DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.025
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
1178 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)13-1178-03

论著

HER2/neu动物模型的建立和免疫学鉴定

方 路[1],吴玉章[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院全军泌尿中心肾科;[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 建立表达人HER2/neu原癌基因的动物肿瘤模型并用免疫学方法加以鉴定。方法 将重组HER2/neu原癌基因真核表达载体转染P815细胞,有限稀释法筛选出稳定表达HER2/neu基因的P815肿瘤细胞株;用Western blot方法鉴定HER2/neu基因在P815细胞中的表达。在DBA/2小鼠体内建立表达HER2抗原的肿瘤动物模型,再通过表达HER2/neu基因的重组质粒免疫小鼠,诱导小鼠产生特异性HER2/neu基因特异的CTL应答,从免疫学方面鉴定HER2/neu动物肿瘤模型建立成功。结果 在体外获得了稳定表达HER2/neu基因的P815细胞株;免疫小鼠脾细胞中诱导出特异性CTL。结论 本研究成功建立了HER2/neu动物肿瘤模型,HER2/neu原癌基因DNA疫苗免疫可在体诱导特异性细胞免疫应答。

关键词:HER2/neu;动物模型;细胞免疫
中图法分类号:R-332;R392.2;R730.51 文献标识码:A

Establishment and evaluation of animal tumor model expressing HER2/neu

FANG Lu, WU Yu-zhang (Department of Diseases of Kidney, Center of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish animal tumor model expressing human oncogene HER2/neu and to evaluate the model by immunological method. Methods The recombinant eukaryotic plasmid expressing HER2/neu gene was transfected into P815 tumor cells. The tumor cell line P815 expressing HER2/neu gene stably was screened by limiting dilution method. The expression of target gene in host cells was determined by Western blotting. Following the establishment of animal tumor model expressing HER2 antigen in DBA/2 mice, tumor-specific response was induced in the spleen cells of DBA/2 mice which were inoculated with recombinant plasmids. Results P815 cell line expressing HER2/neu oncogene stably was obtained. HER2/neu specific CTLs could be induced from immunized DBA/2 mice. Conclusion HER2/neu-expressing tumor animal model is established successfully and the *in vivo* immune response can be induced after immunization with HER2/neu genetic vaccine.

Key words: HER2/neu; animal model; cellular immunity

肿瘤特异性的免疫学治疗正日益受到人们的重视[1],基于肿瘤免疫治疗的临床前期研究和肿瘤免疫学基础性研究的需要,已建立了多种小鼠肿瘤模型,其中小鼠肥大细胞瘤P815是应用较为广泛的一种肿瘤模型。其细胞株在体内外都有良好的增殖活性,且较稳定,用于体外杀伤实验。本研究筛选出一个P815单克隆瘤系,并鉴定出该瘤系存在肿瘤抗原基因的表达。在建立了P815肿瘤模型的前提下,对体内特异性抗瘤CTL效应的诱发和检测做了初步的研究,这为以后基于该肿瘤模型的肿瘤免疫研究及相关肿瘤免疫学基础研究奠定了基础。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2001CB510001)
作者简介:方 路(1967-),女,上海市人,硕士,主治医师,主要从事疫苗与免疫方面的研究。电话:(023)68754000-730085
收稿日期:2003-01-20;修回日期:2003-04-15

1 材料与试剂

1.1 细胞系

P815细胞为DBA/2小鼠来源的肥大细胞瘤,购于上海细胞所。采用含10%小牛血清的RPMI1640培养基,5%的CO_2,37 ℃培养。

1.2 实验动物

DBA/2小鼠($H\text{-}2L^d$),雌性,6~8周龄,购自军事医学科学院实验动物中心。

1.3 质粒

Pcmv/erbB-2A为重组真核表达载体,其中插入了人HER2/neu基因突变体片段(K753→A753),它受CMV启动子驱动。本质粒由美国Karmanos Cancer institute的Wei-Zen Wei博士惠赠。质粒pCI-neo(购于Promega公司),为阴性对照。

1.4 试剂

鼠抗人HER2/neu单抗购自博士德公司;$Na^{51}CrO_4$液购自美

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

国同位素公司；DOTAP 脂质体转染试剂盒购自德国 Boehringer mannheim 公司；DBA 试剂盒、Western-blot 试剂盒购自 Roche 公司。

2　方法

2.1　质粒 Pcmv/erbB-2A、pCI-neo 转染 P815 细胞及筛选阳性克隆

脂质体法转染细胞：无菌 EP 管中，3 μg 质粒 pCMV/erbB-2A（2.3 μl）、3 μg 质粒 pCI-neo（1.2 μl）溶于 21.5 μl HBS；另一个无菌 EP 管 15 μl DOTAP 与 35 μl HBS 混匀；将两管混匀，室温放置 15 min；在 DOTAP/质粒混合液中加入 2 ml 新鲜培养基，混匀；置 24 孔板 37 ℃孵育 24 h；G418 600 μg/ml 反复筛选细胞。

将转染 pCMV/erbB-2A 和 pCI-neo 的 P815 培养细胞进行有限稀释，至细胞浓度为 2.5 个/ml，以 200 μl/孔接种于 96 孔细胞培养板培养 7～10 d，挑取有单克隆细胞生长孔内的细胞至 25 cm^2 培养瓶中扩增培养，作 Westernblot 鉴定 erbB-2A 阳性的单克隆，扩增培养。

2.2　Westernbolt 检测 P815 细胞 HER2/neu 的表达

将转染 Pcmv/erbB-2A P815 细胞胰酶消化后，PBS 2 次，5 min/次，加细胞裂解液 100 μl，100 ℃下煮 5 min，Western-blot 方法参考《分子克隆实验指南》，SDS 电泳后电转移至硝酸纤维素膜上，丽春红 S 染色 5 min，10% 封闭液封闭 40 ℃过夜，加鼠抗人 HER2/neu 单抗（浓缩型 1∶100）与 0.5% 的封闭液 4 ℃共孵育 1 h，TBST 缓冲液漂洗 3 次 10 min/次，加 POD 二抗孵育 30 min，TBST 漂洗 3 次 10 min/次，加入化学发光剂，放入暗盒压片，1～10 min 后显影、定影。空质粒 pCI-neo 转染 P815 细胞为阴性对照。

2.3　体内诱发特异性 CTL 的检测

DBA/2 小鼠 10 只，随机分为实验组、对照组，每组 5 只小鼠。每只小鼠胫前肌注射质粒 pCMV/erbB-2A（100 μg/次）每 2 周 1 次，共 3 次，最后一次免疫后 2 周，取脾细胞检测 CTL。

2.3.1　脾细胞制备　　将免疫小鼠第 8 周处死取出脾脏，Hanks 液中洗涤，200 目无菌不锈钢网中压碎，Hanks 液吹打混匀，去除其中红细胞（1 ml 无菌水处理 30 s 低渗涨破，后立即用等体积的 1.8% NaCl 调至等渗），用无血清的 1640 培养液洗涤并与经 ^{60}Co 照射后的转染 pCMV/erbB-2A 的 P815 细胞共同培养 7 d，进行体外 CTL 诱导增殖。

2.3.2　靶细胞制备　　将转染 pCMV/erbB-2A 的 P815 细胞调至 2×10^6/ml，取 1×10^6 靶细胞加 $Na^{51}CrO_4$ 溶液 100 μl 共育 1.5 h，无菌 PBS 清洗细胞，8 000 r/min 离心 5 min，收集细胞沉淀，同时设转染 pCI-neo 的 P815 细胞为对照靶细胞。

2.3.3　将脾细胞离心后调至 10^7/ml，将靶细胞调至 10^5/ml，脾细胞在 96 孔板（V 形底）分别以 100∶1、50∶1、25∶1 和 12.5∶1 的比例与 2.3.2 中制备的靶细胞相混合，同时设 2 mol/L HCl 孔以测定靶细胞的最大 ^{51}Cr 释放量，培养基孔以测定靶细胞的自释放量，300 r/min 离心 5 min，使效应细胞和靶细胞充分混合，37 ℃孵箱中孵育 4 h。

2.3.4　1 000 r/min 离心 5 min，各孔分别收集 100 μl 上清，r-记数器测定各孔上清的 Bq 值，各组数据分别取平均值。其中自释放值应小于最大释放值的 15%。据如下公式计算各组 ^{51}Cr 释放百分数，即特异性 CTL 杀伤效率。

特异性 CTL 杀伤率（%）=（实验组释放值－自释放值）/（最大释放值－自释放值）×100%

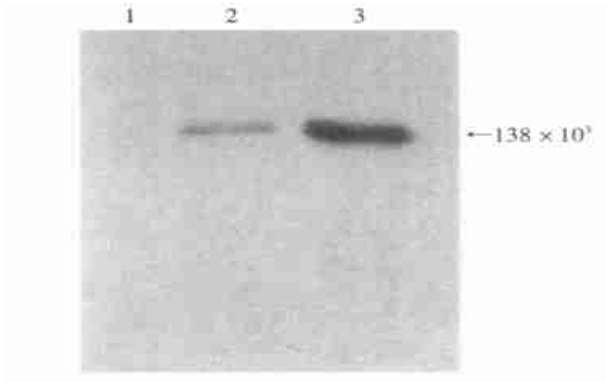
2.4　统计学方法

采用 SPSS10.0 对各组数据进行 χ^2 检验。

3　结果

3.1　Western blot 检测结果

转染 pCMV/erbB-2A 的 P815 细胞裂解后，经电泳、电转移至硝酸纤维素膜上进行杂交，图 1 可见 2、3 泳道有 138×10^3 的荧光条带，表明目标蛋白成功表达。



1：P815 cells transfected with pCI-neo in control group；2，3：P815 cells transfected with pCMV/erbB-2A in experimental group

图 1　质粒 **pCMV/erbB-2A** 转染的 **P815** 细胞 **Westernblot** 检测

Fig 1　Western blot analysis of P815 cells transfected with plasmid pCMV/erbB-2A

3.2　质粒 DNA 诱导的特异性 CTL 效应

实验组效应细胞对靶细胞（转染 pCMV/erbB-2A 的 P815 细胞）的特异性 CTL 杀伤率在 100∶1、50∶1、25∶1、12.5∶1 的效/靶比例下，分别为 69%、55%、38%、22%；而对照组效应细胞对靶细胞（转染 pCI-neo 的 P815 细胞）的特异性 CTL 杀伤率在 100∶1、50∶1、25∶1、12.5∶1 的效/靶比例下，分别为 18%、16%、13%、8%，可见实验组小鼠体内诱发了特异性 CTL 应答，对照组小鼠体内未诱发出特异性 CTL 应答。实验组、对照组均有显著性差异（$P<0.01$）。

4　讨论

构建合适的动物模型是研究肿瘤免疫学、临床前评价肿瘤治疗方案有效性和安全性的重要前提。1957 年 Dunm 等首先用化学致癌剂甲基胆蒽在 DBA/2 系小鼠体内诱发产生 P815 系，其后该瘤系成为肿瘤免疫学领域常用的模型之一。另外，P815 细胞株在体内、外都具有良好的增殖活性，且较稳定，适用于抗瘤效果评价。

基因疫苗又称 DNA 疫苗，它是由编码某一抗原蛋白的基因片段和载体构建而成，将其导入动物组织细胞，质粒 DNA 能在体内被细胞摄取，并通过转录、翻译、表达出相应的抗原蛋白，其中含多个 T 细胞表位，通过激活 T 细

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

胞，诱导机体产生特异性免疫应答，打破机体对肿瘤的免疫耐受[2]，从而达到治疗和预防肿瘤的目的。

HER2/neu 基因是特异性较强的肿瘤相关抗原，在乳腺癌的发生、发展、治疗和预后中起重要作用，可作为肿瘤免疫治疗的靶子，诱导机体产生有效的免疫应答。国外采用 HER2 单抗导向治疗乳腺癌已得到 FDA 批准上市。本研究正是基于以上特点，将人类原癌基因 HER2 克隆到真核表达载体 pCMV 上作为肿瘤特异的基因疫苗，利用脂质体法将 pCMV/erbB-2A 转染至 P815 细胞，通过有限稀释法挑选阳性细胞克隆，运用 Westernblot 方法鉴定 erbB-2A 在细胞中的表达，并将转染该质粒的 P815 细胞注入小鼠体内，建立动物肿瘤模型，通过 DNA 疫苗免疫小鼠，探讨主动特异性免疫治疗乳腺癌的可能性。结果小鼠呈现较为明显的特异性 CTL 杀伤效应，而对照组则未呈现特异性 CTL 杀伤效应。由此可见，在小鼠肥大细胞瘤 P815 模型中取得良好的肿瘤免疫治疗效果，抗肿瘤的免疫应答中细胞免疫起着主要作用，特别是 CTL，它是抗肿瘤免疫的主要效应细胞[3]。当质粒 DNA 注射至小鼠肌肉后，宿主肌细胞通过胞饮方式摄取外源性 DNA，质粒编码的抗原基因在肌细胞内首先转录成 mRNA，再翻译成抗原蛋白，经加工处理后抗原分子与肌细胞表达的 MHC-I 类抗原形成复合物，并将抗原递呈给 CD^{8+} 细胞，诱导产生特异性 CTL[4]，杀伤表达此类抗原的肿瘤细胞。而且细菌质粒 DNA 本身含有 CpG 基序，它可以调节 Th0 细胞向 Th1 方向极化，从而更容易产生细胞免疫[5]。因此，HER2/neu 基因免疫小鼠后可以有效的在小鼠体内诱发特异性 CTL 应答。这为基于该肿瘤模型的 HER2/neu 基因疫苗的研制提供了理论依据，也为肿瘤免疫治疗提供了新的途径。

参考文献：

[1] Waalen J. Genetic testing opens brave new world[J]. Ann Intern Med, 1997, 126(12): 139－140.

[2] Encke J, Putlittz J Z, Wands J R. DNA vaccines[J]. Intervirology, 1999, 42(2－3): 117－124.

[3] Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, *et al*. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-in-filtrating T lymphocytes associated with *in vivo* tumor regression[J]. J Immunol, 1995, 154(8): 3961－3968.

[4] Hoffman S L, Chen J, Doolan D L. Toward clinical trials of DNA vaccines against malaria[J]. Immunol Cell Biol, 1997, 75(5): 376.

[5] Chu R S, Targoni O S, Krieg A M, *et al*. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T Helper 1 (Th1) immunity[J]. J Exp Med, 1997, 186(10): 1623－1631.

（编辑 刘洪娥）

（上接 1177 页）

1.4 免疫组化法检测培养绒毛组织中的 β-hCG 表达

取出培养板各孔中的绒毛组织，迅速置于液氮中冷冻，然后移至恒冷切片机上，连续冰冻切片 20 μm，自然晾干。在 PBS 液中轻轻洗涤后，浸入 4% 多聚甲醛，室温下浸泡 20 min，取出后自然晾干。纯甲醇加 H_2O_2 至 0.5%，室温浸泡切片 30 min 以灭活内源性过氧化物酶，PBS 液洗 3 次。抗原修复液处理 10 min，PBS 液洗 3 次。其余步骤按照 SABC 免疫组化染色试剂盒（博士德公司）说明书进行。

结果判定：光镜下细胞浆内有棕黄色颗粒即为阳性表达，采用 Tiger 920 图像分析仪对阳性表达的标本进行平均光密度（Average optical density, AOD，单位面积的积分吸光度）测定，每个标本测定 5 个视野。以博士德公司提供的阳性片为阳性对照，用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.5 统计学分析

采用 t 检验、直线相关分析。

2 结果

2.1 放免法测定上清液中 β-hCG 含量

加入不同浓度 rhIL-1 继续培养 24 h 后，以放免法检测各组绒毛组织上清液中 β-hCG 含量（ng/ml），rhIL-1、rhIL-6、rhTNFα 在较高浓度时 hCG 的产生量明显加，尤其 rhIL-6、rhTNFα 处理组，与对照相比差异非常显著（$P<0.01$）。

2.2 免疫组化法检测各组绒毛组织中 β-hCG 表达

以免疫组化法检测各组绒毛组织中滋养细胞 β-hCG 的表达，测定 AOD 值作半定量分析，IL-1、IL-6、TNF 处理组滋养细胞 β-hCG 阳性表达的阳性程度均高于对照组（$P<0.05$），浓度越高其作用则越明显。

3 讨论

正常早孕滋养细胞产生 β-hCG 的量受到多种细胞因子的调控[2]，IL-6 受体在滋养细胞中和细胞因子介导的 β-hCG 由滋养细胞产生的调节网络中的存在已被发现，IL-1、TNFα 刺激滋养细胞释放 IL-6 并激活 IL-6 受体传导途径，引起 β-hCG 从滋养层的释放[3]。本结果说明晚期妊娠滋养细胞产生 β-hCG 的过程可能受到了细胞因子的调控，但其之间的相互关系以及可能存在的调控机制与早孕时是否相同，仍需进一步研究。

关键词：β-hCG；细胞因子；绒毛组织
中图法分类号：R714.14+2　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Onderoglu L S, Kabukcu A. Elevated second trimester human chorionic gonadotropin level associated with advere pregnancy outcome[J]. Int J Gynecol Obstet, 1997, 56(3): 245－249.

[2] Chandana D V, Senthil K. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells[J]. J Rep Immun, 2002, 53(2): 257－268.

[3] Baud O, Emilie D, Pelletier E, *et al*. Amniotic fluid concentrations of interleukin-β, interleukin-6 and TNFα in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome[J]. Br J Obstetrics Gynec, 1999, 106(1): 72－77.

（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net