

研究报告

人绒毛膜促性腺激素 β 亚基 DNA 疫苗的构建及其抗肿瘤作用的初步研究*

陈云 石树群 杨颖 彭景槐**

(中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 人绒毛膜促性腺激素 β 亚基(hCG β)除了在正常的妊娠滋养层细胞中分泌外,在许多肿瘤细胞也大量分泌,是防治hCG β 依赖型癌症的有效目标分子之一。通过RT-PCR方法克隆全长的hCG β 基因,成功构建了PCR3.1-hCG β DNA疫苗,其能够在HeLa细胞中高效表达hCG β 蛋白,表达的hCG β 蛋白主要存在于细胞内。将20 μ g PCR3.1-hCG β 质粒DNA通过普鲁卡因盐酸盐(bupivacaine-HCl)药物诱导后接种小鼠肌肉,小鼠能够吸收质粒DNA,并表达编码的hCG β 蛋白抗原,表达的hCG β 被小鼠的免疫系统识别,同时激发hCG β 抗原特异性的体液免疫和细胞免疫反应,抗体滴度最高可超过1:8000,并且这两种类型的免疫应答均能够在体外作用于HeLa细胞,诱导其发生细胞凋亡,表明PCR3.1-hCG β DNA疫苗激发的免疫反应在体外具有抗肿瘤作用。

关键词 人绒毛膜促性腺激素 β 亚基, PCR3.1-hCG β DNA疫苗, 构建, 表达, 免疫, 抗肿瘤作用

学科分类号 R318

大量文献报道,人绒毛膜促性腺激素 β 亚基(hCG β)除了在正常的妊娠滋养层细胞中分泌外,在许多肿瘤细胞也大量分泌,是多种肿瘤的特征性蛋白。多种组织的肿瘤选择性分泌单链hCG β 或hCG β 的核心片段(hCG β -cf),如生殖系统中的绒毛膜癌、前列腺癌、乳腺癌,子宫内膜癌、宫颈癌,其他系统中如胃癌、膀胱癌、肺癌、肝癌,甚至口腔中的鳞状细胞癌也能检测到^[1~3]。完整的hCG及其他内分泌激素在癌细胞中则未检测到^[4]。hCG β 蛋白作为一项重要的血清学指标已被广泛用于早期肿瘤的诊断^[5,6]。利用RT-PCR检测hCG β mRNA的方法可灵敏地检测到早期的细胞癌变, hCG β 与hCG的比值可作为癌症检测的灵敏指标^[7]。hCG β 在癌细胞中高表达,并与肿瘤的扩增与衰退呈相关性变化^[8]。因此, hCG β 作为肿瘤细胞分泌的特征分子之一,亦是防治癌症的有效靶分子之一。许多实验已证明利用hCG β 纯化蛋白、重组蛋白及合成多肽制作的疫苗能够激发体内产生有效的免疫反应,从而抑制肿瘤细胞的生长^[9~12]。机体在抵御肿瘤细胞生长增殖过程中,免疫系统发挥极其重要的作用。利用hCG β 作为靶抗原,激发体液免疫反应产生保护性抗体,中和肿瘤细胞分泌的hCG β 抗原,能抑制、阻断肿瘤细胞-hCG β 自分泌反馈调节环,特异性的细胞免疫则能更为有效地攻击肿瘤细胞^[13,14]。传统的蛋白质疫苗主要激发体液免疫反应,对于快速扩张的肿瘤细胞的抑制作

用十分有限,因此需要肿瘤特异性的T淋巴细胞细胞毒杀伤作用直接杀伤肿瘤细胞,才能达到治疗癌症的作用^[15]。

DNA疫苗是20世纪90年代发展起来的免疫新技术,许多动物模型和人体实验都证明了DNA疫苗能激发有效的体液免疫应答和细胞免疫应答^[16]。目前,针对艾滋病、肿瘤、癌症等疾病的DNA疫苗已进入临床试验阶段^[17]。本文利用DNA疫苗技术克隆hCG β 基因,构建重组真核质粒表达载体PCR3.1-hCG β DNA疫苗,分析其在体免疫效果,探讨该疫苗在防治hCG β 分泌型肿瘤中的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂

RNAgents Total RNA Isolation System 试剂盒、Access RT-PCR System 试剂盒、Wizard plus SV Minipreps DNA Purification System 试剂盒、CellTiter 96 Aqueous One Solution 细胞增殖检测试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等分子生物学试剂购自Promega公司;PCR3.1真核表达质粒购自Invitrogen公司;DMEM培养基、胎牛血清

* 国家高技术“863”计划资助项目(2001AA215421)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX-SW-201)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62571277, E-mail: pengjp@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 2002-07-03, 接受日期: 2002-09-26

和脂质体均购自 GIBCO 公司; 邻苯二胺 (OPD)、磷酸和柠檬酸缓冲液、碳酸盐缓冲液、碘化丙啶购自 Sigma 公司; 普鲁卡因盐酸盐 (bupivacaine-HCl) 购自 Astra 公司; hCG β 标准纯品及其单克隆抗体购自 Phamigen 公司; 兔抗人 hCG β 抗血清由中国科学院动物研究所内分泌室提供; TUNEL 检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司; 其余试剂均为分析纯和优级纯。

1.2 实验动物

实验动物选用 6~8 周龄的雌性 BALB/c 纯系小鼠, 体重 18~22 g, 由中国科学院遗传研究所实验动物中心提供。所有实验小鼠均按二级动物标准饲养。

1.3 真核质粒表达载体的构建

选用真核质粒表达载体 PCR3.1 含有真核启动子 CMV, 能够在真核细胞中高效表达外源蛋白质。根据 hCG β 序列分析设计出一对特异性引物。上游引物: 5'-CACGGGCCCCGGGACGCACCAAGGATG-3'; 下游引物: 5'-GCGGATTCAGAAGCC-TTTATTG-3'。采用 Promega 公司 RNagents Total RNA Isolation System 试剂盒提取妊娠流产胎盘组织总 RNA, 详细操作方法见其使用说明。通过 RT-PCR 方法^[18]得到一条特异扩增带 (图 1), 测序分析确定为 hCG β 的 cDNA 序列。将 hCG β 全长氨基酸编码序列的 cDNA 片段重组到 PCR3.1 真核表达质粒中, 构建成 PCR3.1-hCG β , 经酶切鉴定筛选正向插入的重组质粒。

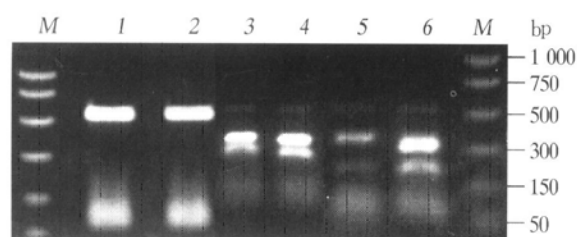


Fig. 1 The clone of hCG β cDNA by RT-PCR and its specific endonucleases mapping

1, 2: hCG β specific RT-PCR amplification products; 3, 4: products digested by *Nae* I; 5, 6: products digested by *Pst* I.

1.4 外源 hCG β 基因的体外表达检测

建立 HeLa 细胞体外瞬时表达系统, 真核表达质粒 PCR3.1-hCG β 经脂质体转染到培养在 24 孔板的 HeLa 细胞中, 分别于 24 h、48 h、72 h 收集细胞, 采用 RT-PCR、免疫荧光方法分析 hCG β 基因的体外表达。

1.4.1 hCG β mRNA 检测: 提取 PCR3.1-hCG β 转染 HeLa 细胞后不同时间收集的细胞总 RNA, 定量 1 μ g 总 RNA, 利用扩增 hCG β 的 cDNA 序列时采用的引物及 RT-PCR 方法, 扩增 cDNA 条带, 经光密度扫描处理后比较不同时间收集细胞的 hCG β 在 mRNA 水平上的表达。

1.4.2 hCG β 在蛋白质水平上的表达: 采用免疫荧光的方法检测转染细胞 hCG β 蛋白的表达。取转染 24 h 的 HeLa 细胞于 4% 磷酸缓冲液-多聚甲醛 (pH 7.4) 中, 室温固定 1 h, PBS 漂洗 3 次后, 用 0.1% Triton X100-0.1% 柠檬酸钠通透细胞 2 min, PBS 漂洗。1:50 正常小鼠血清室温封闭 30 min, 弃封闭血清, 加入 50 μ l 1:250 稀释的小鼠抗 hCG β 单克隆抗体 (0.5 g/L) 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h, 经 PBS 漂洗后, 样品于 1:100 稀释羊抗小鼠 IgG-异硫氰酸荧光素 (FITC) 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 漂洗后, 用 50 mg/L 碘化丙啶 (PI) 在 4 $^{\circ}$ C 染色 4 min, PBS 漂洗, 于激光共聚焦显微镜 488 nm 和 564 nm 激发波长下观察分析。

1.5 实验动物处理及取材

将 BALB/c 小鼠随机分为 2 组, 每组 8 只。实验组肌肉注射 20 μ g PCR3.1-hCG β 质粒 DNA; 对照组肌肉注射 20 μ g PCR3.1 空质粒 DNA。每只小鼠接种质粒 DNA 前 24 h, 在右侧大腿肌肉处分三点注射 50 μ l 0.5% bupivacaine-HCl, 然后在相同部位分三次注射质粒 DNA, 并在 2 周后加强免疫一次。在注射质粒 DNA 前和注射质粒 DNA 后 2 周、4 周、6 周和 8 周, 用玻璃毛细管自小鼠眼球的后上眶眼球静脉取血 200~300 μ l, 收集血清, -20 $^{\circ}$ C 保存。在第 8 周取脾脏, 无菌制备 T 淋巴细胞。采用 ELISA、细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 杀伤活性检测方法检测 PCR3.1-hCG β 免疫小鼠后的抗体水平的动态变化及细胞免疫情况。

1.6 ELISA 检测小鼠体液免疫应答

采用标准 ELISA 方法检测体液免疫应答的情况。用 1:50 倍稀释的正常血清作为对照, 收集的实验动物血清按不同比例稀释检测, 取 A_{490} 值与对照血清 A_{490} 值的差值大于 0.1 时的最大稀释度为有效滴度。每个样品每个稀释度三次重复取样, 取平均值。免疫反应曲线表示方法参见文献 [19], 即以抗体滴度值的对数值表示, 例如抗体滴度值为 1000, 则反应曲线值为 $\lg 1000 = 3$ ^[19]。

1.7 CTL 杀伤活性检测

将实验组、对照组及未处理组的淋巴细胞单细胞悬液作为 CTL 检测效应细胞 (effector cells, E), 按大约 5×10^6 个/ml, 与 5 mg/L 的特异性刺激抗原 hCG β 标准蛋白相互作用, 在 RPMI1640-10% FBS 培养液中于 37 °C, 5% CO₂ 共培养 5 天, 同样设立 5 mg/L 的 PHA 阳性对照和 5 mg/L 的 BSA 阴性对照. 利用 HeLa 细胞能够分泌 hCG β 蛋白, 选作靶细胞 (target cells, T) 而不需作任何处理. 50 μ l 的 HeLa 细胞 (2×10^6 个/ml) 与 50 μ l 经过刺激处理的效应淋巴细胞在 96 孔细胞培养板中培养, E:T 从 50:1、25:1 到 12.5:1, 作用 6 h 后, 每孔加入 20 μ l 的 CellTiter 96 Aqueous One Solution 细胞增殖检测试剂 (具体原理及使用方法见其使用说明), 37 °C, 5% CO₂ 培养 4 h, 读取样品 A₄₉₀ 吸收值. 结果用特异性裂解率 (specific lysis) 表示.

1.8 体外抗肿瘤实验

采用 TUNEL 实验进行 PCR3.1-hCG β DNA 疫苗在体外的抗肿瘤实验, 选用 HeLa 细胞和 JEG-3 (人绒毛膜癌细胞) 细胞作为靶细胞. 在进行抗肿瘤实验前 12 h, HeLa 细胞和 JEG-3 细胞均改用无血清培养, PCR3.1-hCG β DNA 免疫小鼠后第 8 周的免疫血清, 以及 T 淋巴细胞利用 5 mg/L 的 hCG β 标准蛋白致敏后与 HeLa 细胞和 JEG-3 细胞共培养 6 h. 取 HeLa 细胞或 JEG-3 细胞于 4% 磷酸缓冲液-多聚甲醛 (pH 7.4) 中室温固定 1 h, PBS 漂洗 3 次后, 用 0.1% Triton X100-0.1% 柠檬酸钠通透细胞 2 min, PBS 漂洗, 滴加 50 μ l TdT 酶-反应液孵育 1 h, PBS 洗后, 于 50 mg/L 碘化丙啶 4 °C 负染 5 min. 阴性对照中加入无 TdT 酶的反应液, 封片后于激光共聚焦显微镜 488 nm 和 564 nm 激发波长下观察分析.

1.9 数据统计

本文所有扫描所得数据均进行 Student's *t* 检验.

2 实验结果

2.1 具有表达活性 PCR3.1-hCG β DNA 疫苗的构建

提取不同时间收集的转染 HeLa 细胞的总 RNA, 定量 1 μ g 通过 RT-PCR 方法扩增出 hCG β cDNA 条带 (图 2a). 经光密度扫描处理后比较在 mRNA 水平上的表达情况, PCMV4_hCG β DNA

转染入 HeLa 细胞后, 在 24 h 时表达最强, 在 48 h、72 h 表达依次减弱, 与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$) (图 2b).

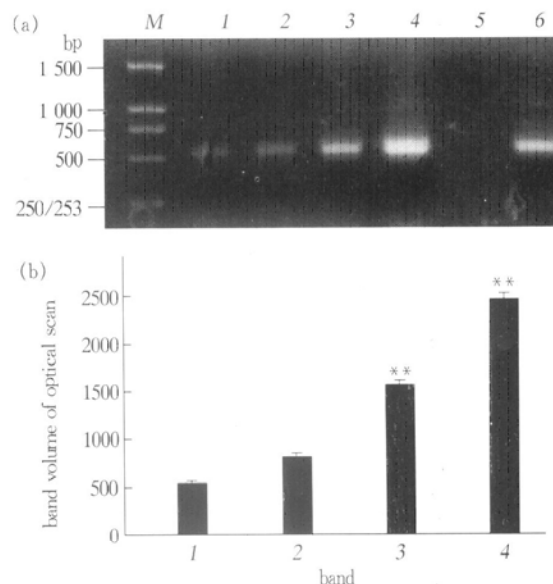


Fig 2 Determination of hCG β mRNA expression using RT-PCR in HeLa cells transfected with PCR3.1-hCG β vector

(a) hCG β cDNA amplifications by RT-PCR. M: 1 kb DNA ladder marker. 1: from normal HeLa cells; 2 ~ 4: from HeLa cells transfected with PCR3.1-hCG β at 72 h, 48 h, 24 h respectively; 5: negative control; 6: positive control. (b) The comparison of optical volume of RT-PCR bands. 1 ~ 4 are the data of optical volume of band 1 ~ 4 from (a) (** $P < 0.01$ compare to control group).

采用免疫荧光技术观察到 PCR3.1-hCG β 转染 24 h 后的 HeLa 细胞表达 hCG β 蛋白非常明显, 表达的蛋白主要在细胞质中, 而对照空质粒未有明显的 hCG β 蛋白表达 (图 3). 结果表明 PCR3.1-hCG β DNA 疫苗能够在真核细胞中表达出相应的 hCG β 蛋白.

2.2 PCR3.1-hCG β 诱导小鼠体液免疫反应

bupivacaine-HCl 药物诱导法, 经 PCR3.1-hCG β DNA 免疫接种 BALB/C 小鼠, 20 μ g 的剂量能诱导小鼠产生强烈的体液免疫应答. 从检测的第 2 周开始, 免疫反应的滴度持续升高, 在第 6 周时上升接近顶峰, 抗体滴度最高可达 1:8000 以上, 显著性高于对照组的背景反应, 特异性的体液免疫反应能持续至少 8 周以上 (图 4). 结果显示 PCR3.1-hCG β DNA 能有效激发 BALB/c 小鼠产生抗原特异性的体液免疫应答.

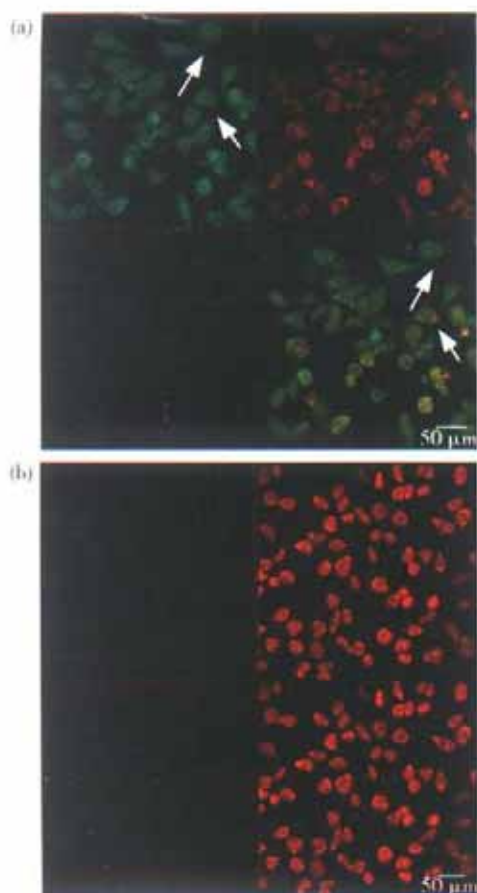


Fig. 3 Detecting the expression of hCG β subunit at protein level in transfected HeLa cells at 24 h by immuno fluorescent assay

(a) PCR3.1-hCG β DNA transfected HeLa cells. (b) PCR3.1 vehicle control transfected HeLa cells. Arrows indicate the hCG β protein was mainly with intracellular state. Green fluorescence was activated by FITC, red fluorescence was activated by PI.

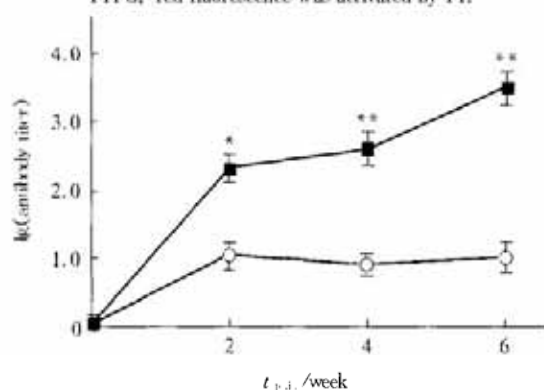


Fig. 4 Humoral immune responses induced by PCR3.1-hCG β DNA with intramuscular inoculation by ELISA

p.i.: postimmunization. Sera samples of each group from 2 weeks to 8 weeks were detected, and the antibody titers were pooled and expressed as lg(titer). The experimental group was inoculated with 20 μ g of PCR3.1-hCG β plasmid DNA with intramuscular injection. 20 μ g of PCR3.1 mock plasmid DNA was set as control. At 2 weeks p.i. all mice had the boost immunization (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compare to control group). ■—■: experiment; ○—○: control.

2.3 PCR3.1-hCG β 诱导小鼠细胞免疫反应

取肌肉免疫后 8 周时的 T 淋巴细胞来检测 CTL 的抗原特异性杀伤活性。在经过特异性抗原蛋白 hCG β 致敏处理后的 T 淋巴细胞, 其 CTL 活性检测结果见图 5。肌肉接种 20 μ g PCR3.1-hCG β DNA 免疫小鼠, 在 8 周时的 T 细胞毒淋巴细胞的抗原特异性杀伤活性, 在不同的 E:T 比例中: 50:1 时达到 45%, 25:1 时达到 26%, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$)。同时结果也说明 PCR3.1-hCG β DNA 疫苗在 BALB/c 小鼠体内诱导产生了抗原特异性的细胞免疫应答。

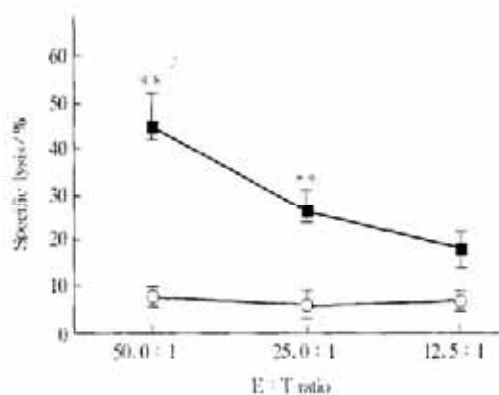


Fig. 5 hCG β specific CTL responses following PCR3.1-hCG β DNA inoculation in mice

The T lymphocyte from experimental group, control group and untreated mice were stimulated with 5 mg/L hCG β for 5 d. The target cells and effector cells were co-cultured for 6 h at indicated E:T. Cells viability was measured at 490 nm and the specific lysis was analyzed (** $P < 0.01$ compare to control group). ■—■: experiment; ○—○: control.

2.4 PCR3.1-hCG β DNA 疫苗体外抗肿瘤实验

采用 TUNEL 实验, 在 PCR3.1-hCG β DNA 免疫小鼠后第 8 周, 取 T 淋巴细胞及免疫血清进行的体外抗肿瘤实验结果发现: PCR3.1-hCG β DNA 免疫小鼠的 T 淋巴细胞能够在体外攻击 HeLa 细胞与 JEG-3 细胞, 导致 HeLa 细胞和 JEG-3 细胞发生细胞凋亡; 同时免疫小鼠的血清也能够作用 HeLa 细胞与 JEG-3 细胞, 诱导 HeLa 细胞或 JEG-3 细胞发生细胞凋亡 (图 6)。结果表明 PCR3.1-hCG β DNA 疫苗不仅能够激发小鼠产生相应的体液免疫和细胞免疫反应, 而且激发的这两种类型的免疫应答均能够作用于 HeLa 细胞与 JEG-3 细胞, 诱导其发生细胞凋亡。

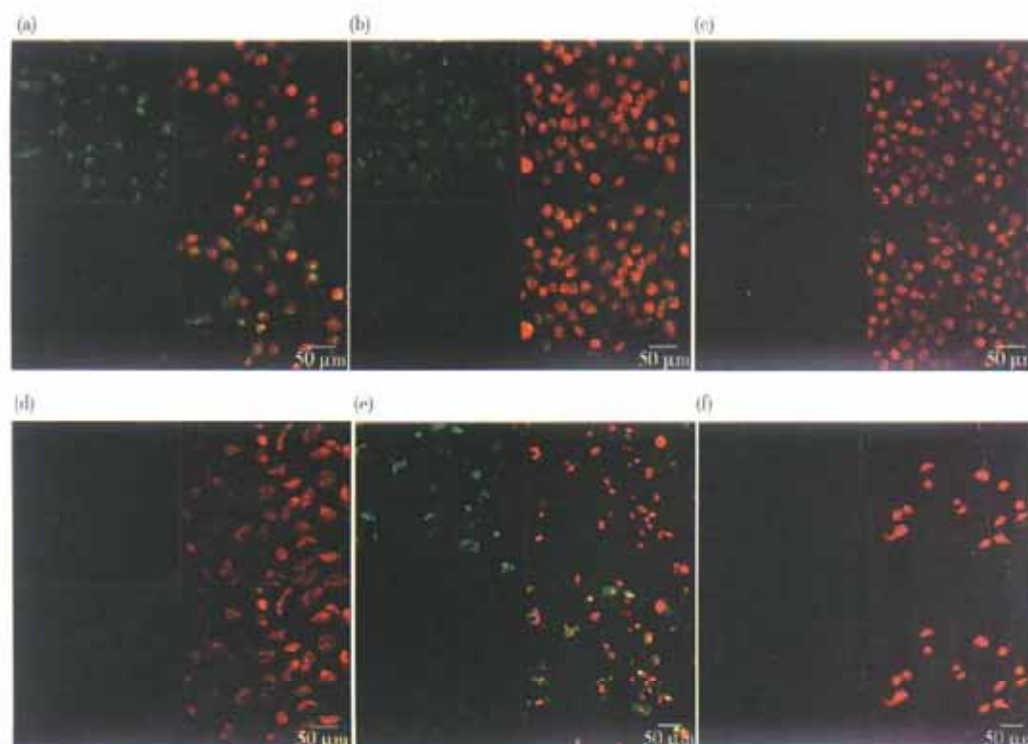


Fig. 6 The antitumor effects of T lymphocytes and sera from mice immunized with PCR3. 1-hCG β DNA inoculation were detected by TUNEL assay *in vitro*

(a) HeLa cells were co-cultured with T lymphocytes from mice immunized with PCR3. 1-hCG β DNA inoculation. (b) HeLa cells were co-cultured with sera from mice immunized with PCR3. 1-hCG β DNA inoculation. (c) HeLa cells were co-cultured with T lymphocytes from mice immunized with PCR3. 1 empty plasmid DNA inoculation. (d) HeLa cells were co-cultured with sera from mice immunized with PCR3. 1 empty plasmid DNA inoculation. (e) JEG-3 cells were co-cultured with T lymphocytes from mice immunized with PCR3. 1-hCG β DNA inoculation. (f) JEG-3 cells were co-cultured with T lymphocytes from mice immunized with PCR3. 1 empty plasmid DNA inoculation. Green fluorescence indicated apoptosis was induced in HeLa cells and JEG-3; red fluorescence was activated by PI.

3 讨 论

DNA 免疫时, 在机体细胞内产生的抗原多肽的提呈过程和自然感染时相似, 以其天然构象被提呈给免疫识别系统, 这对于构象型抗原表位引起的保护性免疫尤为重要, 而用目前的重组技术在体外合成的蛋白质抗原常造成构象型抗原表位的改变或丢失。大量的研究结果显示在 hCG β 蛋白初级结构及空间构象中主要包含 9 个不同的抗原表位 β 1~ β 9, 其中包括构象型抗原表位 β 1~ β 7, 聚集地位于 hCG β 的核心序列上, 而剩余的两个线性抗原决定簇 β 8 和 β 9 位于 hCG β 上, hCG β 蛋白分子三维结构的免疫原性主要由 β 1~ β 7 决定, 其激发的免疫应答主要由构象型抗原表位决定的^[20~22]。目前研究中 hCG β 蛋白疫苗不仅免疫原性较差, 激发的免疫作用主要依赖体液免疫起作用, 而不存在由 T 细胞介导的细胞毒杀伤作用。对于抑制快速扩张的

肿瘤细胞则更需要更为有效的细胞免疫作用, 因此需要进行免疫方法的改进以利于 hCG β 蛋白疫苗的应用, 利用 DNA 免疫技术来探讨 hCG β DNA 疫苗的可能抗肿瘤作用。

本文克隆全长的 hCG β 基因, 成功地构建了 PCR3. 1-hCG β DNA 疫苗, 其能够在 HeLa 细胞中高效表达 hCG β 蛋白, 表达的 hCG β 蛋白主要以细胞内的形式存在。将质粒 PCR3. 1-hCG β DNA 通过 bupivacaine-HCl 药物诱导后接种小鼠肌肉, 小鼠骨骼肌细胞能够吸收质粒 DNA, 并表达编码的 hCG β 蛋白抗原, 表达的 hCG β 被小鼠的免疫系统识别, 同时激发 hCG β 抗原特异性的体液免疫和细胞免疫反应。尽管肌肉接种 DNA 疫苗激发免疫应答的机理还不清楚, 但有实验证明在肌肉接种 DNA 疫苗中必须有骨髓源抗原呈递细胞 (APCs) 呈递抗原才能激发免疫反应^[23]。目前有假设认为 DNA 疫苗在接种时引发的局部炎症反应能够招募

骨髓源 APCs 到达肌肉组织部位, 感染质粒 DNA 的肌细胞产生抗原后分泌出来或肌细胞死亡后释放出来, 被炎症反应招募来的巨噬细胞和 B 淋巴细胞吸收, 引发 Th 依赖性的抗体反应, 转运的蛋白质进入 MHC I 加工途径, 从而介导 CTL 反应^[24, 25].

疫苗活化的抗原特异性 T 淋巴细胞能够作用癌细胞导致其裂解已成定论, 同样, 有实验证实抗原特异性抗体也能够作用癌细胞导致其裂解. Kalantarov 等^[26]利用 hCG β 抗生育疫苗发现 hCG β 特异性的抗体或免疫血清具有抗癌作用, hCG β 抗体能够导致 hCG β 分泌型癌细胞裂解, 且成剂量依赖关系. 本实验中 PCR3.1-hCG β DNA 激发的 hCG β 抗原特异性的体液免疫和细胞免疫反应, 两种免疫应答类型均能够在体外作用于 HeLa 细胞和 JEG-3 细胞, 诱导其发生细胞凋亡. 这为进一步在动物体内研究 DNA 疫苗的抗肿瘤作用奠定了基础.

参 考 文 献

- Gawronska B, Leuschner C, Enright F M, *et al.* Effects of a lytic peptide conjugated to beta HCG on ovarian cancer: studies *in vitro* and *in vivo*. *Gynecol Oncol*, 2002, **85** (1): 45~ 52
- Lundin M, Nordling S, Carpelan-Holmstrom M, *et al.* A comparison of serum and tissue hCG beta as prognostic markers in colorectal cancer. *Anticancer Res*, 2000, **20** (6D): 4949~ 4951
- Marcillac I, Cottu P, Theodore C, *et al.* Free hCG-beta subunit as tumour marker in urothelial cancer. *Lancet*, 1993, **341** (8856): 1354~ 1355
- Okamoto T, Niu R, Matsuo K, *et al.* Human chorionic gonadotropin beta core fragment is directly produced by cancer cells. *Life Sci*, 2001, **68** (8): 861~ 872
- Mungan T, Kuscu E, Ugur M, *et al.* Screening of persistent trophoblastic disease with various serum markers. *Eur J Gynaecol Oncol*, 1998, **19** (5): 495~ 497
- Gregory J J, Finlay J L. Alpha-fetoprotein and beta-human chorionic gonadotropin: their clinical significance as tumour markers. *Drugs*, 1999, **57** (4): 463~ 467
- Hoshi S, Suzuki K, Ishidoya S, *et al.* Significance of simultaneous determination of serum human chorionic gonadotropin (hCG) and hCG-beta in testicular tumor patients. *Int J Urol*, 2000, **7** (6): 218~ 223
- Crawford R A, Iles R K, Carter P G, *et al.* The prognostic significance of beta human chorionic gonadotropin and its metabolites in women with cervical carcinoma. *J Clin Pathol*, 1998, **51** (9): 685~ 688
- Triozzi P L, Stevens V C. Human chorionic gonadotropin as a target for cancer vaccines. *Oncol Rep*, 1999, **6** (1): 7~ 17
- Triozzi P L, Stevens V C, Aldrich W, *et al.* Effects of a beta-human chorionic gonadotropin subunit immunogen administered in aqueous solution with a novel nonionic block copolymer adjuvant in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, 1997, **3** (12Pt1): 2355~ 2362
- Gillott D J, Iles R K, Chard T. The effects of beta-human chorionic gonadotropin on the *in vitro* growth of bladder cancer cell lines. *Br J Cancer*, 1996, **73** (3): 323~ 326
- Geissler M, Wands G, Gesien A, *et al.* Genetic immunization with the free human chorionic gonadotropin beta subunit elicits cytotoxic T lymphocyte responses and protects against tumor formation in mice. *Lab Invest*, 1997, **76** (6): 859~ 871
- Gillott D J, Iles R K, Chard T. The effects of beta-human chorionic gonadotropin on the *in vitro* growth of bladder cancer cell lines. *Br J Cancer*, 1996, **73** (3): 323~ 326
- Talwar G P. Vaccines and passive immunological approaches for the control of fertility and hormone-dependent cancers. *Immunol Rev*, 1999, **171**: 173~ 192
- Dangles V, Halberstam I, Scardino A, *et al.* Tumor associated antigen human chorionic gonadotropin beta contains numerous antigenic determinants recognized by *in vitro*-induced CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, **50** (12): 673~ 681
- Hasan U A, Abai A M, Harper D R, *et al.* Nucleic acid immunization: concepts and techniques associated with third generation vaccines. *J Immunol Meth*, 1999, **229** (1~ 2): 1~ 22
- Schultz J, Dollenmaier G, Molling K. Update on antiviral DNA vaccine research (1998-2000). *Intervirology*, 2000, **43** (4~ 6): 197~ 217
- Chen Y, Liu Z, Peng J P. Identification of beta subunit of the rhesus monkey chorionic gonadotropin (rmCG). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2001, **218** (1~ 2): 157~ 163
- Kerr P J, Jackson R J, Robinson A J, *et al.* Infertility in female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) alloimmunized with the rabbit zona pellucida protein ZPB either as a purified recombinant protein or expressed by recombinant myxoma virus. *Biol Reprod*, 1999, **61**: 606~ 613
- Bidart J M, Troalen F, Bohuon C J, *et al.* Immunochemical mapping of a specific domain on human chorionic gonadotropin using anti-protein and anti-peptide monoclonal antibodies. *J Biol Chem*, 1987, **262** (32): 15483~ 15489
- Dirnhofer S, Madersbacher S, Bidart J M, *et al.* The molecular basis for epitopes on the free beta-subunit of human chorionic gonadotropin (hCG), its carboxyl-terminal peptide and the hCG beta core fragment. *J Endocrinol*, 1994, **141** (1): 153~ 162
- Stephan D, Klieber R, de Leeuw R, *et al.* Functional and immunological relevance of the COOH-terminal extension of human chorionic gonadotropin beta: implications for the WHO birth control vaccine. *FASEB Journal*, 1993, **7**: 1381~ 1385
- Doe B, Selby M, Barnett S, *et al.* Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (16): 8578~ 8583
- Corr M, Lee J D, Carson D A, *et al.* Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med*, 1996, **184**: 1555~ 1560
- Thomas T, Jonathan A, Walter J S, *et al.* The immunology of DNA vaccines. In: Lowrie D B, Whalen R G. eds. *Methods in Medicine*, Totowa NJ: Humana Press Inc, 1999. 37~ 64
- Kalantarov G, Acevedo H F. Demonstration of dose dependent cytotoxic activity in cancer cells by specific human chorionic gonadotropin monoclonal antibodies. *Cancer*, 1998, **83** (4): 783 ~ 787

The Construction of Human Chorionic Gonadotropin β -Subunit Glycoprotein (hCG β) DNA Vaccine and Its Preliminary Antitumor Study*

CHEN Yun, SHI Shu-Qun, YANG Ying, PENG Jing-Pian**

(State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract The β -subunit of human chorionic gonadotropin (hCG β) is secreted by trophoblastic cells during normal pregnancy. In addition, hCG β is also synthesized by many tumor and cancer cells, and it has been one of target molecules for active immunotherapy to prevent and treat hCG β dependent tumors and cancers. The full coding region of hCG β was isolated by the RT-PCR method, and was inserted into PCR3.1 eukaryotic expression vector to construct the recombinant PCR3.1-hCG β DNA vaccine successfully. Using HeLa cells transient expression system, the capability of hCG β expression of PCR3.1-hCG β was confirmed *in vitro*, and the expressed hCG β protein was mainly with intracellular state. With 20 μ g PCR3.1-hCG β plasmid DNA through intramuscular inoculation after bupivacaine-HCl inducing, the immunized BALB/c mice could express hCG β antigen to induce both intensive hCG β -specific humoral immune responses and CTL responses, and the antibody titer reached high to 1: 8000. Moreover, both two types of immune responses elicited by PCR3.1-hCG β could attack HeLa cells to induce apoptosis *in vitro*. The results indicated that the immune responses induced by PCR3.1-hCG β DNA vaccine have antitumor effects *in vitro*, and would be helpful to detect the antitumor effects of PCR3.1-hCG β DNA vaccine *in vivo*.

Key words hCG β , PCR3.1-hCG β DNA vaccine, construction, expression, immunization, antitumor effects

* This work was supported by grants from The State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA215421), and The Key Innovation Research Programs of The Chinese Academy of Sciences (KSCX2-SW-201).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62571277, E-mail: pengjp@panda.ioz.ac.cn

Received: July 3, 2002 Accepted: September 26, 2002