

表皮生长因子受体为靶向重组 T7 噬菌体抗肿瘤疫苗的构建及免疫活性

蔡新华^{1,3*} 曾宪卓³ 张尚权² 谈立松³ 唐亮³ 刘崇³ 周彩存³

(¹ 新乡医学院形态学研究室, 新乡 453003; ² 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; ³ 上海肺科医院肺癌免疫研究室, 上海 200433)

摘要 利用 RT-PCR 技术从人 A431 细胞中克隆表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) 基因 N 端序列, 经测序鉴定正确。将膜外序列不同功能及模拟抗原呈递较佳的亚克隆 DNA 片段插入 T7 噬菌体表达载体, 从而构建了重组 T7 噬菌体抗肿瘤疫苗并用于动物免疫注射, 用斑点印迹(dot blot)和 MTT 法分别检测到特异性抗体和细胞毒性 T 淋巴细胞反应。结果显示, 以噬菌体颗粒为载体的疫苗可以诱导体液免疫反应和细胞免疫反应。

关键词 表皮生长因子受体; 噬菌体展示技术; 抗肿瘤疫苗; 抗体; 细胞毒性 T 淋巴细胞反应

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体糖蛋白, 普遍表达于人体的表皮细胞和基质细胞, 是较早发现的肿瘤相关性抗原^[1]。表皮来源的恶性肿瘤组织中, EGFR 呈不同程度的过度表达^[2], 与肿瘤细胞的分化、增殖和迁移以及内环境的稳定密切相关, 以 EGFR 为抗肿瘤治疗靶点的研究已取得一定的进展。近几年来, 应用针对 EGFR 的单克隆抗体进行抗肿瘤治疗得到较快的发展, 并用于临床实验^[3-5]。这为抗肿瘤疫苗的发展研究打下了基础。噬菌体作为载体的重组噬菌体疫苗已取得一定进展^[6,7]。我们利用蛋白质分析软件得到 EGFR 膜外区域具有最佳模拟空间结构和抗原性的多肽, 并将其 DNA 片段插入到 T7 噬菌体载体基因, 以融合蛋白形式呈现于噬菌体壳蛋白, 从而构建了重组 T7 噬菌体抗肿瘤疫苗, 并进行动物实验, 评价其特异性免疫活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 T7Select[®] System Kit 包括噬菌体 T7Select 10-3b (低拷贝)和 T7Select 415-1b (高拷贝) Vector Arms 表达载体, 用于外源目的基因片段的表达。宿主菌分别为 BLT5403 (具氨苄青霉素抗性)和 BL21 (无抗性)。T7Select Control Insert、

T7Packaging Extracts、T7SelectPackage Control DNA、T7SelectUP/DOWN Primer, 购自 Novagen 公司。pMD18-T 克隆载体, 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 试剂盒和试剂 T4 DNA 连接试剂盒、ExTaq 酶购自 TaKaRa 公司。小量柱离心式组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒、小量胶回收试剂盒、柱离心式小量质粒抽提试剂盒、病毒/液体 DNA/RNA 抽提试剂盒、*E.coli* DH5 α 感受态细胞, 购自华舜生物工程有限公司。Reserve Transcription System Kit 购自 Promega 公司。EcoRI 和 HindIII 限制性内切酶购自 MBI 公司。人 A431 细胞提取的 EGFR 购自 Sigma 公司。人 EGFR 多克隆羊抗体购自 R & D Systems, Inc。兔抗羊 HRP 标记 IgG 和兔抗鼠 HRP 标记 IgG, 购自 Santa Cruz Biotechnology。EGFR 单克隆抗体由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所提供。

1.1.3 细胞系 A549 细胞(人肺腺癌细胞)由本实验室保存。A431 细胞(人外阴鳞状上皮癌细胞)由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所提供。

雄性 C57BL/6N 小鼠购置于中国科学院上海实验动物中心

收稿日期: 2005-03-30 接受日期: 2005-10-08

上海市科委立项资助重点课题 (No.0319236)

* 通讯作者。Tel: 0373-3029198, E-mail: cxh@xxmc.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 克隆人 EGFR 基因 N 端 DNA 片段 检索 GenBank 数据库, 获取 EGFR 基因 N 端 DNA 序列, 设计一对引物: 有义: 5'-AGAGGATCCTTGCCAA-GGCACGAGTAAC-3', 反义: 5'-TCTCTCTCGAGC-TTGATAGCGACGGGAAT-3'。应用 RT-PCR 从人 A549 细胞中扩增 EGFR 基因 N 端 DNA 片段, 用胶回收试剂盒回收和纯化目的片段。另外设计一对含有 *EcoRI* 和 *HindIII* 限制性内切酶酶切位点的引物: 有义: 5'-GCCGAATTCATGTACTACGAAAA TTCC-3', 反义: 5'-TCGAAGCTTCAAGATCCTCAAGAGAG-3'。亚克隆两端分别含有 *EcoRI* 和 *HindIII* 限制性内切酶酶切位点 DNA 片段。

1.2.2 目的 DNA 片段鉴定 利用 TaKaRa DNA 连接试剂盒将获取的目的 DNA 片段与 pMD18-T 克隆载体 (含有 *EcoRI* 和 *HindIII* 限制性内切酶酶切位点) 连接, 转化感受态 *E.coli* DH5a, 在含有 X-Gal、IPTG 和 *amp^R* 的 LB 琼脂平板培养基上培养, 挑选白色单菌落并扩增, 抽提质粒 DNA, PCR 鉴定目的 DNA 片段的大小正确, 进行 DNA 测序。

1.2.3 构建重组的 T7 噬菌体 根据 EGFR 膜外各区域不同作用以及模拟最佳抗原性, 设计 3 对引物, 亚克隆 3 个 DNA 片段。引物 1: 有义: 5'-ATCGAATTCGCGACTGAAGGAGCTG-3'、反义: 5'-AGTAAGCTTGACTATGTCCCGCCACTG-3', 扩增膜外 546~678 位 132 bp DNA 片段。引物 2: 有义: 5'-CATGAATTCAGCCTGTGGGGCCGACA-3'、反义: 5'-CTGAAGCTTCTTACACTTGCAGGACGCC-3', 扩增膜外 1075~1165 位 90 bp DNA 片段。引物 3: 有义: 5'-ATGGAATTCGTGCAACGTGGAGAGC-3', 反义: 5'-CTGAAGCTTGTGCAGTTTTGAAGTGTT-3', 扩增膜外 625~1263 位 638 bp DNA 片段。引物设计均含 *EcoRI* 和 *HindIII* 限制性内切酶酶切位点。将目的 DNA 片段分别与 T7Select Vector Arms 相连接 (图 1), 132 bp、90 bp 和 45 bp (对照组)

DNA 片段插入高拷贝数载体 T7415-1b, 638 bp DNA 片段插入低拷贝数载体 T710-3b。体外包装和噬菌体扩增。

1.2.4 重组噬菌体的鉴定 利用 UP/DOWN primer (Kit 提供) 进行 PCR, 鉴定插入的目的 DNA 片段。参考《分子克隆》的方法, 扩增的重组 T7 噬菌体 100 °C 水浴变性 5min, 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 进行 SDS-PAGE 电泳, 显示融合壳蛋白的大小。重组 T7 噬菌体常规处理, SDS-PAGE 电泳、转膜、Western 免疫印迹。一抗为人 EGFR 多克隆羊抗体, 二抗为兔抗羊-HRP 标记的 IgG, DAB 显色。

1.2.5 重组噬菌体扩增 参考《分子克隆》M13 噬菌体扩增方法, 采用高倍数感染法进行大量液体扩增。扩增的重组噬菌体检测效价, 调整浓度在 10^{14} pfu/ml, 4 °C 保存。

1.2.6 动物免疫方案 雄性 C57BL/6N 小鼠 [6~8 周, 体重 (21±1) g], 随机分成 5 组 (实验组 3 组、对照噬菌体组和生理盐水组), 每组 6 只。动物颈背部多点皮下注射, 300 μl/只重组噬菌体 (10^{13} pfu 约 20 μg) 或生理盐水。一周后加强免疫一次, 此后间隔两周加强免疫, 共计 5 次。初次免疫前尾部采血检测, 免疫后第三天采血斑点印迹 (dot blot) 检测抗体效价。

1.2.7 斑点印迹检测抗体效价 人 EGFR (30 ng/μl) 在硝酸纤维素薄膜点样 10 μl, 置于封闭容器中 4 °C 冰箱完全吸收。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗为不同稀释倍数免疫鼠血清, 37 °C 温育 1.5 h, 二抗为兔抗鼠 HRP 标记 IgG, 37 °C 温育 1 h, DAB 显色, 每步骤之间均洗涤 3 次, 每次 5 min; 洗涤液及稀释液均用 PBS (pH 7.4)-0.05% Tween。

1.2.8 MTT 法检测细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 活性 对数生长期的 A431 细胞经 0.25% 胰蛋白酶和 1% EDTA 混合液消化成单细胞悬液, 用 RPMI1640 洗涤细胞两次并重悬细胞, 调整计数细胞约 2×10^5

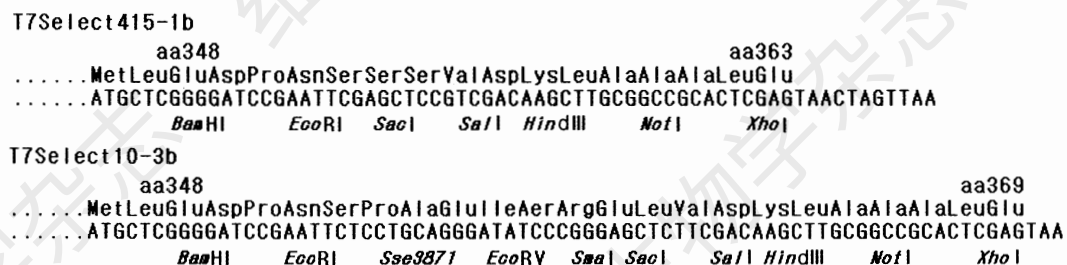


Fig. 1 T7select Vector cloning region

个/ml 作为靶细胞(用胎盘兰染色示活细胞数大于 95%)。无菌取免疫鼠的脾脏, 200 目消毒尼龙纱网上滴入 RPMI1640 研磨呈单细胞悬液, 并用 RPMI1640 洗涤并重悬细胞, 用低渗裂解法去除红细胞^[8]。用含 10% 新生牛血清(NBS)的 RPMI1640 重悬细胞并调整计数脾细胞作为效应细胞, 效应细胞与靶细胞比例分别为 50:1、10:1、5:1, 分别接种 96 孔板, 每孔接种效靶细胞各 100 μ l。另外设 100 μ l/孔 A431 细胞对照孔和不同浓度的效应细胞对照孔, 并用含 10%NBS 的 RPMI1640 培养液补足 200 μ l/孔, 每项均设 6 个复孔。置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 20 h^[9], 然后每孔加入 20 μ l 5 mg/ml MTT, 继续培养 4 h, 离心沉淀器 1 000 r/min 离心 10 min, 小心倾去培养液, 加入二甲基亚砜(DMSO) 200 μ l/孔, 于脱色摇床上使深蓝色结晶完全溶解, 用酶联免疫检测仪读取波长 570 nm 的 A (A₅₇₀)值, 并按下列公式计算杀伤率(%)。每组动物实验至少重复 3 次。

$$\text{杀伤率}(\%) = \{1 - [(A_{E+T}) - A_E] / A_T\} \times 100\%$$

A_{E+T}: 效应细胞 + 靶细胞 A 值

A_T: 相应浓度单独靶细胞 A 值

A_E: 相应浓度单独效应细胞 A 值

1.2.9 安全性 实验组和对照组动物每周测量体重、观察记录体毛及粪便情况, 处死动物后肉眼观察和组织学切片检测。

1.2.10 统计学分析 实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间 A 值, 进行 *t* 检验。效应细胞对靶细胞的杀伤率采用 Q 检验。 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 扩增 EGFR 目的片段

RT-PCR 扩增的 EGFR 基因 N 端目的 DNA 片段, 长约 1 900 bp(图 2)。亚克隆 EGFR 膜外约 1 800 bp DNA 片段(图 3)。亚克隆插入 T7 噬菌体目的 DNA 片段(图 4)。

2.2 构建重组噬菌体鉴定结果

PCR 扩增得到的产物为插入的目的 DNA 片段, 加上噬菌体载体臂上下游约 80 bp DNA 片段, 扩增鉴定结果正确。对照重组 T7 噬菌体为试剂盒中提供, 插入片段为 45 bp(图 5)。

重组噬菌体壳蛋白 SDS-PAGE 显示: 低拷贝数重组 T7 噬菌体外壳由主要壳蛋白(10A)和次要壳蛋白

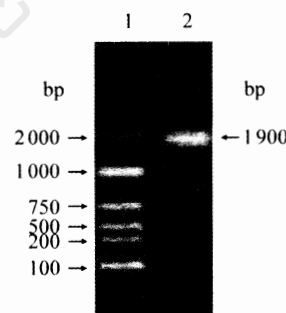


Fig.2 Cloning N-terminal DNA fragment of EGFR with RT-PCR

1: DNA marker; 2: target DNA fragment.

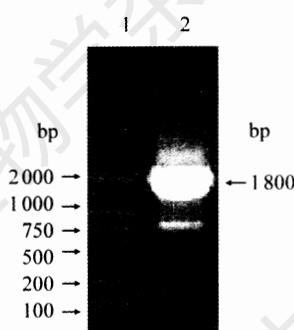


Fig.3 Subcloning DNA fragment of EGFR extracellular region with PCR

1: DNA marker; 2: target DNA fragment.

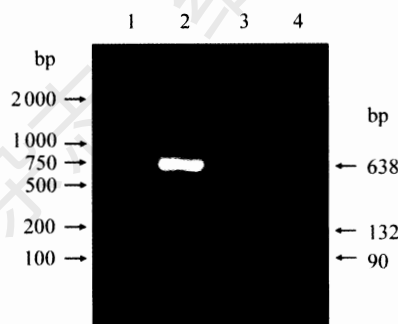


Fig.4 Subcloning DNA fragment for inserting bacteriophage T7 vector with PCR

1: DNA marker; 2-4: target DNA fragment.

白(10B)组成(融合表达目的片段的壳蛋白)。高拷贝数重组 T7 噬菌体只有 10B 壳蛋白(图 6、图 7)。

重组噬菌体融合壳蛋白表达产物的 Western 印迹见图 8。

2.3 斑点印迹检测抗体效价

实验组: 重组 T7415-1b-132 噬菌体产生特异性抗体 1:2 000 为阳性信号; 重组 T7415-1b-90 噬菌体和重组 T710-3b-638 噬菌体实验组 1:1 000

为阳性信号(图 9)。

对照组：生理盐水组特异性抗体呈阴性；重组 T7415-1b-45 组特异性抗体 1：50 为弱阳性；用重组噬菌体点样检测产生抗噬菌体抗体效价 1：20 000 为阳性(图 10)。

2.4 CTL 杀伤活性检测

检测结果显示效应细胞和靶细胞比例在 10：1 时杀伤效率最佳，各孔 570 nm 波长读取的光密度(A_{570})值见表 1。

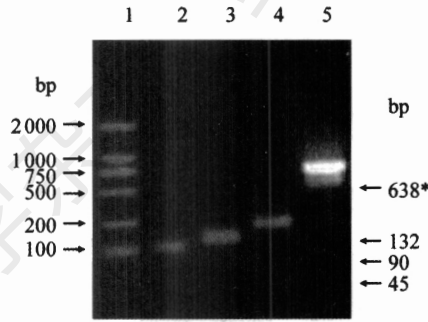


Fig.5 Identifying the target DNA fragment with PCR
1: DNA marker; 2-5: target DNA fragment. *The target DNA fragment with PCR consisted of inserting DNA fragment and about 80 bp of bacteriophage arms.

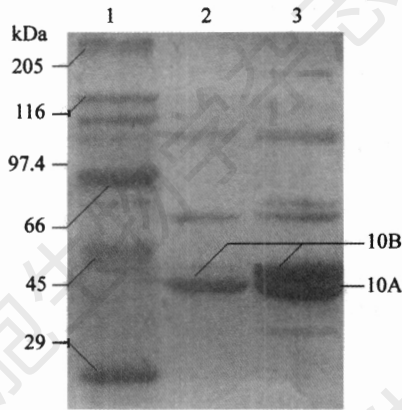


Fig.6 SDS-PAGE of recombinant bacteriophage T7 in control group
1: protein marker; 2: T7415-1b-45; 3: T7415-1b-132; 10A: major capsid protein; 10B: minor capsid protein.

比较 A_{E+T} 均数，实验组高拷贝数重组噬菌体与对照组间具有显著性差异 ($P<0.01$)，而实验组低拷贝数重组噬菌体和对照组相比无显著性差异 ($P>0.05$)。比较 A_T 和 A_E 均数，实验组和对照组间无显著性差异 ($P>0.05$)。比较效应细胞对靶细胞杀伤率，实验组高拷贝数重组噬菌体与对照组间具有显

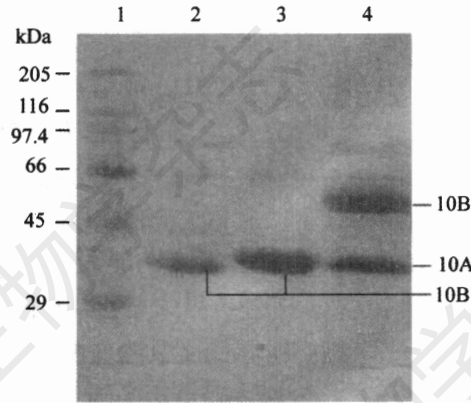


Fig.7 SDS-PAGE of recombinant bacteriophage T7 in experimental group
1: protein marker; 2: T7415-1b-90; 3: T7415-1b-132; 4: T710-3b-638; 10A: major capsid protein; 10B and 10B': minor capsid protein.

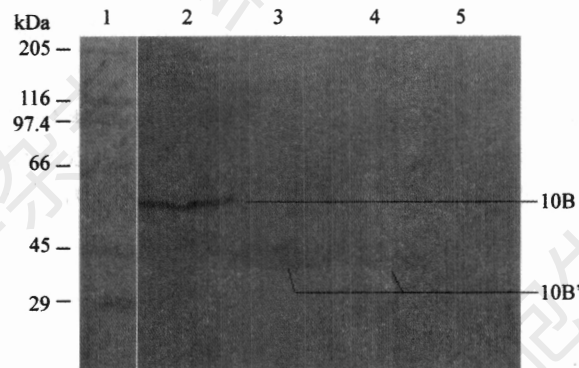


Fig.8 Identifying the target multi-peptide of recombinant bacteriophage with Western blot
1: protein marker; 2: T710-3b-638; 3: T7415-1b-132; 4: T7415-1b-90; 5: T7415-1b-45; 10B and 10B': minor capsid protein.

表 1 酶联免疫检测仪检测的 A_{570} ($\bar{x} \pm s$)

		A_{E+T}	A_T	A_E	杀伤率(%)
实验组	T7415-1b-90	$0.725 \pm 0.005^*$	0.710 ± 0.050	0.190 ± 0.017	24.69%**
	T7415-1b-132	$0.706 \pm 0.056^*$	0.659 ± 0.030	0.259 ± 0.02	32.12%**
	T710-3b-638	0.734 ± 0.014	0.611 ± 0.095	0.125 ± 0.076	0.2%
对照组	T7415-1b-45	0.686 ± 0.037	0.602 ± 0.014	0.113 ± 0.015	4.81%
	生理盐水组	0.655 ± 0.046	0.602 ± 0.014	0.103 ± 0.007	8.43%

与对照组相比，* $P<0.01$ ；与对照组相比，** $P<0.05$ 。

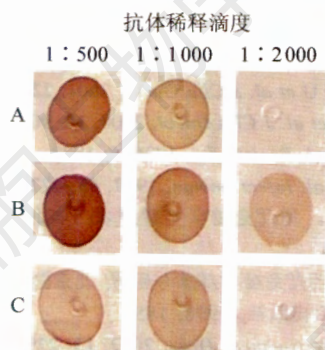


Fig.9 Identifying the titer of specific antibody with dot blot in experimental group

A: T7415-1b-90; B: T7415-1b-132; C: T710-3b-638.



Fig.10 Identifying the titer of specific antibody and anti-bacteriophage antibody with dot blot

A: physiological solution; B: T7415-1b-45; C: antibody of anti-bacteriophage.

著性差异($P<0.05$)。

2.5 安全性

实验组与对照组动物相比,体重增加的平均数无显著性差异($P>0.05$);动物皮毛第7周后有轻微的杂乱和干燥,粪便色泽及形态正常;动物处死后肉眼观肝、脾无明显增大,组织切片显微镜下观察,肝、肺和肾组织无实质性病变;有2例可见肺组织切片上有少量炎细胞浸润,无严重的毒性反应。因此,以噬菌体作为疫苗载体具有良好的安全性。

3 讨论

表皮生长因子受体是较早发现的肿瘤相关抗原,一直是抗肿瘤治疗的重要靶点,它可以抑制损伤细胞和肿瘤细胞的凋亡、促进血管生成、影响肿瘤细胞的运动、黏附和浸润,在肿瘤形成和进展过程中起着重要的作用。目前,EGFR单克隆抗体已用于临床实验。Cetuximab是人-鼠嵌合型单克隆抗

体,可以竞争阻止配体EGF/TGF- α 与EGFR结合起来。在非小细胞肺癌(NSCLC)的体内、外的实验中显示:单独使用Cetuximab(C225)或联合放疗/化疗可以抑制细胞的生长、使癌细胞处于细胞周期的G₀/G₁期以及下调细胞内信号分子^[3]。单克隆抗体的临床治疗效果为抗肿瘤疫苗的发展打下了基础。

正常情况下,EGFR作为自身抗原机体不产生免疫应答,即呈现自身的耐受。在人与小鼠两个不同物种间,EGFR在多核苷酸水平存在着较高的同源性,胞外区配体结合序列同源性可达86%。利用这种异种同源蛋白作为免疫抗原,很易被宿主体内免疫细胞识别为外来抗原产生免疫应答^[10],并与自身的EGFR存在交叉反应^[11]。我们利用蛋白质分析软件,将人源EGFR膜外区域模拟抗原呈递较佳的DNA片段进行亚克隆,然后插入T7噬菌体表达载体,体外包装成具有活性的重组噬菌体,感染宿主菌大量扩增噬菌体,成为抗肿瘤研究的噬菌体载体疫苗。目前,未检索到用T7噬菌体作为抗肿瘤疫苗载体相关文献。

本实验成功构建了2个高拷贝数重组噬菌体T7415-1b-132和T7415-1b-90,一个低拷贝数重组噬菌体T710-3b-638,经过鉴定证明成功构建了保持原有生物活性的重组噬菌体载体抗肿瘤疫苗。实验显示:实验组重组噬菌体免疫动物均诱导产生了特异性高滴度抗体,而T7415-3b-132重组噬菌体产生的抗体滴度最高,1:2000阳性;对照组重组噬菌体T7415-1b-45呈弱阳性反应,可能是噬菌体与EGFR存在一定的交叉反应,其原因有待进一步探讨。

特异性细胞毒性T淋巴细胞反应检测,实验组2个高拷贝数重组噬菌体诱导产生了特异性细胞毒杀伤活性;体外MTT实验可见在倒置显微镜下高表达EGFR的A431(流式细胞仪检测EGFR阳性细胞率达96.1%)细胞周围可见大量脾细胞聚集;低拷贝数的重组噬菌体未产生特异性杀伤活性。由于作者没有检索到EGFR的T细胞表位和B细胞表位相关资料,本实验插入的目的片段是根据蛋白质分析软件模拟假设的抗原表位,检测到的特异性细胞毒杀伤活性只达29.47%。Wan等^[12]将已证实的乙肝病毒表面抗原表位HBs₂₈₋₃₉ DNA片段插入丝状噬菌体构建的疫苗,免疫动物产生高达约70%的特异性细胞毒性T淋巴细胞反应,证明噬菌体颗粒是一种有效的CTL疫苗形式。所以,要获得高质量抗肿瘤疫苗,筛选高亲和力和特异性抗原表位至关重要,因此,本

研究还待进一步完善。

已有研究表明共价交联的微小颗粒抗原参与MHC I类非经典抗原递呈的效率较可溶性抗原高1 000~10 000倍^[13]，虽然作为颗粒抗原的T7噬菌体载体疫苗免疫机制还不清楚，但它可以有效诱导机体产生体液免疫反应和细胞免疫反应，而且安全可靠。因此，可能成为一种有效抗肿瘤疫苗。

参考文献 (References)

- [1] Wells A. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, **31**: 637
- [2] Groves RW *et al. J Cutan Pathol*, 1992, **19**: 66
- [3] Raben D *et al. Clin Cancer Res*, 2005, **11**: 795
- [4] Vanhoefter U *et al. J Clin Oncol*, 2004, **22**: 175
- [5] Baselga J *et al. J Clin Oncol*, 2000, **18**: 904
- [6] Ren ZJ *et al. Protein Sci*, 1996, **5**: 1833
- [7] Jiang J *et al. Infect Immun*, 1997, **65**: 4770
- [8] 周汝麟等. 现代免疫学实验技术, 湖北科学技术出版社, 1998, 410
- [9] 巴德年. 当代免疫学技术与应用, 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998, 185
- [10] Wei YQ. *Anti-cancer Drug*, 2002, **13**: 229
- [11] Lu Y *et al. J Immunol*, 2003, **170**: 3162
- [12] Wan Y *et al. Vaccine*, 2001, **19**: 2918
- [13] Men Y *et al. Vaccine*, 1999, **17**: 1047

Construction and the Immune Reactivity of the Anti-cancer Vaccine of Recombinant Bacteriophage T7 Targeting Epidermical Growth Factor Receptor

Xin-Hua Cai^{1,3*}, Xian-Zhuo Zeng³, Shang-Quan Zhang², Li-Song Tan³, Liang Tang³, Dong Liu³, Cai-Cun Zhou³

(¹Morphological Laboratory of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China; ²Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China; ³Lung Carcinoma Immune Laboratory of Shanghai Pneumology Hospital, Shanghai 200433, China)

Abstract The overexpression of epidermical growth factor receptor (EGFR) played a vital role in the process of the formation, progression, metastasis and therapy of the malignant tumor. The monoclonal antibodies have been used for treatment of EGFR-positive expression tumors in clinical trial. In our study the N-terminal of EGFR gene was cloned from human A431 cells with RT-PCR technology and the sequence was identified. The subclone DNA fragments with different function and better presentation of mimic antigen were inserted into the bacteriophage T7 expression vector. The anti-cancer vaccine of recombinant bacteriophages T7 were constructed and the mice were immunized. The specific antibodies and the cytotoxic T lymphocyte response were detected with dot blot and MTT method, respectively. The result showed that recombinant bacteriophage T7 carrier vaccine could induced humoral immune reaction and cellular immune reaction. Therefore, the recombinant bacteriophage T7 carrier could be a kind of promising vaccine and provides a basis for the study of anti-cancer vaccine.

Key words epidermal growth factor receptor; bacteriophage display; anti-cancer vaccine antibody; cytotoxic T lymphocyte response

Received: March 30, 2005

Accepted: October 8, 2005

This work was supported by the Commission of Science and Technology of Shanghai (No.0319236)

*Corresponding author. Tel: 86-373-3029198, E-mail: cxh@xxmc.edu.cn