

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.04.002

• 基础研究 •

来源于成纤维细胞激活蛋白 α 的多肽疫苗 FAP τ 的抗肿瘤效应

衣艳梅¹, 杜军², 陈东¹, 唐雯莹²**Anti-tumor Effect of Polypeptide Vaccine FAP τ from Fibroblast Activation Protein α** YI Yanmei¹, DU Jun², CHEN Dong¹, TANG Wenyong²

1. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Science, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. Department of Microbial and Biochemical Pharmacy, School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University



Abstract: Objective To detect the anti-tumor effect of polypeptide vaccine-FAP τ from fibroblast activation protein α . **Methods** The antigen FAP τ was mixed uniformly with Freund's incomplete adjuvant and then immunized in multiple locations on the back of mice on day 1, 14 and 21. Tumor cells were implanted into the mice on day 7. Curves of tumor volume change and mice survival were recorded. Murine serum and splenic cells were collected on day 22 after the implantation. Antibody titer of FAP τ was detected by ELISA. IFN- γ expression in CD8⁺T cells was detected by flow cytometer. **Results** The tumor growth rate was reduced while the survival rate was increased in mice immunized with FAP τ vaccine compared that in with PBS control group. Similarly, high level of antibody titer and IFN- γ expression in CD8⁺T cells were detected in mice immunized with FAP τ . **Conclusion** By activating humoral immune response and CD8⁺T cell immune response effectively, FAP τ has strong anti-tumor activity.

Key words: FAP τ ; Polypeptide vaccine; Anti-tumor effect; Immune response

摘要: 目的 了解来源于成纤维细胞激活蛋白 α 的多肽疫苗-FAP τ 的抗肿瘤效应。**方法** 将抗原FAP τ 与氟氏不完全佐剂混合均匀, 在第1、14、21天于小鼠背部皮下多点注射进行免疫, 于第17天给小鼠接种肿瘤细胞, 记录小鼠肿瘤体积变化曲线及存活率曲线。肿瘤接种22天后对小鼠进行尾静脉取血并取脾脏分离脾脏淋巴细胞。ELISA检测小鼠血清内FAP τ 抗体滴度; 脾脏淋巴细胞体外经抗原FAP τ 再次刺激, 流式细胞仪检测CD8⁺T细胞内IFN- γ 的产生。**结果** FAP τ 免疫组小鼠肿瘤生长速度低于PBS对照组, 存活率高于PBS对照组。FAP τ 免疫组小鼠血清内产生较高的抗体滴度; 其脾脏CD8⁺T细胞内有更高水平的IFN- γ 表达。**结论** 多肽疫苗FAP τ 能够有效激活机体的体液免疫应答和CD8⁺T细胞免疫应答, 显示出较强的抗肿瘤活性。

关键词: FAP τ ; 多肽疫苗; 抗肿瘤效应; 免疫应答

中图分类号: R730.1 文献标识码: A

0 引言

肿瘤和间质之间的相互作用是肿瘤发生侵袭和转移的重要条件。肿瘤可分泌多种因子诱导间质细胞活化, 而活化的间质细胞又通过分泌细胞因子和基质蛋白酶等促进肿瘤的增殖、浸润与转移^[1]。此外, 相对于肿瘤细胞容易突变产生抗肿瘤药物的耐药性, 间质细胞还具有基因型相对稳定的特质, 因此选择这群细胞表面抗原为靶标, 进

而切断间质对肿瘤细胞的支持促进作用, 不失为一种富有前景的肿瘤免疫治疗策略。

成纤维细胞激活蛋白 α (fibroblast activation protein α , FAP α) 是高表达于肿瘤间质成纤维细胞表面的特异性标志物。FAP α 是一种丝氨酸蛋白酶, 具有胶原酶和二肽酶的活性, 通过参与肿瘤-宿主界面基质的降解和重建, 对肿瘤的生长、浸润和转移具有重要意义^[2-3]。近年来, FAP α 作为一种极具潜力的抗肿瘤靶标分子正备受关注。这是因为: (1) FAP α 在90%以上的上皮性肿瘤间质细胞中恒定表达, 正常组织仅限于胚胎及愈合创口; (2) FAP α 阳性的间质细胞构成了50%~95%肿瘤基质成分, 靶位十分丰富; (3) FAP α 阳性间质细胞主要分布于肿瘤血管周围, 这为以FAP α 为靶标的肿瘤免疫治疗能够有效阻断肿瘤组织血液供应提供

收稿日期: 2012-12-13; 修回日期: 2013-05-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81201763); 广东医学院科研基金资助项目(B2010001)

作者单位: 1.524023 广东湛江, 广东医学院基础医学院组织学与胚胎学教研室; 2.中山大学药学院微生物与生化药理学实验室

作者简介: 衣艳梅(1981-), 女, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤免疫研究工作

了有利条件^[4-5]。在前期实验中,通过分子克隆的方法我们制备了来源于FAP α 的多肽FAP τ 。本研究重点探讨FAP τ 的抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

SPF级4~6周龄BalB/c雌鼠,购自中山大学实验动物中心,动物生产许可证[SCSK(粤)2004-0011]。

RPMI 1640, FCS购自美国Gibco公司; PE-CD8单抗、抗小鼠IFN- γ 抗体、FITC-IgG二抗、细胞固定穿孔试剂均购自美国Beckman Coulter公司; HRP-二抗购自博士德; 氟氏不完全佐剂(FICA)、IL-2、BSA 购自美国Sigma公司; 其余主要化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 SDS-PAGE 检测FAP τ 纯度

取FAP τ 结晶10 μ g, 3% SDS溶解, 12% SDS-PAGE分离, 经考马斯亮蓝染色后观察其条带。

1.3 小鼠免疫及肿瘤测量

小鼠免疫及肿瘤测量方法见参考文献^[6]。

1.3.1 疫苗制备 将FAP τ 在PBS中充分研磨, 加入同体积FICA乳化均匀, 每只小鼠0.2 ml。PBS对照组则没有FAP τ , 制备方法同上。

1.3.2 实验分组及动物免疫 BalB/c小鼠20只, 随机分为2组, 每组10只, 分别为: PBS对照组, FAP τ 免疫组。首次免疫FAP τ 每只300 μ g, 加强免疫使用半量。各组动物分别于第1、14、21天时进行背部皮下多点免疫, 见图1。第2、3次均为加强免疫。

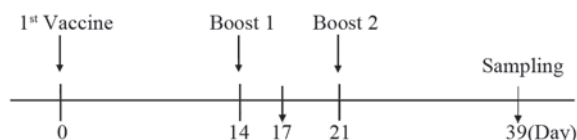


图1 小鼠肿瘤接种及免疫时限表

Figure1 Tumor implantation and immune time table

1.3.3 肿瘤接种及测量 小鼠第二次免疫3天后, 于左侧第四对乳腺脂肪垫处, 以 $10^5/100 \mu$ l的体积接种4T1肿瘤细胞。当肿瘤长径达到3 mm以上时测其长径a和短径b, 按 $v=1/2ab^2$ 算出肿瘤体积, 绘制肿瘤体积变化曲线并记录小鼠死亡情况。当小鼠肿瘤体积超过3 000 mm^3 时将小鼠颈椎脱臼法处死, 结束实验。

1.4 小鼠血清中FAP τ 抗体滴度检测

1.4.1 小鼠血清制备 肿瘤接种后22天, 各组小鼠经尾静脉取血200 μ l左右离心, 取上层血清, 4 $^{\circ}$ C放置备用。

1.4.2 间接ELISA法检测小鼠血清中抗体滴度 以每孔50 ng FAP τ 包被ELISA板, 4 $^{\circ}$ C过夜; 2% BSA 4 $^{\circ}$ C封闭过夜; 被检血清以1:1000依次倍比稀释, 37 $^{\circ}$ C孵育1 h; HRP标记二抗1:8 000稀释,

室温孵育1 h; 每孔0.2 ml TMB溶液室温避光作用30 min; 2 M H₂SO₄终止反应; 酶标仪450 nm处测定显色反应结果。

1.5 小鼠脾脏淋巴细胞制备及流式细胞仪检测

肿瘤接种后22天, 取小鼠脾脏, 制成单细胞悬液, NH₄Cl裂解去除红细胞, 用含10%FBS的RPMI1640培养液重悬, CO₂ 孵箱内培养。FAP τ 5 μ g/ml体外再次刺激, 同时加入IL-2 300 u/ml, 72 h后, 收集细胞, 并分别孵育以下抗体, PE-CD8单抗, 抗小鼠IFN- γ 抗体, FITC-IgG二抗, 行流式细胞仪检测。

1.6 统计学方法

用统计软件SPSS 13.0对结果进行双尾t检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FAP τ 纯度检测

FAP τ 行SDS-PAGE分离并经考马斯亮蓝染色后显示, 其纯度达90%以上, 足可用于下一步实验, 见图2。

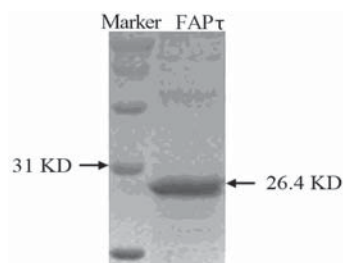


图2 FAP τ 经SDS-PAGE分离结果示意图

Figure2 FAP τ polypeptide detected by SDS-PAGE

2.2 FAP τ 疫苗对4T1荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

在肿瘤接种后30天内, FAP τ 疫苗免疫组小鼠肿瘤生长速度显著低于PBS对照组, 其差异具有统计学意义($P=0.027$), 见图3。小鼠存活率记录曲线显示, FAP τ 疫苗免疫组小鼠存活率较PBS对照组高, 见图4。

2.3 ELISA检测小鼠血清中特异性抗体滴度

结果显示, 与PBS对照组相比, FAP τ 免疫组血清检测到较高滴度的抗体产生, 见图5。

2.4 流式细胞仪检测小鼠脾脏CD8⁺T细胞内IFN- γ 表达

结果显示, 在FAP τ 免疫组小鼠脾脏内检测到约5.73%的CD8⁺T细胞表达IFN- γ , 而PBS对照组约1.33%的CD8⁺T细胞表达IFN- γ , 见图6。

3 讨论

目前以FAP α 为基础的肿瘤疫苗大多是选取FAP α 全部氨基酸序列或其膜外蛋白区域的氨基酸序列, 其抗原体积较大, 抗原表位过多容易引发机体的非特异性免疫应答。与大分子蛋白相比, 小分子多肽具有诱发高度特异性免疫反应, 毒性小和成本低, 制备简易, 便于商业化等优势^[7]。

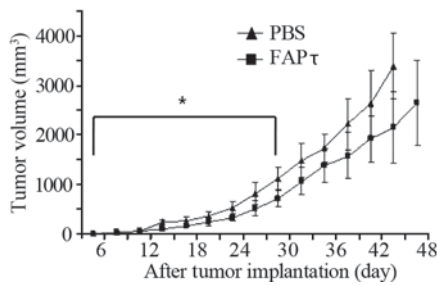


图3 两组小鼠的肿瘤体积变化图
Figure3 Changes of tumor volume of two groups

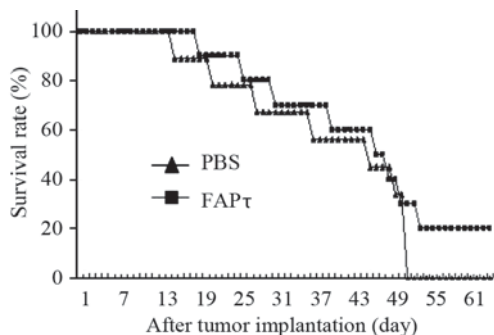


图4 荷瘤小鼠存活率示意图
Figure4 Survival rate of tumor-bearing mice treated during experiment

因此，我们选取了FAP α 内富含T细胞表位的多肽FAP τ ，研究其抗肿瘤效应。

Lee等^[8]证实FAP α 表达于小鼠乳腺癌肿瘤间质，在细胞株内不表达。本实验室也证实了同样的结果，因此，选择4T1乳腺癌作为肿瘤模型。实验证实，在小鼠肿瘤接种后6~30天FAP τ 疫苗能够显著降低小鼠肿瘤生长速度，显示出较强的抗肿瘤作用；然而，肿瘤接种30天后，FAP τ 疫苗免疫组小鼠肿瘤生长速度与对照组差异逐渐变小（图3），究其原因如下：从30天到实验记录结束，由于小鼠的死亡逐渐增加，致使样本数减少，每组小鼠间肿瘤体积误差增大；其次，随着免疫时限的延长，免疫效价逐渐降低，加之FAP α 在4T1乳腺癌内表达丰度不高及4T1肿瘤的高侵袭能力，导致两组间差异变小。

Loeffler等^[9]构建了FAP α DNA口服疫苗，该疫苗显著增加了肿瘤组织对化疗药物的摄取量，抑制了肿瘤生长并延长了荷瘤小鼠的存活时间。该组^[10]进一步利用4T1乳腺癌小鼠模型证实FAP α DNA疫苗对肿瘤的生长和转移的抑制作用主要是通过调节肿瘤免疫微环境中的极性，即促进肿瘤组织内Th2细胞向Th1细胞的转化来实现的。然而，在肿瘤杀伤过程中起主导作用的是CD8⁺T细胞。肿瘤免疫治疗策略主要以激活CD8⁺T细胞免疫应答为中心，特别是诱导肿瘤特异性的CTL^[11]。本研究组制备的抗原为不溶性颗粒抗原，在体内主要激活CD8⁺T细胞，因此，除了体液免疫应答外，我们重点检测了CD8⁺T细胞免疫应答，并证实FAP τ 免疫组较对照组能够显著激活CD8⁺T细胞应答。

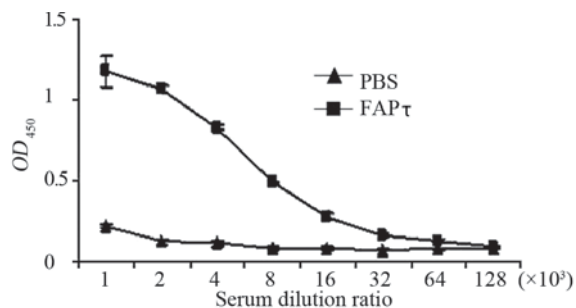


图5 ELISA检测小鼠血清中FAP τ 特异性抗体滴度
Figure5 FAP τ specific antibody titer in murine serum detected by ELISA

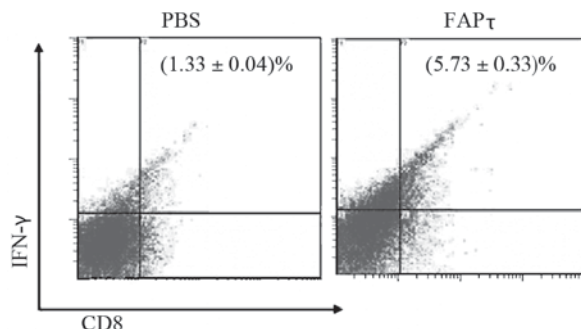


图6 流式细胞仪检测小鼠脾脏CD8⁺T细胞内IFN- γ 表达水平
Figure6 IFN- γ expression in splenic CD8⁺T cells detected by flow cytometer

参考文献:

- [1] Mueller M, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(11): 839-49.
- [2] Chen WT, Kelly T. Seprase complexes in cellular invasiveness[J]. Cancer Metastasis Rev, 2003, 22(2-3): 259-69.
- [3] Acharya PS, Zukas A, Chandan V, et al. Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Hum Pathol, 2006, 37(3): 352-60.
- [4] Monsky W, Lin C, Aoyama A, et al. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells[J]. Cancer Res, 1994, 54(21): 5702-10.
- [5] Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(18): 7235-9.
- [6] Zeng J, Cai S, Yi Y, et al. Prevention of spontaneous tumor development in a ret transgenic mouse model by ret peptide vaccination with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitor 1-methyl tryptophan[J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 3963-70.
- [7] Offringa R, van der Burg SH, Ossendorf F, et al. Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12(5): 576-82.
- [8] Lee J, Fassnacht M, Nair S, et al. Tumor immunotherapy targeting fibroblast activation protein, a product expressed in tumor-associated fibroblasts[J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 11156-63.
- [9] Loeffler M, Krüger JA, Niethammer AG, et al. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake[J]. J Clin Invest, 2006, 116(7): 1955-62.
- [10] Liao D, Luo Y, Markowitz D, et al. Cancer associated fibroblast promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7965.
- [11] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines[J]. Nat Med, 2004, 10(9): 909-15.