

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0269-05

腺病毒介导的 AFP 基因修饰树突状细胞的体外生物学特性

宋文刚¹, 曲 迅², 陈宪锐¹, 李雅林¹, 吴 聪¹, 秦庆亮¹(1. 泰山医学院免疫学教研室, 山东 泰安 271000; 2. 山东大学齐鲁医院基础医学研究所, 济南 250012)

[摘 要] 目的: 探讨腺病毒介导 AFP 基因修饰树突状细胞瘤苗体外生物学活性。方法: 将携带小鼠 AFP 全长 cDNA 的重组腺病毒表达载体 Ad-AFP 转染 BMDC, 构建 AFP-DC 肝癌瘤苗, 采用电化学发光免疫测定法确证 AFP-DC 转染的有效性, FACS 检测表面分子和吞噬功能, ³H-TdR 掺入法检测 T 细胞增殖反应的能力, ⁵¹Cr 释放法检测 CTL 活性。结果: AFP 基因转染 12 h 后 DC 及其培养上清中可检测到 AFP 的表达, 表明腺病毒介导的 AFP 基因转染的有效性。AFP-DC 与 BMDC 比较 B7 分子明显上调, MHC 分子也有轻度升高, 吞噬功能降低 ($P < 0.05$)。AFP-DC 激发同基因型小鼠 T 细胞增殖功能均明显高于 DC 对照组和 LacZ-DC 组 ($P < 0.05$)。AFP-DC 体外诱导 CTL 对 Hepal-6 肿瘤细胞的杀伤作用具有特异性。结论: 肝癌相关基因 AFP 可作为抗肝癌基因治疗的切入点, 该研究为肝癌树突状细胞体内免疫治疗提供了实验依据。

[关键词] 树突状细胞; 甲胎蛋白; Hepal-6 肝癌细胞; 瘤苗; 基因转染

[中图分类号] R730.59

[文献标识码] A

Biological Characteristics of Adenovirus-Mediated AFP Gene-Modified Dendritic Cells *in vitro*

SONG Wen-gang¹, Qu Xun², CHEN Xian-rui¹, LI Ya-lin¹, WU Cong¹, QIN Qing-liang¹(1. Department of Immunology, Taishan Medical College, Taian 271000, China; 2. Institute of Basic Medicine, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012 China)

[Abstract] **Objective:** To explore biological characteristics of AFP gene-modified DC tumor vaccine *in vitro*. **Methods:** The recombinant adenovirus expression plasmid Ad-AFP which carries the full length cDNA of mice AFP was transfected into bone marrow-derived dendritic cell (BMDC), to construct AFP-DC Hepatocarcinoma tumor vaccine. The effectiveness of transfection was detected by electrochemiluminescence immunoassay. Surface molecules and phagocytosis of AFP-DC were detected by FACS. Mice T cell proliferation stimulated by AFP-DC were detected by ³H-TdR uptake assay. Cytotoxic CTL activity induced by AFP-DC *in vitro* was detected by ⁵¹Cr releasing assay. **Results:** AFP secreted by AFP-DC could be detected on surfaces of DCs and their supernatants after being transfected for 12 hours, which was suggested that the transfection was effective. B7 was obviously higher, MHC slightly higher and phagocytosis lower for AFP-DC compared with BMDC ($P < 0.05$). Isogenotype T cell proliferation induced by DC-AFP were obviously higher than DC control group and LacZ-DC group ($P < 0.05$). The cytotoxicity of CTL induced *in vitro* by AFP-DC to hepatoma Hepal-6 cells have specificity. **Conclusion:** Hepatocarcinoma associated antigen AFP could be used as a cut in point to gene therapy of hepatoma. The research provided experimental bases for immunotherapy of Hepatocarcinoma mediated by DC.

[Key words] dendritic cell; alpha fetoprotein; hepatoma Hepal-6 cells; tumor vaccine; gene transfection

* 肝癌的生物治疗是生物医学领域研究的热门课题^[1-3], 然而, 多年的研究显示, 肝癌细胞抗原性弱, 缺少特异性抗原, 这成为肝癌生物治疗中的一个主要难点。甲胎蛋白 (alphafetoprotein, AFP) 虽然并非肝癌特异性抗原, 但临床上约 70% 的肝癌患者血中可检出 AFP, 使人们考虑能否以 AFP 为切入点开展肝癌生物治疗的研究。本研究将 AFP 基因转染至树突状细胞 (dendritic cell, DC), 以期增强 DC 诱导特异性抗肿瘤

免疫反应的能力, 为肝癌的治疗寻求新的思路。

1 材料与方法

[基金项目] 山东省教育厅科技计划项目 (J00K61) 和山东省卫生厅科技发展计划项目 (2001CA1CDB1)

[作者简介] 宋文刚 (1964 -), 男, 山东威海市人, 副教授, 主要从事肿瘤免疫学的研究。Email: zxsys@tsmc.edu.cn

1.1 动物及细胞株

C57BL/6(H-2k^b)小鼠,6~8周龄,体重18~20g雌性,购自山东省医科院实验动物中心;Hepa1-6细胞为C57BL/6小鼠来源的肝癌细胞株购自ATCC,EL-4,293细胞由本室常规传代培养。

1.2 主要试剂

小鼠重组GM-CSF,IL-4购自Promega公司,分装(10ng/μl),-80℃保存备用;RPMI-1640完全培养基由RPMI-1640(Hyclone公司)、10%胎牛血清(Hyclone公司)组成,4℃保存备用;荧光素标记的大鼠抗小鼠单抗MHC-I-FITC、MHC-II-FITC,CD80-FITC,CD86-FITC均购自PharMingen公司;³HTdR、同位素⁵¹Cr购自Amersham公司;Elecsys AFP检测试剂盒购自Roche公司;MTT,OVA-FITC购自Sigma公司。

1.3 小鼠骨髓树突状细胞体外扩增

按文献方法[4]进行。

1.4 重组腺病毒的转染

携带小鼠AFP全长cDNA的重组腺病毒表达载体Ad-AFP(滴度为2.1×10⁹PFU/ml)、对照病毒Ad-LacZ(含对照基因LacZ,滴度为3.6×10⁹PFU/ml)扩增、纯化并稀释为1×10⁸pfu/ml备用;转染时,取培养第6天的BMDC,弃去培养基后加入少量无血清培养基覆盖细胞层,再加入100MOI重组腺病毒Ad-LacZ或Ad-AFP,置37℃,5%CO₂孵箱中,培养120min后洗去上清,加入完全培养基继续培养。

1.5 Western blot 印迹分析

按Elecsys AFP试剂盒说明书操作,用Roche公司Elecsys 1010分析仪定量检测AFP基因转染后DC培养上清中AFP的含量。

1.6 FACS 检测 AFP 基因修饰 DC 的表面分子

收集各组DC,用PBS悬浮为1×10⁶/ml,加入离心管,100μl/管,分别加入荧光标记抗体:包括MHC-I-FITC,MHC-II-FITC,CD80-FITC,CD86-FITC,终浓度为5μg/ml,置4℃标记45min,PBS洗2遍,以荧光标记的同型Ig作为对照;用流式细胞仪(FACS calibur,BD公司)检测,CellQuest软件分析。

1.7 AFP-DC 刺激同基因型小鼠 T 细胞增殖能力

采用的³H-TdR 掺入法检测 DC 刺激自体 T 细胞增殖反应的能力。取正常 C57BL/6 小鼠脾脏,制备无菌的脾细胞悬液,以 RPMI-1640 完全培养基悬浮,注入尼龙毛柱,置 37℃,5% CO₂ 孵箱培养 1 h,冲出非黏附的细胞即为纯化的 T 细胞,调节细胞浓度至 2×10⁶/ml,加入 96 孔圆底培养板,100 μl/孔;各实验组 DC 以 4 000 rad 放射线灭活后,以 2×10⁴,1×10⁴/(孔·100 μl) 分别加入到已含有反应细胞的各孔中,总体积 200

μl,每组 3 个复孔。置 37℃,5% CO₂ 孵箱中培养 96 h,于培养结束前 16 h 加入 ³H-TdR(0.5 μCi/孔)。收集细胞,液闪计数器检测 cpm 值,结果以 3 孔平均值表示。

1.8 AFP-DC 体外诱导 CTL 及其杀伤活性的检测

将上述 AFP-DC,LacZ-DC 和 DC 分别和 T 细胞以 1:10 混合培养于 24 孔板,每孔加重组人 IL-2 100 U/ml。收集培养 7 d 的 T 细胞作为 CTL 效应细胞,以 Hepa1-6 和 EL-4 肿瘤细胞作为靶细胞进行标准的 4 h ⁵¹Cr 释放杀伤实验。CTL 活性按下列公式计算:

$$\text{杀伤率}(\%) = \frac{\text{实验组 cpm} - \text{自发释放组 cpm}}{\text{最大释放组 cpm} - \text{自发释放组 cpm}} \times 100\%$$

1.9 FACS 检测 AFP-DC 的内吞能力

各实验组 DC,铺 24 孔培养板[2.5×10⁵细胞/(孔·500 μl)],然后加入预冷 OVA-FITC,终浓度为 10 μg/ml,置 37℃,5% CO₂ 孵育 30 min,对照细胞加入 OVA-FITC 后仍置于冰上孵育 30 min。预冷 PBS 洗细胞 2 次后,以流式细胞仪检测平均荧光强度。

1.10 统计学处理

采用 t 检验,P<0.05 时有显著性差异。

2 结果

2.1 AFP-DC 分泌 AFP 水平的动态变化

为了确证腺病毒介导的 AFP 基因转染的有效性,采用电化学发光免疫测定法动态检测 AFP 基因转染后 DC 培养上清中 AFP 的分泌水平,DC 及转染了对照基因 LacZ 的 DC 不分泌 AFP,转染了 AFP 基因的 DC 分泌 AFP 的水平随时间的变化而不同,基因转染后 12 h 就可在其上清中检测到 AFP,48 h 达到高峰,随后其分泌表达逐渐减弱(图 1)。

图 1 AFP-DC 培养上清中 AFP 分泌水平

Fig.1 The kinetic level of AFP in the supernatants of AFP-DC in vitro

2.2 AFP-DC 表面分子的变化

AFP-DC 与 DC 比较 B7 分子明显上调, MHC 分子也有轻度升高, AFP-DC 上调 DC 的 MHC- I 和 MHC- II

类分子表达能力弱于 LacZ-DC, 却高于 DC 对照组(图 2)。

2.3 AFP-DC 激发同基因型小鼠 T 细胞增殖能力

图 2 FACS 检测 DC, LacZ-DC 和 AFP-DC 表面分子的变化

Fig. 2 FACS analysis of phenotypes of DC, LacZ-DC and AFP-DC

如图 3 所示, AFP-DC 激发同基因型小鼠 T 细胞增殖功能均明显高于 LacZ-DC 组和 DC 对照组($P < 0.05$), 这些结果证明腺病毒介导 AFP 转染后的 DC 能更有效地刺激自体 T 细胞增殖。

2.4 AFP-DC 体外诱导 CTL 及其杀伤活性

CTL 的诱导及其杀伤活性在肿瘤免疫治疗中起着非常关键的决定作用。我们进一步观察了 AFP-DC 体外诱导 CTL 及其杀伤活性情况。图 4 所示, AFP-DC 体外诱导的 CTL 对 Hepa1-6 肿瘤细胞杀伤作用具有特异性, 与 LacZ-DC 和 DC 比较有显著性差异($P < 0.01$)。AFP-DC 和 LacZ-DC 组、DC 组对 EL-4 均无杀伤作用, 差异无意义($P > 0.05$)。

2.5 AFP-DC 瘤苗内吞能力

FITC 的绿色荧光的平均荧光强度(Geo mean)代表 DC 吞入胞内的 OVA-FITC 的含量, 从而反映 DC 对外来抗原的内吞能力。图 5 所示, AFP-DC 和 LacZ-DC 组内吞功能均低于 DC 对照组, 表明基因转染后 DC 抗原摄取能力降低。

3 讨论

近年来, 随着部分肿瘤特异性抗原被识别和 DC 在抗肿瘤免疫中地位的确证, 人们开始应用肿瘤特异性抗原刺激 DC, 诱导针对肿瘤特异性抗原的 CTL, 最终用于肿瘤的预防和治疗。在尚未明确肝癌特异性抗原的情形下, 以 AFP 这一肝癌相关抗原作为肝癌生物治疗的切入点, 仍不失为一有希望的选择。Butter-

field^[5]和 Vallmer^[6]等设想以 AFP 作为肝癌生物治疗靶点的实验取得了初步结果,他们将 AFP 转染到 DC 中,发现被转染的 DC 能用 RT-PCR 方法检测到 AFP 的表达。而且,表达 AFP 的 DC 在体内或体外强烈诱发 T 细胞免疫反应,诱导特异性 CTL 及分泌 IFN- γ 。

重组腺病毒载体已被证明能高效介导小鼠和人 DC 的基因转移^[7-9],而并不影响 DC 诱导抗原特异性的免疫应答。本实验考虑到 DC 发育的生物学特性,选择了培养第 6 天的 BMDC 进行 AFP 转染,结果显示 AFP-DC 能分泌 AFP,表明腺病毒介导的 AFP 基因转染的有效性。

图 3 AFP-DC 激发同基因型小鼠 T 细胞增殖功能

Fig. 3 AFP-DC stimulated the proliferation of auto genotype T cells

图 4 AFP-DC 诱导特异性 CTL 杀伤能力检测

Fig. 4 Specific CTL cytotoxicity induced by AFP-DC
A: Hepa1-6 cell; B: EL-4 cell

图 5 AFP-DC 内吞 OVA-FITC 的 FACS 分析

Fig. 5 FACS analysis of AFP-DC endocytosis OVA-FITC

自体混合淋巴细胞反应在一定程度上反应刺激细胞的抗原提呈能力,成熟 DC 由于其表达高丰度的 MHC-II 和多种共刺激分子,因此其对淋巴细胞具有很强的刺激能力,而未成熟 DC 的刺激能力则较弱。本研究结果证明腺病毒介导 AFP 转染后的 DC 能更有效

地刺激自体 T 细胞增殖,也提示了 AFP 转染后 DC 更趋成熟,抗原提呈能力增强。

MHC 分子在机体 T 细胞介导的抗肿瘤免疫中发挥十分重要的作用,肿瘤细胞逃避免疫监视的另一重要机制是缺少 B7 分子表达^[10]。本研究结果显示,

AFP-DC 与 DC 比较 B7 分子明显上调, MHC 分子也有轻度升高, 在体外能增强 CTL 特异性杀伤作用, 抗原摄取能力降低, 抗原提呈功能增强, DC 更趋成熟。本实验为进一步应用 AFP-DC 治疗肿瘤提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] 郭建巍, 蔡美英, 魏大鹏, 等. 树突状细胞负载甲胎蛋白、细胞毒性 T 细胞表位肽后的免疫应答[J]. 中华肝脏杂志, 2002, 10(3): 178-180.
- [2] Iimuro Y, Fujimoto J. Strategy of gene therapy for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2003, 10(1): 45-47.
- [3] Takikawa H, Mafune K, Hamada H, *et al.* An advanced strategy of enhanced specific gene expression for hepatocellular carcinoma [J]. Int J Oncol, 2003, 22(5): 1051-1056.
- [4] 宋文刚, 于益芝, 曲迅, 等. 肿瘤细胞培养上清对小鼠骨髓来源的树突状细胞分化发育的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(2): 134-137.

- [5] Butterfield LH, Koh A, Meng W, *et al.* Generation of human T-cell responses to an HLA-A2. 1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein[J]. Cancer Res, 1999, 59(13): 3134-3142.
- [6] Vollmer CM, Eilber FC, Butterfield LH, *et al.* Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 1999, 59(13): 3064-3067.
- [7] Kirk CJ, Mule JJ. Gene-modified dendritic cells for use in tumor vaccines[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11: 797-806.
- [8] Monahan SJ, Salgaller ML. Viral vectors for gene transfer into antigen presenting cells[J]. Curr Opin Mol Ther, 1999, 1(5): 558-564.
- [9] Jenne L, Schuler G, Steinkasserer A. Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy[J]. Trends Immunol, 2001, 22(2): 102-107.
- [10] 张焯, 曹雪涛. 肿瘤免疫逃逸机制研究新进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(1): 72-74.

[收稿日期] 2003 - 10 - 20

[修回日期] 2003 - 11 - 10

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0273-01

腺相关病毒与变异体 DHFR 和 GFP 重组载体的构建及其在 NIH3T3 细胞中的表达

李黎波¹, 罗荣城¹, 冯 茹², 董 青³, 成 军³, 吴小兵⁴(1. 第一军医大学南方医院肿瘤科, 广州 510515; 2. 第一军医大学南方医院血液科, 广州 510515; 3. 北京 302 医院基因治疗研究中心, 北京 100000; 4. 中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京 100000)

全身化疗仍然是目前治疗恶性肿瘤的主要手段之一, 而化疗对骨髓造血的抑制严重影响治疗肿瘤的疗效。将耐药基因导入造血干细胞可以保护机体的造血, 从而提高对化疗敏感肿瘤患者对化疗药物的耐受性, 增大化疗药物的剂量, 缩短化疗间隔时间提高疗效。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)能稳定整合宿主细胞染色体中、感染静止期细胞和无致病性等优点, 已成为基因治疗中的热点载体。变异体二氢叶酸还原酶(Mutated dihydrofolate reductase L22Y/F31R, mDHFR)是 22 和 31 位置双突变的二氢叶酸还原酶, 具有对氨甲喋呤(Methymetroxate, MTX)高强度的耐药性, 同时又保留了野生型酶的催化活性, 是比较理想的耐药基因。绿色荧光蛋白(GFP)是一种新型报告基因。我们设计以 AAV 载体为基础, 利用 mDHFR 的耐药性, 以 GFP 为报告基因, 构建重组 AAV/mDHFR-GFP 重组载体, 包装成病毒后感染 NIH3T3 细胞, 用 PCR、荧光显微镜和流式细胞仪检测融合基因的表达, MTT 法观察转染 mDHFR-GFP 融合基因 NIH3T3 细胞对 MTX 的耐药性, 并探索 mDHFR 基因和 AAV 载体在基因治疗中的作用。先分别扩增耐药变异体二氢叶酸还原酶(mDHFR)和绿色荧光蛋白(GFP)基因片段, 并通过甘氨酸 LINKER 以 PCR 的方法将其连接在一起, 插入 T 载体, 酶切后插入 AAV

载体, 构建携带融合基因的重组腺相关病毒载体, 并使其在 NIH3T3 细胞中表达, 通过荧光显微镜、PCR 和流式细胞仪对融合基因的表达进行观察, 观察其对 MTX 的耐药性。结果显示重组载体可以将 mDHFR 和 GFP 融合基因导入 NIH3T3 细胞并成功表达, 荧光显微镜和流式细胞仪观察到绿色荧光蛋白表达的比率约为 25%, 且其对 MTX 耐药性增强。本实验以一种 AAV 的多克隆载体为基础, 成功构建了 rAAV/mDHFR-GFP 重组载体, 并检测证实其在 293 细胞中经辅助质粒和辅助病毒协同作用下包装成一定量的病毒颗粒, 重组病毒感染 NIH3T3 细胞后, 细胞耐药性明显增强。本研究的最终目的是将 mDHFR-GFP 融合基因导入外周造血干细胞中, 使 mDHFR 表达以提高造血干细胞对 MTX 的耐药性, 从而达到化疗时的造血功能保护作用, 为大剂量 MTX 化疗时的骨髓抑制以及如何将外源基因导入造血干细胞提供一条思路, 为转基因表达的检测建立一种简便易行的方法, 同时为腺相关病毒在基因治疗中的应用提供实验依据。

[关键词] 腺相关病毒; 变异体二氢叶酸还原酶; 绿色荧光蛋白; 基因转染

[中图分类号] R373.9

[文献标识码] D

[收稿日期] 2003 - 05 - 19

[修回日期] 2003 - 07 - 20