

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.005

抗促胃液素疫苗 mG17-CRM197 单用及联合 5-FU 抑制小鼠结肠癌的生长

宫新江,王栋海,赵 娥,郑庆梅,王克波,高永宏,范传文,朱屹东,杨清敏,王晶翼(齐鲁制药有限公司 药物研究院,山东 济南 250100)

[摘要] 目的:观察抗促胃液素(gastrin,又称胃泌素)疫苗 mG17-CRM197(mG17)单用及联合氟尿嘧啶(flourouracil,5-FU)对小鼠结肠癌 C38 移植瘤的抑制作用。方法:采用 Western blotting 法检测结肠癌细胞促胃液素受体(CCKBR)的表达情况,磺酰罗丹明 B(SRB)法检测 mG17-NH₂ 对 C38 细胞增殖的影响。C57BL/6 小鼠随机分为 PBS 组、CRM197 组、mG17 组、5-FU 组和 mG17/5-FU 组,ELISA 法检测小鼠血清中抗 G17 抗体水平;免疫后的小鼠皮下进行肿瘤移植,5-FU 组和 mG17/5-FU 组给予 5-FU(20 mg/kg,q2d×5),其他组给予生理盐水,通过肿瘤生长曲线和瘤质量评价不同治疗方案对 C38 移植瘤生长的影响。结果:小鼠结肠癌 C38 细胞表达 CCKBR,mG17-NH₂ 浓度依赖性上调 CCKBR 的表达,且能促进 C38 细胞增殖(细胞增殖率为 115.7%~133.5%)。mG17 疫苗免疫 3 次后,小鼠血清抗 mG17 抗体水平依次升高。mG17 组、5-FU 组和 mG17/5-FU 组对 C38 移植瘤有显著抑制作用,抑瘤率分别为 58.0%、60.5% 和 80.7%;按金氏法计算,mG17 与 5-FU 联用的 Q 值为 0.97,两药联用出现相加作用。结论:mG17-CRM197 疫苗对小鼠结肠癌 C38 移植瘤治疗有效,与 5-FU 联用增强对小鼠结肠癌的抑制。

[关键词] 促胃液素;疫苗;结肠癌;5-氟尿嘧啶

[中图分类号] R735.3⁺5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)05-0510-04

Anti-gastrin vaccine mG17-CRM197 alone or in combination with 5-FU inhibits growth of mouse colon tumors

GONG Xin-jiang, WANG Dong-hai, ZHAO E, ZHENG Qing-mei, WANG Ke-bo, GAO Yong-hong, FAN Chuan-wen, ZHU Yi-dong, YANG Qing-min, WANG Jing-yi (Qilu Pharmaceutical Research Institute, Qilu Pharmaceutical Co. Ltd, Ji'nan 250100, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the inhibitory effect of anti-gastrin vaccine mG17-CRM197 (G17) alone or in combination with 5-FU on the growth of mouse transplanted C38 colon tumors. **Methods:** Gastrin receptor (CCKBR) expression in C38 cells was detected by Western blotting analysis, and the influence of G17 on proliferation of C38 cells was examined by sulforhodamine B (SRB) assay. C57BL/6 mice were randomly divided into 5 groups: PBS, CRM197, G17, 5-FU and G17/5-FU. The anti-G17 levels in mouse serum were measured by ELISA assay after immunization. After immunization, mice were subcutaneously injected with C38 cells, and then treated with 5-FU (20 mg/kg, q2d×5) in 5-FU and mG17/5-FU groups, or treated with 0.9% sodium chloride in the other groups. The influences of different therapies on the growth of C38-implanted tumors were evaluated by tumor growth-curves and tumor weights. **Results:** Mouse colon cancer C38 cells expressed CCKBR; mG17-NH₂ dose-dependently increased the expression of CCKBR. Exogenous mG17-NH₂ increased the proliferation of C38 cells, with the proliferation rate being 115.7% - 133.5%. Mouse serum anti-G17 antibody was increased after immunization with G17 vaccine for 3 times. The tumor growth and tumor weights were significantly inhibited in G17, 5-FU and mG17/5-FU groups, with inhibitory rates being 58.0%, 60.5% and 80.7%, respectively ($P < 0.05$), and tumor weight in mG17/5-FU group was less than those in the G17 and 5-FU groups. **Conclusion:** G17-CRM197 vaccine can inhibit the growth of mouse transplanted C38 colon tumors, and the inhibitory effect is enhanced

[基金项目] 国家重大新药创制科技重大专项(No.2010ZX09401-302-2-25);泰山学者建设工程专项经费资助(No.200908)。Project supported by the Major Scientific and Technological Special Project for "Significant New Drugs Creation" (No.2010ZX09401-302-2-25), and the Special Construction Engineering Foundation for "Taishan scholar" (No.200908)

[作者简介] 宫新江(1982-),男,山东省青州市人,硕士,主要从事体内抗肿瘤药效研究

[通信作者] 王晶翼(WANG Jing-Yi, corresponding author), E-mail: jingyi.wang@qilu-pharma.com

when it is combined with 5-FU.

[**Key words**] gastrin; vaccine; colon neoplasmas; fluorouracil

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(5): 510-513]

促胃液素(gastrin, 又称胃泌素)作为多肽类激素,其生理作用是调控胃酸分泌和促进胃肠道表皮细胞的生长^[1]。当消化道细胞发生癌变后会合成并分泌大量不同加工程度的促胃液素,促进肿瘤细胞的增殖和迁移^[2]。越来越多的证据^[3-4]表明,促胃液素参与一些恶性肿瘤尤其是消化道肿瘤的发生和发展。因此,通过抑制促胃液素能在一定程度上抑制肿瘤的增殖和转移^[5]。以促胃液素为靶点开发的抗肿瘤疫苗 G17-DT 正在进行临床 III 期研究,该疫苗能诱导机体产生抗 G17 抗体,对治疗 G17 依赖性胃肠道肿瘤有效^[6-7]。本课题组以白喉毒素(diphtheria toxin, DT)的无毒突变体 CRM197 为载体蛋白开发了 G17-CRM197,在生产工艺和安全性上更具优势^[8-10],推测与 G17-DT 有类似的抑瘤作用。本研究观察 mG17(鼠源 G17)-CRM197 疫苗单用及联合氟尿嘧啶(flourouracil, 5-FU)对小鼠结肠癌 C38 移植瘤的抑制作用,旨在为该产品的开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂、细胞和动物

mG17-CRM197 疫苗(简称 mG17,批号为 080702)、CRM197 乳剂(批号为 080702)和 5-FU(批号为 080523)均由齐鲁制药有限公司制备。小鼠酰胺化 G17(G17-NH₂,批号为 080705)由吉尔生化(上海)有限公司合成。RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)购于 Gibco 公司,兔抗人/鼠 CCKBR 多抗购于 Stan Cruz 公司。小鼠结肠癌细胞 C38 购于中国科学院细胞所。6 周龄清洁级雄性 C57BL/6 小鼠[动物合格证号为 SCXK(沪)2008-001],体质量 18~20 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.2 Western blotting 法检测小鼠结肠癌 C38 细胞 B 型促胃液素受体的表达

取对数生长期小鼠结肠癌细胞 C38,以含 5% FBS 的 RPMI 1640 液调整细胞密度至 1×10^4 /ml,以 1 ml/孔接种于 6 孔板。当细胞覆盖率达 80% 时,换以无血清培养液,并加入终浓度为 0、1 和 10 nmol/L 的 G17-NH₂,孵育 6 h 后裂解细胞,收样^[11]。参考 Ericsson 法^[12]提取小鼠脑组织膜蛋白,制备 C38 B 型促胃液素受体(cholecystokinin type B/gastrin receptor, CCKBR)阳性对照品。Western blotting

检测 C38 细胞中 CCKBR 的表达情况。

1.3 磺酰罗丹明 B(SRB)法检测 mG17-NH₂ 对细胞增殖的影响

以 4×10^3 /孔接种细胞于 96 孔板,24 h 后换以含 5% FBS 的 RPMI 1640 培养液,加入终浓度为 0.01、0.1、1、5 和 10 nmol/L 的 mG17-NH₂^[13],每个浓度设 6 个复孔,对照组不加 mG17-NH₂。置 CO₂ 培养箱继续培养 72 h,以 SRB 法检测细胞活力,mG17-NH₂ 对细胞增殖率的影响以各组 D_{512} 与对照组 D_{512} 的百分比值表示。

1.4 ELISA 法检测免疫血清中抗 mG17 抗体水平

取 C57BL/6 小鼠 50 只,按体质量随机分为 PBS 组、CRM197 组、mG17-CRM197 单独免疫组(mG17 组)、5-FU 单独化疗组(5-FU 组)和联合化疗组(mG17/5-FU 组)($n = 10$)。各组分别于 d0、d14 和 d28 经肌内注射免疫,mG17 组和 mG17/5-FU 组给予 mG17(50 μ l/只)疫苗;CRM197 组给予 CRM197 乳剂;PBS 组和 5-FU 组给予等体积 0.01 mol/L PBS。各组分别于 d14、d28 和 d42 经眼眶后静脉丛取血,制备血清,以 ELISA 法检测血清中抗 mG17 抗体水平。

1.5 结肠癌 C38 移植瘤模型的建立与抑瘤实验

小鼠结肠癌 C38 以皮下移植瘤方式体内传代备用。于 d42 剪取生长良好的小鼠结肠癌 C38 肿瘤组织,用玻璃研磨器研磨,并制成密度为 2×10^5 /ml 的细胞悬液,按 0.2 ml/只接种于小鼠右侧腋部皮下,建立移植瘤模型。接种后第 5 天(即 d47)开始给药,5-FU 组和 G17/5-FU 组分别腹腔注射给予 20 mg/kg 5-FU, q2d $\times 5$;其他组均以相同方案给予等体积生理盐水。记录各组成瘤时间,成瘤后隔天 1 次测量肿瘤体积,绘制生长曲线。于 d56 采血检测荷瘤鼠血清中抗体维持情况。以 PBS 组出现死亡为实验终点,记录各治疗组(T)和 PBS 组(C)瘤质量和动物去瘤后体质量。抑瘤率(%) = $(1 - T/C) \times 100\%$ 。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 SPSS 11.0 软件进行方差分析,应用 q 检验比较组间差异。协同性分析用金正均 Q 值法判断^[14]。 $Q = (Ea + Eb) / [(Ea + Eb) - Ea \times Eb]$ 。若 Q 值在 0.85~1.15 范围内,表示两药合用具有相加作用; Q 值 > 1.15 为协同作用; Q 值 < 0.85 则为拮抗作用。

2 结果

2.1 C38 细胞 CCKBR 表达情况

Western blotting 检测结果显示,小鼠脑组织有高水平的 CCKBR 表达。不加入外源 mG17-NH₂ 情况下, C38 细胞亦表达有较高的 CCKBR; 1 nmol/L 和 10 nmol/L 外源 mG17-NH₂ 诱导 6 h, 可浓度依赖性上调 CCKBR 的表达(图 1)。

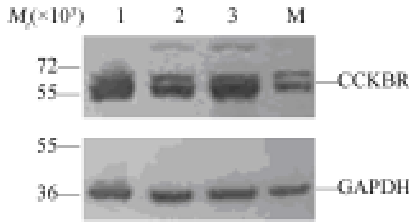


图 1 外源 mG17-NH₂ 上调 C38 细胞 CCKBR 的表达

Fig. 1 Exogenous mG17-NH₂ up-regulated CCKBR expression in C38 cells

M: Marker; 1: Brain; 2: mG17-NH₂ 1 nmol/L; 3: mG17-NH₂ 10 nmol/L

2.2 外源 mG17-NH₂ 对 C38 细胞增殖的影响

在低浓度血清(5% FBS)培养条件下, C38 细胞增殖相对缓慢, 外源 mG17-NH₂ 可促进其增殖。与对照组比较, 0.01 nmol/L mG17-NH₂ 对细胞增殖无影响, 其他浓度组则可显著促进细胞增殖($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 增殖率为 115.7% ~ 133.5%, 1、5、10 nmol/L 浓度组对细胞增殖的影响无显著差异(图 2)。

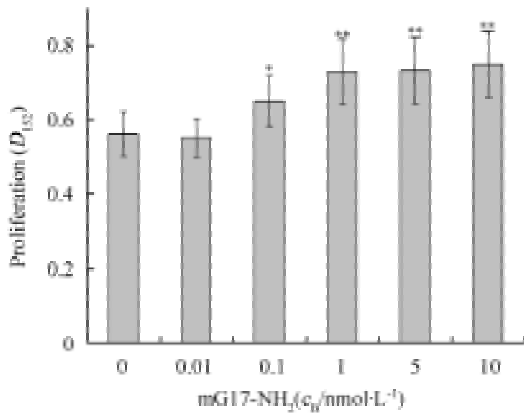


图 2 外源 mG17-NH₂ 促进小 C38 细胞的增殖($n = 6$)

Fig. 2 Exogenous mG17-NH₂ promoted proliferation of C38 cells ($n = 6$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 group

2.3 mG17 免疫小鼠血清中的抗体水平

C57BL/6 小鼠以 mG17 疫苗免疫 3 次, 通过

ELISA 法测得抗 mG17 抗体水平依次升高, 并在第 3 次免疫后达到平台, 滴度为 $1:2.5 \times 10^6$ 。接种瘤后一个免疫周期(即 d56)时荷瘤鼠血清中抗 mG17 抗体仍维持在较高水平。整个免疫过程中 PBS 组和 CRM197 组无抗 mG17 抗体产生。

2.4 mG17 免疫对 C38 移植瘤的抑瘤作用

3 次免疫后接种 C38 细胞, PBS 组和 CRM197 组均于第 7 天开始成瘤(成瘤体积 $> 100 \text{ mm}^3$), 成瘤时间分别为 6 ~ 9 d 和 7 ~ 9 d, 其他各组肿瘤成瘤时间较 PBS 组和 CRM197 组明显延迟(与 PBS 组比较, $P < 0.05$), 成瘤时间分别为 8 ~ 11 d 和 9 ~ 12 d。CRM197 组与 PBS 组肿瘤增殖速率最快, 两者生长曲线基本一致; mG17 组和 5-FU 组肿瘤增殖减慢, 在各时间点均表现出显著的抑制肿瘤生长的作用; mG17/5-FU 组则更能抑制肿瘤生长, 其抑制作用显著强于 mG17 组和 5-FU 组($P < 0.05$)。

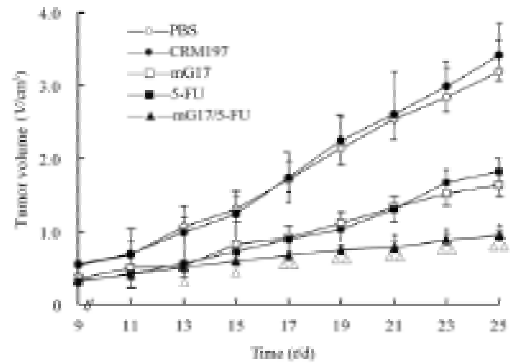


图 3 G17 单用及联合 5-FU 抑制 C38 移植瘤的生长($n = 10$)

Fig. 3 G17 alone and in combination with 5-FU inhibited the growth of C38 homograft($n = 10$)

* $P < 0.05$ vs mG17 or 5-FU group; $\Delta P < 0.05$,

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs PBS or CRM/97 group

至实验终点时, 除 PBS 组出现 1 只动物死亡外, 其他组均无死亡。CRM197 组瘤质量与 PBS 组相当, 分别为(3.1 ± 0.4)g 和(2.9 ± 0.3)g; mG17 组、5-FU 组移植瘤的生长受抑制, 与 PBS 组比较瘤质量显著减小($P < 0.05$), 抑瘤率分别为 58.0% 和 60.5%; mG17/5-FU 组瘤质量显著小于 mG17 组和 5-FU 组, 抑瘤率为 80.7%。按照金氏公式计算 mG17 与 5-FU 联用的 Q 值为 0.97, 说明两药联用有相加作用。此外, PBS 组、CRM197 组和 mG17 组小鼠体质量均有显著升高; 而 5-FU 组和 mG17/5-FU 组体质量增长受到抑制(图 4)。

3 讨论

mG17 通过分布于靶细胞表面或细胞内的受体

执行一系列的调控作用。目前已发现 3 种促胃液素受体(CCKAR、CCKBR 和 CCKCR),其中 CCKBR 被认为是成熟形式促胃液素即 mG17-NH₂ 的高亲和力受体,mG17-NH₂ 与 CCKBR 结合后,通过激活下游信号转导途径而发挥其生物学效应^[15]。本研究采用 Western blotting 法检测到 13 株常见人源或鼠源胃肠道肿瘤细胞中有 12 株表达有 CCKBR,其中小鼠结肠癌细胞 C38 表达水平最高,同时证明外源 mG17-NH₂ 能上调该受体的表达。在肿瘤细胞体外增殖实验中发现,外源 mG17-NH₂ 的加入能促进 C38 肿瘤细胞的增殖,且该效应具有剂量依赖性,这表明结肠癌细胞 C38 为 mG17 增殖依赖型细胞。

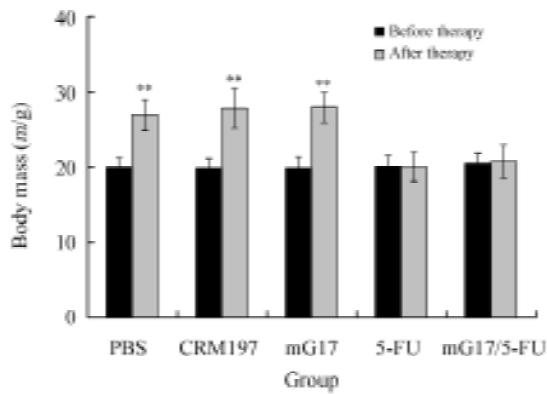


图 4 治疗前后各组小鼠体质量的变化
Fig. 4 Changes of mouse mass before and after different treatments

** $P < 0.01$ vs before therapy

mG17 疫苗主动免疫对 C38 移植瘤抑制作用研究表明,mG17 疫苗具有较高的免疫原性,且血清抗体在移植肿瘤后仍维持在较高水平,给予化疗药并不影响其免疫效果。从与对照组肿瘤生长曲线、实验终点时瘤质量及抑瘤率的比较来看,mG17 免疫能显著抑制 C38 移植瘤的生长,与 5-FU 联用的 Q 值在 0.85 ~ 1.15 范围内,提示两者联用具有相加抗肿瘤作用;此外,与 5-FU 化疗相比,在同等疗效的情况下,mG17 免疫不造成动物体质量的降低,可以明显提高肿瘤治疗时的生存质量。

综上所述,mG17-CRM197 疫苗可能成为结肠癌治疗的新选择,或者作为二线用药联合化疗增加疗效或通过降低化疗药的剂量而减少不良反应。因此,深入研究 mG17-CRM197 疫苗,对于开发新型消化道肿瘤治疗药物具有重要意义。

[参 考 文 献]

[1] Dockray GJ, Varro A, Dimaline R, Wang T. The gastrins: Their

production and biological activities [J]. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63(1): 119-139.

- [2] Seva C, Dickinson CJ, Yamada T. Growth-promoting effects of glycine-extended progastrin [J]. *Science*, 1994, 265(5107): 410-412.
- [3] Hoosein NM, Kiener PA, Curry RC, Brattain MG. Evidence for autocrine growth stimulation of cultured colon tumor cells by a gastrin/cholecystokinin-like peptide [J]. *Exp Cell Res*, 1990, 186(1):15-21.
- [4] Baldwin GS, Shulkes A. Gastrin, gastrin receptors and colorectal carcinoma [J]. *Gut*, 1998, 42(4):581-584.
- [5] Kermorgant S, Lehy T. Glycine-extended gastrin promotes the invasiveness of human colon cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285(1): 136-141.
- [6] Watson SA, Michaeli D, Grimes S, Morris TM, Robinson G, Varro A, et al. Gastrimmune raises antibodies that neutralize amidated and glycine-extended gastrin-17 and inhibit the growth of colon cancer [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(4): 880-885.
- [7] Watson SA, Michael D, Justin TA, Grimes S, Morris TM, Robinson G, et al. Pre-clinical evaluation of the gastrimmune immunogen alone and in combination with 5-fluorouracil/leucovorin in a rat colorectal cancer model [J]. *Int J Cancer*, 1998, 75(6): 873-877.
- [8] Burkitt MD, Varro A, Pritchard DM. Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(1): 1-16.
- [9] 王晶翼,王栋海,李模孝,张 薛,王庆民,刘禄娟,等. 以白喉毒素突变体 CRM197 为载体的免疫原及其制备方法与应用:中国,CN101050236 [P], 20071010.
- [10] 李模孝,张 薛,王栋海,孙英侠,郭俊贤,王晶翼,等. 白喉毒素突变体 CRM197 及其制备方法:中国,CN100999548 [P], 20070718.
- [11] Ashurst HL, Varro A, Dimaline R. Regulation of mammalian gastrin/CCK receptor (CCK2R) expression *in vitro* and *in vivo* [J]. *Exp Physiol*, 2008, 93(2): 223-236.
- [12] Ericsson C, Peredo I, Nister M. Optimized protein extraction from cryopreserved brain tissue samples [J]. *Acta Oncol*, 2007, 46(1): 10-20.
- [13] Szabó I, Rumi G, Bódis B, Németh P, Mózsik G. Gastrin and pentagastrin enhance the tumour proliferation of human stable cultured gastric adenocarcinoma cells [J]. *J Physiol Paris*, 2000, 94(1): 71-74.
- [14] 金正均. 合并用药中的相加 [J]. *中国药理学报*, 1980, 1(2): 70.
- [15] Friday BB, Adjei AA. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/ERK mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(2): 342-346.

[收稿日期] 2010 - 07 - 01

[修回日期] 2010 - 08 - 20

[本文编辑] 韩 丹