

· 论 著 ·

前列腺特异性膜抗原、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子双顺反子 DNA 疫苗的构建及其免疫活性的测定

黄云腾, 叶传忠*, 陈 方, 齐 隽

(上海交通大学医学院附属新华医院泌尿外科, 上海 200092)

[摘要] **目的:** 构建前列腺特异性膜抗原(PSMA)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)核酸疫苗并测定其免疫活性。**方法:** 应用 DNA 疫苗载体 pIRES 构建 pIRES-PSMA-mGM-CSF、pIRES-PSMA、pIRES-mGM-CSF 重组质粒, 酶切鉴定正确后与 pIRES 空质粒分别免疫 C56BL/6 小鼠(每组 15 只), LDH 释放试验测定各自免疫后小鼠的特异性细胞毒性 T 细胞(CTL)杀伤活性。**结果:** 成功构建上述重组质粒; pIRES-PSMA-mGM-CSF 免疫后小鼠特异杀伤率最高, pIRES-PSMA、pIRES-mGM-CSF 次之, pIRES 空质粒最差($P < 0.05$), 各组杀伤效果以效靶比为 10:1 时最高。**结论:** PSMA 及 mGM-CSF 双顺反子 DNA 疫苗有望在前列腺癌的基因治疗中发挥积极的作用。

[关键词] 前列腺特异性膜抗原; 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; 疫苗, DNA

[中图分类号] R 737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0837-05

Construction of bicistronic DNA vaccine expressing prostate-specific membrane antigen and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and determination of its activity

HUANG Yun-teng, YE Chuan-zhong*, CHEN Fang, QI Juan (Department of Urology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct DNA vaccines expressing prostate-specific membrane antigen (PSMA) and/or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and to determine their immunoactivity. **Methods:** Recombinant plasmids pIRES-PSMA-mGM-CSF, pIRES-PSMA, and pIRES-mGM-CSF were constructed with DNA vaccine vector pIRES. After identified by endonuclease digestion, the above 3 plasmids and blank pIRES vector were used to immunize C56BL/6 mice ($n=15$). LDH release assay was used to exam the cytotoxicity of cytolytic T lymphocytes in each group. **Results:** We successfully constructed the above mentioned recombinant plasmids. Mice in pIRES-PSMA-mGM-CSF immunized group had the highest specific cytotoxicity, followed by pIRES-PSMA and pIRES-mGM-CSF immunized groups. The blank pIRES group had the lowest cytotoxicity ($P < 0.05$). The cytotoxicity was the highest in all 4 groups at an effector/target ratio of 10/1. **Conclusion:** The bicistronic DNA vaccine expressing PSMA and mGM-CSF may have a promising therapeutic value in gene therapy of prostate cancer.

[KEY WORDS] prostate-specific membrane antigen; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; vaccine, DNA

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8): 837-841]

核酸疫苗(DNA 疫苗)是近年来免疫学研究的一个热点,它为肿瘤和传染病疫苗研制带来了新的希望^[1]。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)是一种由活化的 T 淋巴细胞、内皮细胞、成纤维细胞及巨噬细胞产生的具有广谱效应的多肽生长因子,具有重要的免疫调节作用,尤其是具有增强机体抗肿瘤免疫的功能^[2]。随着对 GM-CSF 免疫激活功能研究的深入,GM-CSF 作为疫苗佐剂应用于肿瘤防治方面的潜力正引起越来越广泛的关注。前列腺癌(prostate cancer, CaP)是目前为数不多的存在明确肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)的肿瘤之一,在 DNA 疫苗治疗中有其独特的优势,应用具有较高特异性的前列腺特异性膜抗原

(prostate-specific membrane antigen, PSMA)cDNA 进行 CaP 的 DNA 疫苗治疗有望获得广阔的应用前景。因此,本研究构建 PSMA-GM-CSF 融合基因,制备 CaP 的 DNA 疫苗并观察其免疫活性,探讨其用于 CaP 免疫治疗的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂 C57BL/6 小鼠,普通级,6~8 周龄,体质量 18~22 g,由中国科学院生物工程中心动物中心提供。Klenow 大片段、CytoTox 96 非放射细胞毒测试剂盒(CytoTox 96Non-Ra-

[作者简介] 黄云腾,博士,主治医师。E-mail: aten2k@21cn.com

* Corresponding author. E-mail: ye_chuanzhong@hotmail.com

dioactive Cytotoxicity Assay)、质粒 DNA 提取试剂盒 (WizardTM plus minipreps DNA purification Kit)、限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、*T₄* DNA 连接酶均为 Promega 公司产品;PCR 产物纯化回收试剂盒 (AdvantageTM PCR-pure Kit) 为 CLONTECH 公司产品;GeneJammerTM Transfection Reagent 转染试剂盒为 TRATAGENE 公司产品。

1.2 质粒、菌种和细胞株 小鼠 GM-CSF 质粒 pLXSN-mGM-CSF 由中国人民解放军第 304 医院杜楠博士惠赠;真核表达质粒 pcDNA3.1、双 MCS 真核表达质粒 pIRES 为 CLONTECH 公司产品;宫颈癌细胞株 HeLa 细胞为中国科学院典型培养物保藏委员会基因库提供,小鼠黑素瘤细胞株 B16 由军事医学科学院野战输血研究所裴雪涛教授惠赠。

1.3 引物设计 根据 mGM-CSF cDNA 序列 (GenBank 登录号: X02333), 参考文献^[3] (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/Primer3>) 设计引物, 并注意避开与人 GM-CSF 的同源部分, PG1: 5'-GCC TTG GAA GCA TGT AGA GG-3', PG2: 5'-CCG TAG ACC CTG CTC GAA TA-3', 扩增产物为 160 bp。PSMA 引物参照 Israeli 等^[4] 发表的序列合成。

1.4 重组质粒的构建及鉴定 3 种质粒的构建 (pIRES-mGM-CSF、pIRES-PSMA、pIRES-PSMA-mGM-CSF) 按照试剂盒及文献^[5] 进行。构建流程如图 1 所示, *Bam*H I 单酶切 pLXSN-mGM-CSF 质粒, 获得 mGM-CSF 片段、亚克隆到 pIRES 载体, 构建 pIRES-mGM-CSF 重组质粒, 双酶切鉴定插入片段的大小及方向。 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切 pcDNA3.1-PSMA, 获得 PSMA 片段, 定向克隆到 pIRES-mGM-CSF 重组质粒和 pIRES 载体中, 构建 pIRES-PSMA-mGM-CSF 和 pIRES-PSMA 重组质粒, 双酶切鉴定大小。

1.5 转染后稳定表达 PSMA 的 B16 细胞株的筛选

1.5.1 质粒的转染 参照转染试剂盒流程说明并稍加改进。具体步骤: (1) 取对数生长期 B16 细胞 (2×10^5) 接种于 35 mm 平皿, 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h, 使细胞密度达 50%。 (2) 制备 GeneJammerTM-DNA 混合物: 在 12 mm × 75 mm 无菌试管中准备 100 μl 无血清、无抗生素的 RPMI 1640 培养液; 加入 12 μl GeneJammerTM Transfection Reagent 轻轻混匀, 置室温 10 min; 在以上液体中按比例加入 2 μg 重组质粒 pIRES-PSMA (或加入 pcDNA3.1-PSMA 作为对照), 置室温 10 min; (3) 吸弃 B16 细胞培养上清, RPMI 1640 培养液洗涤 2 次, 将 0.9 ml 的 RPMI 1640 完全培养液及 GeneJammerTM-

DNA 混合物分别小心滴加至细胞上, 轻轻混匀 (或只滴加完全 RPMI 1640 培养液作为阴性对照)。3 h 后追加等体积的完全培养液, 继续培养 72 h 后加入终浓度为 400 μg/ml 的 G418 筛选; 每 3~4 d 更换选择培养基 1 次, 直至 3 周左右出现抗性克隆。 (4) 用无菌滤纸沾适量 0.25% 胰酶, 选取数个抗性细胞克隆分别消化后接种于培养瓶内, 仍加含 400 μg/ml G418 的 RPMI 1640 选择培养液加压培养, 得到数个细胞系, 并冻存部分细胞。

1.5.2 转染后 B16 细胞株的筛选 参照 M-PERTM 抽提试剂盒提供的方法, 采用 Western 印迹法分析转染后细胞 PSMA 蛋白表达情况, 筛选稳定表达的 B16 细胞, 将稳定表达 PSMA 的 B16 细胞命名为 B16-PSMA。

1.6 PSMA、mGM-CSF 双顺反子质粒的共表达鉴定 将 pIRES-PSMA-mGM-CSF 瞬时转染 HeLa 细胞后, RT-PCR 法分别鉴定细胞 PSMA 及 mGM-CSF 的 mRNA 表达水平, 操作按试剂盒说明进行。

1.7 动物分组和免疫 60 只 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组, 每组 15 只。腹腔注射 0.75% 戊巴比妥钠 (100 μl/10 g), 待小鼠全身麻醉后剃去后腿毛, 暴露胫骨及股四头肌, 各组分别缓慢注射 100 μg 应用碱裂解法制备和纯化的 pIRES-PSMA-mGM-CSF、pIRES-PSMA、pIRES-mGM-CSF 及 pIRES 空质粒, 于第 2、3、4 周加强注射 1 次, 共注射 4 次, 末次注射后 14 d 引颈处死小鼠, 检测 CTL 反应。

1.8 LDH 释放试验测定免疫后各组小鼠 CTLs 杀伤活性 参照 Promega 公司提供的 CytoTox 96 试剂盒操作手册进行, 实验分 3 步: (1) 效应细胞 (E) 的制备: 末次注射后 14 d 引颈处死小鼠 ($n = 15$), 75% 乙醇浸泡 5 min 后, 无菌取脾脏; Hanks 液洗 1 次后, 经 200 目不锈钢筛网研磨, 制备单细胞悬液; 加入 0.83% NH₄Cl-Tris 重悬细胞, 在 37℃ 培养箱放置 15 min, 215 × g 离心 5 min, 弃上清; Hanks 液洗涤 2 次, 将脾淋巴细胞重悬于含重组人 IL-2 (100 U/ml) 和 MBP-edPSMA (10 μg/ml) 的 RPMI 1640 完全培养液, 37℃、5% CO₂ 中培养; 第 5 天用 Ficoll (密度为 1.077) 离心, 除去死细胞。收集活细胞作为效应细胞, 调整细胞密度为 2×10^6 /ml。 (2) 靶细胞 (T) 的制备: 以稳定表达 PSMA 的 B16-PSMA 作为靶细胞, 收集对数生长期的 B16-PSMA 细胞, 无血清的 RPMI 1640 洗涤 2 次, 重悬于 RPMI 1640 完全培养液, 调整细胞密度为 1×10^5 /ml。 (3) LDH 释放试验: 设立实验孔、靶细胞自然释放孔及最大释放孔、效应细胞自然释放孔、空白对照孔, 实验孔中按

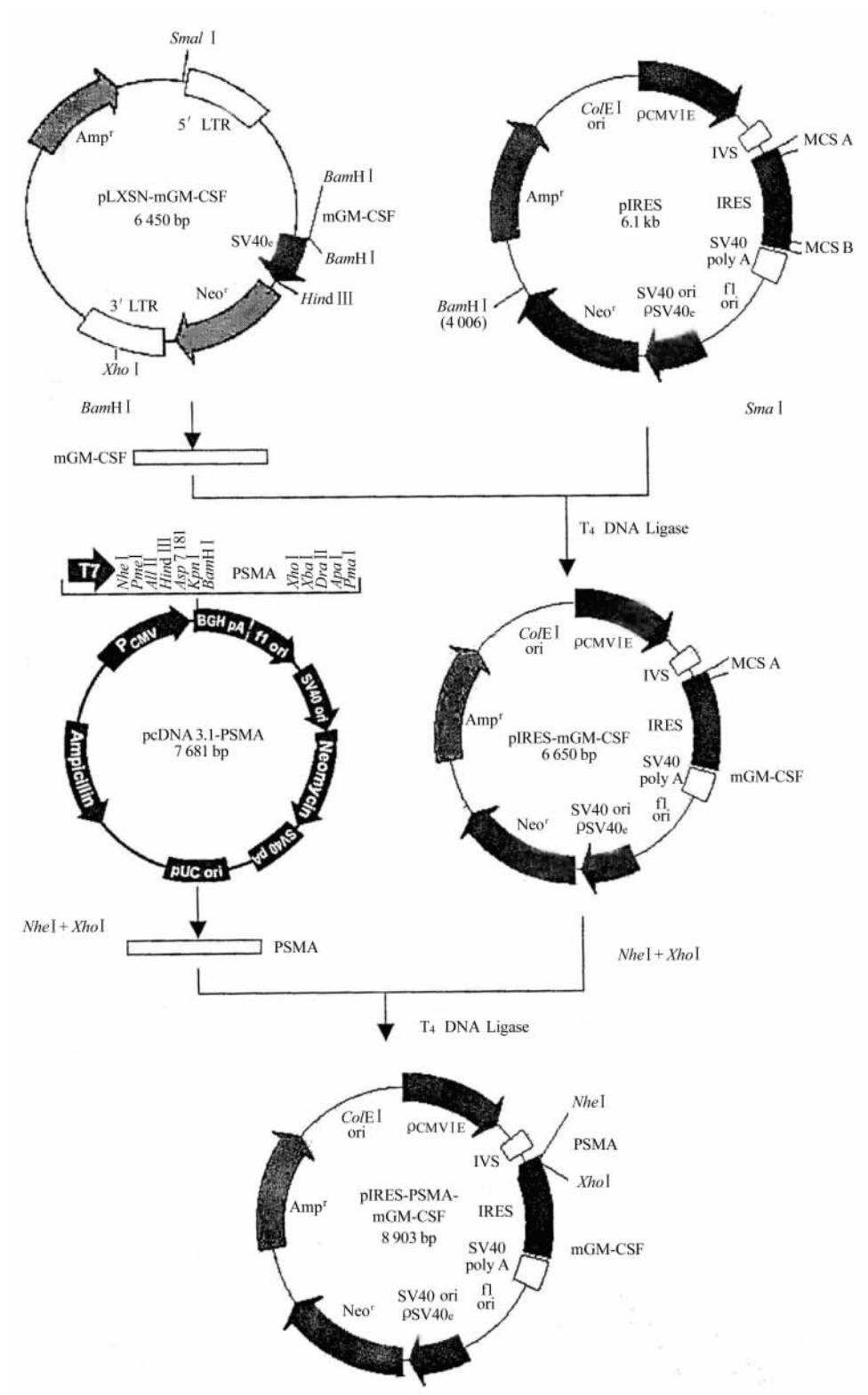


图 1 顺反子表达质粒 pIRES-mGM-CSF 及 pIRES-PSMA-mGM-CSF 的构建

Fig 1 Construction of cisgenic expression plasmid pIRES-PSMA-mGM-CSF and pIRES-mGM-CSF (pIRES-PSMA was constructed in the same way)

10 : 1, 5 : 1, 2.5 : 1, 1 : 1 不同的效靶比 (E : T), 将效应细胞和靶细胞依次加样于 96 孔板, 每一比例设 3 个复孔; 37°C、5% CO₂ 环境中孵育 4 h, 215 × g 离

心 5 min; 取出培养板, 吸取各孔上清 50 μl 到新的 96 孔板上; 加入 50 μl 反应液, 室温避光环境反应 20 min, 加 50 μl 终止液, 在酶标仪上测波长 490 nm

处光密度值(D_{490}),计算细胞杀伤率(cytotoxicity),公式如下:细胞杀伤率(%)=(实验孔-效应细胞自然释放孔-靶细胞自然释放孔)/(靶细胞最大释放孔-靶细胞自然释放孔) $\times 100\%$ 。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析处理,小鼠杀伤率的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为显著差异。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定 如图 2 所示,双酶切 pIRES-mGM-CSF,正向插入者可获得 550 bp 的 mGM-CSF 片段和 6 100 bp 的 pIRES 载体,反向插入者仅获得 6 650 bp 的片段;用 *Xho* I 酶切重组质粒 pIRES-PSMA-mGM-CSF 可获得预期大小的 DNA 片段(8 903 bp),用 *Xho* I 和 *Nhe* I 双酶切 pIRES-PSMA-mGM-CSF,可获得 2 253 bp 的 PSMA 片段。以上酶切结果证明 PSMA 和 mGM-CSF cDNA 已成功亚克隆于双顺反子载体 pIRES 上,并筛选出正向重组子。大量抽提以上质粒,经 PEG 纯化,终浓度约为 1.8~2.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

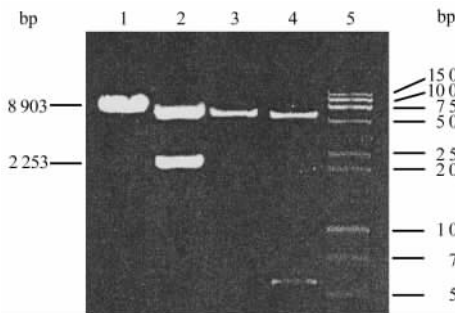


图 2 pIRES-PSMA-mGM-CSF 和 pIRES-mGM-CSF 的酶切鉴定

Fig 2 Restriction enzyme assay of recombinant plasmid pIRES-PSMA-mGM-CSF and pIRES-mGM-CSF

1: pIRES-PSMA-mGM-CSF; 2: pIRES-PSMA-mGM-CSF; 3: pIRES-mGM-CSF (backward insertion); 4: pIRES-mGM-CSF; 5: DL15000+DL2000 DNA marker

2.2 稳定表达 PSMA 的 B16 细胞株的获得 经 pIRES-PSMA 转染后 B16 细胞裂解后用 PSMA 单抗 4G5 进行 Western 印迹分析,显示在 100 000 附近形成特异性杂交条带,与预期结果一致,表明 pIRES-PSMA 质粒转染的 B16 细胞能稳定表达 PSMA,命名为 B16-PSMA。

2.3 pIRES-PSMA-mGM-CSF 转染 HeLa 细胞 RT-PCR检测结果表明转染后 HeLa 细胞可特异性扩增出 160 bp 的 mGM-CSF 基因片段和 527 bp 的 PSMA 片段(图 3),与预期结果一致。

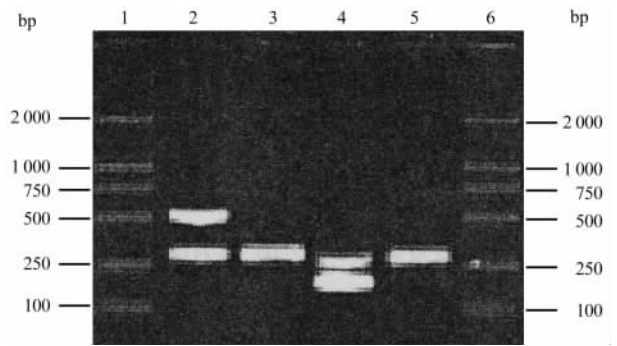


图 3 pIRES-PSMA-mGM-CSF 转染后 HeLa 细胞 RT-PCR 检测

Fig 3 RT-PCR analysis of PSMA and mGM-CSF in transient transfection cells

1, 6: DL2000 DNA marker; 2: HeLa/PSMA-mGM-CSF cell; The RT-PCR products of PSMA primers, which defines a 527 bp fragments; 3: HeLa cell used as negative control; 4: HeLa/PSMA-mGM-CSF cell; The RT-PCR products of mGM-CSF primers, which defines a 160 bp fragments; 5: HeLa cell used as negative control. As a control for the quality of mRNA sample, a control gene(GAPDH) transcript was selected, which defines a 310 bp fragments

2.4 免疫后各组小鼠脾细胞 PSMA 特异性 CTLs 杀伤活性 pIRES-PSMA-mGM-CSF 免疫后小鼠特异杀伤率最高,pIRES-PSMA、pIRES-mGM-CSF 次之,pIRES 空质粒最差($P < 0.05$);各组的杀伤效果以效靶比为 10 : 1 时最高(图 4)。

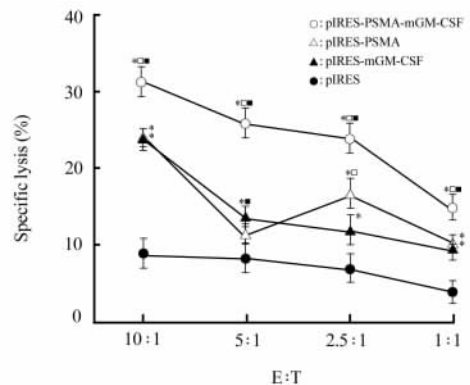


图 4 四种重组质粒免疫后 C57/BL-6 小鼠脾细胞抗原特异性 CTL 活性比较

Fig 4 Antigen specific cytotoxic lymphocyte activity following immunization of C57/BL6 with DNA vaccine

* $P < 0.05$ vs pIRES, $\square P < 0.05$ vs pIRES-mGM-CSF, $\blacksquare P < 0.05$ vs pIRES-PSMA

3 讨论

基于 PSMA 的 CaP 免疫治疗已成为目前的研究热点。从目前的动物实验和为数不多的临床试验来看,相关研究还是集中在经肿瘤相关肽致敏树突状细胞(dendritic cells,DCs)的免疫治疗^[6]。此疗法必须

依赖高水平的医疗设施,而且花费高、工作量大,需根据每个患者进行不同的操作,不适用于推广应用。因此,寻找一种经济、高效的新疗法十分必要。

众所周知,细胞因子在免疫细胞分化成熟和免疫应答过程的各个环节起着重要的作用。目前多种细胞因子已被证实具有一定的抗肿瘤作用,其中普遍认为效果较好的有 GM-CSF、IL-12、IL-2 等。GM-CSF 能激活 APC,增加 APC 的 MHC II 类抗原表达,也能加强初始的抗体应答^[2]。Dranoff 等^[7-9]将 GM-CSF 导入肿瘤细胞以引发机体特异性的抗肿瘤免疫作用,发现其作用最强而且持久,优于 IL-2、IL-4、IL-5、IFN- γ 及 TNF- α 。一些研究^[10,11]将 GM-CSF 基因作为基因佐剂,应用于增加 DNA 疫苗的疗效,发现其能升高抗体滴度,可明显增强特异性的细胞免疫及体液免疫反应,抑制肿瘤生长,并提供抵抗致死量肿瘤攻击的保护性免疫。近年来, DNA 疫苗研究在一些领域的成功给基于 PSMA 的 CaP 免疫治疗带来了新的希望,但关于构建 PSMA-GM-CSF 融合基因,制备 DNA 疫苗用于治疗 CaP 的报道较少见,本研究将 PSMA 和 GM-CSF 构建到同一载体,设计一种新型的共表达 DNA 疫苗,以期达到增强疗效的作用。

基因治疗中常用的多基因表达方式主要是通过使用多启动子或重组表达融合蛋白,但由于多启动子之间或目的基因之间的相互影响,往往会减弱甚至丧失某些基因的表达^[12]。内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)序列来源于某些病毒和细胞的 mRNA 5' 端的一段非翻译区。在上游启动子的控制下,该序列及与之相连的基因可同时转录,并以不依赖帽的方式启动远端 mRNA 的翻译,从而在同一转录本上翻译出不同的蛋白。来源于脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)的 IRES 又被称为不依赖帽的翻译增强子(cap-independent translation enhancer, CITE),在大部分细胞中可直接招募核糖体启动其下游顺反子的翻译^[13]。因此,近年来多基因表达大都采用 IRES 元件代替内部启动子克服启动子间的抑制现象。我们在以往的研究^[14]中曾构建了 HSV-tk 和 GFP(绿色荧光蛋白)共表达的真核表达载体并成功地在膀胱癌细胞株 EJ 中获得表达。因此在本研究中,我们采用已商品化的双 MCS 真核表达质粒 pIRES 作为基因载体,值得一提的是,该质粒的氨苄青霉素抗性基因含有 CpG 序列,能够非特异刺激免疫反应,从而增强其表达抗原的免疫应答^[13]。

本研究结果表明制备的 pIRES-PSMA-mGM-

CSF 双顺反子 DNA 疫苗具有一定的免疫活性,有望在前列腺癌的基因治疗中发挥积极的作用;但对于 DNA 核酸疫苗免疫保护的时效特点、免疫机制及其安全性评价等方面还需要作更多的深入研究,提供更详细的实验资料。

[参考文献]

- [1] Hockney RC. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli* [J]. Trends Biotechnol, 1994, 12: 456-463.
- [2] Gropman JE, Molina JM, Scadden DT. Hematopoietic growth factors. Biology and clinical applications [J]. N Engl J Med, 1989, 321: 1449-1459.
- [3] Misener S, Kraweta SA. Bioinformatics methods and protocols [M]. New Jersey: Human Press Inc., 2000: 112-143.
- [4] Israeli RS, Powell CT, Fair WR, et al. Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen [J]. Cancer Res, 1993, 53: 227-230.
- [5] 奥斯伯 F 著. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王梅林译. 北京: 北京科学出版社, 1998: 983-992.
- [6] Tjoa BA, Simmons SJ, Elgamal A, et al. Follow-up evaluation of a phase II prostate cancer vaccine trial [J]. Prostate, 1999, 40: 125-129.
- [7] Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 3539-3543.
- [8] Johnen H, Kulbe H, Pecher G. Long-term tumor growth suppression in mice immunized with naked DNA of the human tumor antigen mucin (MUC1) [J]. Cancer Immunol Immunother, 2001, 50: 356-360.
- [9] Dummer R. GVAX (Cell Genesys) [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2001, 2: 844-848.
- [10] Syrengelas AD, Levy R. DNA vaccination against the idiotype of a murine B cell lymphoma: mechanism of tumor protection [J]. J Immunol, 1999, 162: 4790-4795.
- [11] Bowne WB, Wolchok JD, Hawkins WG, et al. Injection of DNA encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor recruits dendritic cells for immune adjuvant effects [J]. Cytokines Cell Mol Ther, 1999, 5: 217-225.
- [12] Levenson VV, Transue DE, Roninson IB. Internal ribosomal entry site-containing retroviral vectors with green fluorescent protein and drug resistance markers [J]. Hum Gene Ther, 1998, 9: 1233-1236.
- [13] Gurtu V, Yan G, Zhang G. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 229: 295-298.
- [14] 叶传忠, 林震, 陈仕平, 等. 含绿色荧光蛋白和 hytk 双顺反子真核表达载体的构建及其在膀胱癌细胞中的表达 [J]. 中国病理生理学杂志, 2001, 17: 825-829.

[收稿日期] 2006-07-04

[修回日期] 2006-07-21

[本文编辑] 贾泽军, 孙岩