

MUC1-VNTR_n 核酸疫苗的优化构建及其抗胰腺癌的实验研究

周泉波 龚远锋 周雨 林青 李志花 陈汝福 曾兵 郑礼平

【摘要】 目的 以 MUC1-VNTR_n 作为胰腺癌免疫治疗的新靶点, 通过体内外实验筛选出免疫原性最强的 pVAX1-MUC1-VNTR_n 核酸疫苗。方法 构建 pVAX1-MUC1-VNTR_n 质粒后转染未成熟树突状细胞, 诱导成熟后与自体 T 细胞共培养, 用 ELISPOT 检测活化分泌 IFN- γ 的特异性细胞毒性 T 细胞 (CTL) 数目, CytoTox[®] 检测 MUC1-VNTR_n 特异性的 CTL 对 Capan-2 的杀伤效应, 筛选出免疫原性较强的 pVAX1-MUC1-VNTR_n 核酸疫苗。通过小鼠体内动物实验进一步证实核酸疫苗的防瘤及抗肿瘤效应。结果 成功构建了 pVAX1-MUC1-VNTR_n 质粒, 并可在真核细胞表达目的蛋白。未成熟树突状细胞摄取 pVAX1-MUC1-VNTR_n 质粒后可分化为成熟树突状细胞, 经刺激后各处理组成熟的树突状细胞表达 CD80、CD86、HLA-DR 表面分子和分泌 IL-12 浓度较未经任何刺激各组的未成熟树突状细胞高 ($P < 0.01$)。负载 MUC1-VNTR₆ 和 MUC1-VNTR₉ 的树突状细胞激活自体 T 细胞, 其分泌 IFN- γ 特异性 T 细胞数 (103.0 ± 8.5 和 94.3 ± 7.7) 要显著高于其他组 ($P < 0.001$)。MUC1-VNTR₆ 和 MUC1-VNTR₉ 特异性的 CTL 对 Capan-2 杀伤效应为 (40.12 ± 3.16)% 和 (37.31 ± 3.95)%, 较 MUC1-VNTR_{1强}、VNTR_{1弱}、VNTR₃、VNTR₄ 和 MUC1-cDNA 各组高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。小鼠体内保护性和治疗性免疫应答实验证实 pVAX1-MUC1-VNTR₆ 核酸疫苗具有最强的免疫原性, 其抑制 panc02-MUC1 肿瘤生长能力要显著优于 pVAX1-MUC1-VNTR_{1强}、VNTR₃、VNTR₉ 核酸疫苗 ($P < 0.01$)。结论 pVAX1-MUC1-VNTR_n 核酸疫苗可在真核细胞表达目的蛋白。通过体内外实验筛选出 pVAX1-MUC1-VNTR₆ 核酸疫苗具有更强杀伤效应。

【关键词】 胰腺肿瘤; 疫苗, DNA; CA-15-3 抗原; 树突细胞

Optimized construction of MUC1-VNTR_n DNA vaccine and the anti-pancreatic cancer research ZHOU Quan-bo, GONG Yuan-feng, ZHOU Yu, LIN Qing, LI Zhi-hua, CHEN Ru-fu, ZENG Bing, ZHENG Li-ping. Department of Hepatobiliary Surgery, The Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: CHEN Ru-fu, Email: chenrf10@gmail.com

【Abstract】 Objective MUC1-VNTR_n served as a new target for pancreatic cancer immunotherapy in the present study. We intended to screen out the most powerful pVAX1-MUC1-VNTR_n DNA vaccine which showed strongest immunogenicity *in vitro* and *vivo*. **Methods** pVAX1-MUC1-VNTR_n were constructed and transfected into MUC1 negative cells. The target protein of MUC1-VNTR_n could be detected by Western Blot. Dendritic cell preparation and research of biological characteristics. pVAX1-MUC1-VNTR_n were transfected into dendritic cell. The stimulated mature dendritic cells were co-cultured with autologous T cells, and then we used the ELISPOT to detect the IFN- γ secreting CTL. We detected the cytotoxic effect of the antigen-specified CTL to Capan-2 cells *in vitro*. Finally, we used the the protective and therapeutic immune response in mice to confirm the immunogenicity of DNA vaccine. **Results** pVAX1-MUC1-VNTR_n were successfully constructed, and the target protein can be expressed in eukaryotic cells. The immature dendritic cells can intake pVAX1-MUC1-VNTR_n plasmid, and then differentiate into mature dendritic cells. Expression of CD80, CD86, HLA-DR and secretion of IL-12 by stimulated

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.20.048

基金项目: 国家自然科学基金 (81000917); 广东省医学科学技术研究基金 (B2010091)

作者单位: 510120 广州, 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科 (周泉波、龚远锋、周雨、林青、陈汝福、曾兵), 肿瘤科 (李志花、郑礼平)

通讯作者: 陈汝福, Email: chenrf10@gmail.com

mature dendritic cells were higher than that of unstimulated immature dendritic cells ($P < 0.01$). The ELISPOT result showed that the number of IFN- γ secreting CTL in MUC1-VNTR₆ (103.0 \pm 8.5) and VNTR₉ (94.3 \pm 7.7) group were more than the other group ($P < 0.001$). Cytotoxic effect of the MUC1-VNTR₆ and VNTR₉ specified CTL to Capan-2 cells were (40.12 \pm 3.16)% and (37.31 \pm 3.95)%, which was higher than that of the other group ($P < 0.001$). Protective and therapeutic immune response in mice showed that pVAX1-MUC1-VNTR₆ had the strongest immunogenicity. **Conclusions** pVAX1-MUC1-VNTR_n can express target protein in eukaryotic cells. We screen out the pVAX1-MUC1-VNTR₆ DNA vaccine which shows the strongest immunogenicity *in vitro* and *in vivo*.

【Key words】 Pancreatic neoplasms; Vaccines, DNA; CA-15-3 antigen; Dendritic cells

MUC1 (mucin1) 是黏蛋白家族中的一类, 在 90% 以上的胰腺癌中呈高表达, 以 MUC1 作为靶点是目前胰腺癌免疫治疗研究的热点^[1-3]。MUC1 基因存在于染色体 1q21~24 上。MUC1 多肽骨架由胞内段、跨膜段和胞外段组成。其胞外段含有重复 20~125 次不等的特异性串联重复序列 (variable numbers of tandem repeats, VNTR), 每个 VNTR 由 20 个氨基酸组成^[4-5]。在胰腺癌上皮细胞中 MUC1 呈异常高表达且糖基化不完全, 使得其胞外段 VNTR 暴露而成为胰腺癌免疫治疗的新靶点。

DNA 疫苗 (DNA-based vaccine) 是一种针对特异抗原产生有效细胞免疫和体液免疫的全新疫苗, 胰腺癌的 DNA 疫苗发展被寄予厚望^[6-7]。已有研究表明: 胰腺癌 MUC1 胞外 VNTR 并非重复次数越多, 其免疫原性越强; 究竟多少重复数目的 VNTR 才能诱导机体产生最强大的抗胰腺癌免疫应答, 国内外已有的研究尚不能回答这些问题。本研究通过构建具有不同胞外重复序列 MUC1-VNTR_n 核酸疫苗, 通过体内外实验筛选出免疫原性最强的 MUC1-VNTR_n 核酸疫苗。

材料与方法

一、材料

质粒载体 pVAX1 购自 Invitrogen 公司。人胰腺癌细胞株 Capan-2 (MUC1 表达阳性)、小鼠胰腺癌细胞株 panc02 (MUC1 表达阴性) 和宫颈癌细胞株 HeLa (MUC1 表达阴性) 由本实验中心保存。将人 MUC1 cDNA 转染到 panc02 细胞中, 通过 G418 压筛实验构建 panc02-MUC1 稳转细胞株, 由莱德尔公司完成。质粒构建过程中的限制性内切酶 Kpn I 酶、Nhe I 酶购自 Fermentus 公司。T4 连接酶购自 TaKaRa 公司。X-tremeGENE[®] HP DNA 转染试剂盒购自 Roche 公司。MUC1-VNTR 单克隆抗体 (VU4H5) 购自 CST 公司。健康人外周血白细胞悬液购自广州血站。IFN- γ Elispot 试剂盒购自 BD 公司。CytoTox[®] 非放射性细胞毒性检测试剂盒购自 Promega 公司。C57BL/6 小鼠购自中山大学实验动物中心, 动物实验过程遵守中山大学实验

动物生物安全管理细则和标准操作规程。

二、pVAX1-MUC1-VNTR_n 质粒的构建

MUC1-VNTR_n 基因由 TaKaRa 公司合成。根据已有研究^[8], 我们构建 PDTRP 靠近 C 端 (免疫原性较强) 的单个重复序列 MUC1-VNTR_{1 强} 和 PDTRP 靠近 N 端 (免疫原性较弱) 的单个重复序列 MUC1-VNTR_{1 弱}。MUC1-VNTR_{1 强} 目的基因片段如下: GCTAGCGCCACCATGCCGGGCTCCACCGCCCCC CAGCCCACGGTGTACCTCGGCCCGGACACCAGG CCGGCCTGAGGTACC。MUC1-VNTR_{1 弱} 目的基因片段如下: GCTAGCGCCACCATGCACGGTGTACC TCGGCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCA CCGCCCCCAGCCTGAGGTACC。GCCACC 为 KOZAK 序列, 斜体部分为 MUC1-VNTR₁ 序列。MUC1-VNTR_n 目的基因片段由 VNTR_{1 强} 重复 n 次所得。将 MUC1-VNTR_n 目的基因克隆到 pVAX1 载体上。构建好的 pVAX1-MUC1-VNTR_n 质粒进一步经双酶切琼脂糖凝胶电泳分离, UVP 系统成像验证, 筛到的阳性克隆送测序。用 pVAX1-MUC1-VNTR_n 质粒转染 MUC1 阴性的 HeLa 细胞株。设空白 pVAX1 载体作为对照, 转染 48 h 后, Western Blot 检测目的蛋白 MUC1-VNTR_n 表达, 一抗为 MUC1-VNTR 单抗 (VU4H5)。

三、树突状细胞 (dendritic cell, DC) 的培养与生物学特性研究

用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC), PBS 洗涤后用 1640 完全培养基 (含 10% 胎牛血清, 2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺, 100 U/ml P-S 双抗) 将 PBMC 密度调到 5×10^6 /ml, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 2 h, 洗去非贴壁细胞保存备用。贴壁细胞加入含 1000 U/ml 粒细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和 500 U/ml IL-4 的 1640 完全培养基培养, 隔天半量换液并补充细胞因子, 第 6 天时收获未成熟 DC, 分组诱导 DC 成熟。A 组: 对照组, 仅用 GM-CSF 和 IL-4 培养; B 组: 加入 1000 U/ml TNF- α 诱导成熟; C 组: 转染入 VNTR₁ 质

粒; D组: 转染入 VNTR₁ 质粒后再加入 1000 U/ml TNF- α 诱导成熟。诱导 24 h 后收获成熟 DC, 用流式细胞仪进行细胞分子表型 (CD80、CD86 和 HLA-DR) 分析。同时收集 DC 培养上清, 采用双抗夹心法检测 IL-12 浓度。

四、ELISPOT 检测活化分泌 IFN- γ 的特异性细胞毒性 T 细胞 (CTL)

将负载不同 MUC1-VNTR_n 抗原的各组 DC 调至 1×10^5 /ml, 将经过毛尼龙柱分离得到的自体 T 细胞作为效应细胞, 调节 T 细胞浓度至 1×10^6 /ml, 按照 1:10 共 100 μ l 加入到 ELISPOT 板中; 另设 3 复孔效应细胞单加 100 μ l 培养基, 3 复孔效应细胞加 100 μ l 培养基后再加入 PHA, PHA 终浓度为 2 μ g/ml。在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 16 h 后, 按试剂盒操作步骤检测活化分泌 IFN- γ 的特异性 CTL。

五、体外 CTL 细胞杀伤效应的检测

将负载不同 MUC1-VNTR_n 抗原的成熟 DC 与自体 T 细胞按 1:10 加入 6 孔板中, 并加入 100 U/ml IL-2 完全培养基, 隔天半量换液并补充细胞因子, 培养 5 d, 收集细胞计数。分 MUC1-VNTR_n 组、空白载体 pVAX1 组和阴性对照 HeLa 细胞组。以 MUC1 阳性的 Capan2 细胞株作为靶细胞。按照效应细胞与靶细胞比例分别为 40:1 加入到 96 孔板中, 按照 CytoTox[®] 非放射性细胞毒性检测试剂盒具体操作步骤检测特异性杀伤效应。

六、体内预防肿瘤生长

将 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 分别为 PBS 组、panc02 对照组、VNTR₁ 组、VNTR₃ 组、VNTR₆ 组和 VNTR₉ 组。各组小鼠在右腿胫前肌注射 100 μ g/100 μ l 质粒 PBS 溶液, 每 2 周一次, 共接种三次, 第 3 次接种 1 周后每只小鼠经左腿外侧皮下注射 5×10^5 /100 μ l panc02-MUC1 细胞, 每 2~3 d 用卡尺测量肿瘤的长径及短径, 观察至肿瘤后 4 周, 并记录小鼠的生存时间。

七、体内抗癌效应

将 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组 (PBS 组、panc02 对照组、VNTR₁ 组、VNTR₃ 组、VNTR₆ 组和 VNTR₉ 组), 每组 10 只, 每只小鼠皮下注射 5×10^5 /100 μ l panc02 或 panc02-MUC1 细胞。在肿瘤后第 4 天、第 8 天和第 12 天分别经肌肉注射 100 μ g/100 μ l 质粒 PBS 溶液。每 2~3 d 用卡尺测量肿瘤的长径及短径并绘制肿瘤生长曲线, 观察至肿瘤后 4 周, 并记录小鼠的生存时间。

八、统计学分析

计量资料的描述采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。两个独立样本均数的比较采用 *t* 检验, 计量资料比较采用方

差分析, 组间比较采用 LSD-*t* 检验。所有数据均采用 SPSS 16.0 统计软件处理, 检验水准 $P < 0.05$, 认为差异有统计学意义。

结 果

1. 质粒的构建: 我们成功构建了 pVAX1-MUC1-VNTR₁ 弱、VNTR₁ 强、VNTR₃、VNTR₄、VNTR₆、VNTR₉ 和 pVAX1-MUC1 质粒。质粒及双酶切后的产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 在相应位置分别切出相对应的清晰条带, 证明目的基因片段已经插入 pVAX1 载体质粒中。相应的 7 个构建好的质粒送测序, 测序结果与目的基因片段进行 Blast 比对, 重合度为 100%。用成功构建的 pVAX1-MUC1-VNTR_n 质粒转染 MUC1 阴性的 HeLa 细胞株, Western Blot 方法检测目的蛋白 MUC1-VNTR_n 表达, 证明了 pVAX1-MUC1-VNTR_n 质粒能在真核细胞中表达。

2. DC 的培养与生物学特性研究: 在倒置显微镜下观察成熟 DC 形态如图 1。成熟的 DC 呈悬浮状态, 胞体呈棘突状, 体积明显比淋巴细胞大, 胞体长出许多细长突起。

成熟 DC 高表达共刺激分子如 CD80、CD86 和 HLA-DR, 用流式细胞仪检测各组 DC 表型见表 1。比较各处理组的细胞表型, 得 $P < 0.001$; 进一步经 LSD-*t* 检验, 未受刺激第 6 天和第 7 天的细胞表型之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 经诱导成熟后的三个组间的细胞表型差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$), 而刺激后各处理组和未受刺激的各处理组两两间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。图 2 为流式细胞仪检测细胞表型的结果。证明了经 VNTR₁ 抗原和 (或) TNF- α 刺激后均能满意诱导 DC 成熟, 后续实验中我们采用转染入 VNTR_n 质粒后再加入 TNF- α 诱导成熟的方法。

表 1 流式细胞仪检测 DC 分子表型 CD80、CD86 和 HLA-DR (% , $\bar{x} \pm s$)

处理组	CD80	CD86	HLA-DR
未经任何刺激 Day 6	9.98 \pm 4.08	17.98 \pm 8.67	71.65 \pm 8.15
未经任何刺激 Day 7	17.72 \pm 8.00	25.05 \pm 11.77	70.99 \pm 8.22
经 TNF- α 诱导成熟	49.75 \pm 9.44	89.42 \pm 2.08	89.09 \pm 2.74
经抗原刺激后	53.98 \pm 8.37	91.31 \pm 3.85	90.64 \pm 4.87
经 TNF- α 和抗原共刺激	59.30 \pm 9.40	92.30 \pm 3.13	93.30 \pm 3.45

收获未成熟 DC 和经过细胞因子/抗原诱导成熟的 DC 培养液离心后取上清, 通过双抗夹心 ELISA 法检测 IL-12 分泌量, 可间接反映 DC 成熟程度。各组 DC IL-12 分泌量的变化见表 2。未经任何刺激第 6 天培养液上清 IL-12 浓度 (7.27 ± 2.71) pg/ml, 到第 7 天

IL-12 浓度为 (5.65 ± 3.64) pg/ml, 与前者之间差异无统计学意义 ($P=0.864$), 而经 TNF- α 诱导成熟的 DC 培养液上清 IL-12 浓度为 (57.09 ± 18.52) pg/ml, 经抗原刺激后的浓度为 (46.05 ± 9.82) pg/ml, 经 TNF- α 和抗原共刺激 (52.52 ± 13.29) pg/ml, 三种处理方法间的差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 而刺激后各组 and 未受刺激的各组, LSD- t 检验两两间比较差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。

表 2 ELISA 法测 DC IL-12 分泌量 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

处理组	IL-12 浓度
未经任何刺激 Day 6	7.27 \pm 2.71
未经任何刺激 Day 7	5.65 \pm 3.64
经 TNF- α 诱导成熟	57.09 \pm 18.52
经抗原刺激后	46.05 \pm 9.82
经 TNF- α 和抗原共刺激	52.52 \pm 13.29

3. ELISPOT 检测活化分泌 IFN- γ 的特异性 CTL: 负载 MUC1-VNTR₆ 和 MUC1-VNTR₉ 的 DC 激活自体 T 细胞, 其分泌 IFN- γ T 细胞数分别为 103.0 ± 8.5 和 94.3 ± 7.7 , 要显著高于 MUC1-cDNA 组 (80.5 ± 7.32)、MUC1-VNTR₄ 组 (71.7 ± 6.51)、MUC1-VNTR₃ 组 (68.7 ± 7.51)、MUC1-VNTR_{1 弱} 组 (48.0 ± 5.6)、MUC1-VNTR_{1 强} 组 (55.0 ± 6.0) 和空质粒组 (17.3 ± 4.9), 差异有统计学意义 (P 均 <0.001), 进一步 LSD- t 检验两两间比较显示, VNTR₆ 和 VNTR₉ 两者间差异无统计学意义 ($P=0.350$)。

4. CTL 细胞杀伤效应的检测: 结果如图 3 所示。VNTR₆ 和 VNTR₉ 特异性的 CTL 对 Capan-2 杀伤效应为 $(40.12 \pm 3.16)\%$ 和 $(37.31 \pm 3.95)\%$, 与其他各处理组的比较差异均有统计学意义 ($P<0.001$)。VNTR_{1 强}、VNTR_{1 弱}、VNTR₃、VNTR₄ 和 MUC1-cDNA 特异性 CTL 对 Capan-2 杀伤效应分别为 $(15.13 \pm 2.65)\%$ 、 $(12.30 \pm 2.72)\%$ 、 $(21.10 \pm 1.76)\%$ 、 $(23.41 \pm 3.31)\%$ 和 $(29.49 \pm 2.92)\%$ 。空白载体 pVAX1 对 Capan-2 杀伤效应为 $(2.50 \pm 2.05)\%$, 与其他 pVAX1-MUC1-VNTR_n 核酸疫苗组比较有统计学差异 ($P<0.001$)。VNTR_{1 强} 特异性 CTL 对 MUC1 表达阴性的 HeLa 细胞株的杀伤效应分别为 $(2.10 \pm 2.85)\%$, 与其他各组间差异均有统计学意义 ($P<0.001$)。

5. 体内预防肿瘤生长: 根据 CTL 细胞杀伤效应的检测结果, 我们选择了 pVAX1-MUC1-VNTR_{1 强}、VNTR₃、VNTR₆ 和 VNTR₉ 进行小鼠体内保护性免疫应答实验。结果如图 4 所示, 与空载体组 pVAX1 及 panc02 阴性对照组相比, pVAX1-MUC1-VNTR_{1 强}、VNTR₃、VNTR₆ 和 VNTR₉ 核酸疫苗从 12 天起显示出特异性的抑制 panc02-MUC1 肿瘤生长的效应 ($P<0.001$)。进

一步经 LSD- t 检验, pVAX1-MUC1-VNTR₆ 核酸疫苗体内抑制 panc02-MUC1 肿瘤生长能力要显著优于 pVAX1-MUC1-VNTR_{1 强}、VNTR₃、VNTR₉ ($P<0.01$), 其中 pVAX1-MUC1-VNTR_{1 强} 和 VNTR₃ 两者之间并无明显差异 ($P=0.083$)。pVAX1-MUC1-VNTR_n 核酸疫苗均未显示出对 panc02 肿瘤细胞具有明显的抑制效应, 证明该疫苗具有 MUC1 特异性。

6. 体内抗瘤效应: 在此实验中, 我们先皮下注射 panc02 或 panc02-MUC1 细胞, 再进行疫苗接种。结果如图 5 所示, 与空载体 pVAX1、panc02 阴性对照组相比, 从 9 天起, pVAX1-MUC1-VNTR_{1 强}、VNTR₃、VNTR₆ 和 VNTR₉ 组 panc02-MUC1 肿瘤生长的即受到时显的抑制 ($P<0.001$)。进一步经 LSD- t 检验, pVAX1-MUC1-VNTR₆ 核酸疫苗抑制 panc02-MUC1 肿瘤生长能力要显著优于 pVAX1-MUC1-VNTR_{1 强}、VNTR₃、VNTR₉ ($P<0.01$), 其中 pVAX1-MUC1-VNTR_{1 强}、VNTR₃ 和 VNTR₉ 三组间并无明显差异 ($P=0.071$)。pVAX1-MUC1-VNTR_n 核酸疫苗均未显示出对 panc02 肿瘤细胞具有明显的抑制效应, 证明该疫苗具有 MUC1 特异性。

讨 论

MUC1 在几乎所有的腺癌上皮细胞中均呈异常高表达且糖基化不完全, 使得 VNTR 暴露因而成为许多肿瘤免疫治疗研究的靶点。多数胰腺癌患者体内 MUC1 特异性的免疫应答较弱以至于不能有效抑制和杀伤肿瘤细胞, 以 MUC1-VNTR 作为免疫治疗的新靶点可有效增强机体免疫反应。Hengerson 等^[9]将含有 22 个胞外段串联重复序列的 MUC1 cDNA 转入小鼠 DC, 用 DC 疫苗免疫小鼠, 成功诱导出了 MUC1 特异性的抗体和 CTL。Snyder 等^[10]研究表明, 用含 6.5 个 MUC1 胞外段串联重复区 MUC1-cDNA 核酸疫苗和 IL-18 基因疫苗共免疫的 MUC1 转基因小鼠, 可显著提高抗瘤能力和延长生存期。这提示采用一定数量的串联重复序列 MUC1-VNTR_n 核酸疫苗免疫机体, 能诱导机体产生强大的免疫应答从而杀灭胰腺癌细胞。

Quinlin 等^[8]发现多肽疫苗 VNTR₁ (GSTAPPAHGV TSAPDTRPAP) 因其 PDTRP 靠近 C 端, 较 PDTRP 靠近 N 端的其他多肽疫苗 VNTR₃ 和 VNTR₅ 更具免疫原性。VNTR 的 20 个氨基酸中存在 β 转角区域 (APDTRP) 突出表达于 MUC1 分子表面, 而其他氨基酸则埋在 MUC1 分子里, APDTRP 可以被多种 MUC1 抗体识别, 可能是免疫显性区域。本研究构建的 PDTRP 靠近 C 端的 VNTR_{1 强} 体外诱导产生的 CTL 对 Capan-2 杀伤效应为 $(15.13 \pm 2.65)\%$,

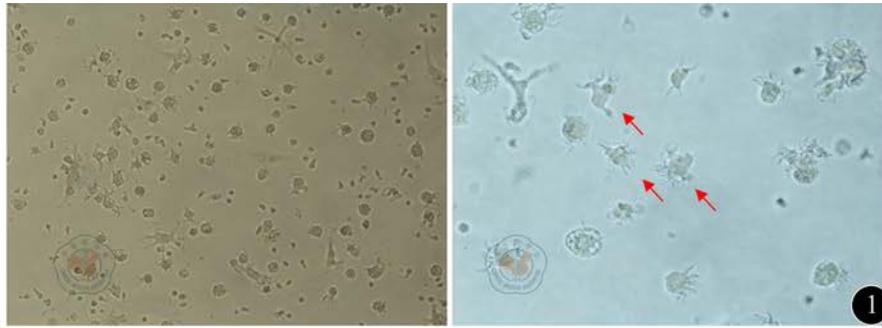


图1 倒置显微镜下观察成熟树突状细胞形态

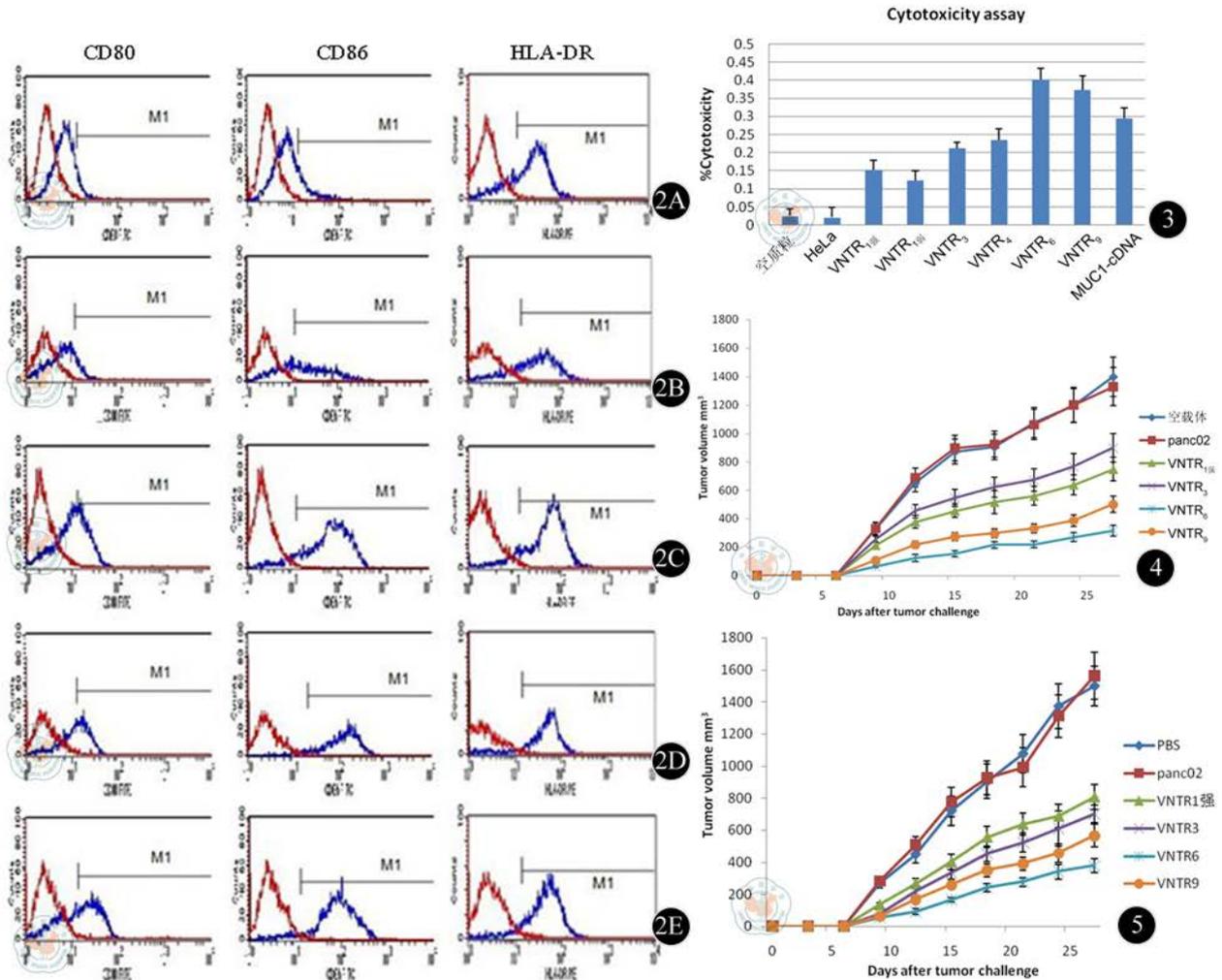


图2 流式细胞仪检测树突状细胞分子表型CD80, CD86和HLA-DR。2A: 未经刺激Day6 DC表型; 2B: 未经刺激Day7 DC表型; 2C: 经TNF- α 诱导成熟Day7 DC表型; 2D: VNTR1转染后Day7 DC表型; 2E: 经VNTR1转染后再加入TNF- α 诱导Day7 DC表型。结果显示经VNTR抗原和/或TNF- α 刺激后的DC表达CD80, CD86和HLA-DR的细胞百分数较高, C、D、E三种刺激方式均能满意诱导树突状细胞成熟 图3 MUC1-VNTRn特异性CTL对Capan-2细胞的杀伤效应 图4 pVAX1-MUC1-VNTRn核酸疫苗预防小鼠体内成瘤作用 图5 pVAX1-MUC1-VNTRn核酸疫苗体内抑制小鼠肿瘤生长的作用

明显优于 VNTR_{1弱} (12.30±2.72) %。Engelmann 等^[11] 深入地研究并证实了在氨基酸水平和核酸水平, 人源性 MUC1-VNTR 主要存在四种变异: DT→ES、P→Q、P→A 和 P→T。其中 DT→ES 变异可能导致免疫治疗靶点的改变从而对免疫应答产生重要影响。

吴文川等^[12]使用免疫佐剂 GM-CSF 来募集 DC,

刺激粒系、巨噬细胞等增殖分化。袁时芳等则进一步构建了 pUC-VNTR₁-CSF 和 pUC-VNTR₄-CSF 核酸疫苗, 他们把 GM-CSF 基因同时克隆进质粒载体中, 两种 DNA 疫苗均能有效抑制 MUC1 阳性乳腺癌细胞的生长, 但 VNTR₄ 的免疫原性要强于 VNTR₁^[11]。那么, 多少重复数目的 VNTR 核酸疫苗才能诱导机体产生最

强大的免疫应答效果? 国内外已有的研究尚不能回答这些问题。

基于上述研究基础之上, 本研究初步构建了 pVAX1-MUC1-VNTR_{1弱}、VNTR_{1强}、VNTR₃、VNTR₄、VNTR₆、VNTR₉ 和 pVAX1-MUC1 质粒核酸疫苗(其中 MUC1-VNTR₆ 和 VNTR₉ 的构建国内外尚无报道), 并从人外周血中分离并诱导出未成熟 DC, 将 pVAX1-MUC1-VNTR_n 核酸疫苗转染至 DC, 并加入细胞因子 TNF- α 诱导成熟, 用负载不同 MUC1-VNTR_n 抗原的成熟 DC 与自体纯化富集的 T 细胞共培养, 诱导出 MUC1-VNTR_n 特异性的 CTL, 通过比较不同 MUC1-VNTR_n 处理组活化分泌 IFN- γ 的特异性 CTL 数目以及该 CTL 对 MUC1 阳性的胰腺癌细胞株 Capan-2 的杀伤毒性, 体外筛选出免疫原性较强的 pVAX1-MUC1-VNTR_n 核酸疫苗, 并通过小鼠体内保护性和治疗性免疫应答实验进一步验证核酸疫苗的免疫原性, 最后证实 pVAX1-MUC1-VNTR₆ 核酸疫苗具有最强的免疫原性, 为进一步制备纳米核酸疫苗靶向淋巴结内 DC 的抗胰腺癌研究提供实验基础。该研究结果紧密结合临床实践, 具有广泛应用前景。本研究的后续实验中拟用纳米包被 DNA 疫苗, 利用其微小粒径直接高效靶向淋巴结内大量的 DC 细胞, 诱发机体产生强大的特异性免疫应答, 避免外周 DC 摄取抗原而产生免疫耐受, 从而克服免疫耐受。因此, 后续实验中可考虑使用目前较成熟 MUC1.Tg 转基因小鼠模型, 因为在自身表达 MUC1 抗原的 MUC1.Tg 转基因小鼠进行体内进行动物实验才能最真实模拟疫苗在人体内的有效性。通过比较 MUC1.Tg 小鼠与 Wt 小鼠对疫苗的反应, 进一步探讨哪些免疫细胞、细胞因子及

机制参与了免疫耐受, 找到免疫治疗的有效方式。

参 考 文 献

- [1] Yamamoto K, Ueno T, Kawaoka T, et al. MUC1 peptide vaccination in patients with advanced pancreas or biliary tract cancer. *Anticancer Res*, 2005, 25: 3575-3579.
- [2] Chen RF, Li ZH, Pan QH, et al. *In vivo* radioiodide imaging and treatment of pancreatic cancer xenografts after MUC1 promoter-driven expression of the human sodium-iodide symporter. *Pancreatol*, 2007, 7: 505-513.
- [3] Kamata M, Denda-Nagai K, Kubota N, et al. Vaccination of mice with MUC1 cDNA suppresses the development of lung metastases. *Clin Exp Metastasis*, 2002, 19: 689-696.
- [4] Hayashi T, Takahashi T, Motoya S, et al. MUC1 mucin core protein binds to the domain 1 of ICAM-1. *Digestion*, 2001, 63 Suppl 1: 87-92.
- [5] Luttes J, Feyerabend B, Buchelt T, et al. The mucin profile of noninvasive and invasive mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Am J Surg Pathol*, 2002, 26: 466-471.
- [6] Prud'Homme GJ. DNA vaccination against tumors. *J Gene Med*, 2005, 7: 3-17.
- [7] Saif MW. Controversies in the adjuvant treatment of pancreatic adenocarcinoma. *JOP*, 2007, 8: 545-552.
- [8] Quinlin IS, Burnside JS, Dombrowski KE, et al. Context of MUC1 epitope: immunogenicity. *Oncol Rep*, 2007, 17: 453-456.
- [9] Henderson RA, Konitsky WM, Barratt-Boyes SM, et al. Retroviral expression of MUC-1 human tumor antigen with intact repeat structure and capacity to elicit immunity *in vivo*. *J Immunother*, 1998, 21: 247-256.
- [10] Snyder LA, Goletz TJ, Gunn GR, et al. A MUC1/IL-18 DNA vaccine induces anti-tumor immunity and increased survival in MUC1 transgenic mice. *Vaccine*, 2006, 24: 3340-3352.
- [11] Engelmann K, Baldus SE, Hanisch FG. Identification and topology of variant sequences within individual repeat domains of the human epithelial tumor mucin MUC1. *J Biol Chem*, 2001, 276: 27764-27769.
- [12] 吴文川, 靳大勇, 秦新裕, 等. GM-CSF 增强胰腺癌 MUC1-VNTR 核酸疫苗免疫效果的研究, *中华肝胆外科杂志*, 2006, 12: 467-470

(收稿日期: 2013-08-06)

(本文编辑: 马超)