

CEA 重组痘苗病毒免疫巨噬细胞抑制 CEA 阳性肿瘤的机制

赵青, 陶莎, 杨洁, 罗超权

(中山医科大学生物化学教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 【目的】探讨癌胚抗原重组痘苗病毒(CEA-rV)对癌胚抗原(CEA)阳性肿瘤的抑瘤机制。【方法】使用我室构建的 CEA-rV 腹腔接种 C57BL/6 小鼠 3 次, 6 周后, 取其腹腔巨噬细胞(M Φ s)转输给携带 CEA 阳性肿瘤的受体小鼠, 同时检测供体 M Φ s 及受体脾细胞的体外细胞毒活性。【结果】供体 M Φ s 体外细胞毒活性无明显增加, 但体内却能明显抑制 CEA 阳性肿瘤的生长, 受体脾细胞对同一靶细胞的杀伤活性亦明显增强。【结论】经 CEA-rV 接种处理的小鼠 M Φ s 可能通过其抗原提呈作用, 激活 T 淋巴细胞, 进而通过 T 细胞的特异性抑瘤活性, 杀伤 CEA 阳性肿瘤细胞。

关键词: 癌胚抗原; 痘苗病毒; 巨噬细胞; 癌胚抗原阳性肿瘤; 抑瘤效应

中图分类号: R730.51 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)06-0429-03

The Mechanism of the Effect of a Recombinant CEA-encoding Vaccinia Virus on CEA Positive Tumor

ZHAO Qing, TAO Sha, YANG Jie, LUO Chao-quan

(Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To explore antitumor mechanism of carcinoembryonic antigen-recombinant vaccinia virus(CEA-rV). 【Methods】C57BL/6 mice were immunized three times with rV-CEA. Six weeks later, the macrophages(M Φ s) from CEA-rV-immunized donors were adoptively transferred in CEA⁺-HePa-bearing recipients, meanwhile, the antitumor effects of the donor M Φ s and of the recipients splenocytes *in vitro* were detected. 【Results】The antitumor effect *in vitro* of the M Φ s from CEA-rV-immunized donors was the same as those from controls statistically. However, the M Φ s expressed strong antitumor activity in CEA positive tumor-bearing recipients the antitumor effect *in vitro* of the recipients splenocytes was statistically increased. 【Conclusion】It was demonstrated that antitumor activity induced by CEA-rV was essentially mediated by antigen present cells such as the M Φ s which activated immune T cells by CEA-specific immune response to kill tumor cells.

Key words: carcinoembryonic antigen; vaccinia virus; macrophage; CEA-positive tumor; antitumor effect

目前, 对癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)阳性恶性肿瘤的治疗包括手术、放疗、化疗等, 效果不理想。肿瘤的免疫治疗是近年来兴起的一种治疗肿瘤的新模式。国外有学者构建了癌胚抗原重组痘苗病毒(carcinoembryonic antigen-recombinant vaccinia virus, CEA-rV), 并将其接种治

疗荷瘤动物^[1]及进行 I 期临床试验^[2,3], 治疗效果是肯定的。国内我室亦进行了类似的研究, 证实了 CEA-rV 对疗效的确切性及安全性^[4~6]。但有关 rV-CEA 抗瘤的机制尚不清楚。巨噬细胞(M Φ)是机体重要的免疫细胞之一, 不仅有吞噬作用, 还可加工和提呈抗原给淋巴细胞, 辅佐促进免疫应答,

收稿日期: 2000-08-01

基金项目: 广州市科委基金资助项目(JB02-98-5-018-01); 广东省卫生厅科研基金资助项目(A1998127)

作者简介: 赵青(1964-), 女, 湖北红安人, 博士生, 讲师, 现在广州医学院病生教研室工作。

本研究通过将 CEA-rV 接种小鼠的 $M\Phi$ 转输给携 CEA 阳性肿瘤的受体, 观察其体内外抑瘤效应, 探讨其作用方式。

1 材料与方 法

1.1 CEA-rV 及天坛株痘苗病毒 (wild-vaccinia virus, W-VV) 的大量制备

W-VV 由我室保存, CEA-rV 由我室构建^[4]。将 W-VV 及 CEA-rV 感染 80% 成片生长的人成纤维细胞 2 h, 再加入培养液继续培养 24 h 后收集细胞离心, 加生理盐水反复冻融 3 次, 再用 TGL-16G 冷冻离心机离心 (5 000 r/min, 10 min) 后留上清, 并作病毒滴度测定。

1.2 痘苗病毒免疫接种及腹腔巨噬细胞的制备

取雌性 6~8 周龄的 C57BL/6 小鼠 30 只, 分 3 组 (10 鼠/组), 分别接种 CEA-rV、W-VV (10×10^6 PFU/鼠) 或等体积的 Hanks 液, 每隔 2 周 (W) 接种 1 次, 共 3 次。并于第 3 次接种后的第 10 天, 给每鼠腹腔注射 10 g/L 硫代乙酸钠 + 30 g/L 蛋白胨 (分别称取 1.0 g 硫代乙酸钠和 3.0 g 蛋白胨各溶于约 40 mL 的三蒸水中, 然后将两者混合, 并补水至总体积为 100 mL) 1.2 mL, 第 14 天取接种鼠的腹腔 $M\Phi$ 用于过继免疫研究, 并作 $M\Phi$ 体外杀伤活性检测。腹腔 $M\Phi$ 的制备, 详见文献 [7]。

1.3 巨噬细胞对肿瘤生长的作用及肿瘤生长态势观察

另取 C57/BL 小鼠 (雌性, 6~8 周龄, 15~18 g/只) 48 只, 分为 6 组, 8 鼠/组, 第 1~3 组每只小鼠颈背部皮下注射 CEA⁺-HePa 肝癌细胞^[5] 3×10^5 个, 同时分别尾静脉注射供体正常 $M\Phi$ (normal $M\Phi$)、W-VV $M\Phi$ (W-VV $M\Phi$) 或 CEA-rV $M\Phi$ (CEA-rV $M\Phi$) 50×10^6 细胞/鼠, 第 4~6 组的每只小鼠颈背部皮下注射 CEA⁻-HePa 细胞 0.3×10^6 个, 同时分别尾静脉注射供体 normal $M\Phi$ 、W-VV $M\Phi$ 或 CEA-rV $M\Phi$ 50×10^6 细胞/鼠。接种癌细胞后观察动物反应和皮下肿瘤的出现, 并每隔 7 d 测量 1 次肿瘤的长径 (l) 和宽径 (b), 计算肿瘤体积 (V), 公式为: $V (\text{mm}^3) = 1/2 [b / (\text{mm})^2 \times l / (\text{mm})]$ ^[1]。

1.4 用 MTT 法^[8] 测定腹腔接种 CEA-rV 后小鼠巨噬细胞的细胞毒活性

取接种了 CEA-rV 或 W-VV 的小鼠腹腔 $M\Phi$, 接种于 96 孔板中 (0.1×10^6 细胞/孔), 加 CEA⁺-

HePa 或 CEA⁻-HePa 细胞 [10×10^3 细胞/孔], 置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 24 h, 加四甲基偶氮噻唑蓝 (MTT)、避光、置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱培养 4 h, 加分析纯二甲基亚砷 (DMSO) 终止反应, 用 590 nm 波长分光光度计测定各孔吸光度 (A) 值, 计算脾细胞的细胞毒活性。

$$\text{细胞毒活性} = \left(1 - \frac{A(\text{实验组}) - A(\text{空白对照组})}{A(\text{靶细胞}) - A(\text{空白对照组})} \right) \times 100\%$$

1.5 受体脾细胞的细胞毒活性检测

取接种了 $M\Phi$ 及肿瘤细胞后第 14 天的 小鼠脾细胞, 接种于 96 孔板中 [50×10^3 细胞/孔], 加 CEA⁺-HePa 或 CEA⁻-HePa 细胞 [10×10^3 细胞/孔], 置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 24 h, 用 MTT 法测脾细胞毒活性。

1.6 统计学处理

各组肿瘤生长比较及细胞毒活性比较采用完全随机设计资料的方差分析, 每两均数间的比较采用 q 检验。

2 结 果

2.1 CEA-rV 小鼠巨噬细胞对受体小鼠 CEA 阳性肿瘤生长的影响

分别取腹腔接种 CEA-rV、W-VV 的小鼠腹腔 $M\Phi$ 或正常鼠腹腔 $M\Phi$ 过继免疫治疗荷 CEA 阳性肿瘤的受体小鼠, 并以荷 CEA 阴性肿瘤鼠作对照。结果见图 1, 接受 W-VV $M\Phi$ 处理的荷 CEA 阳性肿瘤小鼠与接受正常 $M\Phi$ 处理的荷 CEA 阳性肿瘤小

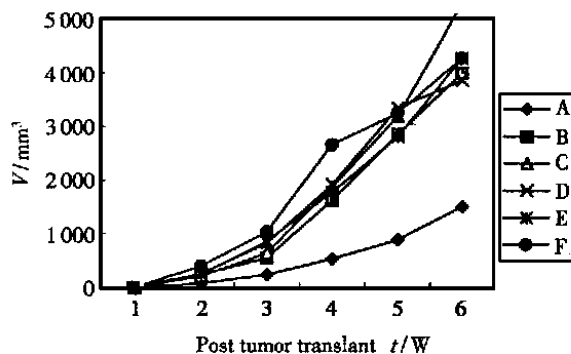


图 1 rV-CEA 小鼠巨噬细胞对 CEA 阳性肿瘤的过继免疫治疗作用

Fig. 1 Effect of Adoptive Transfer of Immune $M\Phi$ on CEA Positive Tumor Growth

A. CEA⁺-HePa/ rV-CEA $M\Phi$ ($n = 8$); B. CEA⁺-HePa/ W-VV $M\Phi$ ($n = 8$); C. CEA⁺-HePa/ Normal $M\Phi$ ($n = 8$); D. CEA⁻-HePa/ rV-CEA $M\Phi$ ($n = 8$); E. CEA⁻-HePa/ W-VV $M\Phi$ ($n = 8$); F. CEA⁻-HePa/ Normal $M\Phi$ ($n = 8$)

鼠,其肿瘤生长情形相似($q = 1.08, P > 0.05$) (图1B、C组),而接受CEA-rV脾细胞处理的荷CEA阳性肿瘤小鼠,瘤体积小,与其它组肿瘤大小存在明显差异($q = 37.36, P < 0.01$),而且CEA-rV脾细胞只对CEA阳性肿瘤有明显抑制作用(图1A、B、C组),同时无论W-VV或CEA-rV对CEA阴性肿瘤均无抑制作用($q = 0.41, P > 0.05$) (图1D、E、F组)。

2.2 巨噬细胞细胞毒活性

取接种痘病毒后的各组小鼠腹腔 $M\Phi$,测其细胞毒活性。结果表明,接种了CEA-rV的腹腔 $M\Phi$ 体外细胞毒活性无明显增加,较接种W-VV或Hanks液组无显著差异(表1)。

表1 接种痘病毒后各组巨噬细胞的体外细胞毒活性

Table 1 Cytotoxicity of $M\Phi$ after vaccine virus immunization¹⁾

$M\Phi$	Cytotoxicity (% , $\bar{x} \pm s, n = 8$)	
	CEA ⁺ -HePa cell	CEA ⁻ -HePa cell
CEA-rV	30.36 ± 7.31 ²⁾	32.85 ± 6.15 ²⁾
W-VV	28.29 ± 6.34 ²⁾	29.11 ± 7.28 ²⁾
Normal	31.87 ± 7.88	30.82 ± 5.36

1) $F = 0.44, P = 0.81$; 2) Compared with all other groups $P > 0.05$

2.3 脾细胞细胞毒活性

取接种了腹腔 $M\Phi$ 后的各组受体小鼠脾细胞,测其细胞毒活性。结果表明,只有接种了CEA-rV $M\Phi$ 的脾细胞体外杀伤CEA阳性肿瘤细胞的作用显著增加,对CEA阴性肿瘤细胞的杀伤作用与W-VV的无显著差异(表2)。

表2 接种巨噬细胞后各组受体脾细胞的体外细胞毒活性

Table 2 Cytotoxicity of splenocytes after $M\Phi$ inoculation¹⁾

Splenocytes	Cytotoxicity (% , $\bar{x} \pm s, n = 8$)	
	CEA ⁺ -HePa cell	CEA ⁻ -HePa cell
CEA-rV	68.25 ± 5.91 ^{2),3),4)}	32.85 ± 6.15 ⁵⁾
W-VV	33.92 ± 6.78 ⁵⁾	31.71 ± 7.28 ⁵⁾
Normal	34.37 ± 7.45	30.97 ± 5.36

1) $F = 72.26, P = 0.00$; 2) Compared with rV-CEA/CEA⁻-HePa cell group $q = 20.78, P < 0.01$; 3) Compared with W-VV/CEA⁺-HePa cell group $q = 19.99, P < 0.01$; 4) Compared with normal/CEA⁺-HePa cell group $q = 19.73, P < 0.01$; 5) Compared with W-VV or normal groups $P > 0.05$

3 讨论

国外及本实验室已报道,CEA-rV对CEA阳性肿瘤具有免疫杀伤效应^{1,5,9},且国外已进行了I期临床试验^{2,3},但CEA-rV的抑瘤机制仍不太清楚。本研究在小鼠身上建立过继免疫治疗模型,旨在从过继免疫治疗角度探讨CEA-rV治疗CEA阳性肿瘤的机制。我们的实验结果表明,CEA-rV主动免疫小鼠的 $M\Phi$ 过继免疫给荷CEA阳性肿瘤鼠能产生明显的抑瘤效应,而且只对CEA阳性肿瘤有抑制作用,对CEA阴性肿瘤无抑制作用,提示CEA-rV的抑瘤效应是通过CEA特异的免疫反应来实现的;对靶细胞有特异性。

本实验结果提示,CEA-rV接种小鼠后,腹腔 $M\Phi$ 就可以摄取,并加工处理CEA-rV,以备提供抗原给T淋巴细胞。因此,当转输该 $M\Phi$ 到携CEA阳性肿瘤的受体小鼠时,可迅速激活受体内的T淋巴细胞从而杀伤CEA阳性肿瘤细胞,脾细胞细胞毒活性的测定结果亦支持这个观点。 $M\Phi$ 体外细胞毒活性检测表明,CEA-rV接种小鼠的 $M\Phi$ 体外细胞毒活性并无明显增强,但当其转输至受体小鼠后即可激活受体效应细胞达到杀伤CEA阳性肿瘤细胞的目的。推测 $M\Phi$ 的功能可能主要还是充当一个抗原提呈细胞的角色,而受体脾细胞体外细胞毒活性结果提示,T淋巴细胞才有可能主要的杀瘤效应细胞。 $M\Phi$ 在摄取CEA-rV后为什么可以增强受体杀伤CEA阳性肿瘤的效应呢?推测 $M\Phi$ 在摄取加工处理CEA-rV中利用了痘病毒的强免疫原性及协同抗原提呈作用,增强CEA抗原表位的暴露,致CEA免疫原性增强,也有可能是通过增强抗原提呈细胞表面第二信号的表达,并借助 $M\Phi$ 的抗原递呈功能,激活T细胞从而达到杀伤CEA阳性肿瘤细胞的目的。

Hodge等⁹证明,CEA-rV与rV-B7联合应用可致抑瘤反应更强,Lorenz等¹⁰亦证实,CEA-rV与rV-CD70联合应用抑制CEA阳性肠癌细胞生长的作用较CEA-rV单独使用的效果更好,提示CEA-rV很可能是起到增强第一信号的作用,即可能加强了CEA抗原表位的暴露再通过APC的作用而达到增强T细胞激活,进而杀伤肿瘤细胞的目的。具体机制有待进一步探讨。

(下转第480页)

肌细胞增殖是 CMV 致动脉粥样硬化的组织基础^[4,5],是致心、肺移植失败的重要原因。CMV 感染骨髓基质细胞后,虽然可以诱导成纤维细胞增殖,但细胞分泌功能紊乱,促进造血的细胞因子分泌减少,抑制造血的细胞因子分泌增多^[1],因此支持造血的能力仍降低。CMV 感染所致骨髓基质成纤维细胞增殖是否是某些恶性血液病骨髓纤维化的原因之一,目前还不清楚,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Lagneaux L, Delforge A, Snoeck R, *et al.* Human cytomegalovirus increases constitutive production of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor by bone marrow stromal cells [J]. *Blood*, 1996, 87(1): 59.
- [2] 姜学英. 骨髓成纤维祖细胞. 见: 唐佩弦, 杨天楹. 造血细胞培养技术[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1985. 147~160.
- [3] 李晓瑜, 欧阳颖, 林穗珍, 等. 脑活素诱导大鼠小脑颗粒神经元死亡的研究[J]. *中华医学杂志*, 2000, 80(2): 104.
- [4] Lemstrom K, Koskinen P, Krogerus L, *et al.* Cy-

tomegalovirus antigen expression, endothelial cell proliferation, and initial thickening in rat cardiac allografts after cytomegalovirus infection [J]. *Circulation*, 1995, 92(9): 2594.

- [5] Yonemitsu Y, Kaneda Y, Komori K, *et al.* The immediate early gene of human cytomegalovirus stimulates vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231(2): 447.
- [6] Salvant B S, Fortunato E A, Spector D H. Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription [J]. *J Virol*, 1998, 72(5): 3729.
- [7] Liu B, Stinski M F. Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements [J]. *J Virol*, 1992, 66(7): 4434.
- [8] Dal Monte P, Bessia C, Landini M P, *et al.* Expression of human cytomegalovirus ppUL83 (pp65) in a stable cell line and its association with metaphase chromosomes [J]. *J Gen Virol*, 1996, 77(Pt 10): 2591.

(编辑 关淡庄)

(上接第 431 页)

参考文献:

- [1] Kantor J, Irvine K, Abrams S, *et al.* Antitumor activity and immune response induced by a recombinant carcinoembryonic antigen-vaccinia virus vaccine [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(14): 1084.
- [2] Tsang K Y, Zarella S, Nieroda C A, *et al.* Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(13): 982.
- [3] McAneny D, Ryan C A, Beazley R M, *et al.* Results of a phase I trial of a recombinant vaccinia virus that expresses CEA in patients with advanced colorectal cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 1996, 3(5): 495.
- [4] 杨洁, 罗超权, 卢方安, 等. 人癌胚抗原重组痘苗病毒的构建和制备 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(1): 54.
- [5] 卢方安, 黄冰, 杨洁, 等. CEA-重组痘苗病毒预防 CEA 阳性肿瘤的动物实验研究 [J]. *癌症*, 1999, 18(4): 382.
- [6] 卢方安, 杨洁, 罗超权, 等. CEA-重组痘苗病毒治疗 CEA 阳性肿瘤的实验研究 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1999, 6(4): 302.
- [7] 雷虹, 曹雪涛, 于益芝, 等. 重组腺病毒介导 IFN- γ 基因转染的巨嗜细胞体外免疫效应功能分析 [J]. *中国免疫学杂志*, 1997, 13(3): 131.
- [8] 彭涛, 刘晓波, 田伏洲, 等. MTT 比色法中应采用分析纯二甲亚砜作为甲替溶剂 [J]. *中国免疫学杂志*, 1999, 15(4): 180.
- [9] Hodge J W, McLaughlin J P, Abrams S I, *et al.* Admixture of a recombinant vaccinia virus containing the gene for the costimulatory molecule B7 and a recombinant vaccinia virus containing a tumor-associated antigen gene results in enhanced specific T-cell responses and antitumor activity [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(16): 3598.
- [10] Lorenz M G, Kantor J A, Schlom J, *et al.* Anti-tumor immunity elicited by a recombinant vaccinia virus expressing CD70(CD27L) [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(7): 1095.

(编辑 张敏瑞)