论著

文章编号:1000-5404(2005)14-1432-04

基于α-病毒复制酶的基因疫苗对人黑色素瘤的免疫作用

倪 兵,姜 曼,黎万玲,毛丽伟,何仰东,肖 宇,吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究基于α-病毒复制酶的人黑色素瘤基因疫苗免疫学作用。**方法** 建立及鉴定人/鼠嵌合模型(trimera),将基于α-病毒复制酶的mage-3基因疫苗免疫动物,检测动物体内特异抗体滴度;用标准4 h ^{51}Cr释放实验检测动物体内特异CTL活性。**结果** FACS分析显示,trimera小鼠腹腔细胞中人白细胞占总细胞的88.84%,脾脏细胞中人白细胞的比例占57%,同国外文献报道一致。基于α-病毒复制酶的重组基因疫苗mage-3/pSMART2a对trimera小鼠免疫后,小鼠腹腔细胞的CTL在效靶比为100∶1时杀伤率达到70%左右,此时的对照组mage-3/pCI-neo组最大杀伤率为40%左右。ELISA结果显示,重组基因疫苗mage-3/pSMART2a组产生的mage-3抗原特异性抗体效价达到1∶512,mage-3/pCI-neo组为1∶256。**结论** 成功建立了人/鼠嵌合模型,并在动物体内激发出针对人黑色素瘤基因疫苗的初次免疫应答。

关键词: α-病毒;复制酶;基因疫苗;trimera;人黑色素瘤

中图法分类号: R392.11;R394.8;R739.5 **文献标识码:** A

Immunity of genetic vaccine based on alpha virus replicase to human melanoma

NI Bing, JIANG Man, LI Wan-ling, MAO Li-wei, HE Yang-dong, XIAO Yu, WU Yu-zhang (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study immunological role of human melanoma genetic vaccine based on alpha virus replicase. **Methods** After human/mouse chimera model was established and identified, the mice were inoculated with mage-3 gene vaccine based on alpha virus replicase. Specific antibody and activity of specific cytotoxic lymphocyte of the inoculated animals were detected by ELISA and ^{51}Cr release assay to monitor the primary immune response of the vaccines. **Results** FACS assay indicated that human leucocyte held 88.84% in total enterocoelia lymphocyte of trimera mice and 57% in total lymphocyte of spleen. Maximal cytolysis activity of specific CTL form mage-3/pSMART2a immunized mice reached about 70%, meanwhile the activity of CTL from mage-3/pCI-neo group reached 40%. ELISA assay showed that the titre of mage-3 specific antibody reached 1∶512 and 1∶256 in mage-3/pSMART2a and mage-3/pCI-neo immunized mice respectively. **Conclusion** Human/mouse chimera model has been established successfully and primary immune response against human melanoma gene vaccine has been provoked in trimera model mice.

Key words: alphavirus; replicase; genetic vaccine; trimera; human melanoma

近10年来,DNA疫苗包括肿瘤疫苗在一些动物模型研究中取得了很大进展[1,2]。但目前的基因疫苗形式的有效性不能令人满意,特别是应用于灵长类动物和人时更是如此。因此,寻找更有效的基因疫苗载体成为目前的研究热点。目前此方面的研究主要集中在如何增加抗原表达量和刺激机体产生更有效的免疫应答,如细胞因子、共刺激分子和树突状细胞的使用等。在这些研究中,基于α-病毒的各种疫苗研究取得了令人瞩目的进展[3,4],这是因为α-病毒的复制酶能够高效复制其下游基因;其本身就是病毒颗粒,能有效激发机体的抗病毒免疫应答,提高天然和适应性免疫应答水平。但是这些研究都是基于动物的各种疫苗模型,而基于人的相关疫苗无法进行评价,故建立评价基于人的疫苗的平台显得特别重要。近年来,人-鼠嵌合模型在人源化的动物模型研究领域中取得了很大的进展[5~7],并使其和转基因动物一样,成为评价基于人的各种疫苗效果的一种选择。因此,本研究拟以含α-病毒复制酶的哺乳细胞高表达重组质粒mage-3/pSMART2a为基因疫苗,以人/鼠嵌合模型(trimera)为对象,观察这种基因疫苗的免疫学效果,为共享mage-

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资目项目("973"项目)(2001CB510001)
Supported by the National "973" Key Research Project of China (2001CB510001)

作者简介: 倪 兵(1968-),男,湖北省黄梅县人,博士,副教授,主要从事基因疫苗方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68752236-614,E-mail: nibingxi@hotmail.com

通讯作者: 吴玉章,电话:(023)68752680,E-mail: wuyuzhang@yahoo.com.

收稿日期: 2004-07-06;**修回日期:** 2004-11-08

3 抗原的各种肿瘤的临床治疗提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　试剂和材料

重组质粒 mage-3/pCI-neo 和 mage-3/pSMART2a 由本所构建[8,9],人黑色素瘤细胞系 LB373(HLA-A2A11)购自 ATCC(美国),293 细胞株为本所自存。细胞培养用品购自 Clontech 公司,酶标二抗 Go a Ms IgG/HRP 购于北京中山生物技术有限公司,^{51}Cr 购自中国原子能科学研究所。6 ~ 8 周龄、体质量 18 ~ 25 g NOD/SCID 小鼠和 SPF 级 BALB/c 小鼠(H-2d)购自中国医学科学院动物研究所。Mage-3 蛋白(由瑞士 Basel 研究所 Giulio Spagoli 博士赠送)。

1.2　方法

1.2.1　人/鼠嵌合模型的构建和鉴定　　参照文献[5]所述方法进行构建和鉴定,不同之处是我们使用的人 PBMC 为 HLA-A2(本校西南医院输血科)。我们使用了抗-人 CD45-FITC(全部白细胞)、抗-人 CD3-PerCP(全部 T 细胞)和抗-人 CD20-PE(全部 B 细胞)等单抗对 trimera 小鼠腹腔和脾脏中人淋巴细胞进行鉴定。

1.2.2　质粒准备　　常规方法大量制备重组质粒 mage-3/pSMART2a 和 mage-3/pCI-neo, 鉴定其纯度及含量。

1.2.3　疫苗接种　　Timera 小鼠随机分组,每组 10 只。实验组为 mage-3/pSMART2a 组,对照组为空质粒 pSMART2a 组、mage-3/pCI-neo、pCI-neo 和生理盐水组。腹腔注射人 PBMC 后第 1 天,每组腹腔注射相应质粒 100 μg(溶于 100 μl 生理盐水中)或生理盐水 100 μl。

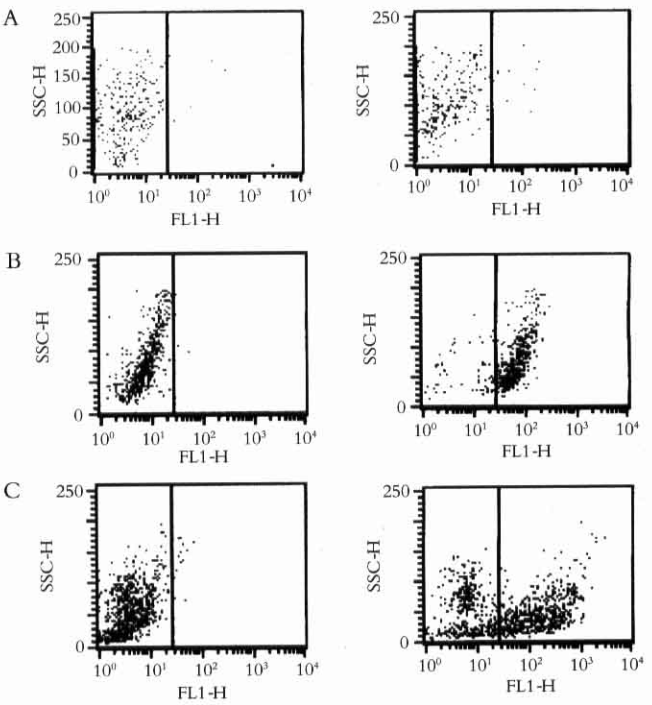
1.2.4　^{51}Cr 释放实验　　按常规方法进行。简述如下,靶细胞为人黑色素瘤细胞系 LB373(HLA-A2A11)(3×10^6),效应细胞为疫苗免疫后的 trimera 小鼠腹腔单个核细胞。按 100∶1、50∶1、25∶1 和 12.5∶1 的效应细胞/靶细胞的比例进行淋巴细胞特异杀伤实验。特异杀伤百分比用下面公式表示:100 ×[(实验组释放-自发释放)/(总释放-自发释放)]。靶细胞 ^{51}Cr 自然释放为自发释放,1% Triton X-100 裂解的靶细胞 ^{51}Cr 释放为总释放。

1.2.5　免疫动物血清 mage-3 特异抗体测定　　按常规方法进行间接 ELISA 检测。Mage-3 蛋白包被酶联板,系列稀释后的 trimera 小鼠免疫血清为一抗。加入 HRP 标记二抗 Go a Ms IgG 和底物后测定每孔 D(492)值。高于阴性对照孔(pSMART2a 组,pCI-neo 组和生理盐水组)平均 D(492)值 2.1 倍为阳性孔。

2　结果

2.1　trimera 模型的构建及鉴定

用抗人 CD45-FITC 单抗对 trimera 小鼠腹腔细胞(图 1B)和脾脏细胞(图 1C)进行 FACS 分析显示,移植人 PBMC 的 BALB/c 小鼠腹腔细胞中人白细胞占总细胞的 88.84%。而对照小鼠(照射过但未注射人 PBMC 的 BALB/c 小鼠)的腹腔细胞中则几乎未见任何人白细胞(图 1 A)。trimera 小鼠脾脏细胞中人白细胞的比例占 57%,其对照组则无此细胞。



A: Control mice which were transplanted with NOD/SCID born marrow cells but not received human PBMC; B: Peritoneal cells of trimera model; C: Spleen cells from trimera mice. Column series left: staining control, standard FACS assay with the omission of CD45 antibody; Column series right: standard FACS assay with anti-CD45-FITC

图 1　trimera 小鼠细胞流式细胞术分析

Fig 1　FACS analysis of cells from trimera mice

2.2　免疫动物 CTL 体外杀伤实验

trimera 小鼠腹腔注射基因疫苗 mage-3/pSMART2a、mage-3/pCI-neo、pSMART2a、pCI-neo 和注射生理盐水后 2 周,用 4 ml PBS 冲洗出腹腔细胞,体外用人 IL-2 和 mage-3 CTL 表位肽 FLWGPRALV(HLA-A2)刺激 5 d 后进行标准 4 h ^{51}Cr 释放实验。结果如图 2 所示,在 100∶1 的效靶比时,实验组 trimera 小鼠腹腔细胞对靶细胞 LB373 的杀伤率为 70% 左右,阳性对照组 mage-3/pCI-neo 组最大杀伤率为 40% 左右,其余对照小鼠都只有 10% 以下的非特异杀伤水平。

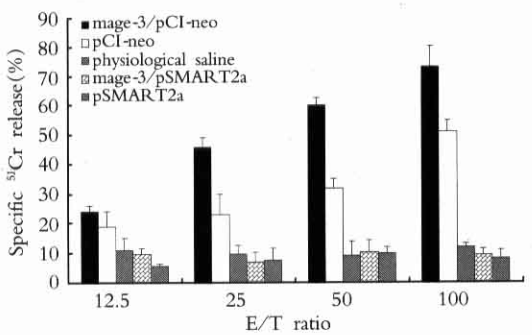


图 2　免疫小鼠的 CTL 杀伤实验

Fig 2　Activity of cytotoxic T-lymphocytes from immunized trimera mice

2.3 免疫动物体内抗体生成情况

疫苗接种后2周,动物经眼眶取血。1 000 r/min离心10 min,收集血清用于抗血清滴度分析。结果显示,重组基因疫苗mage-3/pSMART2a组产生的mage-3抗原特异性抗体效价达到1:512,mage-3/pCI-neo组为1:256,而其它对照组均未产生mage-3特异抗体。

3 讨论

本研究采用国外最新方法制作了trimera模型,FACS分析证实,移植人PBMC 2周后,小鼠腹腔中的人$CD45^+$细胞占88.84%、脾脏中为57.65%。这和以前文献中报道的结果是一致的。证实模型成功建立后,基于α-病毒复制酶的mage-3基因疫苗腹腔免疫动物2周后,产生70%左右的最大特异CTL杀伤活性,而对照组的mage-3/pCI-neo质粒则只有40%左右的杀伤活性,其它阴性对照组都只有10%以下非特异杀伤率。后者可能反映了NOD/SCID小鼠本身的T细胞的非完全缺失。在体液免疫方面,只有基因疫苗组产生了特异抗体,而对照组则没有产生任何特异抗体。这些结果说明,在trimera模型中,疫苗的刺激能够激发出特异初次细胞和体液免疫应答,提示这种模型可以通用于基于人的各种疫苗免疫效果的评价,这将是各种转基因动物之外的另一个备选方案。同时也证明了基于α-病毒复制酶的基因疫苗可以产生比常规基因疫苗高得多的免疫应答。

重组病毒基因疫苗因其有效性而备受人们关注。在诸多病毒载体中,α-病毒因其表达的有效性和安全性等特性被受人们青睐。α-病毒是RNA病毒,含有催化从RNA到RNA复制的复制酶(replicase)。这种复制过程是在宿主细胞的胞浆中进行的,效率极高,所以随后的蛋白质的表达量也会得到提高。研究显示,其表达量可以达到宿主细胞总蛋白的20%以上。同时研究还表明,基于α-病毒复制酶的真核表达质粒,同样具有α-病毒的复制和表达特性[10],而且还排除了病毒性载体使用的风险性,因此,基于α-病毒复制酶的载体在基因疫苗的研究中倍受青睐。

同rSFV感染细胞一样,基于α-病毒复制酶的质粒转染细胞之后,也会激发机体的抗病毒应答,病毒dsRNA可以诱导I型IFN和热休克蛋白的产生,通过活化2′,5′-A合成酶/RNase L和PKR途径,促进细胞的凋亡。实际上,一个质粒可在宿主细胞中产生多达200 000拷贝的病毒(+)链RNA,但是相应的抗原量增加并不明显,这一特点就是由于宿主细胞的凋亡所引起的。已有研究证实,凋亡细胞可以激活机体的专职APCs,刺激机体的天然免疫应答[11,12],从而过度补偿适应性免疫所必需的抗原量的减少,大大激活机体总体免疫应答,其效率远远高于其它常规真核表达质粒。因此,基于α-病毒复制酶的基因疫苗可能为临床治疗肿瘤的措施提供新的思路。

评价基于人的各种疫苗的免疫学效果需要人源化的动物模型,转基因动物和人/鼠嵌合模型都可供选择。在利用人/鼠嵌合模型的研究中,以前的研究是利用SCID小鼠T、B细胞的联合免疫缺陷性,将人PBMC直接移植到SCID小鼠中,结果显示在移植后的细胞扩增速度非常缓慢,容易形成了大量针对小鼠抗原的T、B细胞克隆[13],同时伴随着显著的B细胞淋巴瘤发生[14]。后来,Lubin等[15]使用了一种替代方法,这种方法是将人PBMC过继转移到经致死性照射并得到SCID小鼠BM放射保护的正常品系小鼠中。这种模型显示,在这种严格条件处理之后,人PBMC可以移植到各种不同品系的小鼠和大鼠中。移植人PBMC 10 d后,在这些小鼠或大鼠体内可见高水平的人Ig。而且,与Mosier等所描述的hu-PBL/SCID小鼠模型不同的是,这种模型中移植淋巴细胞的移行要迅速得多。移植后数天在淋巴组织中可以检测到大量的T、B淋巴细胞。这种强烈而快速的人T细胞可以使我们在移植人PBL到小鼠后很早就可以研究人T细胞的功能,而以前模型要在移植后1~3个月才能使用[16]。因此,人/BALB嵌合模型能比人/SCID小鼠模型产生针对不同抗原更为显著的初次免疫应答,是更理想的评价基于人的各种疫苗的模型。

参考文献:

[1] Srivastava I K, Liu M A. Gene vaccines [J]. Ann Intern Med, 2003, 138(7): 550-559.

[2] Nossal G J. The double helix and immunology [J]. Nature, 2003, 421(6921): 440-444.

[3] Hanke T, Barnfield C, Wee E G, *et al*. Construction and immunogenicity in a prime-boost regimen of a Semliki Forest virus-vectored experimental HIV clade A vaccine [J]. J Gen Virol, 2003, 84(Pt 2): 361-368.

[4] Lundstrom K. Alphavirus vectors for gene therapy applications [J]. Curr Gene Ther, 2001, 1(1): 19-29.

[5] Ilan E, Eren R, Lubin I, *et al*. The trimera mouse: a system for generating human monoclonal antibodies and modeling human diseases [J]. Curr Opin Mol Ther, 2002, 4(2): 102-109.

[6] Ilan E, Arazi J, Nussbaum O, *et al*. The hepatitis C virus (HCV)-trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV [J]. J Infect Dis, 2002, 185(2): 153-161.

[7] Bocher W O, Dekel B, Schwerin W, *et al*. Induction of strong hepatitis B virus (HBV) specific T helper cell and cytotoxic T lymphocyte responses by therapeutic vaccination in the trimera mouse model of chronic HBV infection [J]. Eur J Immunol, 2001, 31(7): 2071-2079.

[8] 倪 兵, 李艳秋, 王 莉, 等. 人肿瘤特异抗原mage-3基因疫苗的构建和表达[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(10): 1133-1136.

[9] 唐 艳，倪 兵，吴玉章. 人黑色素瘤抗原mage-3基因的克隆和表达[J]. 免疫学杂志，2001，17(6)：406-409.
[10] Leitner W W, Hwang L N, deVeer M J, *et al*. Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways [J]. Nat Med, 2003, 9(1): 33-39.
[11] Yamanaka R, Zullo S A, Tanaka R, *et al*. Enhancement of antitumor immune response in glioma models in mice by genetically modified dendritic cells pulsed with Semliki forest virus-mediated complementary DNA [J]. J Neurosurg, 2001, 94(3): 474-481.
[12] Murphy A M, Morris Downes M M, Sheahan B J, *et al*. Inhibition of human lung carcinoma cell growth by apoptosis induction using Semliki Forest virus recombinant particles [J]. Gene Ther, 2000, 7(17): 1477-1482.
[13] Mosier D E. Adoptive transfer of human lymphoid cells to severely immunodeficient mice: models for normal human immune function, autoimmunity, lymphomagenesis, and AIDS [J]. Adv Immunol, 1991, 50: 303-325.
[14] Okano M, Taguchi Y, Nakamine H, *et al*. Characterization of Epstein-Barr virus-induced lymphoproliferation derived from human peripheral blood mononuclear cells transferred to severe combined immunodeficient mice [J]. Am J Pathol, 1990, 137(3): 517-522.
[15] Lubin I, Segall H, Marcus H, *et al*. Engraftment of human peripheral blood lymphocytes in normal strains of mice [J]. Blood, 1994, 83(8): 2368-2381.
[16] Marcus H, David M, Canaan A, *et al*. Human/mouse radiation chimera are capable of mounting a human primary humoral response [J]. Blood, 1995, 86(1): 398-406.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2005)14-1435-01

个案与短篇

自动切割针CT引导下经皮肺活检的成功率

Automated cutting needle for percutaneous biopsy of lung under CT fluoroscopic guidance

陈 琉[1]，陈 涛[2]，陈金鳌[3]（重庆市第九人民医院：[1]胸外科，[2]老年康复科，北碚 400700；[3]山西医科大学临床一系，太原 030001）

CT引导下经皮肺活检是一个安全、高效的诊断肺结节良性和恶性病变方法[1]。诊断准确度达96.2%，敏感度95.1%，气胸发生度16.0%～44.6%，出血（肺实质出血，咳血）6.4%。回顾性分析2000年4月至2004年12月在本院与外院25例用自动切割Gallinil活检针，在CT引导下经皮肺活检，就活检成功率，诊断的准确率，敏感度及安全性做分析。

1 材料与方法

1.1 临床病例

25例病员，男性21例，女性4例，年龄20～83岁，平均54.1岁，60岁以上12例。X线片及胸部CT显示有肺损伤改变，其中24例有明确肺结节阴影：2～2.9 cm 11例，3～3.9 cm 12例，1例>6.0 cm；1例弥漫性肺间质病变。肺结节位于右肺上叶6例，右肺下叶7例，左肺上叶2例，左肺下叶5例，右肺中叶2例，右侧肺门2例。其中4例合并有肺气肿，3例合并少量胸腔积液。全组病员无出血倾向病史，无肝肾疾病史，无口服阿司匹林和抗凝剂，血小板和凝血酶元时间均正常。全部病人均在CT引导下，自动切割针经皮肺结节活检。

1.2 材料

市售普通CT或螺旋CT被用于肺活检。市售自动切割Gallinil活检针，18～20号，长20 cm，备用。

1.3 活检程序

病人取仰卧位，放射科医师行CT扫描，获肺结节图像。选择进针位并进行皮肤消毒。1%利多卡因10 mg/ml用于局部麻醉。Gallinil活检针经皮到肺结节边缘，进针避开可见肺大泡和大血管。选定进针深度1～2 cm，推动板机，切割针进结节内，CT影像定位针尖合适位置，胸腔外手工控制切割针，从不同方向，部位获取合适足够标本。标本置于10%甲醛溶液，送病理科冷冻切片，行组织细胞学检查。获取满意标本后，活检针关闭，避免医原性气胸和肺气栓。缓慢（1 cm/min）退出胸壁下。允许肺回弹膨胀封闭胸腔穿刺部位。活检后，CT被用于检查不同肺部去发现有无气胸。CT检查重复5 min，去发现迟发气胸/或肺实质出血。如肺从胸壁塌陷>2 cm，标志着中等量气胸，再插入穿刺针抽吸。活检后病人置于仰卧位，1 h后常规行直立后前位胸片，观察肺活检后并发症（气胸，肺实质出血）。

对气胸估价：由CT发现肺压缩距胸壁<2 cm为轻度，2～4 cm为中度，>4 cm为重度。出血并发症：由CT检查发现延活检针道模糊阴影为轻度，连续咳血/或少量胸腔内出血为中度，严重出血，胸腔内积血伴血循环不稳定。

全组活检组织均送病理科行组织细胞学诊断。

（下转1439页）

作者简介：陈 琉（1949～），男，江苏省淮安市人，博士，副主任医师，主要从事胸心外科方面的研究，发表论文10余篇。电话：(023)68203434
收稿日期：2005-04-21；修回日期：2005-05-08