

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.007

· 基础研究 ·

GM-CSF 膜修饰 B16. F10 黑素瘤细胞疫苗对小鼠种植肿瘤的抑制作用

杨传红, 王捷*, 陈鸣丽, 洗江, 詹纯列, 肖育华, 夏冰(广州军区广州总医院 医学实验科, 广东 广州 510010)

[摘要] 目的: 研究粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)膜修饰小鼠黑素瘤 B16. F10 细胞制备的疫苗对小鼠种植肿瘤的抑制作用。方法: 采用生物素-链亲合素-GM-CSF 融合蛋白技术制备 GM-CSF 膜修饰 B16. F10 黑素瘤细胞疫苗, 将 BALB/c 小鼠随机分为 GM-CSF 膜修饰 B16. F10 细胞疫苗组、GM-CSF 与 B16. F10 细胞混合疫苗组、B16. F10 细胞疫苗组、GM-CSF 组、生理盐水组。各组于第 1 天和第 7 天分别进行免疫接种, 第 14 天皮下注射 0.2 ml B16. F10 细胞(1×10^6 个细胞) 进行攻击, 观察各组小鼠无瘤率和生存期; 攻击后 24 d 用 ELISA 法检测小鼠脾细胞 INF- γ 分泌水平。结果: 接受 B16. F10 细胞攻击后第 60 天和第 90 天, GM-CSF 膜修饰 B16. F10 细胞疫苗组小鼠均未成瘤, 存活率为 100%; GM-CSF 与 B16. F10 细胞混合组无瘤率分别 50% 和 40%, 存活率分别为 70% 和 40%; B16. F10 细胞疫苗组无瘤率均为 20%, 存活率分别为 80% 和 20%; GM-CSF 组和生理盐水组无瘤率为 0, 无小鼠存活。GM-CSF 膜修饰 B16. F10 细胞疫苗组的 INF- γ 分泌量比其他组明显升高($P < 0.01$)。结论: GM-CSF 膜修饰 B16. F10 肿瘤细胞疫苗可以激发 BALB/c 小鼠特异性抗肿瘤免疫反应, 有效防止 B16. F10 肿瘤细胞的攻击。

[关键词] 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; 黑素瘤细胞; 膜修饰; 肿瘤疫苗

[中图分类号] R739.5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0136-04

Inhibitory effect of GM-CSF membrane-modified melanoma cell B16. F10 vaccine against implanted tumors in mice

YANG Chuan-hong, WANG Jie, CHEN Ming-li, XIAN Jiang, ZHAN Chun-lie, XIAO Yu-hua, XIA Bing (Department of Medical Research, Guangzhou General Hospital, PLA Guangzhou Military Area Command, Guangzhou 510010, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor) membrane-anchored B16. F10 (murine melanoma cell line) vaccine against implanted tumors in mice. **Methods:** GM-CSF membrane-anchored B16. F10 vaccine was prepared by fusing biotin-avidin-GM-CSF together. BALB/c mice were randomly divided into 5 groups: GM-CSF membrane-anchored B16. F10, B16. F10 mixed with GM-CSF, B16. F10 cells, GM-CSF and 0.9% sodium chloride. At day 1 and 7, all BALB/c mice were immunized; at day 14, all the mice received subcutaneous injection of 0.2 ml wild-type B16. F10 cells (1×10^6 cells). Tumor-free rate and survival time of different groups were measured. INF- γ levels in splenocytes were detected by ELISA at day 24 in different groups. **Results:** Sixty days and 90 d after subcutaneous injection with B16. F10 cells, tumor-free rate and survival rate of mice in GM-CSF membrane-anchored B16. F10 group, B16. F10 mixed with GM-CSF group, B16. F10 cell group were 0% and 0%, 100% and 100%; 50% and 40%, 70% and 40%; 20% and 20%, and 80% and 20%, respectively. The tumor-free rate and survival rate of mice in GM-CSF group and 0.9% sodium chloride group were both 100% and 0%, respectively. INF- γ levels in splenocytes in GM-CSF membrane-anchored B16. F10 group were significantly higher than those of other groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** GM-CSF membrane-anchored B16. F10 vaccine can induce specific anti-tumor immunity in mice and can prevent later B16. F10 tumor cells challenge.

[Key words] GM-CSF; melanoma cell; membrane modification; tumor vaccine

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 136-139]

[基金项目] 广东省自然科学基金重点资助项目(No. 06104396)。Supported by the Natural Science Key Program of Guangdong Province (No. 06104396)

[作者简介] 杨传红(1963-), 女, 吉林省长春市人, 副主任技师, 主要从事肿瘤分子生物学研究

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: jiew@tom.com

对肿瘤细胞进行修饰以增强其免疫原性和免疫效应是肿瘤细胞疫苗制备的主要途径。目前修饰的主要方法采用基因转染技术,但是基因转染存在很多局限性,主要表现在注入体内的各种疫苗载体,有将传染源或其他毒性分子带给患者的潜在危险;另外,在利用基因工程肿瘤疫苗时,外源基因持续表达、外源抗原或插入激活内源性致癌基因,都有引起新的疾病和致癌的可能。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)具有增强树突状细胞抗原提呈功能,从而提高机体对特异性肿瘤抗原的识别能力^[1-7]。本研究采用生物素-链亲合素- GM-CSF 融合蛋白技术,通过生物素与链亲合素的特异性结合,将 GM-CSF 固定在小鼠黑素瘤细胞 B16. F10 细胞表面,形成新型的肿瘤疫苗,以期增强 GM-CSF 膜修饰 B16. F10 免疫接种 BALB/c 小鼠的抗肿瘤保护效果^[8]。

1 材料与方法

1.1 细胞株、试剂和实验动物

Sulfo-NHS-LC-生物素、链亲合素/粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子融合蛋白(SA/GM-CSF)由广州启星生物科技有限公司提供。小鼠黑素瘤 B16. F10 细胞株由本室保存。RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司,小牛血清购自杭州四季青公司,小鼠 IFN- γ ELISA 检测试剂盒购自晶美生物技术公司。BALB/c 小鼠 8 周龄雌性小鼠(SPF 级)购自南方医科大学实验动物中心[实验许可证号:SYXK(军) 2002-039]。

1.2 肿瘤细胞疫苗的制备

GM-CSF 膜修饰 B16. F10 细胞疫苗的制备: 5×10^7 个 B16. F10 黑素瘤细胞悬浮于 1 ml 50 mmol/L PBS (pH 7. 2),加 10 ml Sulfo-NHS-LC-生物素 (0. 05 mg/L)并混匀,室温 30 min, 50 mmol/L PBS (pH 7. 2)离心洗涤 3 次,加 10 ml 0. 005 mg/ml SA/GM-CSF 冰上 30 min, 50 mmol/L PBS (pH 7. 2)离心洗涤 3 次,通过链亲合素的桥联作用将 GM-CSF 固定在 B16. F10 细胞膜表面。再加 2 ml 生理盐水,按 1 ml/支分装,细胞密度为 $2. 5 \times 10^7$ /ml,经 10 Gy γ 射线灭活后获得 GM-CSF 膜修饰 B16. F10 细胞疫苗,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

GM-CSF 混合 B16. F10 细胞疫苗的制备: 5×10^7 个 B16. F10 细胞悬浮在 2 ml 0. 025 mg/ml GM-CSF 中,按 1 ml/支分装,细胞密度为 $2. 5 \times 10^7$ /ml,

经 10 Gy γ 射线灭活,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

B16. F10 细胞疫苗的制备: 将 5×10^7 个 B16. F10 细胞用 2 ml 生理盐水悬浮,按 1 ml/支分装,细胞密度为 $2. 5 \times 10^7$ /ml,经 10 Gy γ 射线灭活,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.3 实验动物的分组

将 BALB/c 小鼠随机分为 5 组: (1)GM-CSF 膜修饰 B16. F10 细胞疫苗组; (2)GM-CSF 混合 B16. F10 细胞疫苗组; (3)B16. F10 细胞疫苗组; (4)GM-CSF 组; (5)生理盐水组。每组均为 13 只,其中 10 只用来测存活时间和成瘤率,3 只用于检测小鼠脾细胞 INF- γ 分泌水平。

1.4 肿瘤疫苗的抑瘤实验

各组小鼠分别接受 2 次肿瘤疫苗免疫接种,第 1 天和第 7 天在右后肢股四头肌处皮下接种 0. 2 ml (5×10^6 个细胞)疫苗、GM-CSF 或生理盐水。第 14 天后于对侧皮下注射 0. 2 ml B16. F10 细胞 (1×10^6 个细胞)。观察各组小鼠成瘤率和存活时间,连续观察 90 d。

1.5 ELISA 法检测免疫小鼠脾细胞 IFN- γ 的分泌水平

B16. F10 细胞攻击接种后第 24 天,每组分别取 3 只小鼠进行脾细胞悬液制备,将小鼠脾细胞作为效应细胞(E),射线灭活的 B16. F10 细胞作为刺激原细胞(T),按 E/T 比为 1: 50 混合后置 5% CO₂ 培养箱中培养 5 d 后收集上清,用双抗夹心法检测小鼠脾细胞的 INF- γ 分泌水平

1.6 统计学处理

用 SPSS13. 0 统计学软件进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 不同种类肿瘤疫苗对 B16. F10 细胞种植瘤的抑制作用

2.1.1 种植瘤成瘤率的比较 小鼠接受 B16. F10 细胞种植后第 60 天和 90 天,GM-CSF 膜修饰 B16. F10 细胞疫苗组小鼠均未成瘤;而 GM-CSF 混合 B16. F10 细胞疫苗组的成瘤率分别为 50% (5/10)和 60% (6/10);B16. F10 细胞疫苗组的成瘤率为 80% ;GM-CSF 组和生理盐水组小鼠成瘤率为 100% (图 1)。GM-CSF 膜修饰 B16. F10 细胞疫苗组与其他组比较,无瘤率差异具有统计学意义 (*P* < 0. 01),表明 GM-CSF 膜修饰 B16. F10 细胞疫苗的抗 B16. F10 种植瘤的作用最强,GM-CSF 混合 B16. F10 细胞疫苗次之。

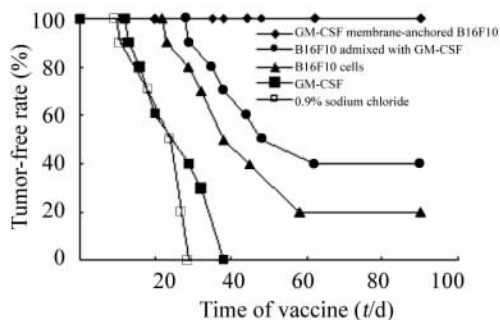


图1 不同免疫组小鼠无瘤率比较

Fig. 1 Tumor-free rates of tumor-bearing mice in different vaccine-immunized groups

2.1.2 荷瘤小鼠存活时间的比较 B16. F10 细胞接种后连续观察 90 d, GM-CSF 膜修饰 B16 细胞疫苗组的荷瘤小鼠存活率为 100%, 而 GM-CSF 混合 B16. F10 细胞疫苗组第 60 天和 90 天的荷瘤小鼠存活率分别为 70% 和 40%; B16. F10 细胞疫苗组第 60 天和第 90 天的存活率分别为 70% 和 20%; GM-CSF 组存活 41 d; 生理盐水组存活 45 d (图 2)。GM-CSF 膜修饰 B16 细胞疫苗组的荷瘤小鼠存活率明显高于其他组的存活率 ($P < 0.01$)。

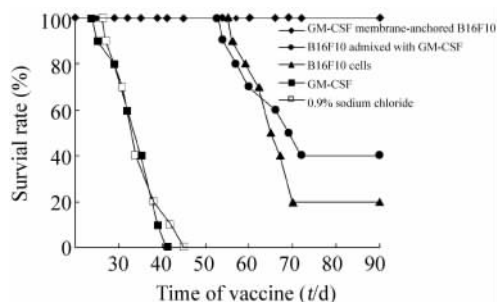


图2 各种肿瘤疫苗治疗后荷瘤小鼠的存活曲线

Fig. 2 Survival curves of tumor-bearing mice after immunized with different vaccines

2.2 疫苗免疫荷瘤小鼠脾细胞的 IFN- γ 分泌水平

采用 ELISA 双抗体夹心法检测肿瘤疫苗免疫小鼠被 B16. F10 攻击 24 d 脾细胞 IFN- γ 的分泌水平, GM-CSF 膜修饰 B16. F10 细胞疫苗组与其他组相比, IFN- γ 分泌量明显提高 ($P < 0.01$, 表 1)。

3 讨论

肿瘤疫苗免疫后可诱导产生一定的体液免疫和细胞免疫反应, 表现为 T 细胞增殖活性增强, 但免疫应答的强弱是否可以使机体抵御肿瘤细胞的攻击, 即疫苗对机体的保护作用如何仍不清楚。而肿

瘤的保护率, 即是实验动物对免疫接种疫苗而产生的抵抗相应肿瘤的能力的测定, 也是目前评价肿瘤疫苗效果的最直接的方法。本实验用 Sulfo-NHS-LC-Biotin-SA-GM-CSF 融合蛋白^[9], 将 GM-CSF 锚定在 B16. F10 细胞表面, 此疫苗不跨越磷脂膜双层结构, 也无胞内区, 用此方法制备的 GM-CSF 膜修饰 B16. F10 肿瘤疫苗, 能利用 GM-CSF 具有刺激 DC 细胞分化、成熟并捕获、加工、提呈抗原, 激活 CTL, 引起机体抗肿瘤免疫应答的特性, 来增强肿瘤疫苗诱导主动免疫的能力^[10-13]。而 GM-CSF 混合 B16. F10 细胞疫苗组仅仅是简单地将 Biotin-SA-GM-CSF 融合蛋白和 B16. F10 细胞混合在一起, 不是通过特殊的锚定技术将 Sulfo-NHS-LC-Biotin-SA-GM-CSF 融合蛋白锚定在 B16. F10 细胞表面, 因此达不到预期的肿瘤免疫效果。本实验结果表明, GM-CSF 膜修饰 B16. F10 肿瘤疫苗接种能有效地保护小鼠免受小鼠黑素瘤细胞 B16. F10 的攻击, GM-CSF 膜修饰 B16. F10 肿瘤疫苗组小鼠脾细胞的 IFN- γ 分泌水平也比其他组明显提高。IFN- γ 不仅可使单核细胞向不典型的成熟的 DC 方向分化, 还能分泌大量的细胞因子来调节和参与免疫应答^[14-16], 增强肿瘤细胞的免疫原性, 直接激活免疫活性细胞, 改善肿瘤局部微环境和机体对肿瘤的免疫耐受状态, 从而诱发机体的特异性抗肿瘤免疫反应。

表1 疫苗免疫小鼠脾细胞 IFN- γ 的分泌水平
($n = 5, \bar{x} \pm s, \rho_B/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)Tab. 1 IFN- γ levels of splenocytes in different vaccine-immunized mice ($n = 5, \bar{x} \pm s, \rho_B/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Group	IFN- γ
GM-CSF membrane-anchored B16. F10	5.41 $\pm$ 1.12 **
B16. F10 mixed with GM-CSF	3.34 $\pm$ 0.77
B16. F10 cell	3.63 $\pm$ 0.65
GM-CSF	2.91 $\pm$ 1.01
0.9% sodium chloride	2.73 $\pm$ 0.48

** $P < 0.01$ vs other groups

目前膜修饰肿瘤疫苗存在修饰量不易控制、修饰因子是否失活以及操作过程是否简单易行等问题^[16]。本实验采用独特的“锚定”生物技术, 对小鼠黑素瘤细胞 B16. F10 进行修饰, 通过链亲合素的桥联作用将 Sulfo-NHS-LC-Biotin-SA-GM-CSF 稳定地固定在 B16. F10 细胞膜表面。该法可同时将多种具有免疫协同作用的细胞因子和免疫刺激辅助分子

“锚定”在肿瘤细胞表面,且“锚定”的量可进行控制,从而有助于机体产生有效的抗肿瘤免疫反应。由于不存在因病毒插入细胞染色体而激活癌基因的危险,且整个过程可在 4 h 内完成,因此该技术具有方法简单易行、安全性好,易于推广的优点,为其他细胞因子修饰肿瘤细胞疫苗的制备奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Gao J, Huang S, Li M, *et al.* GM-CSF-surface-modified B16. F10 melanoma cell vaccine [J]. *Vaccine*, 2006, 24(25): 5265-5268.
- [2] Sano T, Cantor CR. Streptavidin-containing chimeric proteins: design and production [J]. *Methods Enzymol*, 2000, 623: 305-311.
- [3] Berhanu A, Huang J, Alber SM. Combinational FL13 ligand and granulocyte macrophage colony-stimulating factor treatment promotes enhanced tumor infiltration by dendritic cells and antitumor CD8(+) T-cell cross-priming but is ineffective as a therapy[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4895-4903.
- [4] Svane IM, Berntsen A, Trepikak R, *et al.* Dendrite cell-based cancer vaccines--clinical application [J]. *Ugeskr Laeger*, 2006, 168(14): 1415-1420.
- [5] Schnurr M, Galambos P, Scholz C, *et al.* Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an *in vitro* model for the assessment of tumor vaccines [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(17): 6445-6450.
- [6] Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D *et al.* Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(7): 1633-1641.
- [7] 朱一蓓,张学光,黄 勇,等. 肿瘤患者外周血单个核细胞来源 DC 的体外诱导及其功能[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(3): 264-268.
- [8] Zheng X, Koropatnick J, Li M, *et al.* Reinstalling antitumor immunity by inhibiting tumor-derived immunosuppressive molecule IDO through RNA interference [J]. *J Immunol*, 2006, 177(8): 5639-5646.
- [9] 高基民. 链亲和素/粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子融合蛋白: 中国, 200410052536[P]. 2004-10-08.
- [10] 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(22): 13141-13146.
- [11] McHugh RS, Ahmed SN, Wang YC, *et al.* Construction, purification, and functional incorporation on tumor cells of glycolipid-anchored human B7-1 (CD80) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(17): 8059-8063.
- [12] Roudkenar MH, Bouzari S, Kuwahara Y, *et al.* Recombinant hybrid protein, Shiga toxin and granulocyte macrophage colony stimulating factor effectively induce apoptosis of colon cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(15): 2341-2344.
- [13] Vuylsteke RJ, Molenkamp BG, van Leeuwen PA, *et al.* Tumor-specific CD8⁺ T cell reactivity in the sentinel lymph node of GM-CSF-treated stage I melanoma patients is associated with high myeloid dendritic cell content [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(9): 2826-2833.
- [14] 王惠明,王沂芹,阮志华,等. IFN- γ 促进人单核细胞向不典型的成熟的 DC 方向分化[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(3): 234-237.
- [15] Delneste Y, Charbonnier P, Herbault N *et al.* Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages [J]. *Blood*, 2003, 101(1): 143-150.
- [16] Wahlsten JL, Mills CD, Ramakrishnan S, *et al.* Antitumor response elicited by a superantigen-transmembrane sequence fusion protein anchored onto tumor cells [J]. *J Immunol*, 1998, 161(12): 6761-6767.

[收稿日期] 2008 - 12 - 24

[修回日期] 2009 - 02 - 25

[本文编辑] 王 莹

· 科技动态 ·

依赖 Foxp3 的 MicroRNA155 负调控 SOCS1 促进 Treg 细胞的生存

microRNA 可以通过靶向于 mRNA,对在器官发育、细胞分化、内环境稳定中发挥作用的基因起调控作用。Foxp3⁺ Treg 中特异性敲除 *Dicer1* 基因可引起致命性的自身免疫疾病,这与在缺失 Treg 细胞的 Foxp3 缺陷小鼠中观察到的现象一致,说明 miRNAs 对维持 Treg 的抑制功能发挥作用。霍华德休斯医学研究中心免疫系的 Lu 等学者研究了 miR155 在 Treg 细胞的分化、维持和发挥功能方面的作用。研究发现在胸腺细胞的分化过程中, Foxp3 的上调可以导致 miR155 的表达升高, miR155 在 Treg 中的高水平表达依赖于 Foxp3 的持续表达。miR155 的缺失会导致 Treg 细胞数量的减少,但这种减少并不是由 Treg 的凋亡和增殖特性的改变引起。miR155 的缺失并未引起 Treg 细胞对诱导凋亡的敏感性增加,也未显著减弱 Treg 的抑制功能。但是,升高的 miR155 可以使 Treg 细胞增强对其主要促生长因子 IL-2 的敏感性,下游 STAT5 的磷酸化程度增加。Treg 细胞在 IL-2 有限的环境中生存竞争力增强,但在 IL-2 充足的环境中这种促进作用并不明显。这种效应是通过 miR155 下调 SOCS1(细胞因子信号转导通路抑制分子)蛋白的表达水平来实现的。

该项研究为细胞表型的维持需要 miRNA 依赖的基因调节提供了新的证据。

[李 冬 摘译,李 楠 审阅. Lu LF, Thai TH, Calado DP, *et al.* *Immunity*, 2009, 30(1): 80-91]