

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0027-04

锚定表达 GM-CSF 疫苗的抑瘤效果研究

程绍辉¹, 马晓慧¹, 陈兴², 于继云²(1. 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100022; 2. 北京军事医学科学院基础所, 北京 100850)

[摘要] 目的: 研究锚定表达 GM-CSF 的小鼠黑色素瘤作为肿瘤疫苗的有效性。方法: GM-CSF 基因嵌合 GPI 信号肽修饰序列实现在 B16 小鼠黑色素瘤细胞表面的锚定表达, 研究锚定修饰的 B16 细胞于同源 C57BL/6 小鼠的成瘤性及诱导抗肿瘤免疫的效果。结果: 抑瘤实验结果表明, 锚定修饰 GM-CSF 的肿瘤细胞免疫原性增强, 成瘤性明显下降; 成瘤率为 58.8%, 而肿瘤对照组为 100%。活瘤苗接种实验结果显示锚定修饰的肿瘤细胞可以预防肿瘤的发生, 肿瘤发生率仅为 20%, 说明抗肿瘤的免疫应答有记忆性, 能够有效地防止野生型肿瘤细胞的攻击。结论: 锚定修饰 GM-CSF 的肿瘤细胞可以诱导抗特异性的抗肿瘤反应, 这种设计可以应用于肿瘤疫苗的研究中。

[关键词] 膜表达; GM-CSF; 抗肿瘤免疫

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

The Antitumor Effects of Tumor Vaccine with Expression of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Anchored on Mouse Melanoma Tumor Cell Surface

CHENG Shao-hui¹, MA Xiao-hui¹, CHEN Xing², YU Ji-yun²(1. College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 10022, China; 2. Institute of Basic Medicine, Academy of Military Science, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the vaccine potency of GM-CSF anchored B16 tumor cells. **Methods:** In this study, mGM-CSF was expressed on surface of B16 mice melanoma cells by GPI-modifying. C57BL/6 mice were inoculated with GM-CSF anchored cells and wide-type B16 cells to evaluate whether the GM-CSF anchored cells could elicit a protective and systemic antitumor response. **Results:** GM-CSF anchored cells resulted in remarkable loss of tumorigenicity in syngeneic mice. The tumor occurrence rate of GM-CSF anchored B16 cells was 58.8% on C57BL/6 mice with 1×10^6 B16 cells/mice inoculated ($n = 12$) and that of wide-type B16 cells was 100%, The C57BL/6 mice receiving inoculation with 5×10^5 GM-CSF anchored cells/mice never grew tumor. These mice were challenged with wide-type B16 cells, and only a minority of mice grew tumor after wide-type B16 cells inoculation. **Conclusion:** GM-CSF protein anchored cells could elicit a protective and systemic antitumor responses.

[Key words] membrane expression; mGM-CSF; antitumor effects

* 如何产生针对肿瘤有效的免疫应答, 是肿瘤免疫治疗的关键。GM-CSF 可以通过募集外周 DC 前体并诱导 DC 成熟来促进抗原递呈细胞(APC)递呈肿瘤抗原和 T 细胞的活化^[1]。我们采用 GPI 锚定修饰的方法, 将 GM-CSF 表达于肿瘤细胞表面, 使机体对肿瘤局部产生有效的免疫应答, 借此打破肿瘤的免疫耐受状态, 有望达到较好的抗肿瘤效果。

1 材料与方

1.1 质粒、抗体、实验动物等

含有小鼠 GM-CSF 全长基因的质粒 PcDNA3.1-mGM, pCI-GPI 真核表达质粒本室保存; DMEM 培养基和胎牛血清购自 Hyclone 公司; Lipofectin 购自 GIBCO

[基金项目] 863 计划项目(2001AA217131)资助

[作者简介] 程绍辉(1973-), 男, 黑龙江省牡丹江市人, 博士, 助理研究员, 从事肿瘤免疫和肿瘤疫苗研究

[通讯作者] 于继云

公司;MTX 购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 抗体、荧光标记的羊抗人 IgG 抗体购自中山生物技术公司;BalB/c 小鼠、C57BL/6 小鼠均为雄性,6~8 周龄来自军事医学科学院实验动物中心,B16 小鼠恶性黑色素瘤细胞系本室保存。

1.2 质粒构建和转染

1.2.1 GPI 修饰的 GM-CSF 真核表达质粒的构建

含有 GPI 修饰信号序列的真核表达质粒 pCI-GPI,由本室构建。该质粒在 pCI-dhfr⁺ 载体基础上改造的,该载体含有扩增筛选基因 dhfr。GPI 信号肽序列融合到了人 IgG-Fc 基因羧基端,其氨基端含有多酶切位点,IgG-Fc 段融合基因以 Nhe I 和 Not I 连接于 pCI-dhfr⁺ 载体,并命名为 pCI-GPI 质粒。感兴趣的基因可通过多酶切位点插入载体,表达的蛋白为含人 IgFc 和 GPI 结构的融合蛋白,并可通过羧基端的 GPI 结构锚定于细胞膜表面。质粒构建方法参照文献[3]进行。以高保真酶扩增 mGM-CSF 基因并删去终止密码子,以 Nhe I 和 EcoR I 插入 pCI-GPI 载体的酶切位点,将重组质粒命名为 pCI-mGM 载体。分子生物学操作方法参照分子克隆第 3 版。

1.2.2 脂质体介导重组质粒转染 B16 细胞

采用 Lipofectin 试剂转染 pCI-mGM 质粒于 B16 黑色素瘤细胞,按 promega 试剂说明书进行,同时转染空载体作为对照。

1.3 锚定表达 GM-CSF 细胞株的鉴定

融合基因中含有人 IgG Fc 段基因序列,分别采用直接 ELISA 法和直接免疫荧光鉴定 GM-CSF 融合蛋白中人 IgG Fc 段在转染质粒的 B16 细胞表面的表达。

1.4 抑瘤实验研究

1.4.1 成瘤性观察

观察 B16 肿瘤细胞锚定表达 mGM-CSF 蛋白与分泌表达 mGM-CSF 对小鼠成瘤性的影响,胰酶消化体外培养的 B16 细胞,PBS 洗 3 遍,过 200 目筛网得到单细胞悬液,细胞计数并调整细胞浓度后接种小鼠背部腋下,每只小鼠接种 10^6 /ml 细胞,动物实验分 2 组进行,分别在 C57BL/6 小鼠皮下接种正常 B16 肿瘤细胞、和锚定表达 mGM-CSF 的 B16 细胞,肿瘤生长情况以是否成瘤,成瘤潜伏期、荷瘤小鼠存活期来评价。是否成瘤以观察 30 d 内肿瘤结节大小直径达到 5 mm 来衡量。成瘤潜伏期和存活期分别为生成肿瘤结节和荷瘤小鼠死亡所需的天数表示。30 d 后,将 1×10^5 个 B16 正常肿瘤细胞经皮下注射入接种了 B16 细胞而未长出肿瘤的实验小鼠右侧背部,观察是否有肿瘤出现。

1.4.2 锚定 GM-CSF 蛋白的肿瘤细胞在同源小鼠的疫苗作用

分别取 10 只 C57BL/6 小鼠,于左侧背部皮下接种 5×10^5 个膜表达 GM-CSF 蛋白的活 B16 细胞,14 d 后,接种 1×10^6 肿瘤细胞于小鼠右侧背部皮下。接种活疫苗在同源小鼠后,观察是否成瘤、原发成瘤的成瘤时间,接种野生型肿瘤攻击后记为开始,观察继发肿瘤是否成瘤及其成瘤时间。

1.5 统计学处理

本实验中数据均采用未配对资料的 *t* 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 锚定表达 mGM-CSF 的 B16 细胞株的生长观察及重组蛋白的 ELISA 鉴定

转染质粒的 B16 细胞成长速度与亲本一样,用辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 抗体(1/500 倍稀释)鉴定转基因细胞表面 GM-CSF 重组蛋白中 Fc 段的表达。加压筛选后的单克隆细胞株细胞做 ELISA 鉴定其重组蛋白中的 Fc 段的表达情况,借此估计重组蛋白的 mGM-CSF 表达水平。设 5 个复孔取 OD 平均值比较阳性克隆细胞株表达水平,空载体对照组 OD 值为 0.101,转染 pCI-GM 质粒组为 0.552。证明蛋白表达成功。

pCI-GPI-mGM 载体包含有人 IgG 抗体 Fc 段,可用于检测重组蛋白的表达。免疫荧光结果表明:转染的 pCI-GPI-mGM 质粒的 B16 细胞有重组蛋白的表达,主要在细胞膜上表达,证明 GPI 锚定重组蛋白膜锚定表达成功(图 1A);而 pCI-dhfr 空载体转染的细胞,免疫荧光染色结果均为阴性(图 1B)。

2.2 成瘤率观察、成瘤时间观察

观察肿瘤对照组、表面修饰 mGM-CSF 蛋白的肿瘤细胞组 2 组肿瘤成瘤情况,结果表明,肿瘤对照组 100% 成瘤,分泌表达组成瘤率也是 100%,锚定表达组成瘤率为 58.33%;30 d 后,对未发生肿瘤的小鼠接种 B16 正常肿瘤细胞,再观察 30 d 未见肿瘤生长,可以认为抑制了肿瘤生长。

成瘤潜伏期时间比较结果表明,肿瘤对照组(14.8 ± 1.4) d,锚定表达组(25 ± 2.38),与肿瘤对照组相比差异极显著($P < 0.01$);说明可以明显地抑制肿瘤的发生,延长肿瘤发生时间。

2.3 生存时间观察结果

生存时间观察结果证实 GM-CSF 锚定修饰肿瘤细胞可以明显延长生命存活期,平均生存时间为 42.4 d,肿瘤对照组平均生存期为 32.6 d,生存延长率为 30.1%,但统计分析结果差异不显著。表面锚定修饰 GM-CSF 蛋白的 B16 细胞与肿瘤正常细胞组的肿瘤成瘤

性、成瘤潜伏期和平均生存期的比较结果见(表1)。

图1 细胞免疫荧光法检测 B16 细胞表面表达的 GPI-mGM

Fig.1 Fusion protein expression on the B16 cell surface identified by immunofluorescence stain

A: Fc fusion protein expressed on B16 cells transfected with plasmid pCI-GPI-mGM; B: Negative protein expressed on B16 cells transfected with plasmid pCI-dhfr

2.4 活疫苗的疫苗作用实验

表1 实验组的肿瘤成瘤性、成瘤潜伏期、平均生存期结果

Tab. 1 Comparison of tumor occurrence, latent time and survival time between tumor cells group and GM-CSF protein anchored cells group

Groups	Tumor occurrence	Latent time	Survival time
Tumor cells group	100%(5/5)	14.8 ± 1.4	32.6 ± 7.9
GM-CSF protein anchored cells group	58.33%(7/12)	25 ± 2.38*	42.4 ± 5.5*

* P < 0.01

表明,锚定表达 GM-CSF 的 B16 细胞肿瘤成瘤性明显降低,成瘤时间延长。进一步的实验研究表明,GM-CSF 蛋白锚定于细胞表面的抑瘤效果较分泌表达 GM-CSF 更好,分泌表达 GM-CSF 实验组肿瘤成瘤率明显高于锚定表达组(未发表数据),活疫苗接种实验表明接种锚定修饰 GM-CSF 蛋白的 B16 细胞可以激发机体特异性的抗肿瘤免疫应答,并且这种免疫应答有免疫记忆的特征,可以防御其后野生型肿瘤细胞的攻击。

接种 5×10^5 个膜表达 mGM-CSF 蛋白的 B16 活细胞接种小鼠皮下,观察 30 d 内未发现小鼠左侧背部有肿瘤发生,而接种同样剂量的 B16 正常细胞却可观察到肿瘤的生长。接种野生型肿瘤细胞后,观察 30 d 后未发现继发肿瘤生长,说明接种细胞膜修饰有 GM-CSF 蛋白的 B16 细胞作为活疫苗确实有预防肿瘤发生的作用,而且这种免疫具有记忆性可以防止其后野生型肿瘤攻击。

3 讨论

在肿瘤免疫治疗研究中,利用基因修饰的肿瘤细胞来分泌细胞因子可以增强机体对肿瘤相关抗原的免疫反应,其中最希望的细胞因子是粒/巨细胞集落因子(GM-CSF),它有自分泌和旁分泌两种表达形式,对单核细胞和树突状细胞均产生影响^[1]。肿瘤细胞分泌 GM-CSF 可刺激产生强大的抗肿瘤免疫反应,一致的观点认为 GM-CSF 刺激 APC 细胞尤其是 DC 细胞产生强大的免疫应答^[2]。我们将 GM-CSF 锚定于肿瘤细胞表面,可以借助 DC 细胞表面的 GM-CSF 受体靶向肿瘤抗原于 DC 细胞,而优化抗原提呈的过程。糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白(Glycosylphosphatidy-1-inositol-anchored protein, GPI-anchored protein),是细胞表面蛋白的一种类型,它只通过糖基化磷脂酰肌醇结构将重组蛋白锚定于细胞膜表面^[3]。在前期工作中,我们已完成了 GPI 锚定修饰的载体构建工作^[4],并实现了 GM-CSF 在 B16 细胞表面的锚定表达。通过动物实验结果

国外有研究报道,将粒细胞集落因子基因连接于血小板生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor PDGFR)跨膜区的上游,而实现了在细胞膜表面的表达,也取得了较好的抑瘤效果^[5]。

我们认为是锚定表达的 GM-CSF 引发特异性的抗肿瘤免疫应答的可能机制是:(1) DC 细胞借助于 mGM-CSF 受体与 mGM-CSF 结合,并完成 DC-GM-Ag 三者一体的联结,有利于 DC 细胞摄取肿瘤抗原。(2)

树突状细胞可通过其表面 GM-CSF 的受体偶合多个 GM-CSF 分子,从而可以提高激活 DC 细胞的效率。GM-CSF 促进 DC 细胞成熟,表达 MHC-I、MHC-II 分子和高表达 B7 分子,提高激活初始 T 细胞的能力。在肿瘤细胞表面锚定表达 GM-CSF 对于介导多个 GM-CSF 与 DC 连接,引发信号传导加速抗原递呈和向淋巴组织迁移提供了便利,可以认为锚定修饰诱发的特异性抗肿瘤反应机制是优化了 DC 成熟、迁移的信号传递机制过程^[5]。

通过锚定技术将免疫分子锚定表达于肿瘤细胞表面,有利于介导肿瘤免疫应答,改善肿瘤局部的免疫微环境,纠正机体对肿瘤的免疫耐受状态,从而诱导特异性的抗肿瘤免疫应答。本次研究的结果证实锚定修饰 GM-CSF 可以诱导抗肿瘤的免疫应答,为进一步研究和开展表面修饰肿瘤疫苗的工作打下了基础。

[参考文献]

· 科技动态 ·

多肽致敏的树突状细胞的免疫注射途径控制效应性 T 细胞与记忆性 T 细胞在淋巴组织中的分布,并决定局部肿瘤免疫的类型

研究表明,树突状细胞(Dendritic Cell, DC)的注射途径不同能够引发机体的不同部位产生不同程度的细胞免疫应答。而应答之后产生的记忆性淋巴细胞的分布与抗原递呈细胞(Antigen Presenting Cell, APC)和 T 淋巴细胞作用的部位有关,但其产生和归巢机制尚不清楚,尤其是记忆性 CD8⁺ T 细胞。为研究使用体外致敏 DC 进行肿瘤主动免疫治疗的方法,作者使用不同的注射途径进行实验,验证了其针对不同部位肿瘤的抑制能力。

使用表达重组 MHC-I 类分子(AAD)的转基因小鼠和 B16-AAD 黑色素瘤细胞。为研究抑制皮下肿瘤生长的机制,给小鼠进行同剂量 DC 接种,分别用皮下注射肿瘤特异抗原(Tyr369Y)致敏的 DC,静脉注射 Tyr369Y 致敏的 DC,皮下注射非特异性抗原(Influenza A M1)致敏的 DC 以及皮下注射未致敏的 DC,另设一组空白对照。3 周后皮下推注 4×10^5 黑色素瘤细胞 200 微升,每隔 72 小时用游标卡尺测量瘤表面积。皮下注射 Tyr369Y 致敏 DC 的小鼠,肿瘤生长明显滞后,存活时间显著延长;而静脉注射即使提高剂量(5×10^5)后仍无效果。进一步研究其原因,待肿瘤生长至 150 mm² 切除,用 HLA-A*0201-Tyr369Y 四聚体检测 T 细胞,结果皮下注射的小鼠产生大量特异性 T 细胞,静脉注射未出现同样结果。为研究抑制肺转移结节生长的机制,分别给小鼠进行皮下和静脉注射不同剂量的致敏 DC,3 周后静脉注射 4×10^5 瘤细胞 200 微升。注射后 21 d 将小鼠处死,对肺转移结节进行显微测量。结果静脉注射的小鼠肿瘤生长明显被抑制,皮下注射也产生了一定的抑制。用切除外周淋巴结的 AAD+白化病小鼠实验,可抑制肺转移结节但不能抑制皮下肿瘤的生长。用切除脾的小鼠进行实验,可抑制皮下肿瘤但不能抑制肺转移结节的生长。为测定注射途径是否决定 DC 的分布,分别进行皮下及静脉注射 CFSE(5-羧基荧光素二乙酸酯)标记的 DC,4,24,72 h 后 3 次收集脾和淋巴结内的淋巴细胞,通过流式细胞术测定 DC 数量。结果显示,皮下注射的 DC 进入腋下引流淋巴结和脾,而静脉注射 DC 全部进入脾。为分析 DC 在次级淋巴组织中的分布对特异性 T 细胞活化增殖的影响,在皮下和静脉注射 7 d 后,使用 HLA-A*0201-Tyr369Y 四聚体检测特异性 CD8⁺ T 细胞并用抗 IFN- γ -FITC 检测细胞内 IFN- γ 的量,结果显示皮下注射 DC 后,脾与腋下淋巴结中特异性 T 细胞数量相当;而静脉注射后脾中特异性 T 细胞数量约为皮下注射的 2 倍,腋下淋巴结中几乎没有。为了检测记忆性 T 细胞的驻留部位,接种过的小鼠静脉注射重组病毒苗 hTyrVac,4 d 后检测记忆性 T 细胞的数量。结果显示皮下接种的小鼠腋下淋巴结与脾产生明显应答,但同时各外周淋巴结也产生较低的应答;而静脉注射的小鼠只有脾产生应答。

综合上述实验,皮下注射致敏活化的 DC 后,明显迁移到引流淋巴结,其余进入脾,能诱发这些淋巴组织中的 CD8⁺ T 细胞发生特异性应答,而产生的记忆性 T 细胞分布于接种部位处的引流淋巴结及外周的淋巴组织中。经静脉注射的 DC 全部进入脾,产生的记忆性 T 细胞驻留在脾中。同时,外周淋巴结对抑制皮下黑色素瘤的生长是必需的,而脾中的记忆性 T 细胞对抑制肺转移结节的生长是必需的。表明 DC 的注射途径不同决定了 T 细胞在淋巴组织中的分布,并产生不同的抗肿瘤效应。

[高国强摘,于益芝 审阅 [英] David W. Mullins, Stacey L. Sheasley, Rebecca M. Ream, ...//J Exp Med, 2003,198(7): 1023-1034]

- [1] Sieff CA, Emerson SG, Donahue RE, *et al.* Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: A multilineage hematopoietin[J]. *Science*, 1985, 230: 1171.
 - [2] Soiffer R, Lynch T, Mihm M, *et al.* Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 13141.
 - [3] 庞志宇, 畅继武. 糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白转化法——一门全新的细胞表面工程学[J]. *国外医学分子生物学分册*, 2000, 22(2): 105.
 - [4] 于继云, 沈倍奋, 黎燕, 等. GPI-CTLA4Ig 嵌合分子的构建和在 CHO-dhf⁻细胞膜上的表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(3): 212.
 - [5] SooHoo W, Lundeen KA, Kohrunel JR, *et al.* Tumor cell surface expression of granulocyte macrophage colony-stimulating factor elicits antitumor immunity and protects from tumor challenge in the P815 mouse mastocytoma tumor model[J]. *Immunology*, 1999, 162(12): 7343-7349.
- [收稿日期] 2003-09-02 [修回日期] 2003-12-05