至 5×10^9 应写成 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$, 或 $(3 \sim 5) \times 10^9$, 不能写成 $3 \sim 5 \times 10^9$; 60% 至 70% 不能写成 60~70%, 应写成 60%~70%; 25.5 ± 0.5 mg 应写成 (25.5 ± 0.5) mg。(5) 带单位的量值相乘时,每个数值后单位不能省略,如 4 mm × 2 mm × 3 mm, 不能写成 $4 \times 2 \times 3$ mm 或 $4 \times 2 \times 3$ mm³。

(本刊编辑部)