

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.03.002

小鼠 *PRL-3* 表达载体的构建及对乳腺癌 D2F2 细胞小鼠移植瘤的治疗作用

曹燕飞^{1,2}, 吕娟^{1,3}, 黄昊¹, 寿成超¹(1. 北京大学肿瘤医院 北京市肿瘤防治研究所 生物化学与分子生物学研究室, 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室, 北京 100142; 2. 长治医学院 生物化学教研室, 山西 长治 046000; 3. 首都医科大学 附属北京朝阳医院 检验科, 北京 100020)

[摘要] **目的:**探讨靶向小鼠肝细胞再生磷酸酶-3(mouse phosphatase of regenerating liver-3, *mPRL-3*)的 DNA 疫苗对小鼠乳腺癌 D2F2 细胞体内生长的抑制作用。**方法:**构建靶向 *mPRL-3* 的真核表达载体 pVAX1-*mPRL-3*, 并转染至鹌鹑肌成纤维细胞 QM7 内, Western blotting 检测 *mPRL-3* 蛋白在 QM7 细胞中的表达; 通过重组慢病毒 Lv-*mPRL-3* 或对照载体 Lv-Ctrl 感染小鼠乳腺癌 D2F2 细胞, 分别建立高表达 *mPRL-3* 的 *mPRL-3*-D2F2 细胞或对照 NC-D2F2 细胞, Western blotting 检测小鼠乳腺癌 D2F2 细胞中 *mPRL-3* 蛋白的表达。BALB/c 小鼠左侧乳腺脂肪垫下分别接种 *mPRL-3*-D2F2 和 NC-D2F2 细胞后, 通过基因枪接种 pVAX1-*mPRL-3* 疫苗(*mPRL-3*-D2F2/pVAX1-*mPRL-3*), 同时设立疫苗对照组(*mPRL-3*-D2F2/pVAX1-Ctrl)和细胞对照组(NC-D2F2/pVAX1-*mPRL-3*), 检测小鼠的肿瘤体积及生存期。**结果:**pVAX1-*mPRL-3* 质粒经酶切鉴定及测序验证均正确, 并在 QM7 细胞中表达。Western blotting 检测结果显示, 慢病毒感染的 *mPRL-3*-D2F2 细胞中 *mPRL-3* 蛋白过表达, 而 NC-D2F2 细胞中不表达 *mPRL-3* 蛋白。荷瘤小鼠经 pVAX1-*mPRL-3* DNA 疫苗免疫, 其肿瘤体积明显低于对照组[(835.3 ± 509.8) vs (1543.0 ± 578.4) mm³, $P < 0.01$], 且 pVAX1-*mPRL-3* 疫苗能显著延长荷瘤小鼠的生存期(中位生存期 55.5 vs 38 d, $P < 0.05$)。**结论:**基因枪接种的靶向 *mPRL-3* 的 DNA 疫苗能抑制高表达 *mPRL-3* 的小鼠乳腺癌 D2F2 细胞移植瘤的生长, 并延长荷瘤小鼠生存期, 提示其对 *mPRL-3* 阳性肿瘤有潜在的治疗作用。

[关键词] 小鼠肝细胞再生磷酸酶-3; 小鼠; 乳腺癌; D2F2 细胞; DNA 疫苗; 基因枪

[中图分类号] R737.9; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2013)03-0266-06

Construction of mouse *PRL-3* expression vector and its therapeutic effects on breast cancer D2F2 cell xenografts in mice

Cao Yanfei^{1,2}, Lü Juan^{1,3}, Huang Hao¹, Shou Chengchao¹(1. Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research of Ministry of Education, Institute of Tumor Prevention and Treatment of Beijing, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Cancer Hospital of Peking University, Beijing 100142, China; 2. Department of Biochemistry, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Beijing Chaoyang Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100020, China)

[Abstract] **Objective:**To explore the inhibitory effect of mouse phosphatase of regenerating liver-3 (*mPRL-3*)-targeted DNA vaccine on the growth of mouse breast cancer D2F2 cells *in vivo*. **Methods:**The eukaryotic expression vector pVAX1-*mPRL-3* targeting *mPRL-3* was constructed and transfected into quail fibroblasts QM7 cells. The *mPRL-3* protein expression in QM7 cells was detected by Western blotting. D2F2 mouse breast cancer cells were infected with recombinant lentivirus (Lv-*mPRL-3*) or control vector (Lv-Ctrl) to generate cells expressing *mPRL-3* (*mPRL-3*-D2F2) or control cells (NC-D2F2), and the expression of *mPRL-3* protein in mouse breast cancer D2F2 cells was analyzed by Western blotting. The *mPRL-3*-D2F2 and NC-D2F2 cells were respectively inoculated into BALB/c mice's left mammary fat pad, then the BALB/c mice were immunized with pVAX1-*mPRL-3* DNA vaccine (*mPRL-3*-D2F2/pVAX1-*mPRL-3*) by gene gun, and

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2009CB521805)。Project supported by the National Key Basic Research Development Program (973 Program) of China (No. 2009CB521805)

[作者简介] 曹燕飞(1975-),女,山西省原平市人,硕士,讲师,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。E-mail:caoyfcsu1023@163.com

[通信作者] 寿成超(Shou Chengchao, corresponding author), E-mail: cshou@vip.sina.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130605.0922.003.html>

mPRL-3-D2F2/pVAX1-Ctrl and NC-D2F2/pVAX1-mPRL-3 were set as controls. The volume of tumor and the survival time of mice were monitored. **Results:** The eukaryotic expression vector pVAX1-mPRL-3 was identified by enzymatic digestion and DNA sequencing and the expression of mPRL-3 protein in QM7 cells was also confirmed. Western blotting assay results showed that the over-expression of mPRL-3 protein was detected in mPRL-3-D2F2, but not in NC-D2F2 cells. The tumor volume of the tumor-bearing mice immunized with pVAX1-mPRL-3 vaccine was significantly lower than that of the control group ($[835.3 \pm 509.8]$ vs $[1543.0 \pm 578.4]$ mm³, $P < 0.01$). The pVAX1-mPRL-3 vaccination could significantly prolong the survival time of the tumor bearing mice (median survival time: 55.5 vs 38 d, $P < 0.05$). **Conclusion:** *PRL-3*-targeted vaccination mediated by gene gun can inhibit the growth of mouse breast cancer D2F2 cell xenografts expressing *mPRL-3*, which could be a potential therapy strategy for *PRL-3* positive tumor.

[**Key words**] mouse phosphatase of regenerating liver-3(*mPRL-3*); mouse; breast cancer; D2F2 cell; DNA vaccine; gene gun

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 266-271]

肝细胞再生磷酸酶-3(phosphatase of regenerating liver-3, *PRL-3*)是蛋白酪氨酸磷酸酶 PTP 家族的成员之一,又名 *PTP4A3*, 编码蛋白的相对分子质量约 22 000^[1]。小鼠源 *PRL-3* (*mPRL-3*)与人源 *PRL-3* 氨基酸序列具有 96% 的同源性^[2]。近年来的大量研究^[3-8]表明, *PRL-3* 在多种癌症中高表达,且能促进肿瘤细胞侵袭与转移,高表达 *PRL-3* 的肿瘤患者预后较差,表明 *PRL-3* 与肿瘤的发生、发展密切相关,有可能是肿瘤治疗的潜在靶点。

目前,通过抑制 *PRL* 活性用以控制肿瘤生长的制剂主要为小分子抑制剂和抗体^[9],而通过 *PRL-3* DNA 疫苗免疫抗肿瘤的研究尚处起步阶段。众所周知,基因疫苗或称 DNA 疫苗,是近年来发展起来的新型疫苗,它通过基因重组技术,将编码某种蛋白抗原的外源基因导入动物体内,通过宿主细胞的转录系统合成抗原蛋白,诱导宿主产生对该抗原蛋白的一系列特异性免疫应答,从而达到预防和治疗疾病的目的^[10]。DNA 疫苗以其安全性、灵活性、稳定性和易于生产、保存、运输及能有效诱导抗原特异性 T、B 细胞应答等特点日渐成为抗原特异性免疫疗法的理想途径之一^[11-12]。为探讨 *PRL-3* DNA 疫苗在抑制肿瘤生长中的作用,本研究构建了 *mPRL-3* 的真核表达载体,在证实其能表达分泌 *mPRL-3* 的基础上,通过基因枪免疫的方法探讨 *mPRL-3* DNA 疫苗对高表达 *PRL-3* 的小鼠乳腺癌的治疗作用,以期 *PRL-3* DNA 疫苗在肿瘤治疗中的应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及主要试剂

小鼠乳腺癌 D2F2 细胞(RPMI 1640 培养基 + 10% FBS 中培养)、小鼠高转移黑素瘤 B16-F10 细

胞(RPMI 1640 培养基 + 10% FBS 中培养)和鹤鹑肌成纤维细胞 QM7(M199 培养基 + 10% FBS + 胰蛋白白磷酸盐肉汤 10% + 2 mmol/L 谷氨酰胺 + 0.5% 鸡胚渗出液中培养)均由本室冻存,培养基和 FBS 购自美国 Gibco 公司。真核表达载体 pVAX1、TRIzol 试剂和脂质体转染试剂 LipofectamineTM 2000 均购自美国 Invitrogen 公司, pVAX1-B(含信号肽 IgK)重组质粒^[13]及 BL21 大肠杆菌菌株由本室保存。SYBR green real-time PCR 试剂盒购自日本 TOYOBO 公司, 2 × Taq plus PCR master mix 试剂购自天根生化科技(北京)有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自美国 Qiagen 公司, 反转录 PCR 试剂盒(ImProm- IITM Reverse Transcription System)购自美国 Promega 公司。限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 购自美国 New England Biolab 公司, 质粒大量提取纯化试剂盒购自北京威格拉斯生物技术公司, 增强化学发光 ECL 试剂盒购自美国 Pierce 公司, 鼠 *PRL-3* 单克隆抗体(sc-130355)购自美国 Santa Cruz 生物公司, HRP 标记的羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥公司。重组慢病毒(lentivirus, Lv)Lv-*mPRL-3* 及对照 Lv-Ctrl 均由上海吉玛制药技术有限公司定制、包装和提供。

1.2 仪器设备
Gene Genius 全自动凝胶成像分析系统购自英国 Syngene 公司, TCS SP2 激光共聚焦显微镜及 Leica Confocal Software 2.00 Build 0585 图像处理软件购自德国 Leica 公司, Step One real-time PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司, 基因枪(Model Heliostm System)购自美国 Bio-Rad 公司。高压氦气和高压氮气由本所提供。

1.3 *mPRL-3* 真核表达载体的构建

依据 GenBank 中 *mPRL-3* 的 DNA 序列(BC027445)设计引物, 分别在上、下游引物的 5' 端

引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点并加保护碱基, 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 预期扩增产物长度为 538 bp。引物上游序列为 5'-GGGGATC-CATGGCCCCGCATGAACCGGC-3'; 下游序列为 5'-AT-GAATTCCTACATGACGCAGCATCTGG-3'。提取表达 *mPRL-3* 的小鼠黑素瘤 B16-F10 细胞总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书进行反转录获得 cDNA, 以 cDNA 产物为模板行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 33 个循环。取 PCR 产物以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。取 pVAX1-B 重组质粒(含 IgK 信号肽)和 *mPRL-3* 的扩增产物, 分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行酶切消化, 常规电泳分离, DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收载体大片段和目的片段。取上述纯化产物 16 °C 连接过夜, 将连接产物转化大肠杆菌, 在 LB 琼脂平板(含卡那霉素 50 μg/ml)中培养过夜, 次日挑选菌落扩增培养, 然后进行质粒提取、酶切鉴定及测序。含目的片段的重组质粒 pVAX1-*mPRL-3* 和对照空载质粒 pVAX1-Ctrl 经常规转化、大量提取并纯化定量后备用。

1.4 Western blotting 检测 *mPRL-3* 蛋白的表达

取对数生长期鹤鹑肌成纤维细胞 QM7, 按 Lipofectamine™ 2000 说明书行 pVAX1-*mPRL-3* 真核表达质粒常规转染。转染 48 h 后, 分别收集培养上清及细胞, 用 RIPA 细胞裂解液(按 1:500 加入 DTT, 1:100 加入蛋白酶抑制剂)裂解细胞, 提取总蛋白, 通过 Western blotting 检测 *mPRL-3* 蛋白的表达及分泌。

1.5 过表达 *mPRL-3* 小鼠乳腺癌 D2F2 细胞的制备

按照慢病毒包装说明书进行预实验确定重组慢病毒 Lv-*mPRL-3* 和对照载体 Lv-Ctrl 的最佳感染复数(multiply of infection, MOI)。取对数生长期 D2F2 细胞接种于 6 孔板, 每孔 5×10^4 个细胞, 按 MOI = 200 分别加入 Lv-*mPRL-3* 和 Lv-Ctrl 各 3 孔, 培养 60 ~ 72 h 后收集细胞, 扩大培养, 分别为过表达 *mPRL-3* 的小鼠乳腺癌 *mPRL-3*-D2F2 细胞和对照 NC-D2F2 细胞。

1.6 Real-time PCR 检测 *mPRL-3*-D2F2 和 NC-D2F2 细胞 *PRL-3* mRNA 的表达

通过 real-time PCR 检测 *mPRL-3*-D2F2 及对照 NC-D2F2 细胞中 *mPRL-3* 的表达水平。常规提取 NC-D2F2 和 *mPRL-3*-D2F2 细胞的总 RNA, 逆转录成 cDNA。RT-PCR 引物序列如下: *mPRL-3* 上游引物为 5'-CTTCTTCATCACCCACAACC-3', 下游引物为 5'-TACATGACGCAGCATCTGG-3'; 内参基因 *mGAPDH*

上游引物为 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3', 下游引物为 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'。Real-time PCR 反应条件为 95 °C、10 min, 95 °C、15 s, 60 °C、20 s, 72 °C、30 s, 40 个循环; 72 °C、5 min, 95 °C、15 s; 反应结束后绘制溶解曲线, 检测反应产物的特异性。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 *mPRL-3* mRNA 的相对表达量。

1.7 Western blotting 检测 *mPRL-3*-D2F2 和 NC-D2F2 细胞中 *mPRL-3* 蛋白的表达

收集 NC-D2F2 和 *mPRL-3*-D2F2 细胞各 4×10^7 个, 加入 RIPA 裂解液(按 1:500 加入 DTT, 1:100 加入蛋白酶抑制剂)裂解细胞, 提取总蛋白, 行 12% SDS-PAGE。冰浴转膜, 室温封闭 2 h, 加入鼠 *PRL-3* 一抗, 4 °C 过夜; PBST 洗膜 5 次, 5 min/次; 加 HRP 标记的羊抗鼠二抗(1:2000), 室温反应 45 min; PBST 洗膜 5 次, 5 min/次, 加 ECL 发光液, 于暗室中显影定影。

1.8 小鼠乳腺癌模型的建立及基因枪 DNA 免疫

SPF 级 BALB/c 小鼠(实验动物合格证号: 0259618), 雌性, 6 ~ 8 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 由北京大学肿瘤医院动物室饲养。BALB/c 小鼠随机分为 3 组, 每组 6 只, 在左侧乳腺脂肪垫下接种小鼠乳腺癌 NC-D2F2 或 *mPRL-3*-D2F2 细胞, 接种细胞数为 2×10^5 /鼠, 100 μl。待触及肿瘤后, 通过基因枪以真核表达质粒实施 DNA 免疫治疗。实验分组和免疫方案见表 1。

表 1 实验分组和免疫方案

Tab. 1 Groups of experiments and immunization scheme

Group	Tumor challenge	DNA vaccine
<i>mPRL-3</i> -D2F2/ pVAX1- <i>mPRL-3</i>	<i>mPRL-3</i> -D2F2	pVAX1- <i>mPRL-3</i>
<i>mPRL-3</i> -D2F2/ pVAX1-Ctrl	<i>mPRL-3</i> -D2F2	pVAX1-Ctrl
NC-D2F2/ pVAX1- <i>mPRL-3</i>	NC-D2F2	pVAX1- <i>mPRL-3</i>

按 BIO-RAD Helio 基因枪说明制备 pVAX1-*mPRL-3* 和 pVAX1-Ctrl 子弹, 1.2 μg 质粒/子弹。按照基因枪免疫方法^[13], 质粒用量为 2.4 μg/(鼠·次), 在接种肿瘤后 7 d 免疫, 间隔 1 周再次免疫。NC-D2F2、*mPRL-3*-D2F2 细胞经小鼠左侧乳腺脂肪垫注射后 14 d 起, 每隔 8 d 观察瘤体生长情况, 游标卡尺测量肿瘤长短径, 计算肿瘤体积[$V(\text{mm}^3) = \text{长径}(\text{mm}) \times \text{短径}(\text{mm})^2/2$], 绘制肿瘤生长曲线。记

录小鼠生存情况,绘制肿瘤生存曲线。

1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad Prism 5 统计软件,组间比较采用方差分析 (Two-way ANOVA),Kaplan-Meier 法绘制生存曲线并用 Log-rank test 分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 pVAX1-mPRL-3 重组质粒

构建的重组质粒 pVAX1-mPRL-3 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,酶切后 pVAX1-mPRL-3 呈线性条带(双酶切得到约 3 kb 和 540 bp 的片段),未见其他杂带,提示 pVAX1-mPRL-3 重组质粒构建成功(图 1)。测序结果显示,pVAX1-mPRL-3 中插入片段与 GenBank 的 *mPRL-3* 序列相一致且无突变,进一步证明重组载体 pVAX1-mPRL-3 构建成功。

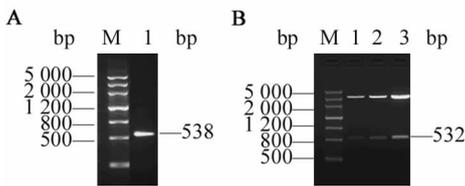


图 1 重组质粒 pVAX1-mPRL-3 的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pVAX1-mPRL-3

A: Amplification products of the mPRL-3;

B: pVAX1-mPRL-3 digested with *Bam*H I and *Eco*R I

M: Marker; 1-3: pVAX1-mPRL-3

2.2 转染 pVAX1-mPRL-3 后 QM7 细胞中 mPRL-3 蛋白的表达

为使 pVAX1-mPRL-3 在真核细胞中表达,在构建 pVAX1-mPRL-3 质粒中引入了 IgK 信号肽序列^[13]。pVAX1-mPRL-3 与 pVAX1-Ctrl 分别经 Lipofectamine™ 2000 转染 QM7 细胞 48 h 后,收集细胞与培养上清,Western blotting 结果(图 2)显示,转染了重组质粒 pVAX1-mPRL-3 的 QM7 细胞及其培养上清中有 mPRL-3 蛋白表达,而转染 pVAX1-Ctrl 的细胞和正常 QM7 细胞中没有表达。结果提示,pVAX1-mPRL-3 质粒在 QM7 细胞中能够表达和分泌。

2.3 过表达 mPRL-3 小鼠乳腺癌细胞的制备及鉴定

按 MOI = 200 将慢病毒 Lv-mPRL-3 感染 D2F2 细胞,制备过表达 mPRL-3 的 mPRL-3-D2F2 细胞和

对照 NC-D2F2 细胞。图 3 A 中绿色荧光代表 GFP,显示感染效率达到 90% 以上;图 3 B、C 显示,mPRL-3-D2F2 细胞无论在 mRNA 还是在蛋白水平,均已有外源 mPRL-3 的高表达。

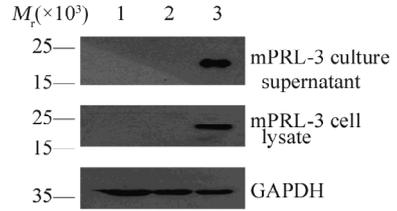
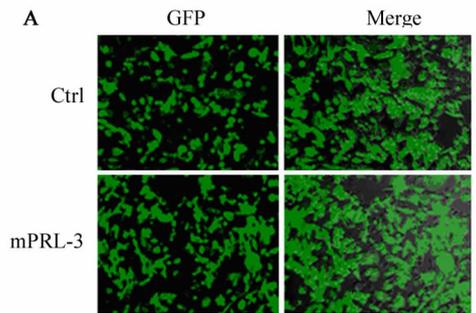


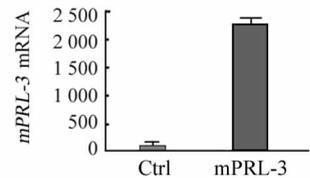
图 2 pVAX1-mPRL-3 转染后 QM7 细胞中 mPRL-3 蛋白的表达

Fig. 2 mPRL-3 protein expression in QM7 cells after pVAX1-mPRL-3 transfection

1: Untransfected; 2: pVAX1-Ctrl; 3: pVAX1-mPRL-3



B



C

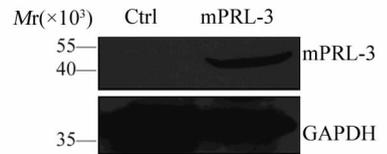


图 3 过表达 mPRL-3 小鼠乳腺癌 D2F2 细胞的制备与鉴定

Fig. 3 Establishment and identification of mouse breast cancer D2F2 cells over-expressing mPRL-3

A: Infection efficiency of mouse breast cancer D2F2 cells with lentivirus; B: Relative expression of *mPRL-3* mRNA; C: mPRL-3 protein expression in D2F2 cells by Western blotting analysis

2.4 DNA 疫苗免疫抑制移植瘤的生长和延长荷瘤小鼠生存时间

荷瘤 mPRL-3-D2F2 小鼠经 pVAX1-mPRL-3

DNA 疫苗治疗(mPRL-3-D2F2/pVAX1-mPRL-3)后, 其肿瘤体积增长速度较疫苗及细胞对照组明显减慢, 荷瘤 30 d 后, 其肿瘤大小明显小于疫苗对照组(mPRL-3-D2F2/pVAX1-Ctrl) [(835. 3 ± 509. 8) vs (1 492. 7 ± 552. 8), $P < 0. 05$] 和细胞对照组(NC-D2F2/pVAX1-mPRL-3) [(835. 3 ± 509. 8) vs

(1 543. 0 ± 578. 4), $P < 0. 01$], 而且小鼠生存期明显长于疫苗及细胞对照组(中位生存期: 55. 5 vs 39. 0, 38. 0 d, 均 $P < 0. 05$) (图 4B、表 2)。以上结果提示, pVAX1-mPRL-3 DNA 疫苗能够明显抑制高表达 mPRL-3 乳腺肿瘤 D2F2 细胞的生长, 并显著延长荷瘤小鼠的生存时间。

表 2 DNA 疫苗抑制小鼠乳腺癌移植瘤的生长和延长荷瘤小鼠的中位生存期(V/mm^3)
Tab. 2 DNA vaccine inhibited the growth of mouse breast cancer xenografts and prolonged the median survival time of tumor-bearing mice

Group	Time after tumor challenge (t/d)			Median survival time(t/d)
	14	22	30	
mPRL-3-D2F2/pVAX1-mPRL-3	142. 5 ± 59. 3	421. 9 ± 370. 3 *	835. 3 ± 509. 8 * ^{△△}	55. 5 *
mPRL-3-D2F2/pVAX1-Ctrl	216. 3 ± 35. 5	1 060. 2 ± 608. 6	1 492. 7 ± 552. 8	39. 0
NC-D2F2/pVAX1-mPRL-3	228. 1 ± 53. 2	1 009. 9 ± 541. 1	1 543. 0 ± 578. 4	38. 0

* $P < 0. 05$ vs mPRL-3-D2F2/pVAX1-Ctrl or NC-D2F2/pVAX1-mPRL-3; ^{△△} $P < 0. 01$ vs NC-D2F2/pVAX1-mPRL-3

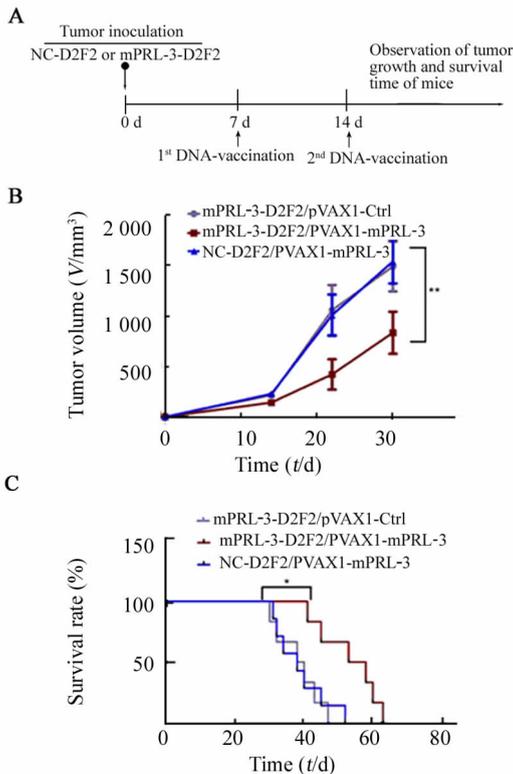


图 4 mPRL-3 DNA 免疫治疗对荷瘤 mPRL-3-D2F2 小鼠肿瘤体积及生存期的影响

Fig. 4 Impact of mPRL-3 DNA vaccination on tumor volume and survival time of tumor-bearing mPRL-3-D2F2 mice

A: Procedure of inoculation tumor cells and DNA immunization;
B: Growth curve of breast tumors;
C: Survival curve of tumor-bearing mice

3 讨论

本研究通过 RT-PCR 法克隆了 mPRL-3, 并构建了真核表达质粒 pVAX1-mPRL-3, 体外实验证实, 该质粒能够在真核细胞中表达并分泌。该 mPRL-3 DNA 疫苗可显著减缓过表达 mPRL-3 的小鼠乳腺癌 D2F2 细胞的生长, 并显著延长荷瘤小鼠的生存期。

研究^[15-16]表明, PRL-3 小鼠单克隆抗体可以特异抑制 PRL-3 高表达卵巢癌细胞系 A2780 的生长, 而不能抑制 PRL-3 低表达的小鼠结肠癌细胞系 CT26 的生长; 研究^[17]进一步发现, PRL-3 特异性人/鼠嵌合单抗亦可有效减少内源性高表达 PRL-3 的 B16-F0、A2780 和 HCT-116 肿瘤细胞在裸鼠中肺转移灶的形成。以上研究从抗体治疗的角度提示, PRL-3 抗体对高表达 PRL-3 的肿瘤生长和转移起抑制作用, 但应用 DNA 疫苗免疫的方法能否抑制高表达 PRL-3 肿瘤的生长, 目前尚处探索阶段。

本研究中, 首先从含 mPRL-3 的 DNA 疫苗构建着手, 对该 DNA 疫苗优化策略首先表现在对 pVAX1 真核表达载体改造上, 在载体结构中引入了 Kozak 序列和 IgK 信号肽。Kozak 序列有利于提高基因在哺乳细胞中的表达水平; IgK 信号肽可以提高 mRNA 稳定性及蛋白翻译效率, 而且可以将表达的蛋白指引到内质网, 从而促进体液免疫和 CD8⁺ T 细胞应答^[11, 18]。其次, 通过慢病毒感染的方式构建了高表达 mPRL-3 的乳腺癌 D2F2 细胞, 并通过基因枪高压氦气轰击小鼠腹部皮肤将包被有 pVAX1-

mPRL-3 DNA 疫苗的均质金粉颗粒导入机体,这一免疫方法可以将 DNA 疫苗导入 DC,实现抗原的直接提呈,也可以将 DNA 导入非免疫细胞(如皮肤角细胞、肌细胞等),利用这些细胞自身的蛋白合成体系合成外源抗原,从而以外源性蛋白的形式提呈给 DC,实现间接提呈^[18]。有效的 DNA 转运系统可以在对机体无明显副作用的前提下将抗原提呈给最适宜的细胞,从而达到最佳的免疫效应,这样肿瘤抗原可以以合适的分子形式从编码全长蛋白的 DNA 中翻译加工提呈,诱导抗体的产生,或截短为 MHC I 或 II 型肽,诱导 T 细胞免疫^[20-21]。本研究结果提示,表达 mPRL-3 的 DNA 疫苗对高表达 mPRL-3 的乳腺肿瘤生长具有明显的抑制效应,并能显著延长荷瘤小鼠的生存期,但体液免疫检测发现,小鼠外周血中抗 mPRL-3 抗体并未出现明显升高(数据未显示),提示体液免疫在抑瘤方面并非占主导地位。

本研究以 mPRL-3 为靶点,采用 DNA 免疫方式抑制肿瘤生长取得了较好的效果,为 PRL-3 DNA 疫苗在肿瘤治疗中的应用提供了一定的实验依据,并为后续工作奠定了一定基础,但 PRL-3 DNA 疫苗治疗肿瘤的分子和细胞机制尚不明确,有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Zeng Q, Hong W, Tan YH. Mouse PRL-2 and PRL-3, two potentially prenylated protein tyrosine phosphatases homologous to PRL-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 244(2): 421-427.
- [2] Li J, Guo K, Koh VW, et al. Generation of PRL-3 and PRL-1 specific monoclonal antibodies as potential diagnostic markers for cancer metastases [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(6): 2195-2204.
- [3] Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer [J]. *Science*, 2001, 294(5545): 1343-1346.
- [4] Bessette DC, Qiu D, Pallen CJ. PRL PTPs: Mediators and markers of cancer progression [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27(2): 231-252.
- [5] Rios P, Li X, Köhn M. Molecular mechanisms of the PRL phosphatases [J]. *FEBS J*, 2013, 280(2): 505-524.
- [6] Wang L, Peng L, Dong B, et al. Overexpression of phosphatase of regenerating liver-3 in breast cancer: Association with a poor clinical outcome [J]. *Ann Oncol*, 2006, 17(10): 1517-1522.
- [7] Ren T, Jiang B, Xing X, et al. Prognostic significance of phosphatase of regenerating liver-3 expression in ovarian cancer [J]. *Pathol Oncol Res*, 2009, 15(4): 555-560.
- [8] Xing X, Peng L, Qu L, et al. Prognostic value of PRL-3 overexpression in early stages of colonic cancer [J]. *Histopathology*, 2009, 54(3): 309-318.
- [9] Al-Aidaros AQ, Zeng Q. PRL-3 phosphatase and cancer metastasis [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(5): 1087-1098.
- [10] 萨仁高娃,毕力夫,吴岩. 肿瘤疫苗的研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(6): 644-647.
- [11] Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: Ready for prime time? [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(10): 776-788.
- [12] Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, et al. DNA vaccines: Developing new strategies against cancer [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 174378-174393.
- [13] 孟麟,姜北海,赵薇,等. SNCG 真核表达质粒的构建、分泌表达与免疫活性初步鉴定 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2010, 27(3): 626-630.
- [14] Qin H, Zhou C, Wang D, et al. Enhancement of antitumour immunity by a novel chemotactic antigen DNA vaccine encoding chemokines and multipeptides of prostate-tumour-associated antigens [J]. *Immunology*, 2006, 117(3): 419-430.
- [15] Guo K, Tang JP, Tan CP, et al. Monoclonal antibodies target intracellular PRL phosphatases to inhibit cancer metastases in mice [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(5): 750-757.
- [16] Guo K, Li J, Tang JP, et al. Targeting intracellular oncoproteins with antibody therapy or vaccination [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(99): 99ra85.
- [17] Guo K, Tang JP, Jie L, et al. Engineering the first chimeric antibody in targeting intracellular PRL-3 oncoprotein for cancer therapy in mice [J]. *Oncotarget*, 2012, 3(2): 158-171.
- [18] Stevenson FK, Ottensmeier CH, Johnson P, et al. DNA vaccines to attack cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(Suppl 2): 14646-14652.
- [19] Stoitzner P, Tripp CH, Eberhart A, et al. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(20): 7783-7788.
- [20] Rice J, Ottensmeier CH, Stevenson FK. DNA vaccines: Precision tools for activating effective immunity against cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(2): 108-120.
- [21] Signori E, Iurescia S, Massi E, et al. DNA vaccination strategies for anti-tumour effective gene therapy protocols [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(10): 1583-1591.

[收稿日期] 2013-03-15

[修回日期] 2013-04-20

[本文编辑] 周玲琳

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅