

人癌胚抗原 cDNA-重组痘苗病毒接种动物的研究^①

杨洁^{1②} 赖晃文² 罗超权¹ 杨太成² 徐国恒¹ 王晓怀²

(1 中山医科大学生化教研室; 广州, 510089 2 广州军区总医院医学实验科; 广州, 510060)

摘要 将构建的表达人癌胚抗原 (CEA) 的重组痘苗病毒接种于纯种新西兰兔, 在兔血清中测到高水平的 CEA 以及高滴度抗 CEA 抗体, 而在兔的非淋巴组织器官中未检测到 CEA 的表达及免疫复合物的沉积, 接种后的兔也没有明显的毒副反应, 显示痘苗病毒作载体在体内应用是安全可行的

关键词 痘苗病毒; 癌胚抗原 治疗应用; 抗体生成 免疫学; 接种

中图分类号 R 735.2

基因治疗可行性与载体的选择密切相关。目前, 在对某些疾病进行基因治疗的研究中常用的表达载体有逆转录病毒、腺病毒和痘苗病毒。虽然前两者在体内应用具有一定的安全性, 但逆转录病毒是将外源基因随机整合到宿主基因组, 可能造成宿主基因的突变。此外, 逆转录病毒自身有致癌性, 其安全株在体内是否会发生变异恢复致源性是很难预料的^[1]; 腺病毒虽不将外源基因插入宿主基因组, 但同样有致癌的可能性^[2]。近来, 很多研究者通过大量实验证实痘苗病毒是有效的真核表达载体^[3-5], 它在体内的安全性和可靠性已在预防天花的疫苗应用中得到验证, 用痘苗病毒作载体具有更多的优势: 外源基因不插入宿主基因组; 所表达的外源蛋白质可被有效糖基化, 保持了原有特性; 对表达产物有抗原提呈作用。本实验室构建的表达人癌胚抗原 (CEA) 的重组痘苗病毒, 接种纯种新西兰兔, 在接种后早期兔血清中即有高含量的 CEA, 很快产生抗 CEA 抗体。接种后兔的非淋巴组织无 CEA 的表达, 肾组织未见沉积物, 接种兔亦未出现毒副反应, 显示重组痘苗病毒的体内应用是可行的, 为进一步研究如何应用于人体进行基因治疗提供了一定的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 CEA-cDNA 重组痘苗病毒的构建

具体内容见文献 [6]

1.2 重组痘苗病毒接种纯种新西兰兔

取 3 只纯种新西兰兔, 每只接种 3 次, 在背部皮

下注射, 前 2 次接种间隔 1 周, 第 3 次接种间隔 2 周, 每次注射剂量为 0.7 mL 病毒液 [滴度为 10^6 U/mL (U/mL 为蚀斑形成单位)]。放射免疫法测定兔血清中 CEA 抗原的水平, 免疫组化法测定体内抗 CEA 抗体的水平。

1.3 测定接种后兔非淋巴系统 CEA 的表达

1.3.1 石蜡组织切片的制备 接种后 3 个月的新西兰兔, 耳缘静脉空气注射致死。取肝、肾、胃、肠、心和肌肉等组织切块用福尔马林固定, 按常规方法制备石蜡组织切片。取未接种的新西兰兔组织作正常对照。

1.3.2 ABC 法测定组织中 CEA 的表达 将石蜡组织切片用二甲苯脱蜡, 经系列酒精处理后入水洗涤, 按 ABC 免疫组织化学检测试剂盒方法进行。试剂盒购自华美生物工程公司。一抗为鼠抗人 CEA 单克隆抗体, 二抗为羊抗鼠抗体。

1.4 电镜观察肾组织

取接种后 3 个月的兔肾脏组织, 戊二醛固定后制备电镜切片。电镜下观察肾单位。未接种 CEA-cDNA 重组痘苗病毒的兔的肾组织作正常对照。

2 结 果

2.1 重组痘苗病毒接种兔后相关指标的测定

2.1.1 接种后兔血清中 CEA 的水平 第 1 次接种后 1 周血清中即含有高水平 CEA, 之后连续数周维持在高水平, 见表 1。

① 广东省卫生厅“九五”五个一工程资助项目; ② 第一作者, 1968 年出生, 女, 博士生。

表 1 CEA-重组痘苗病毒接种兔的结果 (ng/L)

编号	接种前	第 1 次接种后 1 周	第 2 次接种后 1 周	第 3 次接种后		
				1 周	2 周	3 周
1	6	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
2	5	78.2	> 80	> 80	> 80	> 80
3	5	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80

2.1.2 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,免疫组化法检测接种后兔血清中的抗人 CEA 抗体,于第 2 次接种后 1 周出现,滴度为 1:10,第 3 次接种后 2 周达 1:100,之后一直维持在较高水平。

2.2 免疫组化测定兔各组织内 CEA 的表达

图 1 为接种兔和正常兔的肠组织,图 2 为肝组

织,图 3 为肾组织。从图可见接种兔各组织的染色情况与正常对照兔组织相同,呈现经苏木素复染后的均匀蓝色,未见有免疫组化反应呈现的棕色。可见接种过 CEA τ -DNA 重组痘苗病毒的兔非淋巴系统组织均未检测到 CEA 的表达。

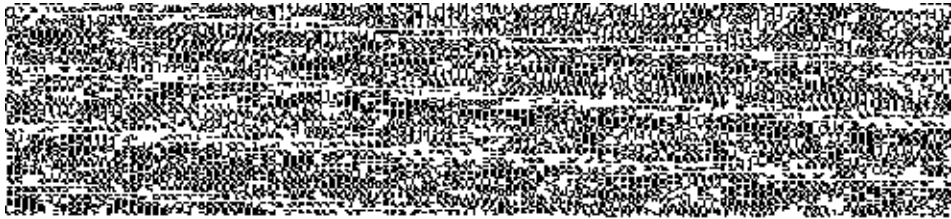


图 1 免疫组化测定肠组织中 CEA 的表达

1-1 接种后兔; 1-2 正常对照兔 $\times 20$

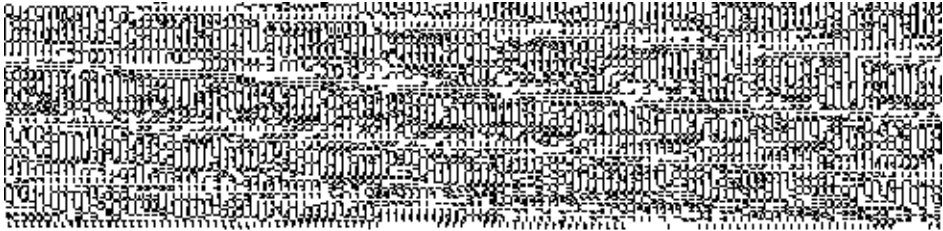


图 2 免疫组化测定肝组织中 CEA 的表达

2-1 接种后兔; 2-2 正常对照兔 $\times 20$



图 3 免疫组化测定肾组织中 CEA 的表达

3-1 接种后兔; 3-2 正常对照兔 $\times 20$

2.3 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,系膜未见有增厚,与正常对照组的肾组织结构无差异。

3 讨论

CEA是一重要的肿瘤相关抗原^[7],尤其在胃肠道肿瘤患者体内有强烈表达,但却没有抗CEA抗体产生。目前,有关肿瘤逃避机体免疫反应的机理还未明确,有人认为可能是肿瘤自身或相关抗原的免疫原性弱或抗原提呈障碍所致,由于痘病毒的免疫原性很强且对弱免疫原有抗原提呈作用,因此研究者提出利用痘病毒作载体可增强外源基因表达产物的抗原性。

本文利用前期构建的CEA-cDNA重组痘病毒接种纯种新西兰兔,第1次接种后1周兔体内即有CEA的高水平表达,第2次接种后1周有抗CEA抗体出现,第3次接种后两周抗体滴度达1:100。同时本实验室曾将表达CEA的质粒给小鼠肌肉注射,只在注射局部检测到CEA的微量表达而血液中未能检测到CEA的存在,更无抗CEA抗体的产生。可见痘病毒是一有效的真核表达载体,所表达的外源基因产物保持了原有特性。

接种后的兔血清中虽有高水平CEA,但非淋巴组织器官中却未能检测到CEA抗原的表达,可见CEA-cDNA重组痘病毒没有侵入实体组织器官。接种后兔的肾组织电镜下未观察到沉积物。观察接种后兔的行为正常,未见毒副反应。综合上述,本实验再次显示痘病毒是安全可靠的真核表达载体,值得进一步深入研究作为基因治疗的载体如何在人体应用,有关实验正在进行中。

参 考 文 献

- 1 许小平.逆转录病毒载体介导基因治疗的完全性问题.国外医学遗传学分册,1994,19(6):326
- 2 徐矜,贺新军.基因转移的DNA病毒方法.国外医学分子生物学分册,1994,16(6):241
- 3 Mackell M, Smith GL, Moss B, *et al.* General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol*, 1984, 49(3): 857
- 4 Mackell M, Smith GL, Moss B, *et al.* Vaccinia Virus a selectable eukaryotic cloning and expressing vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(12): 7415
- 5 Sedegah M, Beaudoin RL, Majorion WR, *et al.* Evaluation of vaccinia designed to induce protective cellular immunity against the plasmodium yoelii circumsporozoite protein vaccinia, pseudorabies, and salmonella transfected with circumsporozoite gene. *Bull WHO*, 1990, 63: 109
- 6 杨洁,杨太成,罗超权,等.表达人癌胚抗原(CEA)的重组痘病毒的构建.中山医科大学学报,1997,18(1):11
- 7 Abdel-Nali H H, Schwartz AN, Goldfoget G, *et al.* Colorectal tumors scintigraphy with In¹¹¹ anti-CEA monoclonal antibody and correlation with surgical histopathologic, and immunohistochemical findings. *Radiology*, 1988, 166(2): 747

(1996-09-10收稿 1996-11-03修回)

(下转第47页)

samples can be solutioned with vWA locus which is useful in forensic medicine.

Subject headings alleles; polym erase chain reaction; polymorphism (genetics)

(上接第 43页)

STUDY OF THE CEA-cDNA RECOMBINANT VACCINIA VIRUS TO VACCINE ANIMALS

Yang Jie¹ Lai Huangwen² Luo Chaoquan¹ Yang Taichang² Xu Guoheng¹ Wang Xiaohuai²

(1 Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089;

2 Department of Medical Experiment, General Army Hospital, Guangzhou, 510060)

CEA cDNA-recombinant vaccinia virus, which had been constructed before, were used to vaccinate rabbits. In serum samples, high level of CEA and high titer of anti-CEA antibody were detected. Immunohistochemical method showed that intestine, liver, kidney and muscle could not express CEA. The vaccinated rabbits did not show toxic reactions. The results showed that it is safety to use vaccinia virus as a vector in vivo.

Subject headings vaccinia virus; carcinoembryonic antigen/therapeutic use; antibody formation /immunology; vaccination