

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0239-04

ehCG β 肿瘤基因疫苗诱生抗体的抗肿瘤作用

王立新, 徐薇, 关庆东, 熊思东(复旦大学上海医学院免疫学系 教育部分子医学重点实验室 上海基因免疫与疫苗研究中心, 上海 200032)

[摘要] **目的:** 探讨 ehCG β 肿瘤基因疫苗诱生抗 hCG β 抗体的抗肿瘤作用。**方法:** 以 TR421-ehCG β 质粒实施基因免疫、空载质粒为对照, ELISA 法检测免疫小鼠血清中特异性抗 hCG β -IgG 抗体; 以³H-TdR 掺入法检测灭活补体前后免疫血清对 ehCG β 肿瘤细胞增殖活性的抑制作用; 倒置显微镜和 FACS 分别观察 HeLa 细胞的形态变化及细胞凋亡情况。**结果:** TR421-ehCG β 质粒诱导小鼠产生高水平抗 hCG β -IgG 抗体; 抗 hCG β 免疫血清对 HeLa 细胞的抑制增殖作用明显强于对照血清, 灭活补体后抑制率无明显变化; 免疫血清的抑制作用与肿瘤细胞的 hCG β 表达水平有一定的相关性; HeLa 细胞与免疫血清孵育后细胞死亡明显增多, 但其中凋亡细胞为 3.42%, 与对照血清孵育细胞的凋亡(1.88%) 比较无明显差异。**结论:** ehCG β 肿瘤基因疫苗诱生的抗 hCG β 抗体以不依赖补体方式抑制 ehCG β 肿瘤细胞的增殖。

[关键词] 异位人绒毛膜促性腺激素; 抗体; 肿瘤; 基因免疫

[中图分类号] R730.59 [文献标识码] A

Anti-Tumor Effects of Anti-hCG β Antibody Induced by Gene Immunization

WANG li-xin, XU Wei, GUAN Qing-dong, XIONG Si-dong(Department of Immunology and Key Laboratory of Molecular Medicine of Ministry of Education, Fudan University, Center for Gene Immunization and Vaccine Research, Shanghai 200032, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the anti-tumor effects of anti-hCG β antibody induced by gene immunization with ectopic human chorionic gonadotropin β -subunit. **Methods:** Sera were collected at the indicated times from the mice immunized with plasmid TR421-ehCG β -coding for hCG β and mock DNA respectively and were determined the levels of anti-hCG β antibody by ELISA. The tumor cells expressing ehCG β were treated with different doses of sera, in which complement were or not inactivated. The proliferation and morphological change as well as apoptosis of tumor cells were detected by [³H]-Thymidine incorporation assay, converse-microscope and FACS, respectively. **Results:** All mice immunized with plasmid TR421-ehCG β developed high levels of anti-hCG β antibody, which could inhibit obviously the proliferation of HeLa cells compared with the serum from animals immunized with mock DNA ($P < 0.05$), even if complement was inactivated. However, the inhibition of normal serum decreased significantly after complement was inactivated. The inhibition activity of the anti-hCG β serum correlated with the expression level of ehCG β in the tumor cells. The number of dead HeLa cells increased obviously upon being incubated with the anti-hCG β serum, while the percentage of the apoptotic cells was only 3.42%, which had no significant difference with the cells incubated with the normal serum (1.88%). **Conclusion:** The anti-hCG β antibody induced by gene immunization had significant inhibitory influence on the proliferation of tumor cells expression ehCG β in complement-independent manner.

[**Key words**] ectopic human chorionic gonadotrophin(ehCG); antibody; tumor; gene immunization

* 恶性肿瘤细胞产生的异位 hCG(ectopic human chorionic gonadotrophin, ehCG) 是肿瘤的早期诊断以及评价肿瘤治疗效果的指标之一, 近来文献报道, 分泌型 ehCG 具有生长因子功能、与恶性肿瘤自我生长的调控有关; 富含负电荷糖链的膜结合型 ehCG β 链与恶性肿

[**基金项目**] 国家杰出青年科学基金研究计划(39925031) 和国家重点基础研究发展计划(2001CB510006)

[**作者简介**] 王立新(1965-), 男, 江苏人, 博士研究生, 主要从事抗肿瘤基因免疫研究, 现工作单位东南大学基础医学院病原生物学与免疫学系

[**通讯作者**] 熊思东, E-mail: sdxiang@shmu.edu.cn

瘤转移特性和恶性化程度、以及肿瘤微环境和免疫耐受的形成等有一定的关系^[14],因而,ehCG与肿瘤发生、发展的关系受到人们的关注,以ehCG为靶抗原的抗肿瘤疫苗也成为肿瘤生物治疗新的热点^[56]。我们以往的研究构建了基于ehCG β 的抗肿瘤基因疫苗,免疫小鼠后产生了特异性免疫应答并具有一定的抗癌效果。细胞免疫在抗肿瘤免疫中发挥主导作用,也有文献报道针对某些肿瘤抗原的抗体在抗肿瘤免疫效应中扮演重要角色,但抗体,尤其是抗hCG β 抗体的抗肿瘤作用如何目前不完全清楚^[7-8]。本文在以往研究的基础上,利用ehCG β 抗肿瘤基因疫苗诱导的抗体,探讨抗hCG β 抗体在抗肿瘤方面所发挥的作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞和动物

Hela细胞为高表达ehCG β 的人宫颈癌细胞株、HepG2细胞为低表达ehCG β 的人肝癌细胞株、ECV-304细胞为不表达ehCG β 的人脐静脉内皮细胞株,均由本室传代保存。3种细胞均用含10%小牛血清的RPMI-1640(GIBCO)培养基在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下培养。BALB/c小鼠(H-2^d,4~6周龄,雌性)由复旦大学实验动物科学部提供,饲养于复旦大学实验动物科学部SPF级环境。

1.2 基因免疫

TR421质粒由美国东卡罗米纳大学Ross TM博士惠赠;TR421-ehCG β 质粒为含ehCG β 编码基因的重组质粒,由本室构建。采用试剂盒(QIAGEN)分别大量纯化TR421-ehCG β 和TR421质粒DNA,以肌肉注射法实施基因免疫[100 μ g DNA/(100 μ l/只)],按期自眼眶内静脉采集小鼠全血,分离血清后置-20 $^{\circ}$ C保存待测抗hCG β 抗体,其中第12周血清用于抗癌作用的研究。

1.3 免疫血清抗hCG β 抗体的检测

采用常规ELISA法,以hCG β 蛋白(1 μ g/ml)包被酶标板,HRP标记的羊抗小鼠IgG抗体(1:5000)为第二抗体,检测小鼠血清(作1:10稀释)中抗hCG β -IgG类抗体,酶标仪测得吸光度值(490nm)显示抗体水平。

1.4 免疫血清对肿瘤细胞增殖活性的影响

收获对数生长期的传代培养细胞,加入96孔平底细胞培养板(1 \times 10⁹/L,100 μ l/孔),待检免疫血清作一定稀释后加入上述各孔(100 μ l/孔)为实验孔,并以细胞培养液为对照孔,均设3复孔。置37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下培养44h,用倒置显微镜观察细胞的形态及变化后,掺入³H-TdR(0.5 μ Ci/孔)继续培养4h,加50 μ l胰蛋白酶消化后收获细胞并用液体闪烁计数仪检测其

CPM值。抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照孔 CPM 值} - \text{实验孔 CPM 值}}{\text{对照孔 CPM 值}} \times 100\%$$

1.5 FACS 检测免疫血清对 Hela 细胞的致死作用

收集对数生长期的Hela细胞,调整细胞浓度后加入离心管(2 \times 10⁹/L,500 μ g/管),分别加入TR421-ehCG β 质粒免疫血清和TR421质粒免疫血清(稀释度为1:10、终体积为1ml),置37 $^{\circ}$ C孵箱作用4h。离心弃上清,加入500 μ l PI染液(Sigma)(含50 μ g/ml PI,0.1%柠檬酸钠,0.1% Triton X-100溶于0.01mol/L pH7.4 PBS中)重悬;另取等量细胞,加不含PI的溶液重悬,混匀后避光冰浴30min,PBS洗3次,FACS检测细胞的凋亡率。

2 结 果

2.1 TR421-ehCG β 基因免疫诱导产生特异性抗 hCG β 抗体

如图1所示,TR421-ehCG β 质粒基因免疫诱导小鼠产生了高水平的特异性抗hCG β -IgG抗体,追加免疫后抗体水平持续增高,与TR421质粒免疫组比较有显著性差异($P < 0.001$)。

图1 免疫小鼠血清抗hCG β -IgG抗体检测
Fig.1 Determination of anti-hCG β IgG in sera from immunized mice

2.2 抗 hCG β 抗体抑制肿瘤细胞的增殖活性

以TR421-ehCG β 质粒免疫血清(抗hCG β 免疫血清,1:8稀释)和TR421质粒免疫血清(对照血清,1:8稀释)分别与Hela细胞共孵育48h,结果显示:抗hCG β 免疫血清和对照血清对Hela细胞的抑制率分别为(56.18 \pm 4.59)%和(35.58 \pm 5.86)%,两者相比差异显著($P < 0.05$)。

2.3 补体对抗 hCG β 抗体抑制肿瘤细胞增殖作用的影响

为观察抗 hCG β 抗体对肿瘤细胞的抑制作用是否需要补体的参与,我们以 56 $^{\circ}$ C, 30 min 灭活免疫血清,从图 2 可以看出,对照血清对 HeLa 细胞有一定的非特异性抑制作用,灭活补体后抑制作用明显下降;抗 hCG β 免疫血清对 HeLa 细胞抑制作用明显强于对照血清 ($P < 0.05$),灭活补体后,免疫血清的抑制作用变化不大,抑制率与血清稀释度呈良好的剂量依赖性,提示,抗 hCG β 抗体以非补体依赖方式抑制肿瘤细胞增殖。

果发现,与对照血清孵育的细胞形态典型、表面光泽、生长状态良好;与免疫血清孵育的 HeLa 细胞表面失去光泽、呈死亡状改变。为探讨抗 hCG β 抗体引起 HeLa 细胞死亡的原因,我们采用 PI 染料对血清孵育的 HeLa 细胞进行 DNA 活性染色, FACS 检测发现(如图 4):免疫血清诱导 HeLa 细胞凋亡的百分率仅为 3.42%,与对照血清(细胞凋亡率为 1.88%)比较无显著差异。提示抗 hCG β 抗体可导致 HeLa 细胞死亡、但并非由凋亡途径引起。

图 2 补体对抗 hCG β 免疫血清抑制作用的影响

Fig.2 Effects of complement on inhibition of anti-hCG β serum

2.4 抗 hCG β 抗体的抑制作用与肿瘤细胞表达 ehCG β 有关

为观察抗 hCG β 抗体抑瘤作用与肿瘤细胞表达 ehCG β 的关系,我们选择高表达 ehCG β 的 HeLa 细胞(45.93%)、低表达 ehCG β 的 HepG2 细胞(5.05%)以及不表达 ehCG β 的 ECV-304 细胞分别作为靶细胞,加入灭活补体的抗 ehCG β 免疫血清和对照血清(作 1:128 稀释)作用 48 h。结果如图 3 所示:对照血清对 3 种细胞的非特异性抑制作用较低;抗 ehCG β 免疫血清对 HeLa 细胞、HepG2 细胞和 ECV-304 细胞的抑制作用差异较大,抑制率分别为 43.47%、33.16% 和 11.79%, Poisson 分析显示,抗 ehCG β 免疫血清对细胞增殖的抑制作用与细胞 ehCG β 的表达水平有一定的相关性($R = 0.917, P < 0.05$)。

2.5 抗 hCG β 抗体引起 HeLa 细胞死亡并非凋亡作用

倒置显微镜观察与血清孵育 48 h 的 HeLa 细胞,结

图 3 抗 hCG- β 免疫血清对不同 hCG β 表达水平细胞的抑制作用

Fig.3 Inhibition of anti-hCG β serum on the proliferation of different cells

图 4 抗 ehCB β 免疫血清孵育 HeLa 细胞的凋亡检测

Fig.4 Analysis of HeLa cells apoptosis induced by anti-ehCG β serum

A: Un-dyed cells; B: Medium;

C: Normal serum; D: Anti-hCG β serum

3 讨论

恶性肿瘤是严重危害人类健康的恶性疾病之一。

肿瘤基因疫苗,是通过真核表达载体在宿主体内表达肿瘤抗原并诱导特异性抗肿瘤免疫应答,从而达到治疗肿瘤或预防复发的作用,近年来受到人们的重视^[7]。ehCG被认为是恶性肿瘤细胞表达的胚胎蛋白,Acevedo等^[4]发现几乎所有的恶性肿瘤细胞都能表达ehCG,以自分泌或旁分泌方式产生的低剂量的功能性ehCG,类似于神经生长因子(NGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF- β),具有生长因子,促进和调控肿瘤细胞的增殖、分化和生长,使得肿瘤细胞能在微环境中自我生长;膜结合型ehCG由于带有负电荷糖基侧链而使肿瘤细胞表面带负电荷,促进肿瘤细胞与血管内皮细胞的黏附或抑制免疫细胞的活化与杀伤功能,从而与肿瘤的转移特性及免疫耐受的形成有一定关系^[4,6]。Kumar等^[8]利用裸鼠模型发现,针对hCG β 链的抗体能抑制ehCG⁺人肺癌-ChaGo在裸鼠体内形成实体瘤,局部或腹腔内注射抗体,可导致瘤体的坏死性退变。体外试验证实hCG与其受体结合可激活肿瘤细胞内cAMP信号传导途径,而抗hCG β 抗体能阻断hCG与其受体结合并导致胞内cAMP水平下降,因此推测,抗hCG抗体有可能在抗ehCG β ⁺肿瘤免疫中发挥重要的作用^[9]。

我们以往的实验证实,基于ehCG β 的抗肿瘤基因疫苗能诱导小鼠产生特异性免疫应答,对携ehCG β 的肿瘤细胞具有一定的抗癌效应。在本研究中,我们收集了ehCG β 基因免疫诱导的抗hCG β 免疫血清,进一步探讨抗体对ehCG β ⁺肿瘤细胞的抗癌作用。结果显示,基因免疫产生的抗hCG β 抗体能抑制Hela细胞的增殖活性,且抗体的抑制作用不依赖补体的存在。选择3株不同ehCG β 表达水平的细胞为靶细胞,观察抗hCG β 抗体的抑制作用与肿瘤细胞表达ehCG β 的关系,结果提示,抗hCG β 抗体的抑制作用与肿瘤细胞ehCG β 的表达水平有一定的相关性($R = 0.917$)。Hela细胞与抗hCG β 免疫血清作用后,细胞失去光泽、形态呈死亡状改变,但进行DNA活性染色并经FACS检

测发现,抗hCG β 抗体作用后Hela细胞的凋亡率仅为3.42%,与对照血清(细胞凋亡率为1.88%)比较无显著差异,提示抗hCG β 抗体导致Hela细胞死亡可能并非由凋亡途径引起。本研究为了解ehCG β 抗肿瘤基因免疫诱导的抗hCG β 抗体的抗肿瘤作用提供了新的实验依据。

[参考文献]

- [1] Moulton HM, Yoshihara PH, Mason DH, *et al.* Active specific immunotherapy with a beta-human chorionic gonadotropin peptide vaccine in patients with metastatic colorectal cancer: Antibody response is associated with improved survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2044-2051.
- [2] Higashida T, Koizumi T, Yamaguchi S, *et al.* Ovarian malignant mixed mesodermal tumor producing the free form of the beta-subunit of human chorionic gonadotropin[J]. *Int J Clin Oncol*, 2001, 6(2): 97-100.
- [3] Dangles V, Halberstam I, Scardino A, *et al.* Tumor-associated antigen human chorionic gonadotropin beta contains numerous antigenic determinants recognized by *in vitro* induced CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 50(12): 673-681.
- [4] Acevedo HF, Hartssock RJ, Maroom JC. Detection of membrane-associated human chorionic gonadotrophin and its subunits on human cultured cancer cells of the nervous system[J]. *Cancer Detect Prev*, 1997, 21(4): 295-303.
- [5] 王立新,熊思东. 异位hCG与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. *中国癌症杂志*, 2001, 11(3): 270-272,275.
- [6] 王立新,熊思东. 基于异位hCG的肿瘤免疫生物治疗[J]. *生命的化学*, 2001, 21(3): 240-242.
- [7] Park JW, Kong K, Carter P, *et al.* Development of anti-p185HER2/neu immunoliposomes for cancer therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(2): 1327-1331.
- [8] Kumar S, Talwar GP, Biswas DK. Necrosis and inhibition of growth of human lung tumor by anti- β -human chorionic gonadotropin antibody[J]. *J Natl Cancer Inst*. 1992, 84(1): 42-47.
- [9] Kalantarov G, Acevedo HF. Demonstration of dose dependent cytotoxic activity in cancer cells by specific human chorionic gonadotrophin monoclonal antibodies[J]. *Cancer*, 1998, 83(14): 783-787.

[收稿日期] 2003-05-05

[修回日期] 2003-07-20

欢迎订阅《细胞与分子免疫学杂志》

《细胞与分子免疫学杂志》由中国免疫学会和第四军医大学主办,是全国唯一与细胞和分子生物学相关的免疫学专业性杂志,系我国中文核心期刊、科技论文统计源期刊、美国《CA》、《IM》及MEDLINE等刊源。

该刊的主要栏目有基础研究、临床研究、抗体工程、技术方法、综述和信息等,主要报道我国生物学领域细胞与分子免疫学方面的理论及应用研究成果。欢迎生物学的基础和医学临床工作者投稿并订阅。

该刊为双月刊(逢单月出版),国际标准开本(A4)128页,信息量大。彩图随文,铜版纸印刷精装。单价¥15元,全年90元。国内外公开发售,邮发代号52-184。欢迎广大读者到当地邮局或单位收发室订购。

该刊的联系方式:(邮编710032)陕西西安第四军医大学校内《细胞与分子免疫学杂志》编辑部;联系电话:029-3374550或军线0901-74550;E-mail:immuedit@fmmu.edu.cn