

B7 修饰的肿瘤细胞疫苗体内外抗肿瘤作用^①

刘晓平¹ 区庆嘉¹ 黄洪莲² 王小宁²

(1 中山医科大学孙逸仙纪念医院外科; 广州, 510120 2 第一军医大学分子免疫学研究所; 广州, 510515)

摘要 目的: 研究小鼠 B7 修饰的肿瘤细胞疫苗的体内外抗肿瘤作用。方法: 应用逆转录病毒载体, 将小鼠 B7-1 和 B7-2 导入小鼠肝癌细胞 Hepal-6 细胞株中, G418 筛选后获高表达 B7 分子的阳性细胞克隆, 经丝裂霉素处理制备成肿瘤细胞疫苗(TCV), 观察 TCV_{B7}体外刺激的脾细胞对不同肿瘤细胞系的抗瘤活性及对不同动物模型的体内免疫保护作用 and 免疫治疗作用。结果: ① TCV_{B7}体外刺激的脾细胞对亲本肝癌细胞和小鼠 NK 敏感的 Yac-1 细胞的体外细胞毒作用明显增强; ② 在免疫模型中, 经 TCV_{B7}免疫的小鼠, 能对同系肝癌细胞产生完全的免疫保护作用, 并能保持无瘤状态长期存活; ③ 在早期模型中, 经 TCV_{B7}治疗的小鼠, 能部分产生对同系肝癌细胞的免疫治疗作用, 肿瘤的生长速度减缓, 荷瘤小鼠的生存期延长。肿瘤组织(尤其是肿块包膜下)中淋巴细胞浸润增加; ④ 在晚期模型中, 经 TCV_{B7}治疗的小鼠, 未能产生对同系肝癌细胞的免疫治疗作用。结论: B7 修饰的肿瘤细胞疫苗能明显刺激增强体内外抗肿瘤作用。

关键词 抗原, CD80(B7-1); 抗原, CD86(B7-2); 疫苗, 合成; 肿瘤疫苗

中图分类号 R 735.7

THE ANTITUMOR EFFECTS *IN VIVO* OR *IN VITRO* OF THE TUMOR CELL VACCINES TRANSFECTED WITH THE GENES ENCODING MURINE B7-1 OR B7-2

Liu Xiaoping¹ Ou Qingjia¹ Huang Honglian² Wang Xiaoning²

(1 Department of Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical

Sciences, Guangzhou, 510120 2 Institute of Molecular Immunology, First Military Medical University, Guangzhou, 510515)

Abstract Objective: To study, *in vivo* or *in vitro*, the antitumor effects of tumor cell vaccines(TCVs) transfected the genes encoding murine B7-1 or B7-2 on syngeneic murine hepatocellular carcinoma. **Methods:** Retrovirus vector was used to transfer the B7-1 or B7-2 gene into syngeneic murine hepatocellular carcinoma cell line Hepal-6. The products were termed as Hepal-6-B7-1 or Hepal-6-B7-2 respectively, and then the TCV_{B7} was obtained by treating them with mitomycin C (MMC). Three models (immunological model, early model, and later model) were established to study the antitumor effects of TCV_{B7}. **Results:** ① The cytotoxic effects of spleen cells to syngeneic Hepal-6 cell line or Yac-1 cell line (NK sensitive) *in vitro* were enhanced obviously by coincubating the spleen cells with TCV_{B7}; ② In immunological models, the syngeneic mice were completely protected by inoculation with TCV_{B7}, and survived free from tumor for a long period; ③ In early models, the syngeneic mice were partly protected by inoculation with TCV_{B7}, and the tumor sizes were smaller, the survival periods were longer than those inoculated with TCV_{Hepal-6} or normal saline (NS); ④ In later models, no protection were observed in each group. **Conclusion:** The antitumor effects on syngeneic murine hepatocellular carcinoma, *in vivo* or *in vitro*, were obviously enhanced by treating them with TCV_{B7}.

Subject headings antigen, CD80(B7-1); antigen, CD86(B7-2); vaccine, synthesis; cancer vaccines

随着现代分子免疫学和肿瘤免疫学的研究进展, MHC (major histocompatibility complex)-TCR (T cell receptor)-抗原多肽三元体结构的确立, T 细

胞激活两大信号系统精密协调调控机制的阐明, 运用协同刺激分子 (CoS) B7 来治疗恶性肿瘤的模式

^① 孙逸仙纪念医院科研基金资助课题

越来越受到人们重视^[1,2]。我们应用逆转录病毒载体,将小鼠 B7-1、B7-2 导入缺乏 B7 的小鼠肝癌细胞株 Hepal-6 中,获 B7 分子高表达的阳性细胞克隆,经丝裂霉素(MMC)处理制备肿瘤细胞疫苗(TCVs),检测了 TCV_{Hepal-6}, TCV_{B7-1}, TCV_{B7-2} 刺激的脾细胞体外对亲本小鼠肝癌 Hepal-6 细胞、NK 敏感的 Yac-1 细胞和黑色素瘤 B16 细胞的杀伤活性。同时,我们还建立了免疫模型、早期模型和晚期模型,分别观察了 TCV_{Hepal-6}, TCV_{B7-1}, TCV_{B7-2} 的体内抗肿瘤免疫保护作用 and 免疫治疗作用,现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 化学及免疫试剂 ①G418、Polybrene、胰酶、MTT、SDS: Sigma 公司产品。②MMC: Kyowa Hakkō Kogyo 公司产品。③胎牛血清(FCS): 中国医学科学院血液学研究所产品。④完全培养液: RPMI1640 和 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 各一半加 φ (FCS) = 10%。⑤羊抗人 IgG-FITC: 军事医学科学院微生物流行病学研究室产品。⑥CTLA-4Ig: 第一军医大学分子免疫研究所提供。

1.1.2 细胞株及动物 ①NIH3T3 细胞株、小鼠肝癌 Hepal-6 细胞株、含 B7-1 和 B7-2 的抗性包装细胞、Yac-1 细胞株、B16 细胞株: 第一军医大学分子免疫研究所提供。②C57BL/6 小鼠: 5~6 周龄, 雌性, 第一军医大学动物中心提供。

1.2 B7 转染及 B7 分子表达情况

参照文献[3,4], 简述如下: 收集病毒上清, NIH 3T3 细胞检测上清滴度, G 418 筛选上清感染的 Hepal-6 细胞, CTLA-4 Ig 间接免疫荧光法检测细胞表面 B7 分子表达情况。

1.3 肿瘤细胞疫苗的制备

收集培养的 Hepal-6, Hepal-6-B7-1, Hepal-6-B7-2 细胞, Hanks 液洗 2 次, 细胞数调至 1×10^{10} /L, MMC 80 mg/L, 37 °C、 φ (CO₂) = 5% 1 h, Hanks 液洗 3 次, 重悬细胞悬液, 制成肿瘤细胞疫苗备用(分别称为 TCV_{Hepal-6}, TCV_{B7-1}, TCV_{B7-2})。

1.4 TCVs 体外抗肿瘤作用的研究

采用 MTT 比色法。无菌取小鼠脾细胞, 细胞数调至 1×10^{10} /L, 置 12 孔培养板, 分别加入培养

液、TCV_{Hepal-6}, TCV_{B7-1}, TCV_{B7-2}, 细胞数为 5×10^8 /L, 37 °C、 φ (CO₂) = 5% 培养 36 h, 离心收集细胞, 细胞数调至 5×10^9 /L, 作为检测细胞毒活性的效应细胞。收集肿瘤细胞 Hepal-6, Yac-1, B16, 细胞数调至 4×10^8 /L, 作为检测细胞毒活性的靶细胞。常规 MTT 法检测(效应细胞: 靶细胞 = 10:1, 作用时间 24 h), 于酶标分析仪上测定 570 nm 的吸光度 A 值。

1.5 TCVs 体内抗肿瘤作用的研究

1.5.1 免疫模型建立及抗肿瘤作用研究

C57BL/6 小鼠 32 只, 随机分对照组、TCV_{Hepal-6} 组、TCV_{B7-1} 组、TCV_{B7-2} 组, 每组 8 只, 分笼饲养。分别皮下接种生理盐水(NS)、TCV_{Hepal-6}、TCV_{B7-1}、TCV_{B7-2}, 每鼠细胞数为 1×10^7 , 7 d 后再分别接种各种 TCV 1 次, 1 周后各组在对侧皮下接种 Hepal-6 肿瘤细胞, 每鼠细胞数为 5×10^6 。观察方法: 接种肿瘤细胞后, 隔周测量肿瘤大小, 以最长径 \times 最短径 (S/mm^2) 表示。测量期为 28 d, 其后观察生存期。

1.5.2 早期模型建立及抗肿瘤作用研究

C57BL/6 小鼠 32 只, 皮下接种 Hepal-6 细胞, 每鼠细胞数为 5×10^6 , 随机分组同前。第 2 天, 各组分别腹腔注射 NS、TCV_{Hepal-6}、TCV_{B7-1}、TCV_{B7-2}, 每鼠细胞数 1×10^7 , 7 d 后再分别腹腔注射 TCV 1 次, 观察方法同前。另设同样的 1 组, 接种肿瘤细胞第 28 天时, 断颈处死小鼠, 取肿块组织作病理分析。

1.5.3 晚期模型建立及抗肿瘤作用研究

C57BL/6 小鼠 32 只, 皮下接种 Hepal-6 细胞, 每鼠细胞数为 5×10^6 , 随机分组同前。第 14 天待肿瘤生长约 6~8 mm 大小时, 各组分别腹腔注射 NS、TCV_{Hepal-6}、TCV_{B7-1}、TCV_{B7-2}, 每鼠细胞数为 1×10^7 , 7 d 后再分别腹腔注射 TCV 1 次, 观察方法同前。

1.6 统计学分析

应用《中国医学百科全书》统计学分册统计处理软件处理。

2 结 果

2.1 B7 分子的表达

CTLA-4 Ig 为 B7 分子的高亲和力受体。我们采用 CTLA-4 Ig 的间接免疫荧光法检测细胞表面 B7 分子的表达情况。结果发现, 转染 B7 的肝癌细胞呈强荧光反应, 而亲本肝癌细胞无荧光反应, 说明转染成功且在细胞膜上高度表达。

2.2 TCVs 体外对脾细胞杀伤活性的影响

用 TCV_{B7-1} 和 TCV_{B7-2} 体外刺激脾细胞后, 其对亲本小鼠肝癌细胞 Hepal-6 和小鼠 NK 敏感细胞株 Yac-1 的杀伤活性明显升高, 但对小鼠黑色素瘤细胞 B16 的杀伤活性无太大影响。而 TCV_{Hepal-6} 和生理盐水对照组, 其激活脾细胞对 3 种靶细胞的杀伤活性均无明显升高。结果见表 1 ($P < 0.01$)。

表 1 TCVs 体外对脾细胞杀伤活性的影响

Table 1 Cytotoxicities of spleen cells activated by

TCVs $[(\bar{x} \pm s)\%]$

TCVs	Cytotoxicity (Hepal-6)	Cytotoxicity (Yac-1)	Cytotoxicity (B16)
Control	5.6±0.3	12.7±1.3	6.2±2.6
TCV _{Hepal-6}	8.2±0.5	18.5±3.6	7.3±1.5
TCV _{B7-1}	43.4±6.3 ¹⁾	40.9±4.1 ¹⁾	10.7±1.1
TCV _{B7-2}	42.7±5.8 ¹⁾	42.8±5.2 ¹⁾	11.4±2.1

1) compared with TCV_{Hepal-6} and Control, $P < 0.01$

2.3 TCVs 对免疫模型的抗肿瘤效应

用 TCV_{B7-1} 和 TCV_{B7-2} 免疫小鼠后, 其对同系肝癌细胞具有明显的免疫保护作用, 表现为成瘤率 0%, 而 TCV_{Hepal-6} 和生理盐水对照组的成瘤率为 100%, 结果见图 1。受 TCV_{B7-1} 和 TCV_{B7-2} 免疫保护的小鼠可以无瘤长期存活, 而其他两组荷瘤小鼠在 40 d 内死亡, 结果见图 2 ($P < 0.01$)。

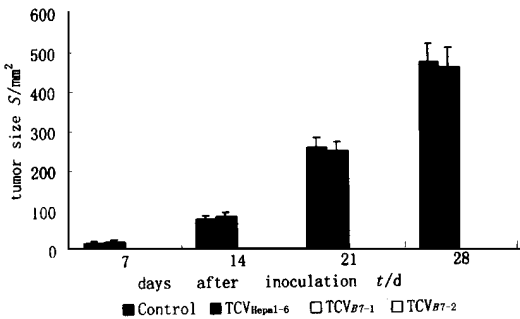


图 1 TCVs 对免疫模型肿瘤大小的影响

Fig. 1 Tumor sizes in immunological models treated with TCVs

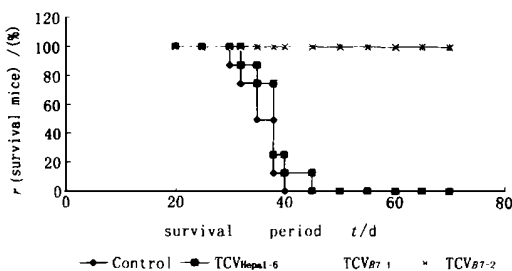


图 2 TCVs 对免疫模型小鼠生存期的影响

Fig. 2 Survival periods in immunological models treated with TCVs

2.4 TCVs 对早期模型的抗肿瘤效应

对于预先接种肿瘤细胞的早期模型, 用 TCV_{B7-1} 和 TCV_{B7-2} 治疗后, 能部分起到抑制肿瘤生长的作用, 表现为肿瘤生长速度明显减慢, 荷瘤小鼠生存期明显延长, 结果见图 3、图 4 ($P < 0.05$)。病理分析结果显示, TCV_{B7-1} 和 TCV_{B7-2} 治疗后, 肿瘤组织中浸润的淋巴细胞增多, 尤其是在肿块包膜下。

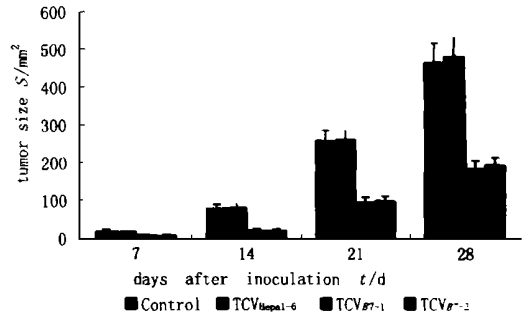


图 3 TCVs 对早期模型肿瘤大小的影响

Fig. 3 Tumor sizes in early models treated with TCVs

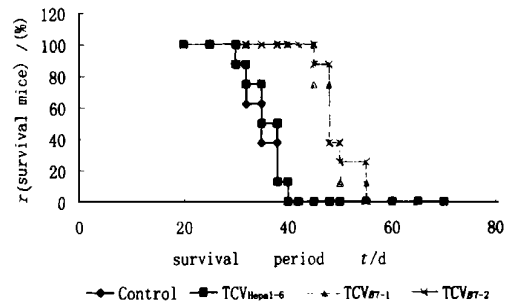


图 4 TCVs 对早期模型小鼠生存期的影响

Fig. 4 Survival periods in early models treated with TCVs

2.5 TCVs 对晚期模型的抗肿瘤效应

对于预先接种肿瘤细胞的晚期模型, 用 TCV_{B7-1}、TCV_{B7-2}、TCV_{Hepal-6} 和生理盐水治疗, 4 组无明显差别, 表现为肿瘤生长速度相似, 荷瘤小鼠的生存期也无明显延长。

3 讨论

基因工程疫苗是近年来的研究热点之一。自 1989 年第一次将 IL-4 导入肿瘤细胞制备疫苗以来, 通过基因工程技术, 人们已将各种细胞因子 (cytokines, CKs) 基因或 MHC I 类, II 类分子基因

导入各种肿瘤细胞,以期能增加肿瘤细胞的免疫原性,激活机体抗癌免疫效应。从现有的研究成果来看,基因工程疫苗能够诱导出一定程度的抗肿瘤免疫反应^[5],联合应用不同 *CKs* 基因疗法或联合应用 *CKs* 基因疗法与其他基因疗法,疗效大多比单独应用为好^[6]。

有资料表明,正常胰腺细胞不表达 B7-1 分子,但经转化的肿瘤细胞会表达^[7]。这说明宿主细胞在受到致癌因素的影响发生恶性转化时会表达 B7-1 分子,从而诱发机体的抗肿瘤免疫反应,而不表达 B7-1 分子的肿瘤细胞则逃避了免疫监视,形成肿瘤。建立在 T 细胞激活双信号学说基础上的 *CMs* 基因治疗的基本设想是在缺乏 *CMs* 的肿瘤细胞中导入 *CMs* 并使之在细胞表面有效表达,进而发挥第二信号作用,诱导出机体强大的 T 细胞抗癌活性。B7 分子是最主要的 *CMs*,大多数小鼠肿瘤细胞株和人类肿瘤细胞不表达 B7 分子^[1,8],我们的研究表明,小鼠肝癌细胞株 Hepal-6 细胞也不表达 B7 分子。

目前,肝癌的基因治疗研究多集中在肝癌的免疫基因治疗、“自杀基因”治疗、抑癌基因治疗等方面,有关肝癌的 B7 基因治疗报道甚少。我们应用逆转录病毒载体,将小鼠 B7-1、B7-2 基因转入小鼠肝癌细胞中,经 MMC 处理制备肿瘤细胞疫苗 TCV_{B7-1}, TCV_{B7-2},观察了其对免疫模型、早期模型和晚期模型的免疫保护和免疫治疗作用,结果发现,TCV_{B7-1}, TCV_{B7-2} 免疫后,对亲本肝癌细胞有完全的免疫保护作用,对接种肿瘤细胞的早期模型,也显示了良好的治疗效果,但对晚期模型,其治疗效果不佳。因此,我们认为,TCV_{B7-1}, TCV_{B7-2} 对预防肿瘤的转移和复发将会有其积极的意义,而人类肿瘤导致的死亡原因主要是转移和复发。

应用协同刺激分子基因治疗为基础的肿瘤免疫基因疗法在很短的时间内得到迅速发展,显示了其良好的应用前景。但由于协同刺激分子基因治疗的疗效不但与 B7 有关,还与其它协同刺激分子如 ICAM-1, LFA-3 及 VCAM-1 等密切相关^[9,10]。肿瘤抗原强弱、MHC 分子提供的第一信号也起重

要作用。因此,联合应用其它基因治疗,将是提高疗效的有效手段和方法。

参 考 文 献

- 1 Chen L, Aashe S, Brady W A, *et al*. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*, 1992, 71: 1093
- 2 Hodge J W, Abrams S, Schlom J, *et al*. Induction of antitumor immunity by recombinant vaccinia virus expressing B7-1 of B7-2 costimulatory molecules. *Cancer Res*, 1994, 54: 5552
- 3 楼国良,曹雪涛,闵碧荷,等.腹腔内注射 TNF 基因转染的 LAK 细胞对于腹水型肝癌小鼠的疗效. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1995, 2(1): 32
- 4 Natesan M, Razi-Wolf Z, Reiser H, *et al*. Costimulation of IL-4 production by murine B7-1 and B7-2 molecules. *J Immunol*, 1996, 156(8): 2783
- 5 Colombo M P, Forni G. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now. *Immunol Today*, 1994, 15: 48
- 6 Chen S H, Chen X H L, Wang Y, *et al*. Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 2577
- 7 Antonia S J, Munoz-Antonia T, Soldevila G, *et al*. B7-1 expression by a non-antigen presenting cell-derived tumor. *Cancer Res*, 1995, 55: 2253
- 8 Hellström K E, Hellström I, Chen L, *et al*. Can costimulated tumor immunity be therapeutically efficacious? *Immunol Rev*, 1995, 145: 123
- 9 Damle N K, Klussman K, Linsley P S, *et al*. Differential regulatory effects of intercellular adhesion molecule-1 on costimulation by the CD28 counterreceptor B7. *J Immunol*, 1992, 149: 2541
- 10 Damle N K, Klussman K, Leytze G, *et al*. Costimulation *via* vascular cell adhesion molecule-1 induces in T cells increased responsiveness to the CD 28 counterreceptor B7. *Cell Immunol*, 1993, 148: 114

(1998-03-31 收稿 1998-06-20 修回)