

## · 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.007

## 活体荧光成像评估 Ag85A 和 Ag85B DNA 疫苗对小鼠膀胱癌移植瘤的疗效

付奎<sup>1</sup>, 杨晓峰<sup>1\*</sup>, 汪海龙<sup>1</sup>, 杨彬<sup>1</sup>, 王炜<sup>2</sup>, 王晔<sup>2</sup>, 刘晶<sup>3</sup>(1. 山西医科大学附属第一医院 泌尿外科, 山西太原 030001; 2. 浙江大学 加州国际纳米技术研究院, 浙江 杭州 31000; 3. 山西离石市人民医院 泌尿外科, 山西离石 033000)

[摘要] 目的: 运用活体红色荧光成像技术及影像学特征评估 Ag85A DNA 疫苗和 Ag85B DNA 疫苗对膀胱癌的免疫治疗效果。方法: 构建稳定转染香菇珊瑚红色荧光蛋白 (discosomasp red fluorescent protein, *DsRed*) 基因的小鼠膀胱癌 BTT 细胞 (BTT-*DsRed*), 建立 BTT-*DsRed* 细胞移植瘤小鼠模型, 将建模成功的 24 只小鼠随机分为 pVAX1-Ag85A DNA 疫苗组、pVAX1-Ag85B DNA 疫苗组和生理盐水治疗组, 各组分别于肿瘤细胞接种后的第 6 天肌内注射 pVAX1-Ag85A、pVAX1-Ag85B 及生理盐水, 然后用活体荧光成像系统检测移植瘤的生长和转移情况。结果: 成功制备了稳定转染 *DsRed* 基因的 BTT-*DsRed* 细胞, BTT-*DsRed* 接种小鼠建立可视化红色荧光膀胱癌移植瘤模型。重组质粒 pVAX1-Ag85A 和 pVAX1-Ag85B 治疗后的第 2 周, 活体荧光成像显示 pVAX1-Ag85B 治疗组小鼠肿瘤荧光强度明显低于生理盐水组 ( $P < 0.05$ ); 治疗后第 3 周, pVAX1-Ag85A 和 pVAX1-Ag85B 组小鼠肿瘤荧光强度都明显低于生理盐水组 ( $P < 0.01$ ), 但 pVAX1-Ag85B 与 pVAX1-Ag85A 组无明显差别 ( $P > 0.05$ ); pVAX1-Ag85B 组小鼠淋巴结转移率 (25.0%) 明显低于生理盐水组 (87.5%,  $P < 0.01$ ) 和 pVAX1-Ag85A 组 (62.5%,  $P < 0.05$ )。结论: 应用活体红色荧光成像技术能够动态、灵敏、可视化地评估 DNA 疫苗对小鼠膀胱癌移植瘤的疗效; Ag85A 和 Ag85B DNA 疫苗均具有抗肿瘤免疫疗效。

[关键词] Ag85A; Ag85B; DNA 疫苗; 膀胱肿瘤; 活体荧光成像; 香菇珊瑚红色荧光蛋白

[中图分类号] R737.14; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)06-0588-07

### ***In vivo* fluorescence image analysis system in assessing efficacies of pVAX1-Ag85A and pVAX1-Ag85B DNA vaccines in treatment of bladder cancer cell-implanted tumors in mice**

FU Kui<sup>1</sup>, YANG Xiao-feng<sup>1</sup>, WANG Hai-long<sup>1</sup>, YANG Bin<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>2</sup>, WANG Ye<sup>2</sup>, LIU Jing<sup>3</sup>(1. Department of Urology, First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China; 2. Institute of California International Nanotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 31000, Zhejiang, China; 3. Department of Urology, People's Hospital of Lishi, Lishi 033000, Shanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To use *in vivo* fluorescence image analysis system for evaluating the efficacies of pVAX1-Ag85A and pVAX1-Ag85B DNA vaccines in treatment of bladder cancer cell-implanted tumors in mice. **Methods:** Discosomasp red fluorescent protein (*DsRed*) stably transfected bladder cancer BTT cell line (BTT-*DsRed*) was established and BTT-*DsRed* cell-implanted mouse model was constructed. Six days later, 24 BTT-*DsRed*-bearing mice were randomly divided into pVAX1-Ag85A DNA vaccine group, pVAX1-Ag85B DNA vaccine group, and saline group through injecting the pVAX1-Ag85A, pVAX1-Ag85B, and saline into the right hind limbs of mice, respectively. The growth and metastasis of implanted BTT-*DsRed* tumors were examined by *in vivo* fluorescence image analysis system. **Results:** BTT cell line stably transfected with *DsRed* (BTT-*DsRed*) was successfully established. Fluorescence visible mouse model was successfully established by inoculating BTT-*DsRed* cells into hind limbs of mice. After treatment with pVAX1-Ag85A or pVAX1-Ag85B for 2 weeks, the *in vivo* tumor fluorescence intensity in pVAX1-Ag85B group was significantly lower than that in the saline group ( $P < 0.05$ ). After 3 weeks, tumor fluorescence intensities in both pVAX1-Ag85A and pVAX1-Ag85B groups were

[基金项目] 山西省科技攻关基金资助项目 (No. 20090321022)。Supported by the Scientific and Technological Project of Shanxi Province (No. 20090321022)

[作者简介] 付奎 (1981-) 男, 山西省太原市人, 硕士研究生, 主要从事泌尿系统肿瘤治疗的研究

\* 通信作者 (Corresponding author)。E-mail: yxfylq@163.com

significantly lower than that in the saline group ( $P < 0.01$ ). But the efficacies of pVAX1-Ag85A and pVAX1-Ag85B groups were similar ( $P > 0.05$ ). The distant lymphatic metastasis rate in pVAX1-Ag85B group was significantly lower than those in the saline (25.0% vs 87.5%) and pVAX1-Ag85A groups (25.0% vs 62.5%) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** *In vivo* fluorescence image analysis system can dynamically, sensitively and visually evaluate the anti-tumor effects of DNA vaccines against bladder cancer cell-implanted tumors. Both pVAX1-Ag85A and pVAX1-Ag85B DNA vaccines have anti-tumor effects for bladder cancers.

[ **Key words** ] Ag85A; Ag85B; bladder neoplasms; *in vivo* fluorescence image; discosomas red fluorescent protein  
[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 588-594 ]

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,治疗的首选方法为经尿道膀胱肿瘤切除术,但术后复发率高达 40% ~ 75%<sup>[1]</sup>。术后膀胱内灌注药物治疗可降低或延缓肿瘤复发,但目前评价膀胱灌注药物治疗方法的客观性、灵敏度、准确性及特异性均较差,不能有效反映药物的疗效,故探索出一种客观、特异、准确、灵敏的评价方法,具有重要的临床意义。

荧光成像技术可以直接、无创伤和快速地在活体动物体内实时成像,连续地观察药物治疗的疗效<sup>[2]</sup>。香菇珊瑚红色荧光蛋白(discosomas red fluorescent protein, DsRed)是 Clontech 公司商业化的一种低毒、低寡聚化的红色荧光蛋白突变体<sup>[3-5]</sup>,广泛应用于生物医学的各个领域。

Ag85 复合体是卡介苗(bacillus Calmette-Guerin vaccine, BCG)培养滤液中的主要分泌蛋白,由 Ag85A、Ag85B 和 Ag85C 组成,相对分子质量为 30 000 ~ 32 000<sup>[6]</sup>。Ag85 复合体不仅可以刺激机体产生体液免疫,尚可激发较强的 Th1 型细胞免疫<sup>[7-9]</sup>。大量实验<sup>[10-12]</sup>证明, Ag85A DNA 疫苗及 Ag85B DNA 疫苗可以诱导机体强烈的 Th1 免疫应答和 CTL 的激活,产生大量 IL-2 和 IFN- $\gamma$  等细胞因子。然而研究<sup>[13]</sup>发现编码 Ag85C 的 DNA 疫苗免疫动物无效。近年来,利用 Ag85A 及 Ag85B DNA 疫苗治疗膀胱肿瘤越来越受到关注,并通过测量一些免疫相关指标(如 CD4<sup>+</sup>T 细胞数量、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值、IL-2、IFN- $\gamma$  等)来评价这些疫苗的临床疗效,但上述免疫指标的变化,不一定能真实反映 DNA 疫苗的临床效果。本实验采用活体红色荧光成像技术,通过可视化图像分析 DNA 疫苗的治疗效果,以期探索出一种客观、特异、准确、灵敏的评价新方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要实验材料

含 pVAX1-Ag85A 质粒以及含 pVAX1-Ag85B 质粒的细菌由上海海规制备有限公司提供,质粒抽提试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公

司。用质粒大量提取试剂盒分别从含相应质粒的细菌中提取 pVAX1-Ag85A 及 pVAX1-Ag85B 质粒。小鼠膀胱肿瘤细胞株 BTT 由上海交通大学附属第一医院细胞室提供。DsRed 基因购于 Clontech 公司; DsRed 表达载体由中国医学科学院实验动物研究所实验室构建。615 小鼠(24 只,6 ~ 8 周龄,雌雄各半,体重 18 ~ 22g)由中国医学科学院天津肿瘤医院肿瘤研究所提供[合格证号: SCXR(津)2004-0001],饲养于 SPF 级环境中。MAESTRO 8.5 活体成像仪购自 Maestro 公司,荧光显微镜购自 Olympus 公司,PCR 仪购自 Gene 公司,DU640 核酸分析仪购自 Beckman 公司。G418 购自 Amresco 公司。

### 1.2 DsRed 质粒转染 BTT 细胞

将 BTT 细胞接种于 6 孔板,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养过夜。转染当天,细胞融汇达 50% ~ 70%。转染方法按脂质体 2000 试剂盒操作说明进行,转染后 BTT 细胞用胰酶消化后,转至 100 mm 的细胞培养皿中,用含 800  $\mu$ g/ml G418 的 RPMI 1640 培养基筛选细胞,每隔 3 ~ 5 d 换液,获得稳定表达 DsRed 的细胞(BTT-DsRed),挑取单克隆,用含 10% 胎牛血清及 0.05% G418 的 RPMI 1640 培养基扩大培养。常规胰酶消化后计数 BTT 及 BTT-DsRed 细胞,绘制细胞生长曲线。

### 1.3 BTT-DsRed 小鼠移植瘤模型的制备

0.25% 胰酶消化对数生长期 BTT-DsRed 细胞,调整细胞密度为  $2 \times 10^7$ /ml。取 24 只 615 小鼠,右后肢大腿内侧皮下注射 0.2 ml BTT-DsRed 细胞悬液(约  $4 \times 10^6$  个细胞),3 d 后在左后肢大腿内侧皮下注射 BTT-DsRed 细胞悬液 0.2 ml,制备 BTT-DsRed 膀胱癌移植瘤小鼠模型。

### 1.4 荷瘤小鼠活体荧光成像的检测

将 24 只 615 膀胱癌 BTT-DsRed 细胞移植瘤小鼠随机分为 3 组,分别为:pVAX1-Ag85A 疫苗治疗组、pVAX1-Ag85B 疫苗治疗组和生理盐水组。各组分别于右后肢肿瘤细胞接种后的第 6、13、20 天,于右后肢肌肉内注射相应质粒 DNA 疫苗:pVAX1-Ag85A

0.1 ml( 100 μg )、pVAX1-Ag85B 0.1 ml( 100 μg )、生理盐水 0.1 ml。然后各组分别于右后肢 DNA 疫苗治疗后的第 0 ~ 3 周,用活体荧光成像系统拍照, MAESTRO 8.5 图像分析系统进行分析。

1.5 荷瘤小鼠主要器官和淋巴结转移的检测

DNA 疫苗治疗后的第 3 周处死小鼠,分离肝、肺、肾和腹腔淋巴结组织,将新鲜的组织剪成约 1 mm<sup>3</sup> 小块,置于 0.125% 的胰酶中,37 °C 消化 5 min。然后,将小块的组织放在干净的载玻片上,用盖玻片压片后,荧光显微镜下观察。

1.6 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析( ANOVA ), P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pVAX1-Ag85A 和 pVAX1-Ag85B 质粒的酶切鉴定

将 pVAX1-Ag85A 质粒用 Bam H I / Hind III 双酶切后进行电泳,在 900 bp 处出现相应条带,与预期结果一致。将 pVAX1-Ag85B 质粒用 Nhe I / Hind III 双酶切后电泳,在 990 bp 处出现相应条带,与预期结果一致( 图 1 )。大量抽提质粒后用核酸分析仪测定质粒 DNA 的浓度,结果显示: pVAX1-Ag85A、pVAX1-Ag85B 的 D<sub>260</sub>/D<sub>280</sub> 值分别为 1.789、1.801,其质粒质量浓度分别为( 2.134 ± 0.001 )mg/ml、( 1.085 ± 0.001 )mg/ml,所抽提质粒 DNA 杂质少,能满足实验需要,用灭菌水将两质粒的质量浓度调节为实验所需的 1 mg/ml。

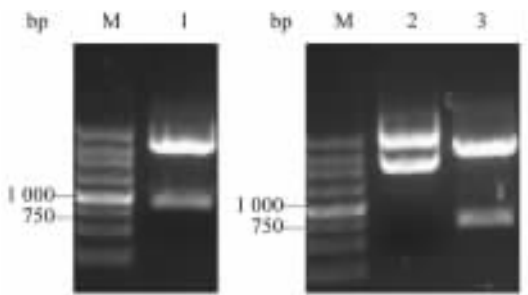


图 1 pVAX1-Ag85A( A )和 pVAX1-Ag85B( B )质粒的酶切鉴定

Fig.1 Identification of pVAX1-Ag85A and pVAX1-Ag85B plasmids by restriction enzyme digestion

M: Marker; 1: pVAX1-Ag85A digested by Bam H I / Hind III; 2: pVAX1-Ag85B; 3: pVAX1-Ag85B digested by Nhe I / Hind III

2.2 BTT 及 BTT-DsRed 的细胞学特征

小鼠膀胱癌 BTT 细胞生长较快,为典型贴壁细

胞,细胞呈圆形或梭形( 图 2 ),倍增时间为 19 h。稳定转染 DsRed 基因的 BTT-DsRed 细胞的生长能力、状态、细胞形态等与 BTT 细胞无差异,但荧光显微镜下稳定表达红色荧光蛋白,且红色荧光不随细胞传代次数的增多而衰减( 图 2 )。BTT-DsRed 细胞活力好,与 BTT 细胞相似,两者均从第 2 天开始进入指数生长期,第 3 天进入平顶期,第 6 天开始退化衰亡( 图 3 )。

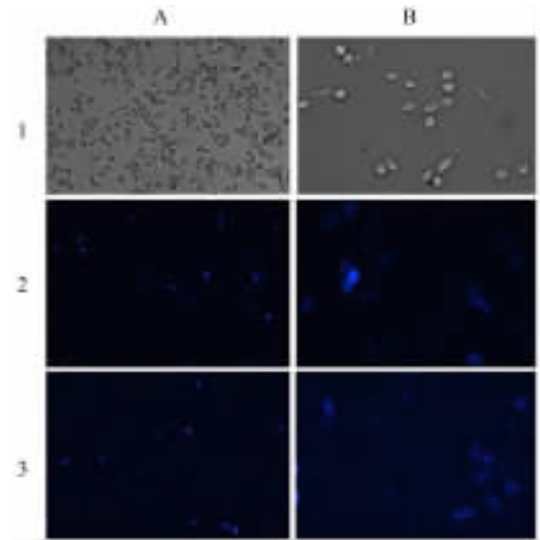


图 2 BTT 细胞及 BTT-DsRed 细胞的形态( A × 100; B × 400 )

Fig. 2 Morphology of BTT cells and BTT-DsRed cells

A: BTT cells; B: BTT-DsRed cells; 1: The first passage; 2: The second passage; 3: The sixth passage

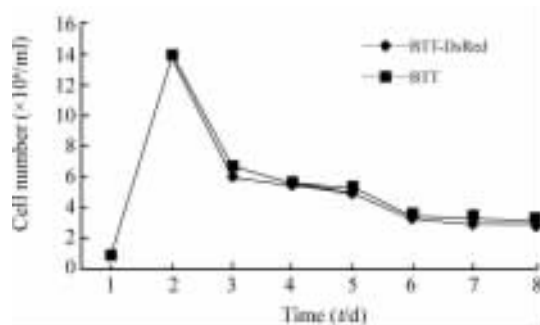


图 3 BTT 细胞和 BTT-DsRed 细胞的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of BTT cells and BTT-DsRed cells

2.3 BTT-DsRed 细胞小鼠移植瘤模型的成功制备

BTT-DsRed 细胞接种于 615 小鼠后的第 6 天,小鼠右后肢内侧皮下生长出肉眼可见的皮下肿瘤;于肿瘤细胞种植后的第 3 天,在左后肢内侧皮下用活体荧光成像系统便可观察到发出红色荧光的皮下肿瘤,而此时肉眼尚不能观察到( 图 4 )。两侧致瘤率均为 100%。移植瘤建模前期,小鼠活动基本正常;移植瘤建模后期,绝大部分小鼠精神萎靡、食欲

减退、双后肢行动不便、活动量明显减少。

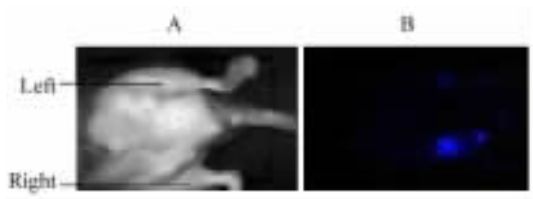


图 4 BTT-DsRed 膀胱癌小鼠移植瘤活体荧光成像(左:3 d;右:6 d)

Fig. 4 BTT-DsRed cells-implanted mice expressing red fluorescence under *in vivo* fluorescence image (Left: 3 d; Right: 6 d)

A: Under naked eye; B: Under *in vivo* fluorescence image system

## 2.4 pVAX1-Ag85A DNA 疫苗和 pVAX1-Ag85B DNA 疫苗抑制小鼠膀胱癌移植瘤的生长

小鼠右后肢接种 BTT-DsRed 后 6 d(左后肢接种 BTT-DsRed 3 d),将小鼠分为 3 组进行 DNA 疫苗治疗。治疗后第 1 周,各组小鼠左、右后肢肿瘤荧光强度无明显差别(表 1,图 5、6)。治疗后第 2 周,pVAX1-Ag85B 组小鼠右后肢肿瘤荧光强度较 pVAX1-Ag85A 组和生理盐水组明显降低( $P < 0.05$ );各组小鼠左后肢肿瘤荧光强度无明显差别。治疗后第 3 周,pVAX1-Ag85B 组和 pVAX1-Ag85A 组小鼠左、右后肢肿瘤荧光强度都较生理盐水组显著降低( $P < 0.01$ ),且 pVAX1-Ag85B 组最低。提示 pVAX1-Ag85B DNA 疫苗治疗 2 周后,即对小鼠膀胱癌移植瘤发挥治疗作用,pVAX1-Ag85A 治疗 3 周后才显示治疗效果。

表 1 DNA 疫苗治疗后小鼠移植瘤的荧光强度值

Tab. 1 Fluorescence intensities (FI) of implanted tumors after treatment with DNA vaccines

Time post treatment (t/week)	Left hind (FI, $\times 10^4$ )			Right hind (FI, $\times 10^4$ )		
	pVAX1-Ag85A	pVAX1-Ag85B	NS	pVAX1-Ag85A	pVAX1-Ag85B	NS
0	16.9 $\pm$ 4.6	16.9 $\pm$ 4.0	17.0 $\pm$ 4.3	28.3 $\pm$ 4.6	28.6 $\pm$ 7.7	31.0 $\pm$ 7.6
1	127.6 $\pm$ 34.3	153.3 $\pm$ 67.6	133.8 $\pm$ 37.5	148.9 $\pm$ 68.3	158.1 $\pm$ 67.0	171.6 $\pm$ 74.8
2	72.1 $\pm$ 30.0	60.8 $\pm$ 35.4	88.8 $\pm$ 39.8	59.1 $\pm$ 19.26	36.5 $\pm$ 24.3 <sup>▲</sup>	76.3 $\pm$ 36.5
3	1 460.9 $\pm$ 433.6 <sup>* 1</sup>	114.3 $\pm$ 651.9 <sup>** 4</sup>	161.1 $\pm$ 1650.5	1 598.8 $\pm$ 498.2 <sup>* 1</sup>	1 063.1 $\pm$ 454.9 <sup>** 3</sup>	957.9 $\pm$ 1 286.7

<sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs NS or pVAX1-Ag85A; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs NS

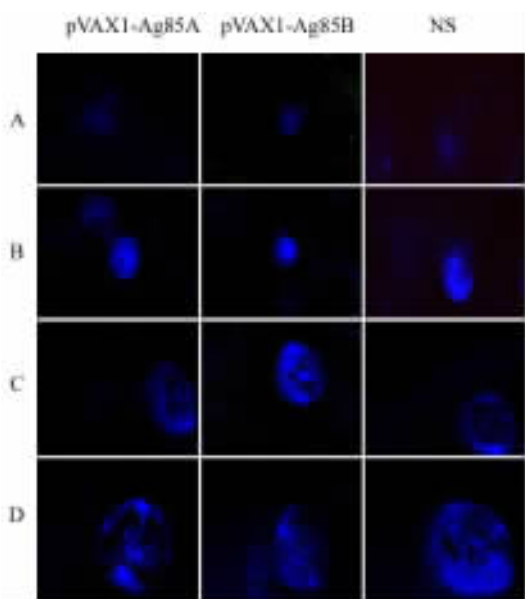


图 5 DNA 疫苗治疗后小鼠左后肢移植瘤的荧光显影  
Fig. 5 Fluorescence images of implanted tumors in left hind of mice after treatment with different DNA vaccines

A: 0 week; B: 1 week; C: 2 weeks; D: 3 weeks

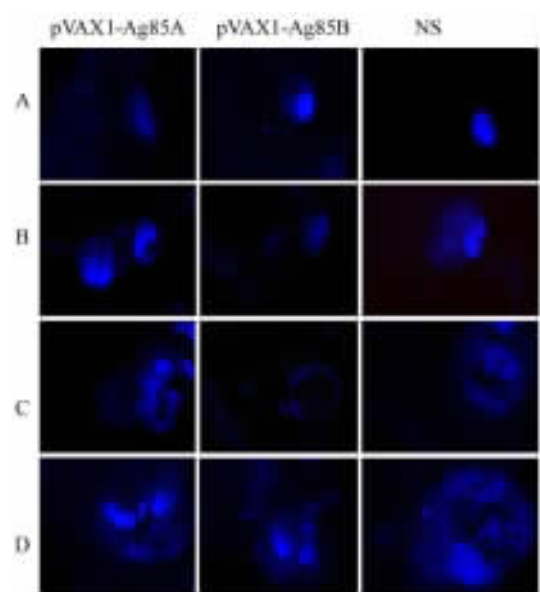


图 6 DNA 疫苗治疗后小鼠右后肢移植瘤的荧光显影  
Fig. 6 Fluorescence intensities of implanted tumors in right hind of mice after treatment with different DNA vaccines

A: 0 week; B: 1 week; C: 2 weeks; D: 3 weeks

### 2.5 pVAX1-Ag85A 和 pVAX1-Ag85B 抑制小鼠左、右后肢移植瘤总荧光强度

治疗后第 3 周, 各组小鼠左、右后肢大腿内侧膀胱移植瘤荧光强度值总和如表 2、图 7 所示, pVAX1-Ag85B 组和 pVAX1-Ag85A 组与生理盐水组比较, 双后肢肿瘤荧光强度总和的差别有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 其中 pVAX1-Ag85B 组荧光强度值总和最低, 但 pVAX1-Ag85B 组与 pVAX1-Ag85A 组差别无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。说明 pVAX1-Ag85A、pVAX1-Ag85B DNA 疫苗均能降低肿瘤红色荧光强度, 对小鼠膀胱癌移植瘤呈现显著的免疫治疗效果。

表 2 DNA 疫苗治疗后 3 周小鼠双后肢肿瘤荧光强度值总和  
Tab. 2 Total fluorescence intensities of tumors on both hinds of mice treated with different DNA vaccines for 3 weeks

Group	n	Total fluorescence intensity ( Counts/s, $\times 10^4$ )
pVAX1-Ag85A	8	3 059.60 $\pm$ 705.21 **
pVAX1-Ag85B	8	2 177.44 $\pm$ 976.77 **
NS	8	4 452.02 $\pm$ 3 003.98

\*\*  $P < 0.01$  vs NS

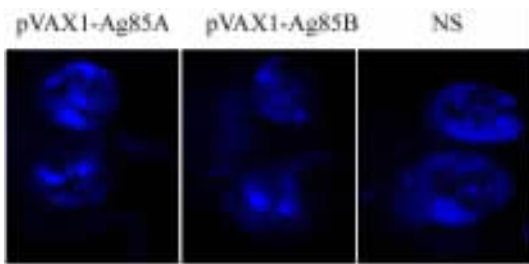


图 7 DNA 疫苗治疗 3 周后小鼠双后肢肿瘤的荧光显影  
Fig. 7 Fluorescence images of tumors on both hinds of mice treated with different DNA vaccines for 3 weeks

### 2.6 荷瘤小鼠腹腔淋巴结转移的荧光显影

治疗后 3 周, 取各组小鼠各主要器官和腹腔淋巴结组织, 荧光显微镜下显示: 肝、肺、肾均未发现肿瘤细胞转移, 而腹腔淋巴结部分组织有肿瘤细胞转移 (图 8)。3 组中以 pVAX1-Ag85B DNA 疫苗组小鼠淋巴结转移率 (2/8, 25.0%) 最低, 与 pVAX1-Ag85A DNA 疫苗组 (5/8, 62.5%) 和生理盐水组 (7/8, 87.5%) 相比, 差别均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 其次, pVAX1-Ag85A 组小鼠淋巴结转移率与生理盐水组小鼠淋巴结转移率差别也有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

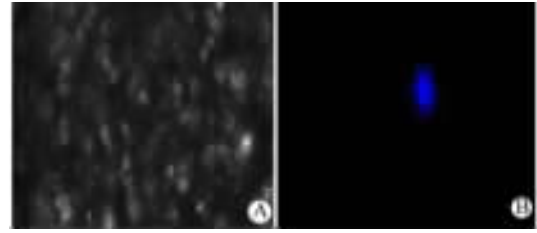


图 8 DNA 疫苗治疗后 3 周荷瘤小鼠腹腔淋巴结组织中呈红色荧光 (  $\times 100$  )

Fig. 8 Intra-abdominal lymph nodes exhibited red fluorescence under fluorescence microscope 3 weeks after treatment with DNA vaccine (  $\times 100$  )

A: Light microscope; B: Fluorescence microscope

### 3 讨论

荧光蛋白基因作为一种报告基因, 转染并稳定整合至肿瘤细胞 DNA 后, 将随着肿瘤细胞的分裂而传给后代, 也将随着肿瘤细胞的死亡而消亡, 因此荧光信号与肿瘤细胞数成正比<sup>[14]</sup>。根据这些特性, 人们已将荧光蛋白应用于抗癌药物的疗效评价<sup>[15-19]</sup>。目前, 荧光蛋白报告基因主要有绿色荧光蛋白 (GFP) 和红色荧光蛋白 (如 DsRed) 两种。其中, 红色荧光蛋白较前者有众多优点: (1) 红色荧光蛋白荧光亮度高, 可与最好的 GFP 相媲美; (2) 较强的抵御光漂白的能力; (3) pH 范围 4.5 ~ 12, 不易在酸性条件下猝灭; (4) DsRed 发射波长较长, 较少受到外来荧光干扰, 灵敏度与信噪比均比 GFP 高; (5) 红色荧光不属于自身荧光的范围, 背景干扰小, 可以从背景光里分离出来, 弥补了 GFP 的一些不足; (6) 红色荧光更能穿透细胞。在荧光显微镜下观察发现, DsRed 比 GFP 更加明亮, 对光的漂白抵抗力更强, 有更长的荧光寿命<sup>[20-24]</sup>。因此, 本研究选用了 DsRed 作为报告基因。

BCG 膀胱灌注已经成为膀胱肿瘤辅助治疗的一种重要手段。但仍有一些问题: 其一, 即使进行规范的术后 BCG 膀胱灌注治疗, 仍有 10% ~ 20% 的患者因对 BCG 缺乏免疫应答或反应低下而导致肿瘤复发。其二, 是 BCG 的不良反应问题<sup>[25]</sup>。因此, 国内外学者在不断研究 BCG 治疗膀胱癌的作用机制, 同时提取 BCG 有效成分, 使其既具有 BCG 的免疫调节作用, 又没有或降低不良反应<sup>[26]</sup>。Ag85A 及 Ag85B 是 Ag85 复合体的重要成分, 同时亦是 BCG 培养滤液分泌蛋白的主要成分<sup>[27]</sup>。近年来, 利用 Ag85A DNA 疫苗及 Ag85B DNA 疫苗治疗膀胱肿瘤

越来越受到关注。目前评价免疫治疗药物的疗效,常采用一些免疫相关指标(如:CD4<sup>+</sup>T 细胞数量、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值、IL-2、IFN 等)的升降来判断,这些评价手段的客观性、灵敏度、准确性、特异性较差,不一定能真实反映免疫治疗药物的效果。

在本实验中,成功将红色荧光蛋白基因转染到小鼠膀胱癌 BTT 细胞中,荧光亮度较高,细胞生长状态好,很快到达对数生长期,说明 DsRed-BTT 细胞活力良好。小鼠在肿瘤细胞种植左后肢后的第 3 天,采用活体荧光成像技术就能观察到左后肢的肿瘤,而此时肉眼尚不能观察到,说明荧光成像技术具有灵敏度高的特点,能够早期发现肿瘤。于右后肢肿瘤细胞种植后的第 6 天开始 DNA 疫苗治疗,治疗后 1 周,各治疗组肿瘤细胞荧光强度的差异无统计学意义,但各组肿瘤荧光强度值较治疗开始时明显变大,说明在此阶段,肿瘤细胞迅速分裂,肿瘤迅速生长。于治疗后第 2 周,右后肢肿瘤荧光强度值在 pVAX1-Ag85B 治疗组中最低,与生理盐水组比较,其差别有统计学意义;pVAX1-Ag85A 组与生理盐水组差别无统计学意义。表明从此阶段开始,pVAX1-Ag85B DNA 疫苗对小鼠膀胱癌移植瘤开始发挥明显的免疫治疗作用,且发挥作用时间较 pVAX1-Ag85A DNA 疫苗早。但此阶段,各组小鼠左后肢肿瘤荧光强度值的差别无统计学意义。其原因可能是疫苗需通过激发较强 Th1 型细胞免疫,引起 CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖和 IL-2 及 IFN- $\gamma$  等细胞因子分泌来发挥作用<sup>[13]</sup>,且此作用需要较长的时间才能发挥效应。左后肢的肿瘤较右后肢肿瘤的接种时间晚 3 d,疫苗激发的细胞免疫尚未达到疫苗发挥效应的阈值。于治疗后第 3 周,pVAX1-Ag85A、pVAX1-Ag85B DNA 疫苗都能显著降低移植瘤的荧光强度,显示它们都具有抗肿瘤效应。治疗后第 3 周各组双后肢肿瘤荧光强度总和中,pVAX1-Ag85A DNA 疫苗、pVAX1-Ag85B DNA 疫苗相对于生理盐水组均呈现出明显的免疫治疗效应,但两疫苗在治疗效应的差异上无统计学意义,此与以前的文献<sup>[11]</sup>报道相似。观察肿瘤的远处转移,发现皮下移植瘤转移主要以淋巴结转移为主,pVAX1-Ag85B DNA 疫苗具有明显的抑制肿瘤远处转移的作用,且其作用强于 pVAX1-Ag85A DNA 疫苗。

综上所述,本研究运用活体荧光成像技术获取移植瘤的荧光影像,动态、客观、灵敏、可视化地评估了 Ag85A DNA 疫苗与 Ag85B DNA 疫苗对小鼠膀胱癌移植瘤的抑瘤效应;初步探索出了一种比较客观、特异、准确、灵敏地评价 DNA 疫苗疗效的方法。下

一步将建立小鼠原位膀胱肿瘤模型,进一步评估 Ag85A DNA 疫苗和 Ag85B DNA 疫苗对小鼠膀胱肿瘤的免疫治疗效果。

#### [参考文献]

- [1] Lamm DL. Prophylaxis for recurrent transitional cell carcinoma [J]. *Urology*, 1991, 37(15): 21-23.
- [2] Katz MH, Bouvet M, Takimoto S, et al. Selective anti-metastasis activity of cytosine analog CS2682 in a red fluorescent protein orthotropic model of pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17):5521-5525.
- [3] Helber N, Requena N. Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. [J]. *New Phytol*, 2008, 177(2): 537-548.
- [4] Summer JP, Westerberg NM, Stoddard AK, et al. DsRed as a highly sensitive, selective and reversible fluorescence-based biosensor for both Cu(+) and Cu(2+) ions [J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21(7): 1302-1308.
- [5] Yarbrough D, Wachter RM, Kallio K, et al. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(2): 462-467.
- [6] Davor L, Situmm A, Eterovic D, et al. Immunoprophylactic intravesical application of bacillus Calmette-Gurin after transurethral resection of superficial bladder cancer [J]. *Croat Med J*, 2003, 44(2):187-192.
- [7] Romano M, D'Souza S, Adnet PY, et al. Priming but not boosting with plasmid DNA encoding *mycolyl-transferase* Ag85A from *Mycobacterium tuberculosis* increases the survival time of *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated mice against low dose intravenous challenge with *M. tuberculosis* H37Rv [J]. *Vaccine*, 2006, 24(16): 353-364.
- [8] Parida SK, Huygen K, Ryffel B, et al. Novel bacterial delivery system with attenuated salmonella typhimurium carrying plasmid encoding Mtb antigen 85A for mucosal immunization: establishment of proof of principle in TB mouse model [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1056: 366-378.
- [9] Demissie A, Wassie L, Abebe M, et al. The 62 kilodalton early secreted antigenic target-responsive, asymptomatic contacts of tuberculosis patients express elevated levels of interleukin and reduced levels of gamma interferon [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(5): 2817-2822.
- [10] Dubnau E, Fontant P, Manganello R, et al. *Mycobacterium tuberculosis* genes induced during infection of human macrophages [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(6): 2787-2795.
- [11] Lozes EK, Huygen J, Content O, et al. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA encoding the components of secreted antigen 85 complex [J]. *Vaccine*, 1997, 15(8): 830-833.
- [12] Tollefsen S, Tjelle T, Schneider J, et al. Improve cellular and humoral immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* antigens after intramuscular DNA immunization combined with muscle elec-

- troportion [ J ]. Vaccine, 2002, 20( 27-28 ): 3370-3378.
- [ 13 ] D' Souza S, Rosseels V, Deltis O, *et al.* Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids [ J ]. Infect Immun, 2002, 70( 7 ): 3681-3688.
- [ 14 ] 陆锦玲. 利用非侵入性光学成像技术监测在体肿瘤的生长 [ J ]. 激光生物学报, 2003, 12( 4 ): 382-386.
- [ 15 ] Hoffman RM. Orthotropic metastasis mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic [ J ]. Invest New Drugs, 1999, 1( 7 ): 343-359.
- [ 16 ] Rehemtulla A. Molecular imaging of gene expression and efficacy following adenoviral mediated brain tumor gene therapy [ J ]. Mol Imaging, 2002, 1( 1 ): 43-55.
- [ 17 ] Chaudhuri TR, Mountz JM, Rogers BE, *et al.* Light based imaging of green fluorescent protein positive ovarian cancer xenografts during therapy [ J ]. Gynecol Oncol, 2001, 8( 2 ): 581-589.
- [ 18 ] 曾 星, 杨 明. 绿色荧光蛋白在环磷酸胺处理小鼠胸腺中表达的研究 [ J ]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21( 3 ): 390-391.
- [ 19 ] 李 凌, 武文森, 徐 萍, 等. 一种新的高转移膀胱癌动物模型的建立 [ J ]. 中华实验外科杂志, 2005, 19( 1 ): 78-79.
- [ 20 ] Dmitrienko DV, Vrzhesch EP, Drutsa VL, *et al.* Red fluorescent protein DsRed: parameterization of its chromospheres as an amino acid residue for computer modeling in the OPLSAA force field [ J ]. Biochemistry ( Mosc ), 2006, 71( 10 ): 1133-1152.
- [ 21 ] Swanson CI, Hinrichs T, Johnson LA, *et al.* A directional recombination cloning system for restriction and ligation-free construction of GFP, DsRed and lacZ transgenic drosophila reporters [ J ]. Gene, 2008, 408( 1-2 ): 180-186.
- [ 22 ] Janus D, Hoff B, Hofmann E, *et al.* An efficient fungal RNA-silencing system using the DsRed reporter gene [ J ]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73( 3 ): 962-970.
- [ 23 ] 张美蓉, 陈玉琳. 红色荧光标记载体 pBacA4DsRed 的构建及其在蚕卵中的瞬时表达 [ J ]. 农业生物技术学报, 2007, 1( 2 ): 346-347.
- [ 24 ] 刘 晶, 韩国梁, 杨晓峰, 等. Ag85A 和 Ag85B DNA 疫苗对大鼠膀胱癌免疫治疗的效果 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15( 2 ): 144-149.
- [ 25 ] 杨晓峰, 张晓俊, 王 鹏, 等. Ag85A 与 Ag85B DNA 疫苗联合免疫对移植性鼠膀胱肿瘤的免疫调节效应 [ J ]. 现代泌尿外科杂志, 2009, 14( 1 ): 8-11.
- [ 26 ] D'Souza S, Romano M, Korf J, *et al.* Partial reconstitution of the CD4<sup>+</sup> T cell compartment in CD4 gene knockout mice restores responses to tuberculosis DNA vaccines [ J ]. Infect Immun, 2006, 74( 5 ): 2751-2759.
- [ 27 ] Rosseels V, Marche S, Roupie V, *et al.* Members of the 30- to 32-kilodalton mycolyl transferase family ( Ag85 ) from culture filtrate of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis are immunodominant Th1-type antigens recognized early upon infection in mice and cattle. [ J ]. Infect Immun, 2006, 74( 1 ): 20-22.
- [ 收稿日期 ] 2009 - 10 - 08 [ 修回日期 ] 2009 - 11 - 12
- [ 本文编辑 ] 徐红梅

## · 科技动态 ·

### 细胞因子 IL-21 在慢性感染和 T 细胞衰竭中的作用

HBV、HCV 和 HIV 等病毒的慢性感染长期困扰着免疫学家。病毒特异性 CTL 细胞( cytotoxic T lymphocytes )的衰竭被认为是机体不能有效清除病毒的重要机制,即 CTL 细胞功能耗竭,处于一种不反应的状态,不能增殖,不能分泌细胞因子( IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等)和杀伤感染细胞。在这过程中,如果缺失了 CD4<sup>+</sup> T 细胞将导致更加严重的 CTL 细胞衰竭,然而其具体机制还不清楚。论文作者研究发现,在慢性感染中,CD4<sup>+</sup> T 细胞分泌的 IL-21 能够作用于 CD8<sup>+</sup> T 细胞,促进其增殖,从而维持长期有效的抗病毒免疫。

该研究以 LCMV 感染为模型,首先比较了野生型和 IL21R<sup>-/-</sup>小鼠在慢性感染过程中 CD8<sup>+</sup> T 细胞反应的动态变化。结果发现在感染的急性期,两者都能激发有效的抗病毒 CTL 细胞产生,但是在急性期之后,CTL 细胞在野生型小鼠能够持续存在,而在 IL21R<sup>-/-</sup>小鼠数量却不断减少,且伴随着血清和各脏器中病毒滴度的相应增加。通过构建野生型和 IL21R<sup>-/-</sup>嵌合体小鼠,作者进一步证实了 IL21R<sup>-/-</sup>的病毒特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞在感染急性期之后迅速减少;利用 BrdU 掺入实验阐明了这种数量的减少是由于这些 CTL 细胞不能进一步增殖,而不是因为凋亡增加。PD-1 在 CTL 细胞表面的表达和机体抑制性细胞因子 IL-10 的升高被认为与 CD8<sup>+</sup> T 细胞的衰竭密切相关,但是在 IL21R<sup>-/-</sup>小鼠并没有观察到 PD-1 或者 IL-10 表达的增加,表明 IL-21 是一种新的能够抑制 T 细胞衰竭和控制慢性感染的重要信号分子。最后又通过细胞因子染色分析,阐明了分泌 IL-21 的主要是 CD4<sup>+</sup> T 细胞,并且其分泌量随着感染的进程不断增加,正好与 IL-21 主要作用于慢性感染的后期相吻合。

该论文首次揭示了在慢性感染中 CD4<sup>+</sup> T 细胞辅助 CD8<sup>+</sup> T 细胞有效控制感染的具体机制,这将为抗原持续存在的慢性感染和肿瘤等疾病的治疗提供新的靶点。然而,这种分泌 IL-21 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞与 Th17 细胞和 Tfh 细胞( follicular helper T cell )之间存在什么样的关系还有待于进一步研究。

[ 徐 胜 摘译,韩岩梅 审阅. Frohlich A, Kisielow J, Schmitz I, *et al.* Science, 2009, 324: 1576-1580. ]