

研究报告

CEA 重组痘苗病毒对 CEA 阳性肿瘤的防治研究

罗超权, 杨洁, 卢方安, 郭俊明, 杨英浩, 伍新尧

(中山医科大学生物化学教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 肿瘤的免疫治疗是治疗肿瘤的新方法, 它通过增强肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的免疫原性, 诱导机体产生肿瘤特异性的免疫应答反应而杀伤肿瘤细胞。本系列研究采用同源重组方法构建了表达人癌胚抗原(carcino embryonic antigen, CEA)的重组痘苗病毒, 经动物实验证明了其具有强免疫原性、安全性和防治 CEA 阳性肿瘤的可靠性。

关键词: 痘苗病毒; 癌胚抗原; 癌胚抗原阳性肿瘤; 免疫疗法

中图分类号: Q244.13; R735.2 文章标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)02-0081-03

The Study of Treatment and Prevention on CEA-Positive Tumors by CEA-Recombinant Vaccinia Virus

LUO Chao-quan, YANG Jie, LU Fang-an, GUO Jun-ming, YANG Ying-hao, WU Xin-yao

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

Abstract: Immunotherapy is a new method to treat tumors. In this method, the tumor cells were killed by means of improving the immunogenicity of tumor antigens or tumor associated antigens and inducing tumor specific cell-mediated immune response. In this series studies, the carcino embryonic antigen (CEA)-recombinant vaccinia virus was constructed by homologous recombination, and its strong immunogenicity, safety and reliability of treatment and prevention on CEA-positive tumors were proved in animal experiments.

Key words: vaccinia virus; carcinoembryonic antigen; CEA-positive tumor; immunotherapy

癌胚抗原(carcino embryonic antigen, CEA)是一种最常见的肿瘤相关抗原和目前国际上公认的肿瘤标志物, 由 Gold 和 Freedman 于 1965 年首先在人类结肠癌和胰腺癌组织中发现。其基因定位于人类 19 号染色体长臂(19q13.1-13.2)。在大多数人体上皮性恶性肿瘤中 CEA 呈阳性, 这包括: 90%左右的胃肠道恶性肿瘤、胰腺癌, 80%以上的非小细胞性肺癌和 50%左右的乳腺癌等。人们把这类有 CEA 表达的肿瘤称为 CEA 阳性肿瘤。CEA 阳性肿瘤在世界各地的发病率很高, 是一类严重危害人类健康的常见肿瘤^[1,2]。长期以来, 放疗、化疗和手术是治疗恶性肿瘤的经典方法。手术方法虽能有效去除肉眼可见的肿瘤, 但无法解决术

后复发等问题; 放疗和化疗除具有严重的毒副反应外, 还因耐受性的增多而使疗效不理想。肿瘤的免疫治疗是近年来兴起的一种治疗肿瘤的新模式, 它通过相关的技术方法增强肿瘤细胞的免疫原性, 进而诱导机体产生肿瘤特异性的细胞免疫应答, 达到特异性攻击肿瘤的作用。由于痘苗病毒是一种有效的真核表达载体, 可将插入的外源基因得到有效表达, 并具有抗原提呈作用, 因此本系列研究构建了表达人 CEA 的重组痘苗病毒, 动物实验证实了其安全性和对 CEA 阳性肿瘤的有效防治。

1 表达人癌胚抗原重组痘苗病毒(CEA-rV)的构建

收稿日期: 1999-12-20

基金项目: 广东省医药卫生“九·五、五个一工程”项目和广州市科委资助项目(98-J-018-01)

作者简介: 罗超权(1935-), 男, 广东兴宁人, 教授, 博士生导师

1.1 pJ-CEA 重组质粒的构建

构建表达外源基因的重组痘苗病毒(CEA-rV)与其它病毒载体有所不同,重组逆转录病毒或重组腺病毒的构建是以质粒型病毒 DNA 的形式进行。由于痘苗病毒的基因组结构复杂,目前尚无质粒型病毒 DNA 形式存在的痘苗病毒载体,因此重组痘苗病毒的构建必须采用同源重组的方法。

经电脑查找 CEA-cDNA 全序列上限制性内酯酶切位点,与含有痘苗病毒胸苷激酶(TK)基因和启动子的特殊质粒 pJ120 的多酶切位点进行比较, pJ120 质粒上可供插入 CEA cDNA 的切点只有 *Xho* I 位点,而 CEA cDNA 是从 p91023B-CEA-17 质粒经 *Eco*R I 酶切获得的。在 CEA cDNA 两端没有 *Xho* I 位点,这就需要经过两个中间载体 pGEM72F(+)和 pBluescript SK,利用 LacZ 作为选择标记,这时在 CEA cDNA 两端各接上一个 *Xho* I 位点,即可将 CEA cDNA 顺利插入 pJ120 质粒。

1.2 CEA-重组痘苗病毒的构建

重组痘苗病毒的构建通过脂质体共沉淀法在细胞内经同源重组完成。pJ-CEA 质粒和 tk1 和 tk2 片段与同源的痘苗病毒的完整 tk 片段转换,将 CEA 片段插入病毒的 tk 片段,含有 CEA 的重组痘苗病毒为 TK⁻,经含有 5-BUDR 的培养液的筛选,只有 TK⁻的重组病毒才能繁殖,再有 LacZ 蓝斑进行双重选择,即可获得 CEA-重组痘苗病毒^[3,4]。

1.3 CEA-重组痘苗病毒的鉴定

经 PCR 扩增后重组病毒具有与 pJ-CEA 相同的带型,说明重组病毒含有 CEA 片段。以 143TK⁻细胞作为宿主细胞,用放射性免疫法测定证实,野生型痘苗病毒样品中无 CEA 的表达;表达的 CEA 只在转化细胞的细胞膜组分中检测到,而其胞质组份和细胞培养液的上清液中均未能检测到^[3]。

2 CEA-rV 免疫原性研究

2.1 兔接种后血清中 CEA 水平

实验动物分为 3 组:第 1 组接种 CEA-rV;第 2 组接种野生型痘苗病毒(W-VV);第 3 组接种生理盐水。每只动物接种 3 次,每次在背部皮下注射 0.7 mL 病毒液(滴度为 100×10^9 U/L)或生理盐水,前 2 次接种间隔 1 周、第 3 次 2 周。用放射免疫法测定兔血清中 CEA 抗原的水平。结果为:第 1

组第 1 次接种后 1 周血清中即含有高水平的 CEA (> 80 ng/L),之后连续数周维持在高水平;而其它组仅为 (5.0 ± 0.5) ng/L^[4,5]。

2.2 接种后兔体内抗 CEA 抗体的水平

以 803 胃癌细胞株作为抗原片,ABC 免疫组化法测定 CEA 抗体,第 1 组抗体滴度达 1:100,而其它两组未检测到抗体的产生^[6]。

3 CEA-rV 的安全性

3.1 兔各组织内 CEA 的表达

免疫组化法比较接种兔和正常兔的肠、肝和肾组织,可见两组同类组织的染色情况完全相同,说明接种过 CEA-rV 兔的非淋巴系统组织均未检测到 CEA 的表达^[9]。

3.2 电镜观察肾组织结构

电镜下可见接种后的兔肾单位结构清晰、系膜未见增厚,与正常对照的结构相同。

上述结果证明 CEA-rV 未侵入实体组织器官;另观察接种兔的行为正常,未见毒副反应,说明 CEA-rV 是安全可靠的^[6]。

4 表达人 CEA 的小鼠肿瘤细胞模型的建立

将 pLXSN-CEA 质粒用脂质体介导法导入小鼠 Hepa 肝癌细胞内,经 G418 筛选后得到阳性克隆。用放免法测定 CEA 的表达情况。结果发现转化的 Hepa 肝癌细胞样品中的 CEA 值随细胞数的增加而增加,且表达产物能与 CEA 特异性抗体结合;而未转化的 Hepa 肝癌细胞样品中未能测得 CEA 的表达。说明导入 CEA 基因后,细胞可表达与天然 CEA 特性相同的产物^[7,8]。

5 CEA-rV 对小鼠 CEA 阳性肿瘤的预防作用

将 40 只 KM 鼠分成 4 组,每组 10 只,雌雄各半。第 1、2 组背部皮下注射 $10 \mu\text{L}$ 22×10^6 PFU 的 W-VV,第 3、4 组接种等剂量的 CEA-rV;每隔 14 d 接种一次,共 3 次。在第 3 次接种后第 7 天,第 1、3 组鼠颈背部皮下注射 0.26×10^6 未转染 pLXSN-CEA 的小鼠 Hepa 肝癌细胞(Hepa-

CEA⁻);第2、4组注射等剂量的转染 pLXSN-CEA 的小鼠 Hepa 肝癌细胞(Hepa-CEA⁺)。结果:第4组在观察的第6周期间内未见肿瘤形成;而其它3组均有肿瘤形成,并以相近速率快速生长。接种小鼠在实验过程中未见有任何毒副反应。说明 CEA-rV 能有效地预防 CEA 阳性肿瘤的发展^[8]。

6 CEA-rV 对小鼠 CEA 阳性肿瘤的治疗作用

将40只KM鼠分成4组,每组10只,雌雄各半。第1、2组颈背部皮下注射 0.26×10^6 Hepa-CEA⁻细胞;第3、4组注射等剂量的 Hepa-CEA⁺细胞。7d后,第1、3组背部皮下注射 $10 \mu\text{L} 2.2 \times 10^6$ PFU 的 W-VV,第2、4组接种等剂量的 CEA-rV;每隔14d接种一次,共3次。结果:第4组小鼠在观察的6周期间内肿瘤生长趋向缓慢,而其它3组小鼠肿瘤生长迅速,肿瘤体积与第4组比有显著差异。说明 CEA-rV 能有效地治疗 CEA 阳性肿瘤^[9]。

7 展 望

本系列研究利用我国曾用于预防天花的疫苗株—痘苗病毒天坛株761,将外源基因(CEA-cDNA)插入其非必需区(tk基因区)构建了CEA-rV,经动物实验证明了其具有强免疫原性、安全性和防治CEA阳性肿瘤的可靠性,为进入临床试验奠定了基础。

参考文献:

- [1] 郭俊明,罗超权. 癌胚抗原阳性肿瘤基因治疗的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6(2): 152.
- [2] 赵青,郭俊明,罗超权. 癌胚抗原阳性肿瘤的基因治疗. 见:罗超权主编. 基因诊断与基因治疗研究进展[M]. 郑州:河南医科大学出版社, 2000. 254~259.
- [3] 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.
- [4] 杨洁,罗超权,杨英浩,等. 表达人癌胚抗原重组痘苗病毒的构建及其免疫原性的研究[J]. 生物化学杂志, 1997, 第八次全国生物化学与分子生物学学术会议专刊: 257.
- [5] 杨洁,罗超权,伍新尧,等. 表达人癌胚抗原重组痘苗病毒免疫原性的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1998, 18(2): 148.
- [6] 杨洁,江悦华,罗超权,等. 痘苗病毒介导人癌胚抗原的免疫原性实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 1997, 13(5): 283.
- [7] 杨洁,卢方安,罗超权,等. 人癌胚抗原重组痘苗病毒在动物体内免疫原性的研究[J]. 癌症, 1999, 18 增刊: 99.
- [8] 卢方安,黄冰,杨洁,等. CEA-重组痘苗病毒对CEA阳性肿瘤的预防实验[J]. 癌症, 1999, 18(4): 382.
- [9] 卢方安,杨洁,罗超权,等. CEA-重组痘苗病毒对CEA阳性肿瘤疗效的实验研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6(4): 302.

(编辑 张敏瑞)

·新成果·

准分子激光屈光性角膜手术系列研究

课题负责人 王 铮等

(中山医科大学眼科中心, 广东 广州 510060)

本研究针对准分子激光屈光性角膜切削术(PRK)和准分子激光原位角膜磨镶术(LASIK)的手术适应症、手术技术、手术参数及切削安全极限、角膜创面愈合机制等问题进行了系统的研究,取得了满意的成果:①首次用动物实验方法证实类固醇激素可有效减少PRK术后上皮多种细胞外间质的沉积,减少术后屈光回退和角膜雾状混浊发生。②在国内最早开展LASIK临床研究,并率先通过多种指标的观察、分析和研究,全面系统地评价了手术疗效,建立了准确的手术参数。③创造性地提出“瓣下冲洗”的手术方法,大大降低了手术合并症。④前瞻性地比较了PRK和LASIK对中、低度近视的治疗效果,发现LASIK也能有效地矫正低中度近视,拓展了LASIK适应症。⑤首次报告对LASIK后屈光回退和欠矫的再手术治疗,提出可采用简单的翻开角膜瓣的方法。⑥最先研究LASIK后角膜后表面曲率的变化,提出了LASIK手术切削的安全极限为角膜床厚度不低于250 μm 。目前,每年开展LASIK 2000多例,现已开展7000多例,据国内领先,达到满意效果。本研究已经为国内30几家医院培养了LASIK手术的专业医师,为我国能够高起点的开展LASIK作出了贡献。该成果于1999年荣获国家科技进步三等奖。

(陈丽芳)