

# 嵌合NY-ESO-1 DNA疫苗诱导黑色素瘤小鼠模型 抗肿瘤免疫的研究

谷银芳<sup>1,2</sup> 顾汉民<sup>3</sup> 周曙明<sup>3</sup> 吴炯<sup>2</sup> 蒋泽华<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234; <sup>2</sup>理查罗伯茨生物科技研究院, 宜兴 214200;  
<sup>3</sup>宜兴市肿瘤医院, 宜兴 214200)

**摘要** NY-ESO-1作为一种肿瘤抗原, 具有较强的免疫抗原性, 并且已成为肿瘤候选疫苗之一。但由于目前大多应用NY-ESO-1多肽以及蛋白质疫苗, 其临床试验效果欠佳, 亟需更为有效的NY-ESO-1抗原设计的肿瘤免疫治疗出现。该研究的目的是探索将NY-ESO-1与具有增强免疫效应的五种因子分别重组成嵌合蛋白抗原, 使其更有效地被加工、转运和呈递, 以期找到最佳的基因佐剂, 增强NY-ESO-1作为肿瘤治疗性DNA疫苗的免疫效果。采用电脉冲体内细胞高效转入的方法对C57BL/6小鼠进行DNA免疫, 发现用编码NY-ESO-1或连接有HSP70的嵌合体质粒免疫可诱导强烈的NY-ESO-1特异性IgG1反应。NY-ESO-1连接泛素的质粒免疫小鼠主要诱导NY-ESO-1特异性IgG2a反应, 表明此基因佐剂诱导强的Th1免疫反应。与其他嵌合NY-ESO-1质粒免疫相比, NY-ESO-1连接泛素的质粒免疫小鼠, 有效地保护小鼠对有NY-ESO-1表达的B16F10黑色素瘤细胞系的挑战作用, 证明强的Th1免疫反应对预防和治疗肿瘤具有重要作用。去除调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)可进一步增强泛素-NY-ESO-1嵌合DNA疫苗治疗黑色素瘤的作用。此外, Ub-NY-ESO-1质粒结合编码异源黑素瘤抗原GP100和TRP-2的质粒免疫可诱导对抗含有NY-ESO-1表达的B16F10黑色素瘤的协同抗肿瘤免疫疗效。该研究结果表明, 编码泛素-NY-ESO-1嵌合抗原的质粒DNA疫苗或与编码其他相关黑色素瘤抗原的质粒的联合可能是有效的治疗黑色素瘤的疫苗。

**关键词** NY-ESO-1; B16F10黑色素瘤; 基因佐剂; 治疗性基因疫苗; gp100; TRP-2

## A Genetic Vaccine Encoding Chimeric NY-ESO-1 Induces Anticancer Immunity in A Mouse Model

Gu Yinfang<sup>1,2</sup>, Gu Hanmin<sup>3</sup>, Zhou Shuming<sup>3</sup>, Wu Jiong<sup>2</sup>, Jiang Zehua<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;  
<sup>2</sup>Richard J. Roberts Institute of Biotechnology, Yixing 214200, China; <sup>3</sup>Yixing Cancer Hospital, Yixing 214200, China)

**Abstract** The NY-ESO-1 is one of the most immunogenic tumor antigens and an attractive candidate for developing cancer immunotherapy. However, trials using NY-ESO-1 peptide and protein vaccines so far have generated insufficient clinical outcomes, and improvement in antigen design is therefore needed for efficient cancer immunotherapy. In this study we designed different genetic vaccines (plasmids) encoding NY-ESO-1 fusion with various proteins that affect antigen processing, trafficking or presentation with the aim to identify an improved

收稿日期: 2015-08-13 接受日期: 2015-10-10

江苏省卫生厅项目(批准号: H200767)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0510-87959028, E-mail: jiangzehua65@sina.com

Received: August 13, 2015 Accepted: October 10, 2015

This work was supported by the Department of Public Health of Jiangsu Province (Grant No.H200767)

\*Corresponding author. Tel: +86-510-87959028, E-mail: jiangzehua65@sina.com

网络出版时间: 2015-11-12 11:25:29 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151112.1125.006.html>

genetic adjuvant for this antigen. We studied the vaccines in a mouse model and measured humoral and cellular immune responses. We found that plasmids encoding NY-ESO-1 alone or linked with HSP70 induced strong NY-ESO-1-specific IgG1 response. Mice immunized with plasmid encoding ubiquitin-linked NY-ESO-1, however, induced primarily a NY-ESO-1-specific IgG2a response indicating that this genetic adjuvant drives the immune system towards a strong Th1 response. Mice immunized with plasmid encoding ubiquitin-linked NY-ESO-1 showed significant enhanced protection against challenge with a B16F10 melanoma cell line expressing NY-ESO-1 as compared to other chimeric NY-ESO-1 vaccine constructs. It demonstrated the importance of a strong Th1 response in tumor protection. Depletion of regulatory T (Treg) cells by denileukin difitox further enhanced the antitumor effect of the ubiquitin-linked NY-ESO-1 DNA vaccine in a therapeutic study. Finally, combining ubiquitin-linked NY-ESO-1 construct with plasmids encoding the melanoma antigens gp100 and TRP-2 induced a synergic antitumor effect against NY-ESO-1 expressing B16F10 tumor. Overall, these data suggested that genetic vaccine encoding the ubiquitin-linked NY-ESO-1, alone or in combination with other relevant melanoma antigens might be a potent therapeutic cancer vaccine.

**Keywords** NY-ESO-1; B16F10 melanoma; genetic adjuvant; genetic vaccine; gp100; TRP-2

在本研究中,我们通过B16F10鼠黑色素瘤细胞表达NY-ESO-1,以测试与NY-ESO-1 DNA疫苗相辅的遗传佐剂。通过使用电脉冲体内转入技术,可以在同一时间内用少量DNA测试六个以上不同的遗传佐剂。泛素可作为NY-ESO-1的最佳融合伴侣,诱导已建立的B16F10/NY-ESO-1的肿瘤模型的抗肿瘤作用。本研究结果表明,在C57BL/6小鼠腹腔单次注射ONTAK,24 h后,部分调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)消失,增强了疫苗的特异性T细胞应答<sup>[1]</sup>。去除Treg很可能有利于临床治疗并进一步提高癌症疫苗的效果<sup>[2]</sup>。在以往的研究中,ONTAK很少被用作DNA疫苗免疫佐剂<sup>[3]</sup>,但是鉴于其表现出的去除Treg细胞的功能,ONTAK很有可能成为一种有效的DNA疫苗免疫佐剂。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

*E.coli*菌株DH5 $\alpha$ 为本实验室保存。NY-ESO-1的基因序列以及CRT、HSP70、SLC、Ub和Ii-PADRE基因序列由上海捷瑞公司进行密码子优化并合成,质粒构建示意图见图1。DNA质粒载体pcDNA3.1为Life Technology公司产品。6~8周龄C57BL/6雌性鼠(H-2<sup>b</sup>)由杭州师范大学模式生物研究中心提供并饲养。鼠黑色素瘤细胞株B16F10购自ATCC公司。

### 1.2 细胞系和转染

B16F10源自小鼠C57BL/6(H-2<sup>b</sup>)自发的鼠黑色

素瘤细胞系(ATCC)。将细胞培养在DMEM完全培养基中,其中含有10%胎牛血清,2 mmol/L的L-谷氨酰胺,100 IU/mL青霉素和100  $\mu$ g/mL链霉素,37  $^{\circ}$ C培养于湿润的5% CO<sub>2</sub>培养箱中。当B16F10细胞密度达到4 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL时,取2  $\mu$ g质粒DNA pcDNA3.1-NY-ESO-1进行转染,用单独转染质粒pcDNA3.1作为对照。96孔细胞板37  $^{\circ}$ C孵育48 h。接着,选择性施加1.5 mg/mL遗传霉素(Geneticin),2周后培养于选择培养基。

### 1.3 实验动物

选取6~8周龄的C57BL/6雌性鼠(H-2<sup>b</sup>),平均重量为18~22 g,购自杭州师范大学模式生物研究中心,由理查·罗伯茨生物科技中国(宜兴)研究院动物室饲养。

### 1.4 RNA提取并逆转录

提取转染的细胞的总RNA,使用Beckman Coulter Genomics公司的Agencourt FormaPure试剂盒进行,操作严格按照试剂盒说明书执行。NY-ESO-1基因特异性PCR引物用于扩增在长度为130 bp的NY-ESO-1片段。克隆PCR引物NY-ESO-1F: 5'-TGA AAG AAT TCA CCG TGA G-3'和NY-ESO-1R: 5'-AAG CAC TGG GTG ATC CAC A-3'。PCR产物经4%琼脂糖凝胶电泳结果验证。*GAPDH*为内参。反应结束后,NanoDrop 2000超微量分光光度计测RNA的浓度和纯度,根据测定的浓度取1  $\mu$ g RNA逆转录为cDNA: RNA 1  $\mu$ g、RT Enzyme mix 1  $\mu$ L、Primer mix 1  $\mu$ L、5 $\times$ RT Buffer 4  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 23  $\mu$ L,65  $^{\circ}$ C水浴10 min,然后迅速放入冰浴中冷却;再加入缓冲液8  $\mu$ L、RNase抑制剂2  $\mu$ L、逆转录酶3  $\mu$ L,总体积为40  $\mu$ L。逆转录反应:

37 °C 15 min; 最后80 °C灭活10 min。余下的分装后保存至-80 °C冰箱中, 避免反复冻融。

### 1.5 RT-PCR

以上所得cDNA必须用ddH<sub>2</sub>O稀释至10倍后进行PCR实验。反转录反应体系: cDNA 2 μL、上游引物1 μL(10 ng)、下游引物1 μL(10 ng)、SYBR Green mix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O补足至总体积20 μL。反应条件: 95 °C 60 s; 95 °C 30 s, 60 °C 60 s, 72 °C 60 s, 40个循环; 然后60 °C延伸10 min。产物用0.1%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 DNA免疫

将10 μg每种质粒DNA溶于40 μL生理盐水中, 对小鼠进行后肢肌肉免疫。加入空载体以保持各组中的相同的DNA量进行免疫。质粒注射之后对肌肉注射区进行电脉冲(125 V/cm, 30 ms/次, 电击2次)。

### 1.7 ELISA检测

对小鼠免疫2周和3周后, 分别收集免疫小鼠的血清。血清样品储存在-80 °C待测。将NY-ESO-1(1-40 aa)多肽(上海生工生物工程有限公司合成)用PBS缓冲液稀释至1 μg/mL, 以50 μL/孔加入96孔酶标板中, 4 °C包被过夜。次日, 用封闭液PBST洗涤3次, 5 min一次并甩干。再封闭, 150 μL/孔, 37 °C孵育2 h, 用PBST洗涤同前, 甩干; 加入用PBST稀释的血清样品, 以100 μL/孔加入封闭的96孔酶标板中, 所有的血清样品初始稀释1:1 000, 再按1:2依次进行系列稀释。37 °C孵育2 h, 封闭液PBST洗涤同前, 甩干; 加入1:1 000稀释的二抗(生物素化的羊抗鼠IgG), 100 μL/孔, 37 °C孵育1 h, PBST洗涤同前, 拍干; 加入新鲜配制的链酶亲和素标记的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)(Southern Biotech), 100 μL/孔, 置于37 °C孵育1 h, 洗涤后加入底物显示, 5 min后以2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止显色, 50 μL/孔。使用酶联免疫检测仪, 读取D<sub>450</sub>值。

### 1.8 体内肿瘤预防实验

动物试验严格参考NIH试验动物指导说明进行。在phgp100+phTRP-2预防实验中, 取6~8周龄C57BL/6雌性鼠随机分为6组: pcDNA3.1组、pNY-ESO-1组、pCRT-NY-ESO-1组、pHSP70-NY-ESO-1组、pSLC-NY-ESO-1组和pUb-NY-ESO-1组, 每组7只。各组小鼠分别于0 d和14 d以相应疫苗免疫, 并于最后1次免疫后7 d皮下注射100 μg黑色素瘤细胞株B16F10, 密度为2×10<sup>5</sup>/mL, 使小鼠成瘤, 建立小

鼠预防模型。用游标卡尺测量皮下肿瘤的最长直径(a)及最短宽度(b), 每周测量3次。将上述测量数据代入公式 $V(\text{mm}^3)=0.5 \times ab^2$ 计算肿瘤体积。肿瘤体积>1 500 mm<sup>3</sup>时对其进行安乐死。

### 1.9 体内肿瘤的治疗实验

在治疗性研究中, 取6~8周龄C57BL/6雌性鼠, 于左侧背部皮下注射100 μg B16F10/NY-ESO-1细胞, 密度为2×10<sup>5</sup>/mL, 使其5 d内形成肿瘤。第5 d, 小鼠腹膜内注射10 μL ONTAK(1:10稀释在100 μL HBSS中), 然后分别于第6, 13, 20 d使用相应的DNA质粒进行免疫, 同时进行电脉冲处理。

### 1.10 数据统计

使用SigmaPlot 11.0进行数据分析, 定量实验至少重复3次, 各组数据以“均值±标准偏差”表示。P<0.05为差异显著, P<0.01为差异极显著。Kaplan-Meier法分析小鼠存活实验。

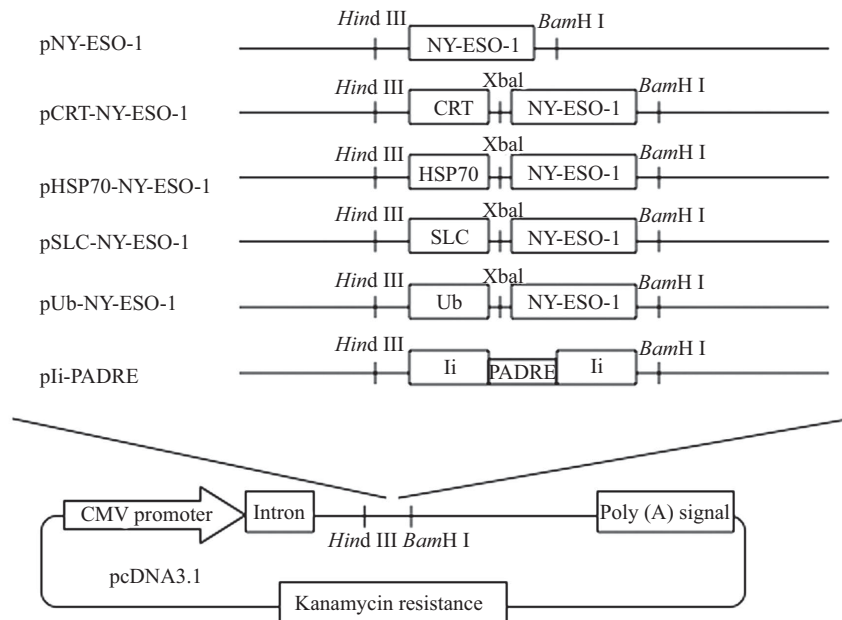
## 2 结果

### 2.1 构建NY-ESO-1 DNA疫苗以及嵌合体

在预防实验中, 以常规分子克隆方法构建DNA疫苗, 将NY-ESO-1基因亚克隆到载体pcDNA3.1中, 如图1所示。在NY-ESO-1序列上游分别插入1个表达阅读框架, 形成5个嵌合体。这些插入的序列在细胞内引导合成的NY-ESO-1抗原到相应的通路或途径得到加工和呈递。如pIi-PADRE, 我们用一个高亲和通用CD4<sup>+</sup> T细胞表位即泛DR辅助T细胞表位(pan-DR helper T cell epitopes, PADRE)来替换Ii链CLIP(class II-associated invariant chain peptide)区, 通过主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)II递呈, 以增强CD4<sup>+</sup>免疫反应<sup>[4]</sup>。

### 2.2 B16F10细胞表达NY-ESO-1的结果

为了阐述在C57BL/6小鼠中免疫NY-ESO-1的DNA疫苗是否能排斥在体内表达NY-ESO-1的肿瘤, 我们用pcDNA3.1-NY-ESO-1质粒转染生长快速免疫原性低的黑色素瘤细胞系B16F10。如图2A所示, 通过RT-PCR和细胞ELISA对NY-ESO-1表达的克隆进行鉴定。单独转染pcDNA3.1、B16F10/neo的B16F10细胞, 不表达NY-ESO-1(图2A)。然后, 我们探讨NY-ESO-1表达的B16F10细胞是否仍存在致瘤性。在C57BL/6小鼠皮下注射相同数量的有NY-ESO-1表达的B16F10细胞或B16F10的亲代细胞系。生长曲线表明, NY-ESO-1的表达不改变B16F10细胞的致瘤

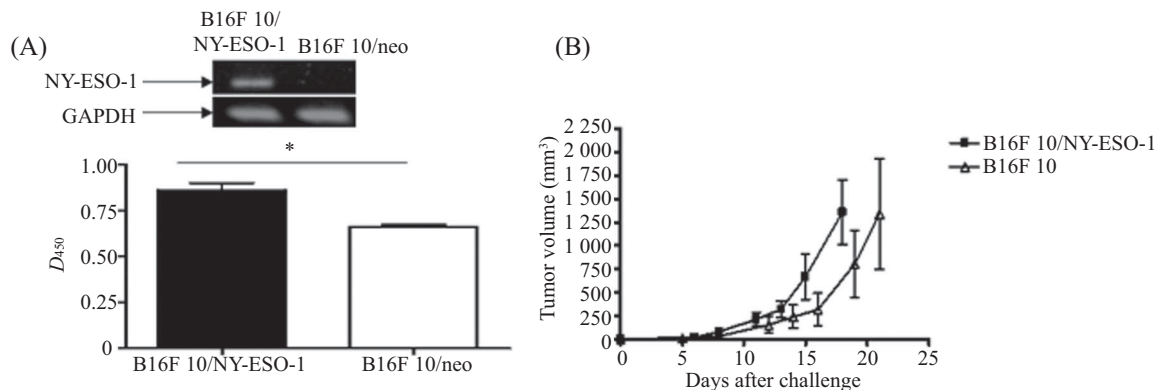


把NY-ESO-1、CRT、HSP70、SLC、Ub和Ii-PADRE的基因序列按图示构建到pcDNA3.1载体CMV启动子。对于pIi-PADRE, 鼠的CLIP区域的保守分子链则被PADRE序列替代。

The fusion genes were cloned into the pcDNA3.1 vector under the CMV promoter control. For pIi-PADRE, the murine invariant chain molecule with the CLIP region replaced by PADRE sequence.

图1 质粒构建示意图

Fig.1 Schematic representation of vector construction



A: RT-PCR检测NY-ESO-1的表达(上), 用ELISA检测NY-ESO-1蛋白质水平(下,  $*P < 0.05$ ); B: NY-ESO-1稳定表达B16F10细胞在小鼠C57BL/6形成肿瘤动态分析, 在C57BL/6小鼠(每组7只)皮下接种 $2 \times 10^5$ 细胞, 在一定时间测定肿瘤大小, 当肿瘤体积达到 $1500 \text{ mm}^3$ 时, 处死小鼠。

A: mRNA level of NY-ESO-1 detected by RT-PCR (top). Protein level of NY-ESO-1 analysed by ELISA (bottom,  $*P < 0.05$ ); B: the analyses of B16F10 cells with NY-ESO-1 expression in C57BL/6 mice. C57BL/6 mice ( $n=7/\text{group}$ ) were inoculated  $2 \times 10^5$  cells subcutaneously. Tumor area was measured at the indicated time, and the mice were sacrificed when tumors exceeded  $1500 \text{ mm}^3$ .

图2 稳定表达NY-ESO-1的B16F10细胞系建立

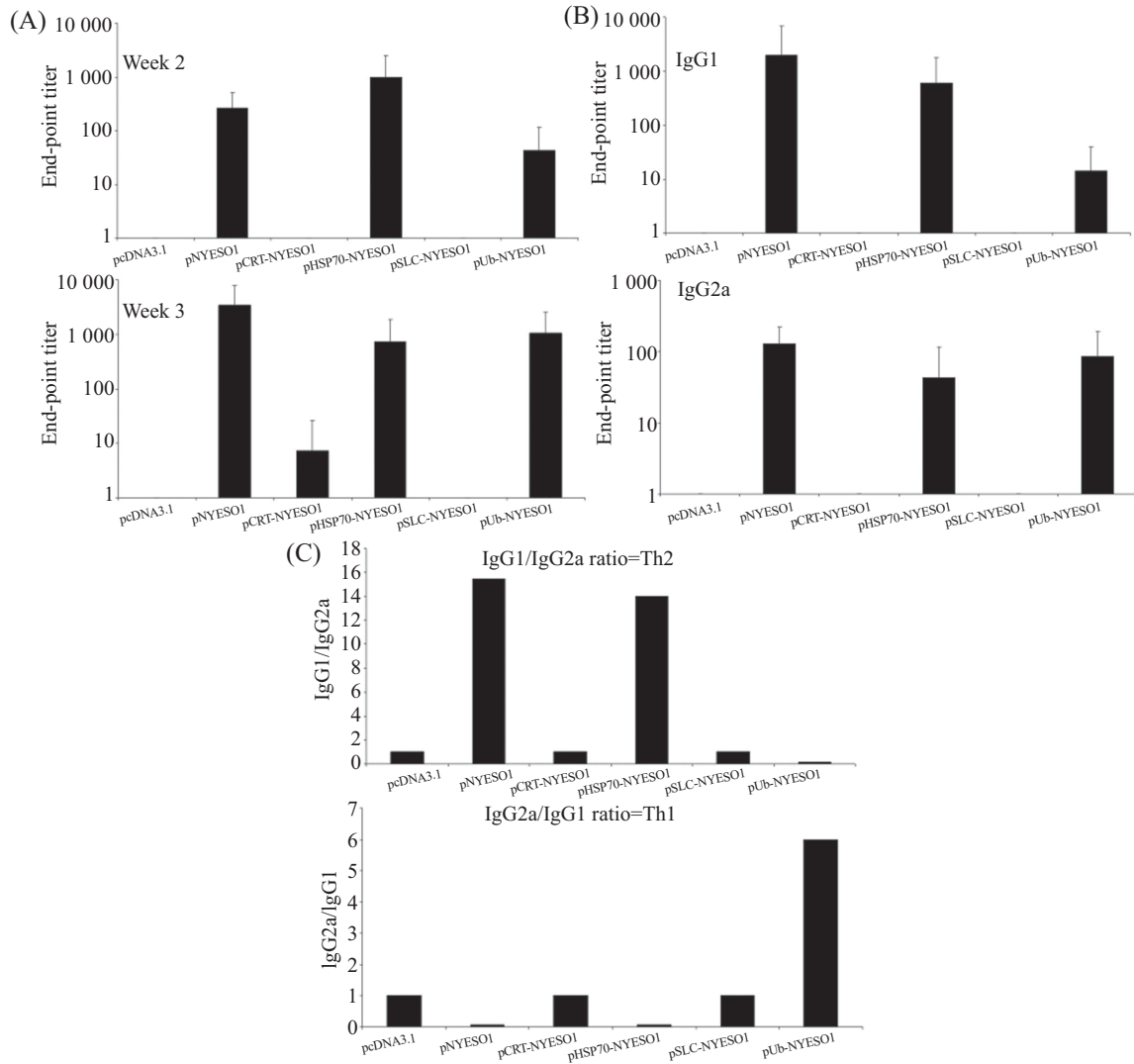
Fig.2 The establishment of B16F10 cells with stable expression of NY-ESO-1

性, 甚至增长略快于亲代细胞系(图2B)。因此, 外源蛋白NY-ESO-1在B16F10表达不会改变该细胞系的免疫原性。我们已经成功地建立了NY-ESO-1肿瘤模型来测试NY-ESO-1 DNA疫苗。

### 2.3 NY-ESO-1免疫小鼠的体液免疫应答效应

为了测定针对NY-ESO-1的体液免疫反应, 我们分别收集了免疫2周和3周后的小鼠血清, 用于ELISA测定。如图3A所示, NY-ESO-1 DNA免疫诱导

了针对NY-ESO-1非常强烈的IgG抗体应答, 表明所包含的B细胞表位是有免疫原性的。与HSP70或泛素融合的NY-ESO-1也产生了抗NY-ESO-1的IgG免疫反应(图3A)。但与CRT或SLC融合的NY-ESO-1未能引起较强的抗NY-ESO-1的IgG免疫应答, 甚至逊于NY-ESO-1本身(图3A), 表明引导抗原到适当的途径递呈对于体液免疫应答非常关键。与单独pCRT-NY-ESO-1免疫小鼠进行比较, 联合pIi-PADRE和



通过电脉冲,用不同的质粒免疫小鼠,分析针对NY-ESO-1的特异性抗体反应。C56BL/7小鼠( $n=7$ ),肌肉注射DNA质粒,然后进行电脉冲。小鼠第一次免疫2周后再用同样的质粒加强免疫,2周和3周后分别收集小鼠血清用于ELISA检测。A: 全部抗NY-ESO-1 IgG检测; B: 在两次免疫后的抗NY-ESO-1 IgG1和IgG2a的检测。结果以抗体滴度平均值±标准差表示; C: IgG2a/IgG1的比值。

Analysis of NY-ESO-1 specific antibody responses in mice immunized with different fusion partner by electroporation. C56BL/7 mice ( $n=7$ /group) were immunized with DNA plasmid by intramuscularly (i.m.) using electroporation. The mice were boosted with the same plasmids 2 weeks after the first immunization. Sera were collected in week 2 and 3 for ELISA. A: detection of serum total IgG specific for NY-ESO-1; B: detection of serum after 2 immunizations (week 3) IgG1 and IgG2a specific for NY-ESO-1. Results were presented as the mean of end-point titer±S.D. C: ratio of IgG2a/IgG1.

图3 NY-ESO-1免疫小鼠的体液免疫应答效应

Fig.3 The humoral immune response in immunized mice against NY-ESO-1

pCRT-NY-ESO-1免疫增强了针对NY-ESO-1的IgG应答(图3A)。从这些免疫小鼠的IgG1和IgG2a的免疫反应,可进一步确定免疫pNY-ESO-1、pHSP70-NY-ESO-1或pUb-NY-ESO-1能够诱导小鼠的IgG1和IgG2a免疫应答反应。然而,免疫小鼠pNY-ESO-1或pHSP70-NY-ESO-1引发的IgG1反应比IgG2a反应更强(图3B)。而免疫pUb-NY-ESO-1的小鼠中引发的IgG2a比IgG1强(图3B)。IgG1和IgG2a的比值表明,免疫pUb-NY-ESO-1能够引发一个由Th1主导的免疫反应,而免疫pNY-ESO-1或pHSP70-NY-ESO-1产生

了Th2占优势的免疫应答(图3C)。

#### 2.4 融合NY-ESO-1疫苗免疫介导肿瘤消退

在肿瘤免疫预防实验中,我们用不同的NY-ESO-1融合质粒免疫小鼠,以NY-ESO-1表达的黑色素瘤细胞(NY-ESO-1/B16F10)为对照<sup>[5]</sup>。如图4A和图4B所示,免疫空载体的小鼠肿瘤逐渐长大,所有小鼠8 d之内均产生肿瘤。免疫任何NY-ESO-1编码的融合质粒的小鼠均显著延迟形成肿瘤,并且显著提高了小鼠生存率,表明NY-ESO-1确是免疫原性肿瘤抗原,能够引起体液和细胞介导的免疫反应<sup>[6]</sup>。

在这些编码NY-ESO-1的质粒免疫中,与泛素融合的NY-ESO-1免疫诱导了最强的抗B16F10/NY-ESO-1肿瘤效应(图4),这与泛素-NY-ESO-1免疫产生强的NY-ESO-1特异性Th1反应相关(图3C)。从图4看,免疫pHSP70-NY-ESO-1和pCRT-NY-ESO-1的小鼠的抗肿瘤效果没有明显增强,与单独免疫pNY-ESO-1相同。免疫pSLC-NY-ESO-1的小鼠表现出明显优于免疫pHSP70-NY-ESO-1和pNY-ESO-1的抗肿瘤效果<sup>[7]</sup>,尽管它产生针对NY-ESO-1的IgG反应较弱(图3和图4),这表明体液免疫反应对抗黑色素瘤的作用较小。此外,与单独免疫pCRT-NY-ESO-1的小鼠相比,共同免疫pCRT-NY-ESO-1和pIi-PADRE增强了抗肿瘤效果,这表明CD4<sup>+</sup>辅助性T细胞的反应在这个模型中的抗肿瘤效果是显著的(图4)。

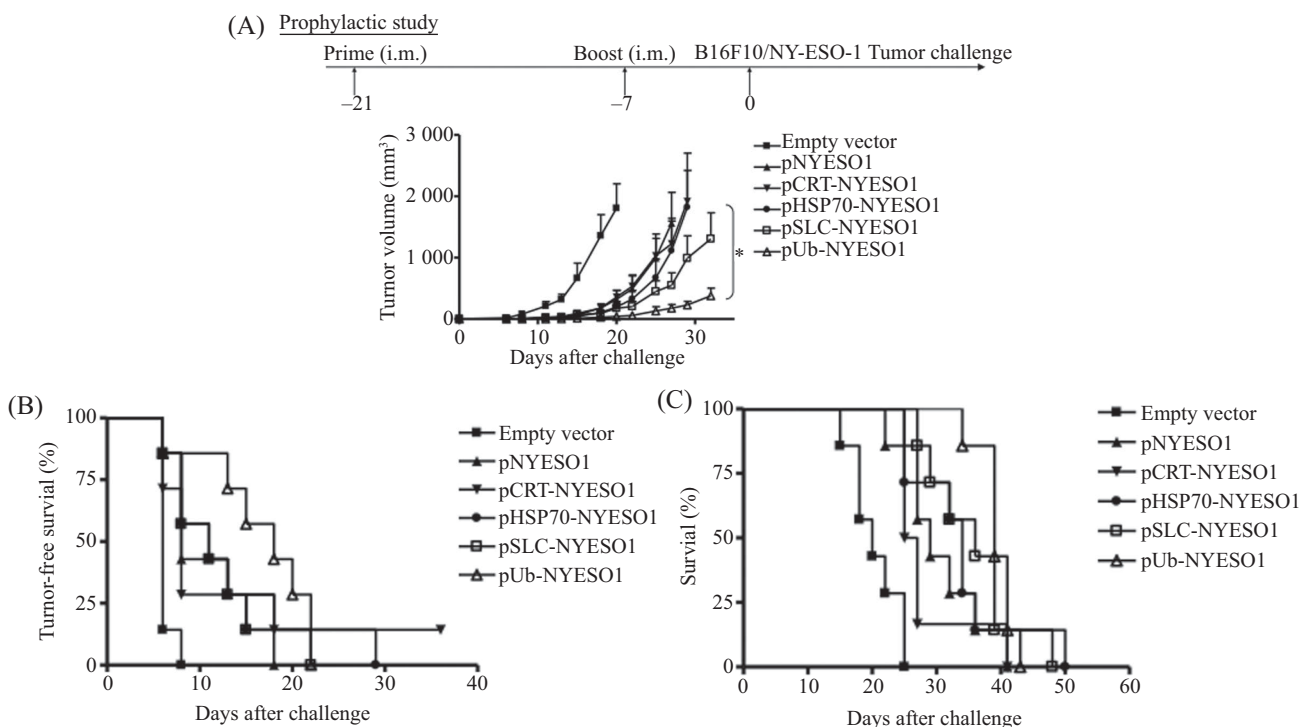
## 2.5 去除调节性T(Treg)细胞增强pUb-NY-ESO-1疫苗对黑色素瘤的治疗效果

为了判断用ONTAK去除Treg细胞<sup>[10]</sup>是否可以增

强pUb-NY-ESO-1免疫的抗肿瘤反应,在对C57BL/6小鼠免疫前1 d,给药ONTAK,以HBSS为对照<sup>[11]</sup>。在治疗性研究中,我们观察到,单独pUNY-ESO-1疫苗免疫小鼠,在免疫第二次(图5A)后抗肿瘤作用较小。而用pUb-NY-ESO-1与pIi-PADRE共同免疫小鼠,抗肿瘤效果降低(图5A)。单独ONTAK给药的小鼠则显示出对B16F10/NY-ESO-1模型的抗肿瘤效果(图5A)。ONTAK给药并结合pUb-NY-ESO-1免疫对该B16F10/模型的抗肿瘤效应显著增强(图5)。此研究表明,去除Treg细胞对DNA免疫有协同作用,去除Treg细胞对增强NY-ESO-1 DNA疫苗的疗效具有重要作用。

## 2.6 pUb-NY-ESO-1结合TRP-2和gp100质粒对B16F10的抗肿瘤作用

为阐明多个肿瘤抗原免疫能提高对已接种建立的B16F10/NY-ESO-1肿瘤的抗癌效应。我们首先按上述方法在小鼠皮下接种B16F10/NY-ESO-1

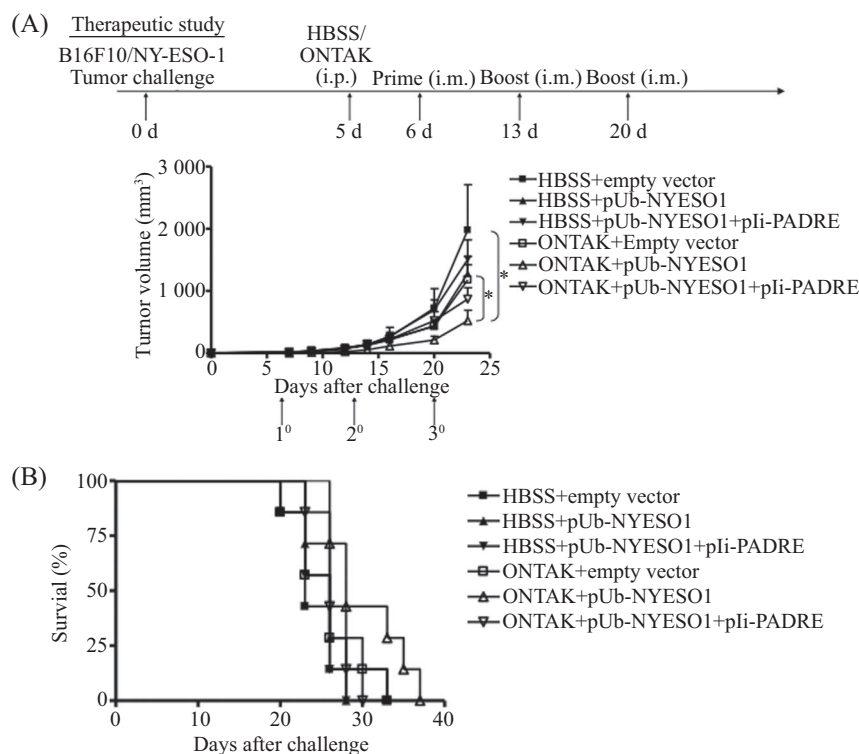


A: 箭头指向表示接种DNA疫苗时间和B16F10/NY-ESO-1肿瘤细胞接种时间,小鼠肌肉注射DNA疫苗(10 μg质粒/鼠)并电脉冲,在最后免疫后一周,用B16F10/NY-ESO-1黑色素瘤细胞免疫,图中每点代表每组小鼠( $n=7$ )测定的肿瘤体积 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ,组间曲线呈显著性差异( $*P<0.05$ ); B: 无肿瘤的比例; C: 在一种预防性模型中,接种NY-ESO-1疫苗的小鼠存活率分析( $\blacktriangle$  vs  $\triangle$ ,  $P=0.019$ )。

A: the immunization scheme indicates the days of vaccination and B16F10/NY-ESO-1 tumor challenge by arrows. DNA (10 μg per plasmid for each mouse) was injected intramuscularly (i.m.) with electroporation. One week after last immunization, mice were challenged with B16F10/NY-ESO-1 melanoma cells. Each point represents mean of tumor volume with SEM bars of animals of each group ( $n=7$ ). Curves of the groups were significant different ( $*P<0.05$ ); B: percentage of tumor-free survival; C: percentage of survival analysis of mice immunized with NY-ESO-1 vaccines by electroporation in a prophylactic treatment model ( $\blacktriangle$  vs  $\triangle$ ,  $P=0.019$ ).

图4 嵌合NY-ESO-1疫苗免疫介导B16F10肿瘤消退

Fig.4 Immunization of chimeric NY-ESO-1 vaccine causes rejection of established B16F10 tumors



泛素嵌合NY-ESO-1基因疫苗对NY-ESO-1/B16F10肿瘤的治疗效果。A: 箭头表示B16F10/NY-ESO-1肿瘤细胞接种时间和DNA疫苗免疫时间。在第5 d经腹腔注射ONTAK或HBSS, 在第6, 13, 20 d分别进行DNA质粒免疫(10 μg/质粒)。图中每点代表每组小鼠每个时间点测得的肿瘤体积平均值±SEM( $n=7$ ), 组间呈显著性差异(\* $P<0.05$ ); B: 在治疗性模型中, 接种NY-ESO-1疫苗的小鼠存活率分析(■ vs △,  $P=0.02$ )。

Therapeutic effect of ubiquitin-linked NY-ESO-1 DNA vaccine against B16F10 melanoma expressing NY-ESO-1. A: the immunization scheme indicates the days of B16F10/NY-ESO-1 tumor cells challenge and vaccination by arrows. Animals were given ONTAK or HBSS on day 5 intraperitoneally (i.p.) and immunized with plasmids (10 μg per plasmid) on day 6 and boost on day 13 and 20, respectively. Each point represents mean of tumor volume with SEM bars of animals of each group ( $n=7$ ). Curves of the groups were significant different (\* $P<0.05$ ); B: percentage of survival analysis of mice immunized with NY-ESO-1 DNA vaccines by electroporation in a therapeutic treatment model (■ vs △,  $P=0.02$ ).

图5 去除Treg细胞增强pUb-NY-ESO-1疫苗对黑色素瘤的治疗效果

Fig.5 Depletion of Treg cells enhanced the therapeutic effect of ubiquitin-linked NY-ESO-1 DNA vaccine

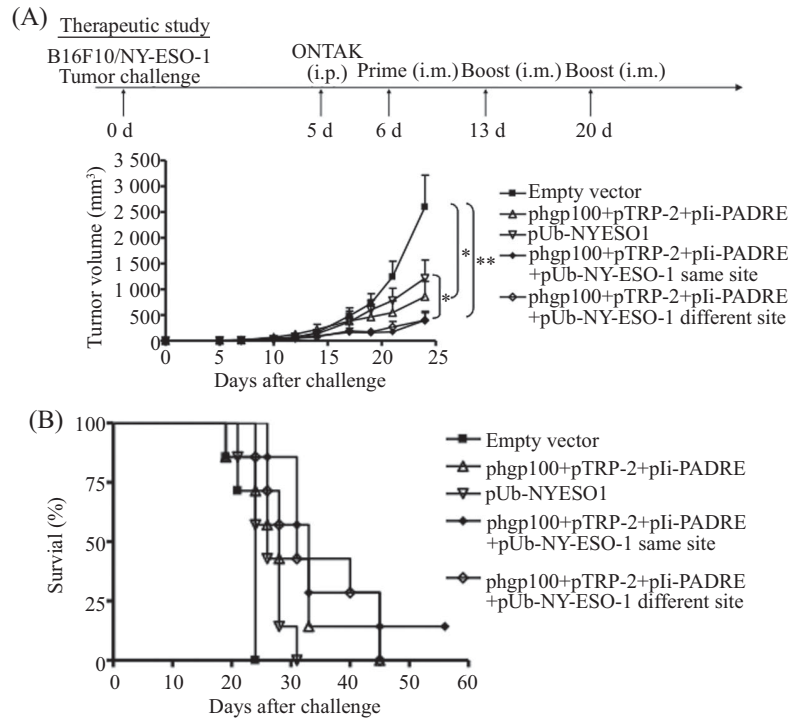
细胞, 于质粒DNA免疫前1 d给药ONTAK, 然后小鼠接受质粒pUb-NY-ESO-1和编码hgp100、hTRP2和Ii-PADRE的质粒免疫<sup>[8]</sup>。我们观察到, 在第三次免疫后, 单独免疫pUb-NY-ESO-1或黑色素瘤疫苗phgp100+hTRP-2+pIi-PADRE都表现出一定的抗肿瘤作用(图6)。黑色素瘤疫苗与pUb-NY-ESO-1的组合免疫表现出对B16F10/NY-ESO-1肿瘤的显著抗肿瘤应答, 这表明免疫多个肿瘤抗原比单一抗原的免疫效果更佳(图6)。将质粒分别接种在不同部位与所有质粒混合免疫在一个部位比较, 显示出相似的抗癌效果, 这表明不同质粒分开接种免疫是没有必要的。

### 3 讨论

NY-ESO-1是一种在各种人类恶性肿瘤中表达的癌症抗原, 除睾丸以外几乎不能在正常组织中表达<sup>[9]</sup>。NY-ESO-1是肿瘤相关抗原的癌症疫苗的最佳候选之一。不同于其他的肿瘤相关抗原, NY-ESO-1

在癌症患者中表现的免疫原性较强, 具有较强的诱导特异性体液免疫应答的能力和诱导自发性细胞免疫应答的能力<sup>[10]</sup>。虽然从NY-ESO-1衍生的肽疫苗试验已在全球范围内进行, 但患者很少表现出肿瘤消退<sup>[11]</sup>或疾病的稳定化。NY-ESO-1的DNA疫苗的使用并结合遗传佐剂在多种肿瘤的临床免疫治疗实验中占有明显优势。

我们的研究表明, 在C57BL/6小鼠体内稳定表达的B16F10/NY-ESO-1显示出与B16F10类似的增长曲线。虽然NY-ESO-1是人源蛋白质, 对C57BL/6小鼠应该具有免疫原性, 但NY-ESO-1是胞内蛋白质, 与膜外蛋白质相比其抗原性较弱。在B16F10细胞内表达的NY-ESO-1被裂解成不同的肽段且被MHC递呈, 这些表位不至于通过免疫监测系统来消除肿瘤细胞。通过使用稳转细胞系在小鼠模型中可以测试所有的NY-ESO-1 DNA嵌合载体, 从而可以节约时间和精力来筛选有效的基因佐剂, 而不要使用



A: 箭头表示B16F10/NY-ESO-1肿瘤细胞接种时间和DNA疫苗免疫时间。在第5 d给小鼠腹腔注射ONTAK或HBSS, 给药ONTAK; 在第6 d产生免疫, 在第6, 13, 20 d分别进行质粒免疫。在第13 d的加强免疫后, 用编码mgp100和mTRP2的质粒分别代替hgp100和hTRP2的质粒进行免疫, 一部分小鼠的一侧腿部免疫pUb-NY-ESO-1和phgp100+phTRP-2+pliPADRE质粒, 其他的小鼠在右腿免疫pUb-NY-ESO-1, 左腿免疫phgp100+phTRP-2+pliPADRE。图中每个点代表每组小鼠每个时间点测得的肿瘤体积( $n=7$ , 平均值 $\pm$ SEM), 组间呈显著性差异(\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ); B: 在治疗性模型中, 小鼠在NY-ESO-1疫苗免疫后的存活率分析(■ vs ◇,  $P=0.0005$ ; ▼ vs ◇,  $P=0.0046$ )。

A: the immunization scheme indicates the days of B16F10/NY-ESO-1 tumor cells challenge and vaccination by arrows. Animals were given ONTAK on day 5 intraperitoneally (i.p.) and immunized with plasmids (10  $\mu$ g per plasmid) on day 6 and boost on day 13 and 20, respectively. On day 13 boosting, all the plasmid encoding hgp100 and hTRP2 were changed to mgp100 and mTRP2, respectively. Some mice were immunized with pUb-NY-ESO-1 and phgp100+phTRP-2+pliPADRE on one leg. Other mice were immunized with pUb-NY-ESO-1 on right leg and phgp100+pTRP2+pli-PADRE on left leg. Each point represents mean of tumor volume with SEM bars of animals of each group ( $n=7$ ). Curves of the groups were significant different (\*\* $P<0.01$ ; \* $P<0.05$ ); B: percentage of survival analysis of mice immunized with DNA vaccines by electroporation in a therapeutic treatment model (■ vs ◇,  $P=0.0005$ ; ▼ vs ◇,  $P=0.0046$ ).

图6 pUb-NY-ESO-1结合黑色素瘤相应抗原TRP-2和gp100质粒免疫增强对NY-ESO-1/B16F10的抗肿瘤作用  
 Fig.6 Effect of combining ubiquitin-linked NY-ESO-1 with melanoma vaccine against established B16F10 expressing NY-ESO-1 in anticancer immunity

人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。我们将质粒DNA编码的肿瘤抗原注入肌肉, 并加以电脉冲, 迅速上升肌细胞膜的渗透性, 使蛋白质的表达提升100~1 000倍<sup>[12]</sup>。B16F10是一种恶性肿瘤, 生长迅速, 若无疫苗接种, 被植入B16F10细胞的小鼠通常会在一个月内死亡。通过体内高效电脉冲转入和B16F10/NY-ESO-1小鼠模型, 可以缩短筛选辅助NY-ESO-1遗传佐剂的时间并只需使用少量的DNA质粒就可以达到目的。

本研究发现, 结合有不同遗传佐剂的NY-ESO-1表现出不同的免疫反应。小鼠单独接种NY-ESO-1编码质粒就足以能够引发体液免疫应答和延迟NY-ESO-1表达的B16F10肿瘤生长。有研究表明, NY-ESO-1蛋白通过钙网蛋白(calreticulin, CRT)的受体<sup>[13]</sup>

结合于未成熟树突状细胞(dendritic cells, DC)、巨噬细胞和单核细胞的表面上, 而不是B细胞或T细胞。NY-ESO-1本身可以作为佐剂。在癌症患者接种NY-ESO-1多肽可诱导的体液和T细胞应答表明, 该蛋白质具有免疫原性<sup>[14]</sup>。然而, 接种的NY-ESO-1编码质粒引起了Th2(体液免疫)占主导地位的免疫应答, 它不能有效地抑制NY-ESO-1表达的B16F10细胞生长, 这表明体液免疫应答在消退肿瘤中的作用相对最小。在我们使用的基因佐剂中, 泛素对NY-ESO-1表达的B16F10细胞的抑制作用最强。此外, 接种质粒编码的pUb-NY-ESO-1疫苗表现出明显的Th1细胞应答, 这表明对于抑制肿瘤生长过程中, 细胞介导的免疫应答比体液免疫应答更为重要。我们已经证实, 单次腹膜内注射尼白介素足以增强pUb-



NY-ESO-1的DNA疫苗的抗肿瘤效应。之前有研究在癌症患者也显示,用尼白介素预处理可以增强疫苗诱导T细胞应答能力<sup>[15-16]</sup>。在我们的模型中,针对B16F10/NY-ESO-1,单独用地尼白介素能够增强抗肿瘤效果,但对B16F10亲代细胞效果欠佳。地尼白介素可能除去了对NY-ESO-1免疫原性的抑制作用,因为NY-ESO-1本身有强的免疫原性。对于某些免疫原性较差的黑素瘤相关抗原(如gp100),本身能够在B16F10细胞中表达,调节性T细胞的去除不能诱发这些抗原的任何抗肿瘤效果。研究表明,由质粒编码黑素瘤抗原(gp100、TRP-2和Ii-PADRE)和泛素连接的NY-ESO-1在治疗肿瘤模型中具有协同抑制肿瘤的作用。通过靶向多种抗原,可以通过降低肿瘤逃逸进而增强抗肿瘤效应<sup>[17]</sup>。针对多种抗原可增加与T细胞相互作用的机会,能够通过交叉递呈机制稳定得递呈抗原,有效地抑制肿瘤抗原表达<sup>[18]</sup>。

目前的研究将作为一种临床前评估不同基因佐剂是否增强特定肿瘤抗原的免疫原性的策略。嵌合佐剂的作用效果可能因不同抗原而异,在我们的实验模型中,将抗原与不同的基因佐剂联合,最终找出适合特定抗原的最佳嵌合疫苗。该实验首次解释了为什么目前的NY-ESO-1多肽或蛋白免疫的临床试验失败的原因,是由于仅诱导了以Th2反应为主的免疫反应。使用泛素结合NY-ESO-1 DNA疫苗可能会引起强烈的Th1免疫反应,加之体内电脉冲的作用,进一步增强了黑色素瘤DNA疫苗治疗黑色素瘤的临床效果。

### 参考文献 (References)

- Litzinger MT, Fernando R, Curiel TJ, Grosenbach DW, Schlom J, Palena C. IL-2 immunotoxin denileukin difitox reduces regulatory T cells and enhances vaccine-mediated T-cell immunity. *Blood* 2007; 110(9): 3192-201.
- Yoshimura K, Laird LS, Chia CY, Meckel KF, Slansky JE, Thompson JM, *et al.* Live attenuated *Listeria monocytogenes* effectively treats hepatic colorectal cancer metastases and is strongly enhanced by depletion of regulatory T cells. *Cancer Res* 2007; 67(20): 10058-66.
- Le Gal FA, Ayyoub M, Dutoit V, Widmer V, Jager E, Cerottini JC, *et al.* Distinct structural TCR repertoires in naturally occurring versus vaccine-induced CD8<sup>+</sup> T-cell responses to the tumor-specific antigen NY-ESO-1. *J Immunother* 2005; 28(3): 252-7.
- Hung CF, Tsai YC, He L, Wu TC. DNA vaccines encoding Ii-PADRE generates potent PADRE-specific CD4<sup>+</sup> T-cell immune responses and enhances vaccine potency. *Mol Ther* 2007; 15(6): 1211-9.
- Jager E, Stockert E, Zidianakis Z, Chen YT, Karbach J, Jager D, *et al.* Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: Correlation with clinical events. *Int J Gynecol Cancer* 1999; 84(5): 506-10.
- Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungbluth A, *et al.* NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: Correlation with tumor grade. *Cancer Res* 2001; 61(12): 4671-4.
- Nakada T, Noguchi Y, Satoh S. NY-ESO-1 mRNA expression and immunogenicity in advanced prostate cancer. *Cancer Immun* 2003; 3: 10.
- 刘祥磊, 张利红, 孙蕴淳, Steve Kay, 吴 炯. 异源黑色素瘤DNA疫苗结合IL-12和Ii-PADRE抗鼠黑色素瘤的研究. *中国细胞生物学学报*(Liu Xianglei, Zhang Lihong, Sun Yunchun, Steve Kay, Wu Jiong. Improved anti-tumor immunity using xenogenic melanoma DNA vaccines combined with IL-12 and Ii-PADRE in murine melanoma. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(9): 1262-8.
- Jager E, Nagata Y, Gnjatich S, Wada H, Stockert E, Karbach J, *et al.* Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: Correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(9): 4760-5.
- Jager E, Gnjatich S, Nagata Y, Stockert E, Jager D, Karbach J, *et al.* Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8<sup>+</sup> T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1<sup>+</sup> cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(22): 12198-203.
- Zeng G, Aldridge ME, Tian X, Seiler D, Zhang X, Jin Y, *et al.* Dendritic cell surface calreticulin is a receptor for NY-ESO-1: Direct interactions between tumor-associated antigen and the innate immune system. *J Immunol* 2006; 177(6): 3582-9.
- Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, Mhawech-Fauceglia P, Andrews C, Hoffman EW, *et al.* Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(31): 12837-42.
- Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, *et al.* Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2005; 115(12): 3623-33.
- Mahnke K, Schonfeld K, Fondel S, Ring S, Karakhanova S, Wiedemeyer K, *et al.* Depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> human regulatory T cells *in vivo*: Kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions *in vivo* and *in vitro*. *Int J Cancer* 2007; 120(12): 2723-33.
- Gilboa E. How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48(7): 382-5.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425-79.
- Dantuma NP, Lindsten K, Glas R, Jellne M, Masucci MG. Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18(5): 538-43.
- Varshavsky A. The N-end rule: Functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(22): 12142-9.