

γ -干扰素基因修饰 A549 细胞瘤苗研究*

于晓虹 刘祥麟 马洁羽

(浙江大学医学院肿瘤基因研究组 杭州 310031)

随着分子生物学与分子免疫学研究的进展,肿瘤的基因治疗已受到人们广泛的重视。增强肿瘤细胞的免疫原性,让免疫系统自己去识别肿瘤疫苗(Vaccine)策略已成为肿瘤生物治疗中的重要手段。 γ -干扰素(Interferon- γ)具有多方面的抗肿瘤效应,大量实验资料表明,经该基因修饰的肿瘤细胞,免疫原性有较大的增强^[1,2]。更重要的是,这种经基因修饰的肿瘤细胞注射入动物体后,可引起机体对未经修饰的原肿瘤细胞产生较强的排斥能力,这为基因修饰肿瘤细胞作为瘤苗的免疫治疗开辟了一条新途径。

本研究将克隆的人源 IFN- γ 基因导入人肺癌细胞株 A549 中制成转基因疫苗,观察其免疫原性的改变及对荷瘤动物的治疗作用。

材料与方 法

1. 试剂

各种工具酶,ELISA 试剂盒,lipofect-amine,1640 培养基等分别购自华美生物工程公司,晶美生物技术公司,Pharmacia GIBCO-BRL 等公司。

2. 实验动物模型

小鼠肿瘤 S180 引自中科院上海药物研究所。

3. 质粒和细胞株

PA317/pLXSN 质粒和人 γ -干扰素基因由中科院生物化学研究所郑仲承教授惠赠。人肺癌细胞株 A549 购自中科院上海细胞所细胞库。A549-IFN- γ 细胞株的构建为本实验室利用逆转录病毒载体将人源 IFN- γ 基因转入到 A549 细胞株中,并经 G418 筛选出可稳定表达 IFN- γ 的克隆化的细胞株。

4. A549-IFN- γ 细胞株基因表达的测定

取对数生长期细胞,1640 无血清培养液洗三次,收集细胞,计数,每个细胞株分成 2 组,每组细胞浓度为 1×10^6 / mL。于 37°C 无血清培养液中培养 24 小时,用 ELISA 试剂盒分别测定 A549 细胞株和 A549-IFN- γ 细胞株的 IFN- γ 总的表达量和细胞外的分泌量。

5. IFN- γ 基因转导对 A549 细胞 MHC-I 和 MHC-II 抗原表达的影响

分别收集 A549 细胞株和 A549-IFN- γ 细胞株,用 FITC 标记的鼠抗人单克隆抗体,流式细胞仪测定两株细胞的 MHC-I 和 MHC-II 抗原表达。

6. 肿瘤细胞裂解物及细胞因子

取小鼠 S180 肿块组织,按体积比 1:5 加生理盐水冻融三次,离心得上清,测其蛋白含量,置 -20°C 冰箱保存备用;GM-CSF 购自厦门特宝生物公司(批号:9808)。

7. A549-IFN- γ 瘤苗的制备

分别收集对数生长期的 A549 及 A549-IFN- γ 细胞,用无血清培养基洗细胞数次,分别计数,再添加肿瘤细胞裂解物及细胞因子,分装,使每 0.2ml 注射液中分别含细胞 1×10^6 、肿瘤细胞裂解物蛋白 1mg、细胞因子 GM-CSF45 单位,Co60 照射(100rad \times 50min)。注射量为 0.2ml/只/次(i.p)。

8. 瘤苗对动物的致瘤性

实验裸鼠由中科院上海实验动物中心提供,雄性,18-20g,分为三组,每组 7 只于背部皮下接种对数生长期的细胞,每只接种量为 8×10^6 / 0.2ml,第一组接种 A549 细胞;第二组接种 A549-IFN- γ 细胞;第三组接种经 Co60 照射(100rad \times 50min)的 A549-IFN- γ 细胞,观察三组细胞在裸鼠身上的致瘤性,共 50 天。

9. 瘤苗的抑瘤性实验

实验动物:NIH 纯种小鼠购自浙江大学医学院动物中心(合格证:医动字 22-9601018),雄性,健康,体重为 18-20g 随机分为 6 组,每组 6 只。每组于第 1d,6d,14d 分别进行三次预防注射,于第 15d 接种 S180,每只小鼠右前肢皮下接种 0.5×10^4 S180 肿瘤细胞/0.2ml 生理盐水液。第 21d 和第 28d 进行两次治疗注射。

10. MTT 法观测接种瘤苗的小鼠淋巴细胞对肺癌细胞的特异杀伤作用

将 A549 细胞和 A549-IFN- γ 细胞和 HeLa 细胞以 8×10^4 /孔量接种于 96 孔板上,37°C 培养 24hr,作为靶细胞。实验小鼠(NIH)接种三次瘤苗,对照组小鼠注射生理盐水,分别于第 15d,27d,45d 取其脾脏,常规淋巴细胞分离法得效应细胞,将效应细胞加到上述三种靶细胞中,效靶比为 10:1,同时设效应细胞和靶细胞的空白对照。

11. 统计学方法

方差分析;t-检验。

结 果

1. A549-IFN- γ 细胞株表达 IFN

用 ELISA 试剂盒分别测定 A549 细胞株和 A549-IFN- γ 细胞株 IFN- γ 总的表达量和细胞外的

本文 2002 年 4 月 18 日收到,7 月 15 日接受。

* 杭州市科委(99113A07)和杭州市卫生局(招 9801)资助项目。

E-mail: xiaohu 65@yahoo. com. cn

分泌量(见表1)。第1组冻融三次,离心取上清液,分别测 A549 细胞株和 A549-IFN- γ 细胞株 IFN- γ 总表达量;第2组取细胞外培养液,分别测 A549 细胞株和 A549-IFN- γ 细胞株细胞培养液中 IFN- γ 的含量(IFN- γ 细胞外分泌量)。结果表明未转基因的对照组 A549 细胞 IFN- γ 表达为阴性,转基因 A549-IFN- γ 细胞株培养液和细胞冻融液都有较高的 IFN- γ 浓度被测出。提出转入 A549 细胞的 IFN- γ 基因能进行正常的表达,并且可以向细胞外分泌。

表1 A549 细胞株和 A549-IFN- γ 细胞株 IFN- γ 含量的测定*

	细胞外分泌量	总表达量
A549-IFN- γ	10pg/ml	45pg/ml
A459	-	-

* 为一式三份的平均数。

2. IFN- γ 基因转导对 A549 细胞 MHC-I 和 MHC-II 抗原表达的影响

对 A549-IFN- γ 细胞株及 A549 细胞株 MHC-I 和 MHC-II 抗原表达的测定(为3次测定的平均数,见表2)表明,经 IFN- γ 基因转染后的 A549 肺癌肿瘤细胞可明显增强 MHC-I 和 MHC-II 抗原的表达,其中 MHC-II 的升高尤为明显为 8.5 倍。

表2 IFN- γ 基因转导 A549 细胞对 MHC-I 和 MHC-II 表达的影响

组	MHC-I (% Gated)	MHC-II (% Gated)
A549	80.66	0.12
A549-IFN- γ	90.88	1.02

3. 转基因瘤苗致瘤性

经 50 天观察,接种 A549 细胞的第一组于第 21 天至 28 天在接种位点全部长出肿瘤;接种 A549-IFN- γ 细胞和接种经 Co60 照射(100rad \times 50min)的 A549-IFN- γ 细胞的第二组和第三组在实验观察的 50 天内均未发现肿瘤。该结果显示,本实验室所建立的 A549-IFN- γ 细胞株较原 A549 细胞株的致瘤性明显降低。

4. 转基因疫苗免疫小鼠后不同时间取样测脾

表4 转基因疫苗免疫小鼠淋巴细胞对不同的靶细胞杀伤性比较

靶细胞	A549			A549-IFN- γ			Hela			
	-	+SL- γ	+SL-NC	-	+SL- γ	+SL-NC	-	+SL- γ	+SL-NC	
OD570	0.65 \pm 0.013	0.27 \pm 0.002	0.53 \pm 0.012	0.23 \pm 0.003	0.08 \pm 0.001	0.22 \pm 0.003	0.71 \pm 0.001	0.61 \pm 0.005	0.68 \pm 0.003	
杀伤率%		51.8	3.6		69.6	4.5		14	2.8	
t-检验		P<0.01			P<0.01			P<0.01		

注:效应细胞 SL- γ 为注射转基因细胞小鼠的淋巴细胞;SL-NC 为注射生理盐水的对照组小鼠的淋巴细胞。

淋巴细胞对 A549 细胞的特异杀伤作用

用转基因细胞疫苗免疫小鼠三次后,分别于第 15 天、第 27 天、第 38 天取实验小鼠的脾淋巴细胞对 A549 细胞进行特异杀伤实验结果显示杀伤率都大于 50%,三次无明显差别(表3),表明转基因细胞疫苗确实能引起小鼠免疫系统对 A549 细胞的特异免疫杀伤;虽经过 38 天后其免疫能力并没有下降,提示该疫苗经三次注射免疫后,可在机体内诱导激发并维持较长时间的针对肺癌细胞的特异性强杀伤能力。

表3 免疫后不同时间的小鼠淋巴细胞对 A549 细胞的特异杀伤作用(MIT 法)

免疫后 天数	OD570nm		杀伤率(%)
	A549(靶细胞)	A549 +SL* - γ (效应细胞)	
15d	0.543 \pm 0.004	0.250 \pm 0.002	54.0
27d	0.650 \pm 0.013	0.270 \pm 0.002	51.8
38d	0.168 \pm 0.001	0.077 \pm 0.001	53.6

注:SL* (spleen lymphocytes),SL- γ (效应细胞)为注射转基因疫苗的小鼠脾淋巴细胞。

5. 接种疫苗第 27 天后小鼠淋巴细胞对 A549、A549-IFN- γ 、Hela 细胞株特异杀伤性比较

为进一步观察转基因疫苗特异性抗肿瘤作用,分别以 A549、A549-IFN- γ 、Hela 为靶细胞,接种转基因疫苗的小鼠淋巴细胞为效应细胞,注射生理盐水的小鼠的淋巴细胞为对照效应细胞,进行淋巴细胞特异杀伤实验。结果发现,接种转基因疫苗的小鼠淋巴细胞不仅对 A549、A549-IFN- γ 细胞有较强的特异杀伤分别为 51.8% 和 69.6%,而对异种的 Hela 细胞也有一定的杀伤作用,杀伤率为 14%,但其抑瘤作用比前两者为低(表4),对此现象的解释是由于肿瘤细胞可能具有共同抗原^[3],或是转基因疫苗引起的非特异抑瘤作用所致。本实验研究结果明显提示接种本转基因疫苗可激起机体强烈地针对疫苗肿瘤细胞的特异性抑制。

6. IFN- γ 基因转入 A549 细胞后对小鼠 S180 肿瘤的抑制作用

实验动物分为三组: NO. 1 组: 注射 A549 细胞为阴性(未转基因)对照组; NO. 2 组注射 A549-IFN- γ 细胞为转基因的实验组; NO. 3 组注射生理盐水(N.S)为空白对照组。结果(表 5), 正常 A549 细胞疫苗组 5/6 动物长肿瘤, 而转基因 A549-IFN- γ 细胞疫苗组只有 1/6 动物长肿瘤, 后者约为前者的 4.9 倍, 两者有显著差异($P < 0.01$)。而正常 A549 细胞疫苗组与 NO. 3 生理盐水对照组一样都为 5/6 动物出现肿瘤。但从中可以看出两者在体重和脾重间还是存在差异的。NO. 1 的体重比 NO. 3 要轻, 但其脾重大大高出 NO. 3, 约是它的 1.67 倍。提示 NO. 1 的动物经正常 A549 细胞免疫后产生了免疫应答, 而 NO. 3 无此效应。转基因的 NO. 2 组, 脾重最重, 约是 NO. 3 组 2.1 倍。这表明转基因疫苗明显提高

了实验小鼠的免疫应答和抗肿瘤能力。

7. 在转基因疫苗中添加 S180 肿瘤细胞裂解物和细胞因子后对小鼠 S180 的抑瘤观察

实验动物分为三组, NO. 1: 注射 A549-IFN- γ 细胞为对照组; NO. 2: 注射 A549-IFN- γ 细胞 + 抗原(S180 裂解物); NO. 3 A549-IFN- γ 细胞 + 抗原(S180 裂解物) + GM-CSF。NO. 2 组是在转基因细胞基础上添加了 S180 肿瘤细胞裂解物免疫实验小鼠, 其肿瘤抑制率较 NO. 1 组提高达到了 100%; NO. 3 组是在 NO. 2 组的基础上又添加了 GM-CSF, 结果肿瘤抑制率同 NO. 3 亦为 100%, 比 NO. 1 组有提高; 脾重 NO. 3 组 > NO. 2 组 > NO. 1; 三组体重没有明显差异($P < 0.05$)(表 6)。提示添加特异性肿瘤细胞裂解物可有利于转基因疫苗发挥其特异性抑瘤效能, 而添加 GM-CS 作为免疫佐剂可协同提高实验小鼠机体的免疫能力(脾重为三组中最高。)

表 5 A549 细胞和 A549-IFN- γ 细胞作为疫苗对小鼠 S180 肿瘤的抑制作用

组 NO	注射类型	注射部位	动物数	S180 肿瘤		第 37 天处理平均	
				发生数	抑制率	体重(g)	脾重(g)
1	A549 细胞	IP	6	5	5/6	29.0 ± 0.004	0.225 ± 0.001
2	A549-IFN- γ 细胞	IP	6	1	1/6	31.6 ± 0.004	0.288 ± 0.004
3	N.S	IP	6	5	5/6	36.5 ± 0.003	0.135 ± 0.002

表 6 添加 S180 肿瘤细胞裂解物和细胞因子对小鼠 S180 的抑制作用

组 NO	注射类型	注射部位	动物数	S180 肿瘤		第 37 天处理平均	
				发生数	抑制率(%)	体重(g)	脾重(g)
1	A549-IFN- γ 细胞	IP	6	1	83.3	31.6 ± 0.004	0.288 ± 0.004
2	A549-IFN- γ 细胞 + 抗原	IP	6	0	100	29.8 ± 0.005	0.307 ± 0.002
3	A549-IFN- γ 细胞 + 抗原 + GM-CSF	IP	6	0	100	30.8 ± 0.003	0.320 ± 0.004

讨 论

γ -干扰素是细胞分泌的一类功能性蛋白, 具有抗病毒、抑制细胞分裂、诱导细胞分化、增强细胞吞噬功能、诱导细胞特定基因表达及调节免疫反应等作用。本研究是以人 γ -干扰素基因转导入人肺腺癌 A549 细胞中, 以稳定表达 γ -干扰素的 A549 细胞株为转基因疫苗, 该疫苗可从两方面激活机体对肿瘤细胞的免疫能力, 首先, 当该疫苗被注射入机体后, 可在瘤苗周围分泌 γ -干扰素, 形成免疫微环境吸引和激活机体的免疫因子和各种免疫细胞^[4,5], 从而构成攻击肿瘤细胞的免疫网络, 极大地增强机体的免疫水平和状态, 以利于抑制肿瘤生长; 另外,

已知肿瘤细胞逃避免疫系统攻击的一个重要途径是下调 MHC 分子表达, 使限制性的淋巴细胞免疫识别能力降低。有文献报道转导 γ -干扰素基因后可使细胞的 MHC-I 和 MHC-II 类分子表达增高^[6-8]。我们的测定亦证实 A549 细胞株在转入 γ -干扰素基因后其 MHC I、II 分子表达明显上调, 而其致瘤性显著下降。由于 A549 细胞株是人肺腺癌细胞株, 因而无对应的动物实验模型, 考虑到肿瘤细胞存在共同抗原的可能性, 我们选用了小鼠 S180 为实验动物模型, 为提高瘤苗专一性抗瘤作用, 在用转基因疫苗治疗小鼠荷瘤时, 特意添加了 S180 裂解物(提供抗原物质), 结果表明, 该瘤苗组合有较好的抑制肿瘤作用。淋巴细胞杀伤实验显示, 被该转基因疫苗

免疫后的小鼠淋巴细胞对原 A549 细胞株有较强的杀伤作用,并且该杀伤作用可维持较长时间;同时,我们设了一组以 Hela 细胞为靶细胞的对照组,被转基因疫苗免疫的小鼠淋巴细胞对其也有一定的杀伤作用(与生理盐水注射的小鼠淋巴细胞为效应细胞对照组有显著区别)。这进一步证明该转基因疫苗的确能提高机体的免疫力,引起机体对未经修饰的原肿瘤细胞产生较强的抑制能力,这为该转基因疫苗作为肿瘤生物治疗的手段提供了实验依据。

本项研究是为临床提供一种通用的人肺腺癌转基因疫苗而设计的,因而我们选用了将人 γ -干扰素基因转入人肺腺癌 A549 细胞株作为瘤苗,这避免因采用病人自身肿瘤细胞再转基因的时间耽搁,也为该转基因瘤苗的产业化生产提供了可能性;同时,为提高该瘤苗的抑瘤专一性和高效性,在注射转基因瘤苗时添加了被治疗肿瘤的相关抗原和细胞因子,得到了良好的抑瘤效果,可见我们设计的该转基因瘤苗有可能用于肺癌术后的辅助治疗,可防止肿瘤转移和复发,对于不同病人的个体差异,我们考虑可通过添加病人自己的肿瘤细胞裂解物来提供特异性抗原,增强针对性治疗的同时提高疗效。本项研究只完成了实验室的部分工作,后续将对该瘤苗进行更加详细的理化性质和生物学方面的测定^[9],如该转基因细胞株 γ -干扰素的生物学活性的测定,大量、系统的针对肺癌的实验动物模型的治疗工作等,为该瘤苗的临床应用提供更加完备的数据。

摘 要

本文研究了将人 IFN- γ 基因重组入 pLXSN

载体,用 pA317 包装后转入人肺腺癌细胞株 A549 中,经 G418 筛选获得稳定表达 IFN- γ 的转基因的 A549-IFN- γ 细胞株。经测定,该转基因的细胞表面 MHC-I、II 分子表达显著提高。接种动物表明致瘤性下降,制成瘤苗可诱导产生较强的细胞毒 T 淋巴细胞的抑瘤能力;经放射线照射的瘤苗,在添加肿瘤特异抗原和细胞因子后,在动物肿瘤模型上显示出良好的抑瘤效果。提示,经 IFN- γ 基因转导的人肺腺癌 A549 细胞株可产生较强的抗肿瘤效果,这为该瘤苗的临床应用提供了实验依据。

关键词: γ -干扰素 主要组织相容性复合物(MHC)
人肺腺癌细胞株 A549 转基因瘤苗

参 考 文 献

- [1] Gansbucher, B., et al., 1996, *Cancer Res.*, **50**: 3561 - 3568.
- [2] Cartel, S. et al., 1985, *Eur. J Immunol.*, **15**: 118 - 123.
- [3] Ramarathnam, L, et al., 1995, *J Immunol.*, **155** (11): 5323 - 5329.
- [4] Martin, B. K., et al., 1999, *J Immunol.*, **162**(11): 6663 - 6670.
- [5] Haas, C., et al., 1999, *Cancer Gene Ther.*, **6**(3): 254 - 262.
- [6] Arosarena, OA, et al., 1999, *Otolaryngol-Head-Neck Surg.*, **120**(5): 665 - 671.
- [7] Abdel-wahab, ZA, et al., 1994, *Cancer Gene Ther.*, **1**: 171 - 179.
- [8] Matsunaga, K, et al., 1999, *Jan J Cancer Res*, **90** (9): 1007 - 1015.
- [9] 钱书兵等, 1998, *中华微生物学免疫学杂志*, **18** (6): 505 - 509.

STUDY ON VACCINATION OF A549 CELL LINES TRANSDUCE WITH HUMAN IF- γ GENE

YU Xiao Hong LIU Xiang Lin MA Jie YU

(School of Medical Sciences Zhejiang University, Cancer Oncogene Res. Lab, Hangzhou 310031 China)

ABSTRACT

We transduced the human interferon- γ (IFN- γ)gene into A549 cells, a human lung adenocarcinoma cell line, using retroviral vector pLXSN as a gene transfer vehicle. A high level of IFN- γ was secreted by IFN- γ gene-transduced A549 cells (A549-IFN- γ). The cells showed increased MHC-I, II molecule expression after IFN- γ gene transfer. The gene-modified tumor cells had a very lower tumorigenesis than its parental tumor cells. The spleen cells of mice were transplanted with A549-IFN- γ cells exhibited high cytotoxic activity compared to those from mice were transplanted with A549 cells and from untreated mice. The vaccine was irradiated by γ -ray radiation, and then immunized mice. Five out of six mice were treated with the transgeneic without tumor appearance. These results indicated that the human IFN- γ gene-transduced lung cancer cells is a promising strategy for inducing antitumor immunity in the treatment of lung cancer.

Key words: Interferon- γ (IFN- γ)gene MHC Molecules Lung adenocarcinoma cell line A549 Transgene vaccine