

融合蛋白 hVEGF121/βhCG 与 mGM-CSF/βhCG 联合抗肿瘤作用及其机制

井亮亮^{1#}, 苗梓韬^{1#}, 李曼曼¹, 叶佳¹, 金亮¹, 曹荣月^{1*}, 龙军^{2**}

(¹中国药科大学生命科学与技术学院,南京 210009; ²南京中医药大学药学院,南京 210029)

摘要 探讨 mGM-CSF/βhCG (GC) 和 hVEGF121/βhCG (VC) 两种融合蛋白联用对 C57BL/6J 小鼠 RM-1 前列腺癌和 B16F10 黑色素瘤的抑制效果, 并对其抗肿瘤作用机制进行初步研究。采用含有 pET-28a-mGM-CSF-X10-βhCGCTP37 和 pET-28a-VEGF-M2-X10-βhCG-CTP37 的两个重组菌进行乳糖诱导表达, 分离纯化融合蛋白。将两种蛋白制备抗肿瘤蛋白疫苗 (VC 蛋白疫苗和 GC 蛋白疫苗), 并将两蛋白混合制备联合蛋白疫苗 (VGC 蛋白疫苗), 免疫 C57BL/6J 接瘤小鼠, 测量瘤块生长状态; 检测免疫小鼠脾细胞增殖以及对肿瘤细胞的细胞毒作用; ELISA 检测小鼠体内细胞因子 IFN-γ 和抗 hVEGF 抗体浓度。结果发现, 在前列腺癌和黑色素瘤小鼠移植瘤模型中, 与生理盐水 NS 组相比, 各实验组均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中 VGC 组抗肿瘤效果优于 GC 组和 VC 组 ($P < 0.01$), 且对前列腺癌和黑色素瘤的抑瘤率分别达到 (41.7 ± 0.83)% 和 (46.4 ± 1.27)%。由此可见, VC 和 GC 两种蛋白联合后, 通过发挥抗肿瘤免疫和抗肿瘤血管生成双重作用, 高效地抑制了 RM-1 前列腺癌和 B16F10 黑色素瘤的生长。

关键词 血管内皮生长因子 (VEGF); 人绒毛膜促性腺激素 (hCG); 鼠源粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (mGM-CSF); 前列腺癌; 黑色素瘤

中图分类号 Q816; R73-36 + 2 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)01-00102-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170116

引用本文 井亮亮, 苗梓韬, 李曼曼, 等. 融合蛋白 hVEGF121/βhCG 与 mGM-CSF/βhCG 联合抗肿瘤作用及其机制 [J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(1): 102–109.

Cite this article as: JING Liangliang, MIAO Zitao, LI Manman, et al. Anti-tumor effect and its mechanism of co-administration of fusion proteins hVEGF121/βhCG and mGM-CSF/βhCG [J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(1): 102–109.

Anti-tumor effect and its mechanism of co-administration of fusion proteins hVEGF121/βhCG and mGM-CSF/βhCG

JING Liangliang^{1#}, MIAO Zitao^{1#}, LI Manman¹, YE Jia¹, JIN Liang¹, CAO Rongyue^{1*}, LONG Jun^{2**}

¹School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract This study aimed at investigating the inhibitory effects and the anti-tumor mechanisms of co-administration of fusion proteins mGM-CSF/βhCG (GC) and hVEGF121/βhCG (VC) on RM-1 prostatic cancer and B16F10 melanoma in the C57BL/6J mouse model. Two recombinant stains containing pET-28a-mGM-CSF-X10-βhCGCTP37 and pET-28a-VEGF-M2-X10-βhCG-CTP37 were induced by lactose to express fusion proteins. The fusion proteins were separated and purified to prepare the anti-tumor protein vaccines (VC protein vaccine and GC protein vaccine), which were then mixed to prepare a combined protein vaccine named VGC protein vac-

收稿日期 2016-06-04 通信作者 * Tel: 025-83271242 E-mail: caorongyuanjing@126.com

** Tel: 025-85811625 E-mail: long_ydp@aliyun.com

#: 井亮亮和苗梓韬对本论文的贡献相同

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81373232, No. 31270985); 国家基础科学人才培养基金资助项目 (No. J1310032); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

cine. The prostatic cancer and melanoma tumor-bearing mice C57BL/6J were immunized with described vaccines, then the growth of each tumor was measured; splenocyte proliferation of immunized mice was detected; and the cytotoxic effects of the vaccine on tumor cells were tested. After that, the *in vivo* concentrations of IFN- γ and anti-hVEGF antibodies were investigated by ELISA. The difference between each experimental group and normal saline group (NS) was statistically significant in both tumor-bearing mouse models ($P < 0.05$) respectively. Besides, VGC group exhibited significantly better anti-tumor effect compared with the GC and VC groups with the anti-tumor rate ($41.7 \pm 0.83\%$) and ($46.4 \pm 1.27\%$) for prostatic cancer and melanoma tumor, respectively. The co-administration of the two proteins, VC and GC, could inhibit the growth of RM-1 prostatic tumor and B16F10 melanoma effectively via anti-tumor immunity and anti-tumor angiogenesis.

Key words vascular endothelial growth factor(VEGF); human chorionic gonadotropin (hCG); mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor (mGM-CSF); prostatic cancer; melanoma

[#]JING Liangliang and MIAO Zitao contributed equally to this work

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81373232, No. 31270985); the National Fund for Fostering Talents in Basic Science(No. J1310032); and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions(PAPD)

肿瘤的发生发展与众多因素有关,联合治疗是目前常用的一种治疗方法^[1],虽然化学药物联合使用效果明显,但是由于其不良反应较大而受到限制。将不同的生物免疫治疗方法相结合,其毒性低、免疫力强,成为治疗肿瘤的新方法^[2]。近年的研究表明,前列腺癌^[3]、乳腺癌、黑色素瘤^[4]等肿瘤发生都与性激素分泌密切相关。本研究选用前列腺癌和黑色素瘤作为研究对象,以人绒毛膜促性腺激素为靶点进行抗肿瘤研究,期望能够产生高效的抑瘤效果。同时为了证实两种不同抗肿瘤蛋白疫苗联用所发挥的抗肿瘤效应,本研究采用两种蛋白联合给药,利用两种蛋白不同的抗肿瘤作用机制,以期提高机体对RM-1 前列腺癌和 B16F10 黑色素瘤不同肿瘤的抗肿瘤免疫应答,并对抗肿瘤机制进行初步研究,为后续临床研究和治疗提供理论依据。

1 材 料

1.1 菌种和质粒

载体 pET-28a(+)、菌种 *Escherichia coli* BL21 (DE3)、质粒 pET-28a-hVEGF121-M2-X10-βh CG-CT-P37 和 pET-28a-mGM-CSF-X10-βhCGCTP37 均为中国药科大学微基因实验室保存。

1.2 试 剂

胎牛血清(杭州四季青工程研究所); RPMI 1640 和 DMEM (美国 Gibco 公司); 刀豆蛋白 (ConA) 和四甲基偶氮唑蓝盐 (MTT) (美国 Sigma 公司); 沙利度胺片(批号:15011531, 常州制药厂

有限公司);多西他赛注射液(DTX, 批号:5080081, 齐鲁制药有限公司);注射用环磷酰胺(CTX, 批号: 04141203, 山西普德药业股份有限公司);乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒和抗人 VEGF ELISA 试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司);其他试剂均为进口分装或市售分析纯。

1.3 动物、鸡胚和细胞株

C57BL/6J 雄性小鼠(5 周龄)购自扬州大学比较医学中心,许可证号:SCXK(苏)2012-0004;白皮受精种蛋购自乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂;小鼠前列腺癌 RM-1 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院;黑色素瘤 B16F10 细胞株为本实验室保存。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方 法

2.1 融合蛋白的诱导表达和分离纯化

将含有 pET-28a-mGM-CSF-X10-βhCGCTP37 和 pET-28a-VEGF-M2-X10-βhCG-CTP37 两个重组菌进行乳糖诱导表达,通过超声破碎、硫酸铵分级沉淀和 DEAE52 阴离子交换色谱的方法分离纯化融合蛋白,透析后冻干保存。

2.2 鸡胚绒毛尿囊膜实验

实验分成 5 组,分别为:生理盐水组 (NS 组),沙利度胺组(终浓度为 50 μg/mL), VEGF/βhCG 蛋白组 (VC 组)、mGM-CSF/βhCG 蛋白组

(GC组)以及联合给药组(VGC组)(终浓度均为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$)，每组6个鸡胚。实验对象选取发育良好的8 d龄的鸡胚，在无菌滤纸上分别滴加各组溶液，每日1次，每次 $100 \mu\text{L}$ ，共给药3 d。第4天固定剪下尿囊膜，拍照进行图像分析。分别以载体为中心直径5 mm范围内，计算血管数目(blood vessel number, BVN)和血管交叉点个数(number of vessel intersection, VN)。计算血管抑制率，抑制率($\text{IR}, \%$) = ($1 - \text{实验组平均血管数} / \text{阴性组平均血管数}$) $\times 100$ 。

2.3 联合给药对小鼠RM-1前列腺癌/小鼠B16F10黑色素瘤的免疫治疗

2.3.1 分组

治疗前列腺癌小鼠分组：NS组，VC组(融合蛋白用无菌生理盐水配成 $2 \text{ mg}/\text{mL}$ 的溶液，等体积混合弗氏不完全佐剂)，GC组，VGC组(VC蛋白 1 mg + GC蛋白 1 mg 用无菌生理盐水配成 $2 \text{ mg}/\text{mL}$ 的溶液，等体积混合弗氏不完全佐剂)以及多西他赛组(DTX，终浓度为 $10 \text{ mg}/\text{kg}$)。

治疗黑色素瘤小鼠分组：NS组、VC组、GC组、VGC组以及环磷酰胺组(CTX，腹腔注射，终浓度为 $20 \text{ mg}/\text{kg}$)。

2.3.2 联合给药对小鼠皮内肿瘤新生血管的抑制作用 腹部皮内接种RM-1前列腺癌/B16F10黑色素瘤肿瘤细胞悬液(3×10^5 个, $100 \mu\text{L}$)，小鼠随机分为5组，每组4只。每3天给药1次，每次 $100 \mu\text{L}$ ，连续3次，第3次给药2 d后，处死小鼠。将腹部外层皮肤剥下，拍照观察瘤块内部和周围的血管分布，并计算瘤块周围 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 面积里的所有血管数。

2.3.3 联合给药对小鼠皮下肿瘤的抑制作用 皮下接种肿瘤细胞悬液(3×10^5 个, $100 \mu\text{L}$)，随机分为5组，每组6只。从接瘤第3、8、13 d给药，每次 $100 \mu\text{L}$ 。待瘤块长到可触摸程度时开始测量瘤体积，每3天测量1次，共测量4次，利用公式^[5]计算出瘤体积。第14 d小鼠眼眶取血并处死，剥瘤称重得出抑瘤率。抑瘤率($\%$) = ($1 - \text{实验组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}$) $\times 100$ 。

2.3.4 脾淋巴细胞增殖实验 无菌取各组小鼠脾

脏，制成每毫升 5×10^6 个小鼠脾细胞的悬液，加入到96孔细胞培养板中，每孔加 $100 \mu\text{L}$ 。每组分别加入培养基、VC溶液、GC溶液、VGC溶液(终浓度均为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$)以及刀豆蛋白ConA(终浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$)。培养48 h后，每孔加入噻唑蓝溶液($5 \text{ mg}/\text{mL}$) $20 \mu\text{L}$ ，继续培养4 h，离心吸去上清液，每孔加入DMSO $100 \mu\text{L}$ ，溶解10 min，测 A_{570} 。脾淋巴细胞增殖指数 = 供试品组平均吸收度/培养基对照组平均吸收度。

2.3.5 细胞毒性检测(CTL) 采用乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测方法，具体操作步骤按说明书进行。脾淋巴细胞制备方法同“2.3.4”项。杀伤率($\%$) = ($\text{实验组释放量} - \text{效应细胞释放量} - \text{靶细胞自发释放量} / (\text{靶细胞最大释放量} - \text{靶细胞自发释放量}) \times 100$)。

2.3.6 肿瘤组织切片分析 小鼠处死后取肿瘤组织固定于10%福尔马林溶液中，常规取材，脱水，包埋，切片($4 \mu\text{m}$)，HE染色，光学显微镜下阅片。

2.3.7 小鼠血清中抗hVEGF抗体和细胞因子IFN- γ 的ELISA检测 采用间接ELISA法检测，具体操作步骤按说明书进行。

2.4 统计分析

实验中采用SPSS11.5统计软件分析，测得的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示， $P < 0.05$ 提示差异具有统计学意义， $P < 0.01$ 提示差异有显著性意义。组间数据符合正态分布和组间方差齐性后，采用LSD法，检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 鸡胚绒毛尿囊膜实验

实验结果显示，VC组、GC组、VGC组及沙利度胺组(thalidomide, THD)鸡胚绒毛尿囊膜的血管数目和血管交叉点明显少于NS，差异具有统计学意义($F = 117.116, P < 0.05$; $F = 20.245, P < 0.05$)，其中沙利度胺和VGC组差异最为显著($P < 0.01$)。VGC组分别与VC组、GC组比较，存在显著性差异($P < 0.01$)。由表1可知沙利度胺和VGC组抑制作用明显，其抑制率分别为($69.85 \pm 4.37\%$)%和($59.81 \pm 4.58\%$)%。

Table 1 Effect of angiogenesis of Chick chorioallantoic membrane immunized by hVEGF121/βhCG protein (VC), mGM-CSF/βhCG protein (GC) and VC-GC combined protein (VGC) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	c/(μg/mL)	Blood vessel/n	Inhibition/%	Vessel intersection/n
NS		71.33 ± 3.94 [△]	0	31.67 ± 6.15
THD	50	21.50 ± 4.37 [*]	69.86	11.33 ± 2.06 [*]
VC	100	43.33 ± 4.93 ^{*△}	39.25	18.17 ± 1.17 ^{*△}
GC	100	58.83 ± 5.42 ^{*△}	17.51	24.50 ± 4.28 ^{*△}
VGC	100	28.67 ± 4.58 [*]	59.81	13.00 ± 2.37 [*]

NS: normal saline ; THD: thalidomide

* P < 0.01 vs NS group; [△] P < 0.01 vs VGC group

3.2 联合蛋白对小鼠皮内肿瘤新生血管的抑制作用

观察肿瘤组织周围毛细血管生成状况(图 1-A, 图 1-B), 两种肿瘤实验中, 与 NS 组比较, 其余 4 组周围血管都有统计学意义($F = 60.806, P < 0.05$; $F = 83.028, P < 0.05$), VGC 组、DTX 组和 CTX 组血管数均减少, 具有极显著差异($P < 0.01$); VGC 组与 VC 组或 GC 组比, 血管减少明显, 均具有显著性差异($P < 0.01$)(图 1-C, 1-D)。

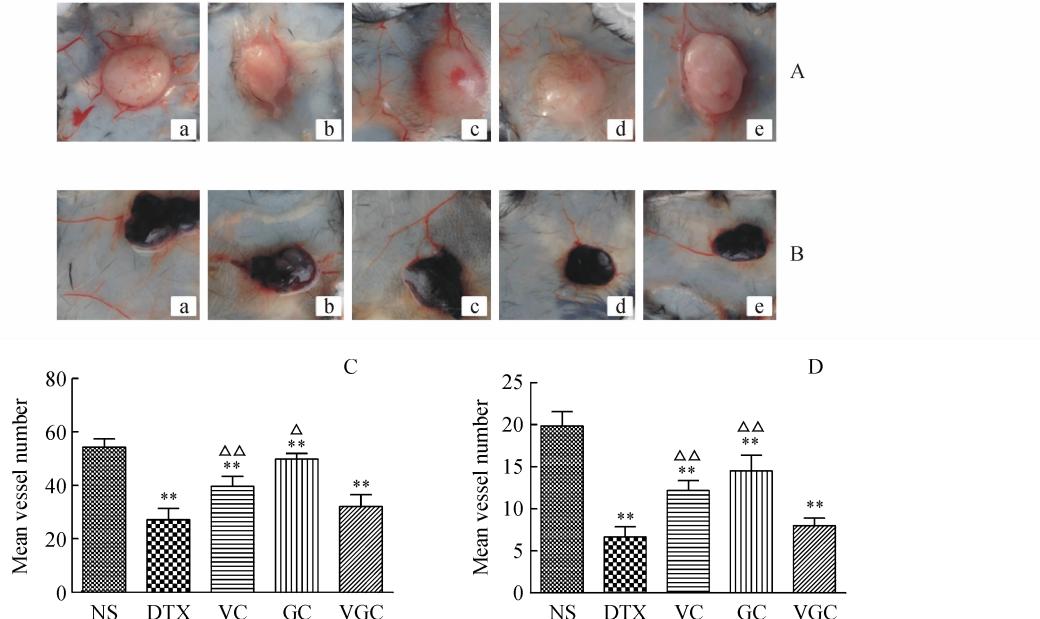


Figure 1 Inhibition effect of tumor-induced angiogenesis immunized by VC, GC, VGC fusion protein taking docetaxel (DTX) and cyclophosphamide (CTX) as positive control, respectively ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A: (a) NS, (b) DTX, (c) VC, (d) GC, (e) VGC. B: (a) NS, (b) CTX, (c) VC, (d) GC, (e) VGC. C-D: Total number of blood vessels

* * P < 0.01, * P < 0.05 vs NS group; ^{△△} P < 0.01, [△] P < 0.05 vs positive control group

3.3 联合蛋白对小鼠皮下肿瘤的抑制作用

小鼠剥瘤并拍照(图 2-A, 图 2-B), 称重。VGC 组对前列腺癌和黑色素瘤抑瘤率分别为($41.7 \pm 0.83\%$ 和 $(46.4 \pm 1.27)\%$)。将各组的平均瘤重纵坐标作图(图 2-E, 图 2-F): 两种肿瘤实验中, 与 NS 组比较, 其余各组均有显著性差异($F = 21.041, P < 0.05$; $F = 18.553, P < 0.05$), 其中 VGC 组与 DTX 组抗前列腺癌效果显著($P < 0.01$), VGC 组与 CTX 组抗黑色素瘤效果显著($P < 0.01$)。肿瘤生长曲线结果显示(图 2-C, 图 2-D)前列腺癌体积变化由小到大依次是 DTX、VGC、GC、VC、NS, 黑色素瘤体积变化由小到大依次是 CTX、VGC、VC、GC、NS。

3.4 脾淋巴细胞增殖实验

脾细胞增殖实验的结果表明(图 3-A, 图 3-B), VGC 组均能够对体外抗原刺激产生增殖反应, 抗前列腺癌 VGC 组表现出对 GC 和 VGC 的显著增殖活性, 抗黑色素瘤 VGC 组表现出对 VC 和 GC 的显著增殖活性, 都明显高于 NS 组($P < 0.01$)。

3.5 细胞毒性检测

在实验设置的 3 种不同效靶细胞比下(图 4-A, 图 4-B), VGC 小鼠的脾细胞杀伤率在效靶比为 80:1 时均达到最高峰($41.61 \pm 3.97\%$ 和 $(45.65 \pm 1.94)\%$, 与 NS 组的差异显著($P < 0.01$))。VC 组和 GC 组也均有一定的杀伤作用, 与 VGC 组比减少, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

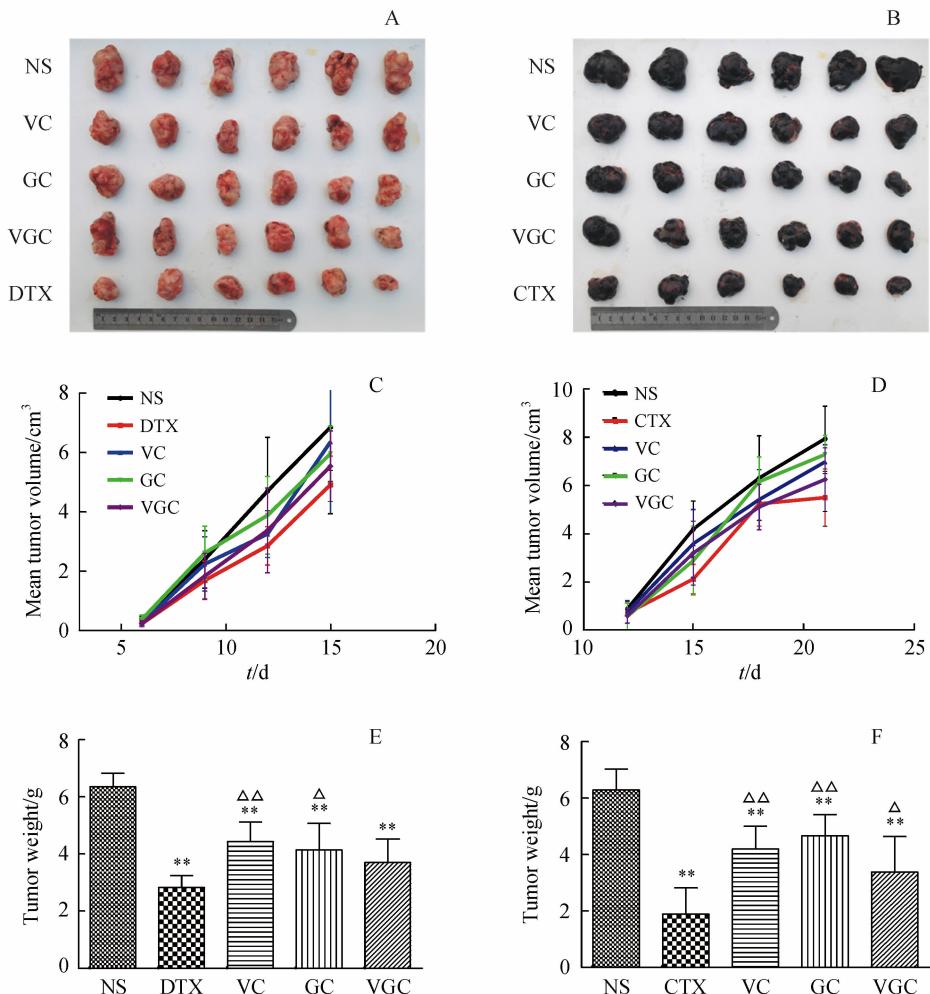


Figure 2 RM-1 prostatic cancer and B16F10 melanoma tumor growth in mice immunized by VC, GC, VGC fusion protein ($\bar{x} \pm s, n=6$)
A-B: Tumor tissue; C-D: Tumor weight; E-F: Tumor volume

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NS group; $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs positive control group

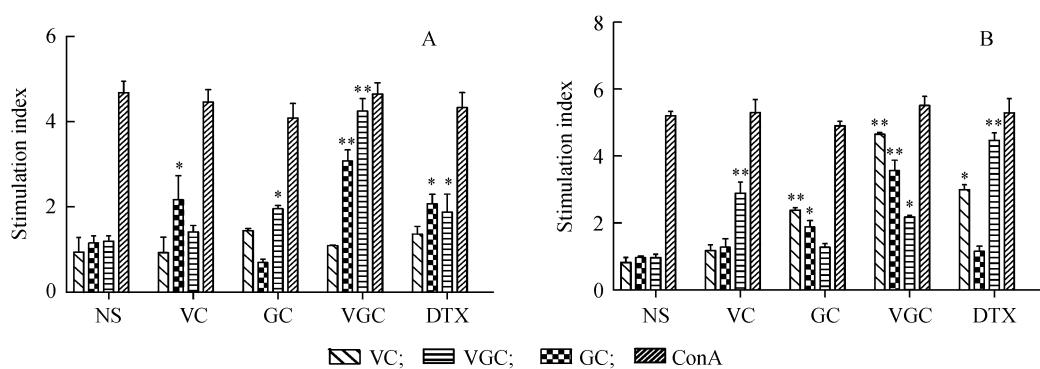


Figure 3 Stimulate index of spleen cell proliferation stimulus by VC, GC, VGC fusion protein ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A: Prostatic cancer; B: Melanoma

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NS group

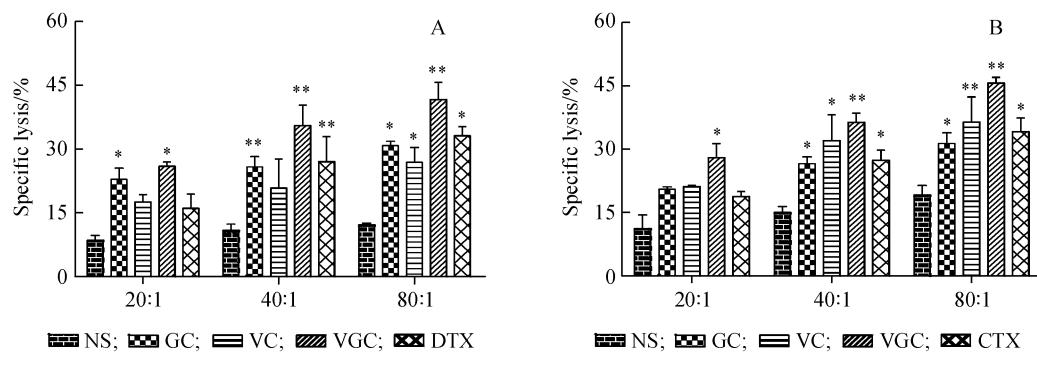


Figure 4 Effects of CTLs on spleen cells in prostatic cancer and melanoma mice groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Prostatic cancer; B: Melanoma

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NS group

3.6 肿瘤组织切片分析

肿瘤病理图片显示(图 5-A, 图 5-B), 各免疫治疗组肿瘤细胞病变程度较 NS 组可见明显的淋巴细胞浸润。VGC 组其肿瘤细胞均出现大面积的

坏死, 局部少量出血。前列腺癌肿瘤组织浸润范围变化由大到小依次为 DTX、VGC、GC、VC、NS, 黑色素瘤肿瘤组织浸润范围变化由大到小依次为: CTX、VGC、VC、GC、NS。

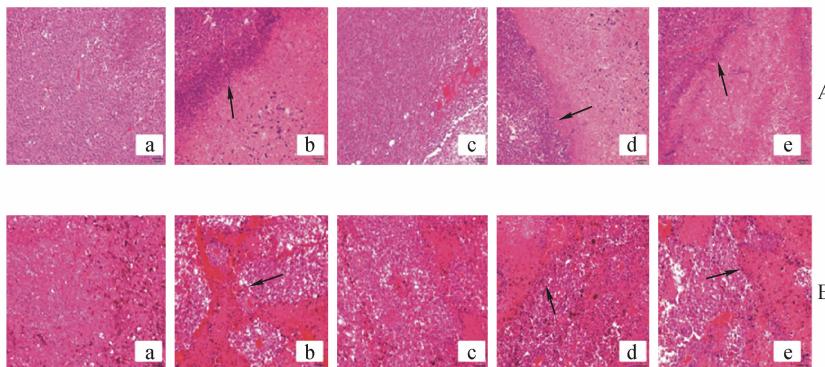


Figure 5 Histopathology study of prostatic cancer and melanoma tissues ($\times 100$)

A: Prostatic cancer, (a) NS; (b) DTX; (c) VC; (d) GC; (e) VGC. B: Melanoma; (a) NS; (b) CTX; (c) VC; (d) GC; (e) VGC

3.7 小鼠血清中抗 hVEGF 抗体的 ELISA 检测

小鼠血清中抗 hVEGF 抗体的 ELISA 检测结果显示(图 6), 与 NS 组比, 实验各组差异均具有统计学意义 ($F = 4.261, P < 0.05$; $F = 5.578, P <$

0.05)。VGC 组中抗 hVEGF 抗体浓度与 PBS 组相比, 均显著性增加(前列腺癌: $P = 0.038$, 黑色素瘤: $P = 0.016$)。

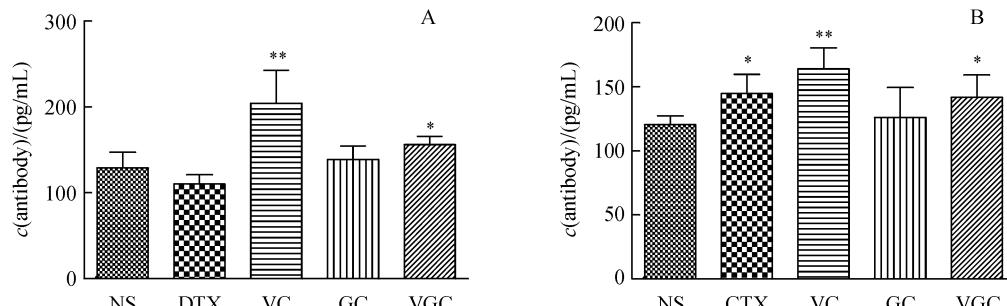


Figure 6 Production of anti-hVEGF antibody in mice immunized by VC, GC or VGC fusion protein ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Prostatic cancer; B: Melanoma

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NS group

3.8 小鼠血清中细胞因子 IFN-γ 的 ELISA 检测

抗肿瘤免疫研究中:IFN-γ 可以诱导初始 T 细胞分化 Th1 型细胞,进而增强免疫应答^[6],因此检测小鼠体内 IFN-γ 水平具有重要意义。小鼠血清中细胞因子 IFN-γ 的 ELISA 检测结果显示(图 7),

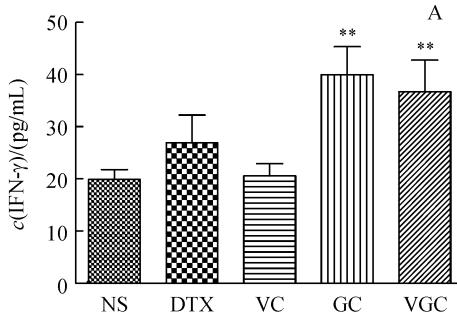
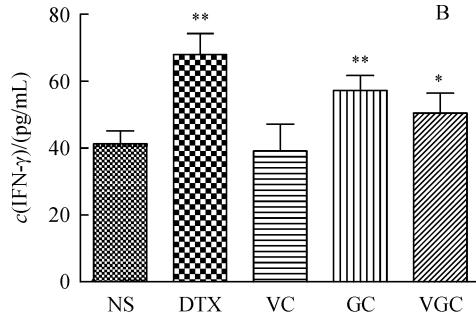


Figure 7 Production of IFN-γ in mice immunized by VC, GC or VGC fusion protein ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Prostatic cancer; B: Melanoma

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NS group

与 NS 组比,实验各组差异均具有统计学意义($F = 16.247, P < 0.05$; $F = 21.312, P < 0.05$)。VGC 组 IFN-γ 浓度与 NS 组相比,均显著性增加(前列腺癌: $P < 0.001$,黑色素瘤: $P = 0.027$)。



4 讨论

近年来国内外研究表明,肿瘤靶向治疗对多种肿瘤生长具有抑制作用。孙红琰等^[7]利用 VEGF 靶向治疗,抑制肿瘤血管生成,显著抑制多种肿瘤生长。Deng 等^[8]通过采用病毒的裂解性质和 GM-CSF 所产生的肿瘤免疫反应,提高了对黑色素瘤的抗肿瘤效果。人绒毛膜促性腺激素^[9-10]与血管内皮生长因子^[11-12]是肿瘤的相关抗原,以 βhCG 和天然配体 VEGF₁₂₁作为肿瘤治疗的特定靶位,可诱导特异性的免疫应答,抑制肿瘤生长。鼠源粒细胞巨噬细胞集落刺激因子可以通过诱导粒细胞、单核细胞及 NK 细胞的抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)^[13],从而促进 Th1 型细胞因子的分泌^[14],达到抗肿瘤效果。

本研究将两种抗肿瘤蛋白联合使用,通过抗肿瘤血管和抗肿瘤免疫发挥了协同抗抑瘤作用。抗肿瘤血管研究中:鸡胚实验及小鼠皮内血管实验,无论是前列腺癌还是黑色素瘤,VGC 组抑制血管能力均显著高于单个蛋白组($P < 0.01$),且与 NS 组比具有极显著差异(前列腺癌: $P = 0.008$,黑色素瘤: $P = 0.002$),说明联合给药中 VC 组能够发挥抗肿瘤血管能力。抗体水平的检测结果发现联合组能够产生大量的抗 hVEGF 抗体,与 PBS 组相比,两种肿瘤实验组均显著性增加($P = 0.038, P = 0.016$),从而更好地抑制肿瘤血管生长。抗肿瘤

免疫研究中:IFN-γ 可以诱导初始 T 细胞分化 Th1 型细胞,进而增强免疫应答^[6]。实验中 VGC 组 IFN-γ 水平与 NS 组比有显著性增强($P < 0.01$),提示 VGC 组抗肿瘤效应可能与提高小鼠细胞免疫水平有关。脾细胞增殖和细胞毒作用研究中,VGC 组均发挥了高效免疫反应,与单独给药组相比具有显著性差异($P < 0.05$)。

在前列腺癌和黑色素瘤的抗肿瘤研究中,联合组对前列腺癌抑瘤率为($41.7 \pm 0.83\%$),对黑色素瘤的抑瘤率为($46.2 \pm 1.27\%$),均能高效抑制肿瘤生长,与单个蛋白免疫组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。原因可能是抗肿瘤血管生成、细胞免疫以及 hCG 靶向治疗共同发挥了作用,具体反应机制还有待进一步研究。由于联合组中每个蛋白量为单个免疫组该蛋白量的一半,从而使抗体水平和细胞因子检测水平不如单个给药组,但是联合后还是充分发挥了二者的协同作用。本研究为后续实验研究奠定了基础,具有良好的临床应用前景。

参考文献

- [1] Finkelstein SE, Salenius S, Mantz CA, et al. Combining immunotherapy and radiation for prostate cancer [J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2015, 13(1): 1-9.
- [2] Rabinovitch GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25(1): 267-296.

- [3] Jiang PL, Lin HJ, Wang HW, et al. Galactosylated liposome as a dendritic cell-targeted mucosal vaccine for inducing protective anti-tumor immunity [J]. *Acta Biomater*, 2015, **11** (1): 356–367.
- [4] Lundin M, Nordling S, Carpelan-Holmstrom M, et al. A comparison of serum and tissue hCG beta as prognostic markers in colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2000, **20** (6D): 4949–4951.
- [5] Gershtein ES, Tailakov BB, Smirnova KD, et al. Cytoplasmic receptors of steroid hormones and clinico-morphological characteristics of skin melanoma [J]. *Vopr Onkol*, 1991, **37** (4): 441–446.
- [6] Przybysz J, Chrostowska M, Ziolkowski H, et al. The influence of prostaglandin E2 on the production of IFN- γ by bovine CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$ and WC1 $^{+}$ T cells[J]. *Res Vet Sci*, 2016, **105**: 31–35.
- [7] Sun HY, Zhang L, Zhang ZL, et al. Anti-cancer effect of VEGF_{121KDR}/rGEL fusion toxin [J]. *Chin J Cancer Prev Treat* (中华肿瘤防治杂志), 2014, **21** (8): 580–583.
- [8] Deng L, Fan J, Guo M, et al. Oncolytic and immunologic cancer therapy with GM-CSF-armed vaccinia virus of Tian Tan strain Guang9 [J]. *Cancer Lett*, 2016, **372** (2): 251–257.
- [9] Alikhan M, Koshy A, Hyjek E, et al. Discrepant serum and urine β -hCG results due to production of β -hCG by a cribriform-morular variant of thyroid papillary carcinoma [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, **438** (7): 181–185.
- [10] Cao RY, Chang N, Li MM, et al. Preparation of mGM-CSF/βhCG fusion protein and the effect of its sensitized DC vaccine on RM-1 prostate tumor in mice [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015, **46** (1): 111–116.
- [11] Tugues S, Koch S, Gualandi L, et al. Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer [J]. *Mol Aspects Med*, 2011, **32** (2): 88–111.
- [12] Zhao MY, Song YN, Gao WT, et al. Fluorescence imaging efficiency of AngioSense(R) 750EX and Hypoxisense 680 to micro-environment of angiogen and hypoxia of tumors *in vivo* [J]. *Chin J Cancer Prev Treat* (中华肿瘤防治杂志), 2015, **22** (7): 496–501.
- [13] van Nieuwenhuijze AE, Coghill E, Gray D, et al. Transgenic expression of GM-CSF in T cells causes disseminated histiocytosis [J]. *Am J Pathol*, 2014, **184** (1): 184–199.
- [14] Cheng YC, Valero V, Davis ML, et al. Addition of GM-CSF to trastuzumab stabilizes disease in trastuzumab-resistant HER2 + metastatic breast cancer patients [J]. *Br J Cancer*, 2010, **103** (9): 1331–1334.

· 本刊讯 ·

本刊副主编尤启冬教授主持的科技成果
喜获 2016 年国家科技进步二等奖

2016 年度国家科技奖励大会 2017 年 1 月 9 日在京召开,评选出国家最高科学技术奖 2 人;国家自然科学奖 42 项,其中一等奖 1 项,二等奖 41 项;评选出国家技术发明奖 66 项,其中一等奖 3 项,二等奖 63 项;评选出国家科学技术进步奖 171 项,其中特等奖 2 项,一等奖 20 项(含创新团队 3 项),二等奖 149 项。本刊副主编尤启冬教授作为第一完成人、中国药科大学作为第一完成单位的“复杂结构天然产物抗肿瘤药物的研发及其产业化”的研究成果喜获国家科技进步奖二等奖。尤启冬教授作为获奖者代表受到了习近平、李克强、刘云山、张高丽、刘延东等党和国家领导人的亲切接见。尤启冬教授带领课题组以复杂结构天然产物的研究作为重点研究内容,突破了制约复杂结构天然产物抗肿瘤药物伊立替康和长春瑞滨的产业化技术瓶颈,获得了具有先进技术水平的产业化工艺,独家获得国家新药证书,并通过美国 FDA 认证,成为我国第一个和第二个进入美国市场的注射剂;突破了复杂结构天然产物藤黄酸药效骨架的化学合成关键技术,创新出“兼顾生物活性及成药性的结构优化”研究策略,发现了易于合成、可口服的候选药物,实现了“由仿到创”的跨越。获中国及国际发明专利授权 15 项。获新药证书 4 项;实现二个品种的产业化,累计销售 52 亿元,利税 19 亿元,创汇 1200 万美元;发表 SCI 论文 51 篇,并特邀在美国化学会年会作报告。

(本刊编辑部)