

DOI:10.13350/j. cjpb. 220109

• 论著 •

人 IL-2 与 EB 病毒 BZLF1 融合基因重组 BCG 的构建及免疫学研究*

于美美¹, 崔晏硕², 邵为林², 密田², 陈廷^{1**}, 薛庆节^{1**}

(1. 潍坊医学院医学检验学院, 山东潍坊 261053; 2. 济宁医学院基础医学院, 山东济宁 272067)

【摘要】 **目的** 构建人 IL-2 与 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)基因 BZLF1 的融合基因重组 BCG(recombinant BCG, rBCG), 并分析其免疫效果。 **方法** 通过重叠延伸技术, 构建融合基因 ILBZ, 将 ILBZ 与穿梭表达载体 pMV261 连接并转化至 BCG 中进行表达。注射 rBCG 至 C57BL/6J 小鼠体内, 通过流式细胞术检测和 CTL 检测分析其免疫反应; 注射 rBCG 至构建的人源性 EBV 阳性肿瘤的 BALB/c-nu 裸鼠中, 观察 rBCG 对肿瘤的治疗效果。 **结果** 重叠延伸 PCR 获得的融合基因 ILBZ 为 1248 bp; Western blot 检测 rBCG 表达的融合蛋白能被 IL-2 抗体和 ZEBRA 抗体识别, 大小约 55 ku; 动物免疫试验显示, 注射 rBCG 的小鼠 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞百分率分别为 45.1% 和 32.3%, 高于 BCG (28.5% 和 24.0%) 及 PBS 的百分率 (21.3% 和 18.1%) ($P < 0.05$); 动物治疗实验显示, 注射 rBCG 治疗的裸鼠 NK 细胞占 2.99%, 高于 BCG (NK 细胞为 1.89%) 和 PBS (NK 细胞为 0.68%) ($P < 0.05$); rBCG 注射 2 周, EBV 阳性小鼠肿瘤体积和重量明显小于对照组。 **结论** 成功构建 rBCG 并表达出稳定的融合蛋白, 且 rBCG 能刺激小鼠产生免疫反应, 具有抗肿瘤作用。

【关键词】 IL-2; BZLF1; 亚单位疫苗; EB 病毒阳性肿瘤

【中图分类号】 R373

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)01-0037-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan; 17(1): 37-42.]

Construction and immunological study of recombinant BCG with a fusion gene consisting of human IL-2 and EB virus BZLF1

YU Mei-mei¹, CUI Yan-shuo², SHAO Wei-lin², MI Tian², CHEN Ting¹, XUE Qing-jie¹ (1. Department of Medical Laboratory, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China; 2. School of Basic Medical, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China)***

【Abstract】 **Objective** To construct recombinant BCG (rBCG) with a fusion gene consisting of human IL-2 and BZLF1, a gene of the Epstein-Barr virus (EBV), and to analyze its immune action. **Methods** The single genes IL-2 and BZLF1 were used to construct the fusion gene ILBZ via overlapping extension. The recombinant plasmid ILBZ-pMV261 was constructed via enzyme digestion and ligation of the shuttle expression vector pMV261 to ILBZ. The identified recombinant plasmid ILBZ-pMV261 was transformed into BCG and expressed. After rBCG was injected into C57BL/6J mice, the immune response was analyzed using flow cytometry and CTL. rBCG was injected into C57BL/6J mice, and the immune response was analyzed using flow cytometry and CTL. rBCG was injected into BALB/c-nu nude mice with human EBV-positive tumors. The therapeutic effect of rBCG on tumors was observed using flow cytometry, and changes in tumor size and weight were determined. **Results** The single gene BZLF1 was 738 bp in length and IL-2 was 465 bp in length. The fusion gene ILBZ obtained via overlapping extension PCR was 1 248 bp in length. Western blotting indicated that the fusion protein expressed by rBCG was recognized by IL-2 antibodies and ZEBRA antibodies, and it was about 55 ku in size. An animal immunization test indicated that the percentage of CD4⁺ T cells was 45.1% and the percentage of CD8⁺ T cells was 32.3% in mice injected with rBCG; those percentages were higher than the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in mice injected with BCG (28.5% and 24.0%) or PBS (21.3% and 18.1%) ($P < 0.05$). Animal treatment experiments indicated that the percentage of NK cells in nude mice treated with rBCG was 2.99%, which was higher than the percentage in mice injected with BCG (1.89%) or PBS (0.68%) ($P < 0.05$). After injection of rBCG for 2

* **【基金项目】** 山东省重点研发计划项目(No. 2018GSF118137); 山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 2017WS339); 山东省高等学校科技计划项目(No. J17KB085); 济宁市重点研发计划项目(No. 2019SMNS020); 济宁医学院重点项目(No. 16008); 贺林院士工作站重点项目(No. JYHL2019ZD03); 济宁医学院大创项目(No. CX2019102)。

** **【通讯作者】** 陈廷, E-mail: chenting3465@163.com; 薛庆节, E-mail: qjxue9797@126.com

【作者简介】 于美美(1996-), 女, 山东威海人, 硕士研究生在读, 主要从事微生物与肿瘤病毒免疫研究。E-mail: 2689481200@qq.com

weeks, the tumor volume and weight in EBV-positive mice was significantly smaller and lighter than the tumor volume and weight in the control group. **Conclusion** RBCG was successfully constructed and expressed as a stable fusion protein. rBCG can stimulate an immune response in mice and it has antitumor action.

【Key words】 IL-2; BZLF1; subunit vaccine; Epstein Barr virus positive tumor

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)是一种自非洲儿童恶性淋巴瘤中分离出来的病毒,被世界卫生组织定义为I类致癌物,世界上95%以上的人口均感染过该病毒,其感染与Burkitt淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和鼻咽癌等多种癌症的发生有关^[1]。EBV主要感染人淋巴细胞和口咽上皮细胞^[2],包括潜伏期和裂解期两个阶段,EBV的潜伏基因是能在潜伏感染细胞中表达的病毒基因,编码病毒的蛋白质、非编码RNA和微小RNA等,不同EBV感染细胞具有不同的潜伏基因表达模式^[3]。在潜伏感染期间,EBV编码的潜伏蛋白刺激被感染的B淋巴细胞逐步分化为静息记忆B细胞,确保EBV基因组能稳定持久地存在于细胞中^[4]。立刻早期蛋白ZEBRA和Rta的表达使EBV由潜伏期进入裂解期,并引起BZLF1等早期裂解蛋白的表达,二者共同促进EBV基因的复制、切割、包装和释放,使其感染邻近细胞^[5],引起相应部位病变。鉴于EBV的致病性和分布的广泛性,亟待寻求一种能够预防和治疗EBV阳性肿瘤的方法。

EBV基因BZLF1编码的蛋白ZEBRA作为调控EBV由潜伏期进入裂解期的关键蛋白,是EBV的特异性治疗靶点之一。本研究通过基因工程技术和分子生物学技术使ZEBRA在宿主体内稳定表达,人工诱导EBV提前进入裂解期,使EBV阳性细胞裂解死亡。ZEBRA作为外来抗原,能刺激人体的细胞免疫和体液免疫,发挥抗肿瘤的作用。IL-2作为T细胞和NK细胞的生长因子,具有维持淋巴细胞生长和肿瘤抑制的功能^[6]。Benitez等^[7]研究发现,表达IL-2的rBCG在黑色素瘤中表现出一定的抗肿瘤作用。BCG作为一种安全有效的佐剂,具有热稳定性^[8],能诱导CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和NK细胞的聚集,促进IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子的分泌,已被应用于黑色素瘤和浅表尿路上皮癌等的治疗。本研究选择人IL-2和EBV基因BZLF1进行基因融合,融合后的基因构建于穿梭表达载体pMV261并转化至BCG中,使其在体内能稳定表达,为探究预防和治疗EBV阳性肿瘤的亚单位疫苗提供理论依据。

材料与方法

1 材料

1.1 试剂 质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒和DH5 α 感受态细胞购自北京天根生化科技有

限公司;PrimeSTAR GXL DNA Polymerase、内切酶BamHI和EcoRI、T4 DNA Ligase购自日本Takara公司;Middlebrook 7H9 Broth和Middlebrook 7H10 Agar购自美国BD Difco公司;ZEBRA抗体购自美国SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY公司;IL-2抗体购自美国Affinity Biosciences LTD公司;Western blot凝胶及电泳液相关试剂购自北京索莱宝公司;超敏ECL化学发光试剂盒购自万达生物科技。抗体CD3、CD4、CD8和NK1.1购自美国Biolegend公司;IC Fixation Buffer和10 \times Permeabilization Buffer购自美国Invitrogen公司;山羊抗小鼠抗体和CellTiter-LumiTM发光法细胞活力检测试剂盒购自中国Beyotime Biotechnology公司。

1.2 细胞株 人EBV阳性鼻咽癌肿瘤细胞CNE-2Z购自吉妮欧生物公司。

2 方法

2.1 重组质粒ILBZ-pMB261的构建

2.1.1 目的基因扩增与连接 根据GenBank已报道的DNA序列设计引物,由生物工程(上海)股份有限公司。引物设计:IL-2-F: 5'-GCGGGATCCGATG-TACAGGATGCAACTCCTGTC-3'(引入BamHI酶切位点);IL-2-r: 5'-GCTGCCGCCACCGCCGCTTC-CGCCACCGCCGCTTCCACCGCCACCTCAAGTT-AGTGTTGAGATGATGC-3';BZLF1-f: 5'-GGTG-GCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGAAGCGGCGG-TGGCGCAGCATGATGGACCCAACTCGACT-TCTG-3';

BZLF1-R: 5'-GCGGTCGACTAAGAAATTTA-AGAGATCCTCGTG-3'(引入SmaI酶切位点)。

根据PrimeSTAR GXL DNA Polymerase说明书进行IL-2和BZLF1基因的PCR扩增。PCR反应体系:模板0.5 μ l,引物(IL-2包括IL-2-F和IL-2-r, BZLF1包括BZLF1-r和BZLF1-R)各0.2 μ l,5 \times PrimeSTAR GXL Buffer 10 μ l,dNTP Mixture 4 μ l,PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 1 μ l,用ddH₂O补充至50 μ l。反应条件:98 $^{\circ}$ C预变性4 min;98 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火15 s,68 $^{\circ}$ C延伸1 min,共30个循环;68 $^{\circ}$ C再延伸5 min。取PCR产物通过1%琼脂糖凝胶进行电泳,并根据琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒说明书进行目的基因的回收。将琼脂糖凝胶DNA回收产物IL-2和BZLF1通过多肽接头(Gly₄Ser)₃

DNA 序列进行连接。连接体系:IL-2 20 μ l, BZLF1 20 μ l, T4 DNA Ligase 5 μ l, 10 \times T4 DNA Ligase Buffer 5 μ l。混匀后 16 $^{\circ}$ C 金属浴过夜。取连接产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收。

2.1.2 重叠延伸 PCR 以胶回收产物为模板、以 IL-2-F 和 BZLF1-R 为引物进行融合基因 IL-2-BZLF1(以下简称 ILBZ)的 PCR 扩增,体系如 2.1.1。反应条件:98 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,68 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30s,共 30 个循环;68 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳后胶回收。

2.1.3 PCR 产物的酶切 将 PCR 胶回收产物 ILBZ 与穿梭表达载体 pMV261 进行 BamHI 酶切。酶切体系:模板 10 μ l, BamHI 1 μ l, 10 \times K Buffer 2 μ l, 加 ddH₂O 补充至 20 μ l。30 $^{\circ}$ C 水浴过夜。酶切产物通过 1% 琼脂糖凝胶进行电泳后胶回收。取胶回收产物 ILBZ 和 pMV261 进行 SaII 酶切,体系同上。37 $^{\circ}$ C 水浴过夜。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳后胶回收。

2.1.4 酶切产物与载体的连接 将 DNA 回收产物 ILBZ 和 pMV261 进行连接,体系如 2.1.1,混匀后 16 $^{\circ}$ C 金属浴过夜。

2.1.5 重组质粒的转化 将连接液与 *E. coli*. DH5 α 感受态细胞混匀,冰浴 30 min,42 $^{\circ}$ C 水浴 90 s,冰浴 10 min,加入 800 μ l 液体 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C、160 r/mim 摇床 60 min,5 000 r/mim(离心半径 6 cm)离心 3 min,去 700 μ l 上清,剩余部分混匀后涂布含有卡那霉素的 LB 固体培养基上,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。

2.1.6 重组菌的液体培养及质粒提取 挑取 LB 固体培养基中的单菌落至含卡那霉素的液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 160 r/min 培养 12~18 h,根据质粒小提试剂盒说明书提取重组质粒 ILBZ-pMV261。

2.1.7 ILBZ-pMV261 的鉴定 以重组质粒 ILBZ-pMV261 为模板进行 PCR 扩增,PCR 体系和反应条件同 2.1.2。以重组质粒 ILBZ-pMV261 为模板进行酶切鉴定。酶切体系:模板 10 μ l, BamHI 10 μ l, SaII 1 μ l, 10 \times K Buffer 2 μ l, 加 ddH₂O 补充至 20 μ l,30 $^{\circ}$ C 水浴过夜。重组质粒 ILBZ-pMV261 由上海生物工程有限公司进行测序。

2.2 重组质粒电转化及 rBCG 的培养与表达 重组质粒 ILBZ-pMV261 测序后取 10 μ l 与 BCG 感受态细胞混合,冰浴 15 min,将混合液转移至预冷的电转杯中,2.3 KV 5.5 ms 进行电转。取 1ml Middlebrook 7H9 Broth 缓慢加至电转杯中混匀,转移至 1.5 ml 离心管中,37 $^{\circ}$ C 100 r/min 摇床 24 h,5 000 r/min(离心半径 6 cm)离心 10 min,去上清。将剩余部分混匀,均匀涂抹在含卡那霉素的 Middlebrook 7H10 Agar 斜面

培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养 3~4 周。挑取单个菌落至含卡那霉素的 Middlebrook 7H9 Broth 液体培养基中,培养 1~3 周至培养基变浑浊。

2.3 rBCG 的诱导表达

2.3.1 蛋白提取 分别取 2 ml 菌液、pMV261-BCG 和 BCG 于 45 $^{\circ}$ C 诱导 45 min, PBS 洗涤 2 次后用细菌裂解液(50 mmol/L Tris-HCL, 2 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 100 μ g/ml 溶菌酶, 0.1% Triton X-100)重悬,300 W 冰浴超声,10 s 超声,15 s 间隔,持续 30 min。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/mim(离心半径 6 cm)离心 30 min,取上清。

2.3.2 Western blot 分别取 10 μ l rBCG、pMV261-BCG 和 BCG 蛋白提取液分别进行蛋白质 12% SDS-PAGE 电泳,80 V 45 min 后调电压至 120 V 45 min。再进行转膜电泳 2 h,用 3% BSA 封闭 2 h,分别用 BZLF1 抗体和 IL-2 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,24 h 后用 TBST 洗膜 6 次,每次 10 min,用山羊抗小鼠抗体室温摇床孵育 2 h,用 TBST 洗膜 6 次,每次 10 min,滴加超敏 ECL 化学发光试剂至覆盖膜表面后进行曝光,观察结果。

2.4 动物免疫试验 将 6~8 周龄的 C57BL/6J 小鼠分为 3 组:PBS 组、BCG 组和 ILBZ-pMV261-rBCG 组,每组 5 只,分别注射 100 μ l PBS、BCG 和 ILBZ-pMV261-rBCG 100 μ l。BCG 和 ILBZ-pMV261-rBCG 的吸光度 A₆₀₀ 值为 2.0,10 d/次,连续注射 3 次,末次注射 10 d 后处死小鼠,分离脾脏。

2.5 流式细胞分析 将小鼠脾脏进行研磨、过滤、红细胞裂解,待红细胞裂解完全后用 PBS 重悬,分别加入抗体 CD3-PE、CD4-FITC 和 CD8-APC 各 0.3 μ l,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,加入 PBS 重悬、洗涤、过滤后进行流式细胞分析。

2.6 CTL 检测 将小鼠脾脏通过研磨、过滤和红细胞裂解后分离脾淋巴细胞并用 RPMI 1640 进行洗涤,加入含 10% FBS-RPMI 1640(含青霉素和链霉素)重悬并计数,将定量的不同免疫组的脾淋巴细胞分别加入 CNE-2Z 细胞中进行 24 h 共培养,通过 CellTiter-LumiTM 发光法细胞活力检测试剂盒检测细胞活力。

2.7 动物治疗试验 注射 1.75 \times 10⁷/ml 人 EBV 阳性鼻咽癌肿瘤细胞 CNE-2 100 μ l 至 6~8 周的 BALB/c-nu 雌性裸鼠进行造模,1 周后将其随机分为 PBS、BCG 和 ILBZ-pMV261-rBCG 3 组,分别注射 100 μ l PBS、rBCG(A₆₀₀ 值为 2.0)和 ILBZ-pMV261-rBCG(A₆₀₀ 值为 2.0)进行治疗,7 d/次,测量肿瘤大小,并计算体积(V=X \times Y²/2)。第 2 次注射 7 d 后处死小鼠,取肿瘤称重、拍照。将脾脏进行研磨、过滤后裂解红细胞,加入 NK1.1-PE 抗体 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,用

PBS 洗涤后进行流式细胞分析。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件对符合正态分布实验数据(以均数±标准差表示)进行统计学分析,通过单因素方差分析(One-way ANOVA)对多样本均数之间的差异进行比较,如差异有统计学意义,则采用 *t* 检验进行多组间两两比较,分析使用双侧检验,若 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 PCR 和重叠延伸 PCR

PCR 扩增 IL-2 和 BZLF1 DNA 电泳结果如图 1a。IL-2 DNA 大小为 465 bp, BZLF1 DNA 大小为 738 bp。根据重叠延伸 PCR 原理,融合基因 ILBZ 的重叠延伸 PCR 的电泳结果如图 1b 所示,ILBZ 大小为 465+738+45(linker),即 1 248 bp。

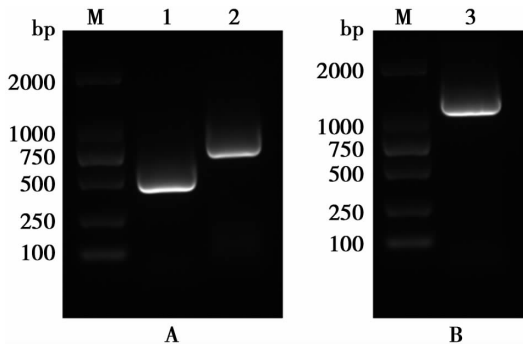


图 1 PCR 和重叠延伸 PCR 电泳
A PCR 扩增 IL-2 和 BZLF1 DNA PCR 产物 M DNA 标志物 (DL2000) 1 PCR 扩增 IL-2 DNA PCR 产物 2 PCR 扩增 BZLF1 DNA PCR 产物 B 重叠延伸 PCR 扩增 ILBZ DNA PCR 产物 3 重叠延伸 PCR 扩增 ILBZ DNA PCR 产物

图 1 PCR 和重叠延伸 PCR 电泳

A DNA PCR products of IL-2 and BZLF1 were amplified by PCR M DNA markers (DL2000) 1 DNA PCR product of IL-2 was amplified by PCR 2 DNA PCR product of BZLF1 was amplified by PCR B DNA PCR product of ILBZ was amplified by overlapping extension PCR 3 DNA PCR products of ILBZ was amplified by overlapping extension PCR

Fig. 1 The electrophoresis of PCR and overlap extension PCR

2 融合蛋白的诱导表达

rBCG、pMV261-BCG 和 BCG 经热诱导后超声破壁提取蛋白,分别进行蛋白质 12% SDS-PAGE 电泳,转膜后经封闭、IL-2 抗体和 BZLF1 抗体孵育、洗膜和山羊抗小鼠抗体的孵育、洗膜及显色反应,结果如图 2。rBCG 成功表达蛋白 IL-2 和 ZEBRA,融合蛋白大小约 55 ku。

3 免疫小鼠脾淋巴细胞流式分析

流式细胞仪检测 C57BL/6 小鼠脾 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞结果如图 3。PBS 组 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞百分率约为 21.3% 和 18.1%, BCG 组 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞百分率约为 28.5% 和 24.0%, rBCG 组 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞百分率约为 45.1% 和

32.3%。

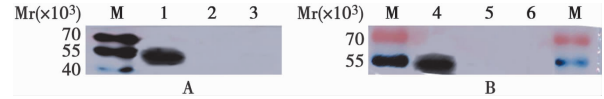
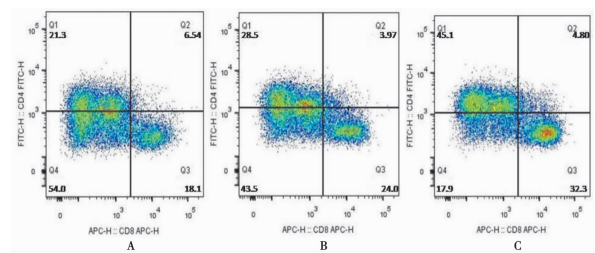


图 2 Western blot 检测融合蛋白的诱导表达
A ZEBRA Western blot M 蛋白质分子质量标准 1 rBCG 中 ZEBRA 检测 2 pMV261-BCG 中 ZEBRA 检测 3 BCG 中 ZEBRA 检测 B IL-2 Western blot rBCG 中 IL-2 检测 4 rBCG 中 IL-2 检测 5 pMV261-BCG 中 IL-2 检测 6 BCG 中 IL-2 检测

图 2 Western blot 检测融合蛋白的诱导表达

A ZEBRA Western blot M Protein molecular weight standard 1 ZEBRA detection in rBCG 2 ZEBRA detection in pMV261 BCG 3 ZEBRA detection in BCG B IL-2 Western blot 4 Detection of IL-2 in rBCG 5 Detection of IL-2 in pMV261 BCG 6 IL-2 was detected in BCG

Fig. 2 The induced expression of fusion protein was detected by Western blot



A PBS 组 B BCG 组 C rBCG 组

图 3 脾淋巴细胞中 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞流式分析

A PBS group B BCG group C rBCG group

Fig. 3 Flow cytometric analysis of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells in splenic lymphocytes

4 CTL 检测

CNE-2Z 细胞中加入不同免疫组小鼠分离的脾淋巴细胞,培养 24 h 后经 CellTiter-Lumi™ 发光法细胞活力检测试剂盒检测 CNE-2Z 细胞特异性裂解率,结果如图 4。rBCG 免疫组脾淋巴细胞对 CNE-2Z 细胞的特异性裂解率显著高于 BCG 组和 PBS 组 ($P = 0.04785, P < 0.05$)。

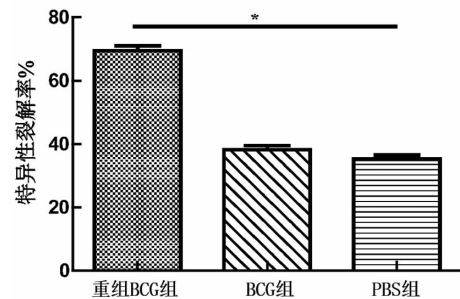
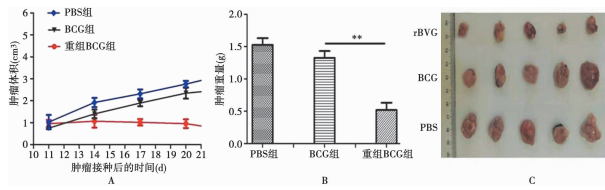


图 4 免疫组小鼠脾淋巴细胞对 CNE-2Z 细胞的特异性杀伤情况
Fig. 4 Specific killing of CNE-2Z cells by splenic lymphocytes of mice immune groups

5 肿瘤治疗试验

荷瘤小鼠分别用 PBS、BCG 和 rBCG 进行注射治疗,每隔 3 d 测量 1 次肿瘤体积并记录,结果如图 5a。最后 1 次治疗完成 7 d 后将 BALB/c 裸鼠处死,剥离

的肿瘤称重、拍照,如图5b和图5c。相较于PBS组和BCG组而言,rBCG组肿瘤体积增长速度明显变缓。rBCG治疗组的肿瘤重量显著小于PBS组和BCG组($P=0.04098, P<0.05$)。



A 荷瘤小鼠肿瘤体积的变化 B 荷瘤小鼠肿瘤重量变化 C 治疗组荷瘤小鼠肿瘤形态变化

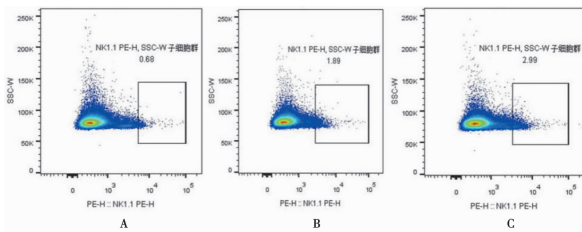
图5 荷瘤小鼠肿瘤体积、重量和形态变化

A Changes in tumor volume of tumor-bearing mice B Changes in tumor weight of tumor-bearing mice C Changes in tumor morphology of tumor-bearing mice

Fig. 5 Changes in tumor volume, weight and morphology of tumor-bearing mice

6 治疗组脾NK细胞流式分析

流式细胞仪检测不同组荷瘤小鼠脾脏的NK细胞结果如图6。PBS组NK细胞占细胞总数的0.68%,BCG组NK细胞占1.89%,rBCG组占2.99%。



A PBS组 B BCG组 C rBCG组

图6 脾NK细胞流式分析结果

A PBS group B BCG group C rBCG group

Fig. 6 NK cells flow cytometric analysis results of spleen

讨论

近年来,病毒相关肿瘤疫苗的研究备受关注。Hartlage等^[9]报道,BZLF1疫苗能够诱导特异性细胞免疫,识别和清除小鼠体内的EBV阳性细胞。与BCG相比,分泌IL-2的rBCG能促进IFN- γ 的产生,增强机体抗肿瘤细胞的作用^[10]。由于联合基因治疗比单一基因治疗效果较好^[11],ZEBRA作为EBV中免疫原性较强的T细胞靶抗原^[12],与IL-2同时表达能协同刺激T细胞的增殖,有效增强机体的免疫反应。因此,本实验选择人IL-2与EBV基因BZLF1作为rBCG的融合基因并进行相关免疫和治疗方面的研究。

本研究成功构建了融合基因ILBZ,并在BCG中表达出稳定的融合蛋白,其产物约为55ku,与预期大小相符。为了探究rBCG在小鼠体内的免疫反应,本研究将rBCG注射至C57BL/6J小鼠体内,并设置了

PBS免疫组和BCG免疫组作为对比。rBCG免疫组的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的比例显著高于PBS免疫组和BCG免疫组,其变化趋势与薛庆节等^[13]报道的EBV基因BZLF1和LMP1融合基因构建的rBCG在小鼠体内引起的免疫反应结果相似,证实rBCG能诱导CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞大量增殖。BCG免疫组CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的比例高于PBS免疫组,这可能是BCG非特异性刺激机体免疫系统的缘故,因此选择BCG作为疫苗的载体是正确且必要的。当然,除EBV相关基因构建的rBCG能引起小鼠体内的免疫反应外,其他细菌抗原构建的rBCG也能引起小鼠体内的免疫反应,如薛士鹏等^[14]用结核分枝杆菌特异性抗原Rv2029构建的rBCG同样促进小鼠体内CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的增加。将不同免疫组小鼠的脾淋巴细胞分离,与CNE-2Z细胞共培养,观察不同免疫组脾淋巴细胞对CNE-2Z细胞的杀伤效果,结果显示rBCG免疫组脾淋巴细胞对CNE-2Z细胞的特异性杀伤作用明显优于PBS免疫组和BCG免疫组,与Xue等^[11]通过CTL研究BZLF1和hGM-CSF融合基因的rBCG对EBV阳性肿瘤细胞杀伤效果相同,于体外证实了rBCG具有杀伤EBV阳性肿瘤的作用。因此,rBCG能有效激活机体的免疫系统,特异性杀伤EBV阳性肿瘤细胞,对于EBV阳性肿瘤具有一定的治疗作用。

为进一步证实rBCG对EBV阳性肿瘤的治疗作用,本研究利用BALB/-nu裸鼠胸腺缺失进行体内治疗试验。首先,皮下注射CNE-2Z细胞至BALB/-nu裸鼠进行造模,在BALB/-nu裸鼠造模成功后浸润注射rBCG进行治疗,并设置PBS组和BCG治疗组作为对比,通过观察和测量裸鼠肿瘤的体积和重量发现,rBCG治疗组肿瘤体积的增长速度慢于PBS治疗组和BCG治疗组,同时rBCG治疗组肿瘤重量低于PBS治疗组和BCG治疗组。该结果与闫迎春等^[15]用BZLF1和LMP2融合基因构建的rBCG的抑瘤作用相同。通过分析脾NK细胞的比例,发现rBCG治疗组的NK细胞比例显著高于PBS治疗组和BCG治疗组,BCG治疗组NK细胞比例显著高于PBS组,证实rBCG对EBV阳性肿瘤的裸鼠具有治疗作用,这与前面CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞的流式分析和CTL分析结果相对应。

本研究中rBCG同时表达IL-2和ZEBRA,使其在机体内诱导较强的免疫反应,与其他疫苗相比,rBCG具有成本低、易于生产和储存方便等优点^[16],为EBV阳性肿瘤的预防和治疗的亚单位疫苗研发提供了理论依据。

