DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.021
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
1272 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2002)14-1272-03

sFv-TNF-α基因修饰的PBMCs对人肝癌细胞系HHCC的体外杀伤活性研究

程 虹[1],刘彦仿[1],张惠中[2],沈万安[2],杨安钢[3],马福成[1] (第四军医大学:[1]西京医院病理科,西安 710032;[2]唐都医院全军骨肿瘤研究所;西安 710038;[3]基础医学部分子生物学教研室,西安 710032)

提 要:目的 观察分泌型抗肝癌单链双功能抗体基因(sFv-TNF-α)的重组逆转录病毒转导的PBMCs对体外培养人肝癌细胞(HHCC)的杀伤作用。方法 用感染性重组病毒产生细胞C_{22}(PA317/PST)产生的病毒上清转导人PBMCs,采用PCR、RT-PCR方法对转导的PBMCs进行DNA和mRNA水平的分析。转导的PBMCs(PBMCs/PST)与HHCC共培养,MTT法检测PBMCs/PST表达产物对肝癌细胞的体外杀伤活性。结果 PCR、RT-PCR结果显示PBMCs/PST中扩增出外源目的基因对应的电泳条带。MTT法检测结果,分泌型抗肝癌单链双功能抗体对体外培养肝癌细胞HHCC的杀伤率为(31.4±4.1)%。结论 分泌型抗肝癌单链双功能抗体基因可以在PBMCs中整合并稳定表达,其分泌的表达产物对HHCC具有一定的体外杀伤作用。

关键词:肝细胞癌;单链抗体;外周血单个核细胞;体外培养
中图法分类号:R394.2;R459.9;R735.7 文献标识码:A

Enhanced *in vitro* cytotoxicity of PBMCs *via* genetic modification of single-chain bi-functional antibody

CHENG Hong, LIU Yan-fang, ZHANG Hui-zhong, SHEN Wan-an, YANG An-gang, MA Fu-cheng (Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract: **Objective** To investigate the selective cytotoxicity of the bifunctional antibody-TNF-α fusion proteins in cell line HHCC. **Methods** The supernatant of the virus produced by C_{22} cells generated by transduction using the recombinant retroviral virus was transduced into human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PCR and RT-PCR were used to detect integration and transcription of the sFv-TNF-α gene in the transduced PBMCs (PBMCs/PST). MTT method was used to detect antitumour activity of the antibody-TNF-α fusion proteins. **Results** The results indicated that there was integrated sFv-TNF-α gene in the genome of PBMCs/PST, and that PBMCs/PST were able to express the fusion antibody-TNF-α proteins. Cell killing was significant in HHCC cells co-cultivated with PBMCs/PST, whereas the PBMCs/pLXSN control cells had no significant cytotoxicity effects on HHCC cells. **Conclusion** The expression of the bifunctional antibody TNF-α fusion proteins in PBMCs/PST has cytotoxicity to HHCC cells *in vitro*.

Key words: hepatocellular carcinoma; single-chain antibody; peripheral blood mononuclear cells; PBMCs; culture *in vitro*

自20世纪90年代初迄今,已有百余项肿瘤基因治疗方案获准进入临床试验,但纵观近10年的研究,其临床试验疗效与预期的目标之间还存在较大差距,原因之一就是肿瘤细胞的特异性识别尚未解决,基因治疗缺乏特异的靶向性仍是亟待解决的难点之一,也是阻碍基因治疗进程的主要问题之一[1~3]。随着基因工程抗体技术的迅速发展,肿瘤特异性单链抗体的问世为基因治疗靶向性问题的解决提供了新的手段,近年来成为肿瘤免疫基因治疗中的热点,目前已有多种单链免疫毒素基因治疗计划进入临床试验[4]。在本实验室成功克隆的抗肝癌单链抗体基础上,我们构建了分泌型抗肝癌单链双功能抗体基因逆转录病毒表达载体pLXSN-sFv-TNF-α(PST),并用PA317细胞进行包装,筛选出一株具有较高滴度的感染性重组病毒产生细胞C_{22}(PA317/PST)[5]。用C_{22}细胞产生的病毒上清转导人外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),使其表达并分泌针对人肝癌细胞的靶向性sFv-TNFα融合蛋白,观察转导的PBMCs对体外培养肝癌细胞的杀伤作用。

基金项目:全军"九五"重点补充课题资助项目(98M098)
作者简介:程 虹(1967—),女,安徽省宣州市人,博士,讲师,主要从事肝癌免疫基因治疗及外科诊断病理学方面的研究。电话:(029)3375497
通信作者:刘彦仿,电话:(029)3374507
收稿日期:2003-05-10;修回日期:2003-06-20

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

1　材料与方法

1.1　材料

人肝癌细胞系 HHCC 为本室保存, RPMI1640 常规传代培养。转染的逆转录病毒产生细胞系 C_{22} 由本室构建[5], 用 DMEM 常规传代培养。DMEM、G418、Superscript™ 逆转录试剂盒、TRIZOL Reagent 为 GIBCO 公司产品, Polybrene 为 Sigma 公司产品, MTT 为 Serva 公司产品, PHA 购自 Sigma 公司, 超级小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所。重组人 IL-2 为上海生物技术研究所产品。淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂。

1.2　PBMCs 的分离[6]

抽取正常人外周血 50 ml, 肝素抗凝, 加入淋巴细胞分离液 50 ml, 室温 1 400× g 离心 30 min, 吸取单个核细胞层悬液, 40 ml 无血清 RPMI1640 洗涤细胞 3 次(1 000× g 离心 10 min), 计数, 用含 20% 小牛血清的完全 RPMI1640 培养液稀释为活细胞 1×10^9/L, 加入 5×10^5 U/L IL-2 及 5 mg/L PHA, 于 37 ℃、5% CO_2 培养 3 d, 换含 5×10^5 U/L IL-2、20% 小牛血清的完全 RPMI-1640 培养液继续培养 3 d 后, 进行逆转录病毒的转导。

1.3　重组逆转录病毒转导[7,8]

用 C_{22} 细胞制备重组逆转录病毒上清[5], 取 5 ml C_{22} 细胞上清(不含 G418)及 8 mg/L polybrene 感染 1×10^6 个 PBMCs, 置 37 ℃、5% CO_2 孵箱内培养 6 h, 换普通完全 RPMI1640 培养液, 连续感染 3 d, 转导的 PBMCs 命名为 PBMCs/PST。对照组 PBMCs 用 PA317/pLXSN(空白载体)细胞上清感染, 转导的 PBMCs 命名为 PBMCs/pLXSN。病毒连续感染 3 d 后, 第 4 天转入含 500 mg/L G418 的完全 RPMI1640 培养液中培养 1 周。

1.4　PCR 分析 PBMCs/PST 细胞基因组 DNA 中的外源基因

分别提取重组逆转录病毒转导的 PBMCs/PST 和 PBMCs/pLXSN 细胞中的基因组 DNA[5], 用 3 对引物(sFv-1 和 sFv-2、TNFα-1 和 TNFα-2 及 *neo*-1 和 *neo*-2), 分别扩增细胞基因组 DNA 中 sFv、TNF-α 及 *neo* 基因, 以证实外源基因导入靶细胞。PCR 反应于 25 μl 体积中完成, 基因组 DNA 模板 2.5 μl, 引物 2.5 μl, 10× PCR 缓冲液 2.5 μl, 2.5 mmol/L, dNTP 2.5 μl, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl, 加水补足 25 μl, 混匀后在 PCR 仪上扩增。循环参数为: 94 ℃变性 60 s, 58 ℃退火 60 s, 72 ℃延伸 90 s, 经 30 个循环后, 72 ℃保温 10 min。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪观察。

1.5　RT-PCR 方法检测 sFv 和 TNF-α 基因的 mRNA

采用 TRIZOL 一步法, 分别提取重组逆转录病毒转导的 PBMCs/PST 和 PBMCs/pLXSN 细胞中的总 RNA。利用 Superscript™ 系统, 以细胞内总 RNA 为模板进行 cDNA 第一链的合成: 3.5 μl RNA, 2 μl 5× 逆转录缓冲液, 1 μl Oligo(dT_{12}), 70 ℃保温 10 min, 冰浴 2 min, 加入 1 μl 100 mmol/L DTT, 1 μl 10 mmol/L dNTP, 1 μl RNase inhibitor, 0.5 μl MMLV 逆转录酶, 37 ℃反应 1 h。以 cDNA 第一链为模板进行 sFv 和 TNF-α 基因的扩增, PCR 反应于 50 μl 体积中完成, cDNA 模板 2.5 μl, 5 μmol/L 引物 5 μl, 10×PCR 缓冲液 5 μl, 2.5 mmol/L dNTP 5 μl, TaqDNA 聚合酶 0.5 μl, 加水补足 50 μl, 混匀后在 PCR 仪上扩增。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪观察。

1.6　PBMCs/PST 与人肝癌细胞共培养[9,10]

选择对数生长期的人肝癌细胞 HHCC 接种于 24 孔培养板中, 每孔 2×10^4, 将 PBMCs/PST 按每孔 2×10^5 接种于孔径 0.4 μm 的 Millicell 滤膜培养皿中, 并将 Millicell 置 24 孔培养板中, 使 PBMCs/PST 与 HHCC 共培养。设 PBMCs/pLXSN 与 HHCC 共培养为空载体对照组, PBMCs 与 HHCC 共培养为空白对照, 每种细胞设 20 复孔。培养板置 37 ℃、5% CO_2 孵箱内培养, 72 h 后用 MTT 法检测其细胞杀伤率。

1.7　MTT 法检测细胞杀伤率[9]

细胞共培养 72 h 时, 取出 Millicell, 加 MTT 每孔 40 μl 至 24 孔培养板中, 继续培养 4 h, 弃上清, 加入 0.2 ml DMSO 终止反应, 充分振荡后在酶标仪上波长为 550 nm 处检测 A_{550} 值, 计算细胞杀伤率。

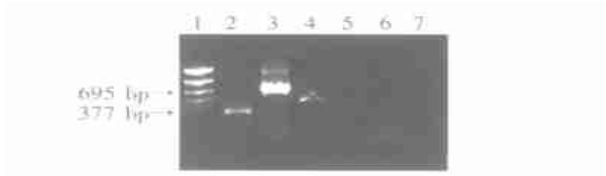
1.8　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验分析。

2　结果

2.1　PBMCs/PST 基因组 DNA 中外源基因扩增

PCR 产物电泳后观察, 可见相应的 327、470、790 bp 大小的条带, 分别与 *neo*、TNF-α、sFv 基因片段大小相符, 而 PBMCs/pLXSN 中未扩增出这 3 种大小的条带, 见图 1, 证实 PBMCs/PST 中有外源性目的基因的导入。



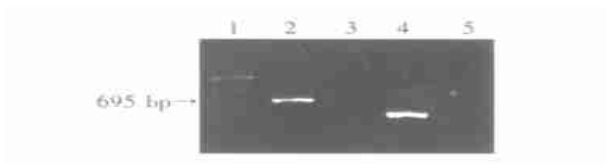
1: PCR marker; 2—4: PBMCs/PST cells (*neo*, sFv, TNF-α); 5—7: Control PBMCs/pLXSN cells (*neo*, sFv, TNF-α)

图 1　PBMCs/PST 细胞基因组 DNA 中 sFv、TNF-α 及 *neo* 基因 PCR 扩增结果

Fig 1　sFv, TNF-α and *neo* gene amplified by PCR in genomes of PBMCs/PST cells

2.2　外源基因在 PBMCs/PST 中转录水平的分析

RT-PCR 产物电泳后, 可见相应的 470、790 bp 条带, 分别与 TNF-α、sFv 基因片段大小相符, 对照组未扩增出这两种大小的条带, 见图 2, 证实 PBMCs/PST 中外源性目的基因有 mRNA 表达。



1: PCR marker; 2: PBMCs/PST cells (sFv); 3: Control PBMCs/pLXSN cells (sFv); 4: PBMCs/PST cells (TNF-α); 5: Control PBMCs/pLXSN cells (TNF-α)

图 2　PBMCs/PST 细胞中 sFv 和 TNF-α 基因 mRNA 的 RT-PCR 检测结果

Fig 2　sFv and TNF-α gene amplified by RT-PCR in PBMCs/PST cells

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

2.3 细胞杀伤率检测

用MTT法检测与PBMCs/PST、PBMCs/pLXSN共培养HHCC的A_{550}(A)值及与PBMCs共培养HHCC的A_{550}值(A_0)，计算对HHCC细胞的杀伤率(%)。计算公式为：细胞杀伤率(%)=(1－A/A_0)×100%。PBMCs/PST和空载体对照PBMCs/pLXSN对HHCC细胞的杀伤率分别为(31.4±4.1)%和(13.7±2.9)%，两者具有显著差别($P<0.01$)。

3 讨论

实现人类实体瘤基因治疗的途径主要有两种：一种是在体靶细胞的转染(*in vivo*)，即直接基因治疗途径，例如将细胞因子或肿瘤抗原的基因表达载体直接体内注射或将MHC-I基因直接注射入瘤体内等治疗肿瘤；另一种是离体靶细胞的转染(*ex vivo*)，即间接基因治疗途径，必须分离并培养离体的靶细胞，并在接受基因转移后移植回人体以治疗疾病，例如应用体外基因修饰的TIL、瘤苗、成纤维细胞等体内回输或接种的方法治疗肿瘤[11,12]。

本实验选择逆转录病毒介导的体外基因转移方法进行基因治疗的研究，要求基因转移的靶细胞既要容易获得，又要容易回输到人体，因此，我们采用PBMCs作为基因转移的靶细胞。由于目前所常用的基因转移方法(包括逆转录病毒载体-包装细胞转移系统)效率均不高，获得大量的靶细胞是重要的先决条件，因此，要求该细胞易于体外培养，而且具有一定的分裂和增殖能力。此外，逆转录病毒载体对处于活跃分裂状态的细胞感染率和基因转移率较高，而对未分化的分裂不十分活跃的细胞感染率和基因转移率较低，因此，基因治疗中应尽量选择处于活跃分裂状态的细胞作为靶细胞。PBMCs具备上述的各项条件，是目前一种较理想的基因治疗靶细胞[13]。虽然有研究表明，TIL抗肿瘤的活性是PBMCs的50～100倍，而且具有良好的肿瘤病灶趋向性和浸润性[14]，但由于其不易分离和培养，在某些肿瘤如肝癌中TIL数量极少，无法满足基因治疗中反复操作的要求，因而其应用受到很大的限制。

我们将正常人PBMCs分离并用PHA和IL-2进行体外刺激培养，用携带分泌型抗肝癌单链双功能抗体基因的重组逆转录病毒感染，使其表达并分泌针对人肝癌细胞的sFv-TNF-α融合蛋白，采用PCR、RT-PCR方法，对转导的PBMCs进行DNA和mRNA水平的分析，证实外源目的基因在PBMCs中整合并表达。将转导的PBMCs与HHCC共培养，由于Millicell底部为孔径0.4 μm的滤膜，细胞不能通过该滤膜，而其分泌物可以相互透过[9]，因此，用MTT法可检测PBMCs/PST表达产物对肝癌细胞的杀伤作用，结果表明，分泌型抗肝癌单链双功能抗体对体外培养的肝癌细胞系HHCC具有较明显的杀伤作用。

本实验结果表明，转导的人PBMCs可以表达并分泌特异性的抗肝癌sFv-TNF-α融合蛋白，并且对体外培养的肝癌细胞系HHCC具有杀伤活性。因此，采用人PBMCs作为靶向细胞因子的表达细胞进行肝癌基因治疗的方法是可行的。

参考文献：

[1] Blaese R M, Culver K W, Miller A D, *et al*. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADAminus SCID: Initial Trial Results After 4 Years[J]. Science, 1995, 270(5235): 475－480.

[2] Taylor N, Bacon K B, Smith S, *et al*. Reconstitution of T Cell Receptor Signaling in ZAP-70-deficient Cells by Retroviral Transduction of the ZAP-70 Gene[J]. J Exp Med, 1996, 184(5): 2031－2036.

[3] Rosenberg C. Gene therapy researcher under fire over controversial cancer trials[J]. Nature, 1992, 360(6403): 339－400.

[4] Chaudhary V K, Batra J K, Gallo M G, *et al*. A rapid method of cloning functional variable-regin antibody gengs in Escherichia coli as single chain immunotoxins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(3): 1066－1070.

[5] 程 虹，刘彦仿，张惠中，等. 抗肝癌单链双功能抗体基因逆转录病毒表达载体的构建及包装[J]. 第四军医大学学报，2001，22(3)：280－282.

[6] Adams G B, McMullen M, Turner S, *et al*. Isolation and Transduction of $CD34^+$ Cells From Small Quantities of Peripheral Blood From HIV-1-Infected Patients Not Treated With Hemopoietic Growth Factors[J]. J Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirol, 1999, 21(1): 1－8.

[7] Barzon L, Bonaguro R, Castagliuolo I, *et al*. Transcriptionally Targeted Retroviral Vector for Combined Suicide and Immunomodulating Gene Therapy of Thyroid Cancer[J]. J Clin Endocrinol & Metabol, 2002, 87(11): 5304－5311.

[8] 程 虹，刘彦仿，张惠中，等. 抗肝癌单链双功能抗体在Hut-78细胞系中的表达及体外杀伤活性[J]. 第四军医大学学报，2002，23(24)：2242－2246.

[9] Chen S Y, Yang A G, Chen J D, *et al*. Potent antitumor activity of a new class of tumour-specific killer cells[J]. Nature, 1997, 385(6611): 78－80.

[10] Yang A G, Chen S Y. A new class of antigen-specific killer cells[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(1): 46－51.

[11] Mah C, Byrne B J, Flotte T R. Virus-Based Gene Delivery Systems[J]. Clin Pharmacokinet, 2002, 41(12): 901－911.

[12] Kellen J A. Gene therapy in cancer[J]. J Exp Therap &Oncol, 2002, 2(6): 312－316.

[13] Culver K, Cornetta K, Morgan R, *et al*. Lymphocytes as cellular vehicles for gene therapy in mouse and man[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(8): 3155－3159.

[14] Kasid A, Moredki S, Aebersold P, *et al*. Human gene transfer: characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes as vehicles for retroviral-mediated gene transfer in man[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(1): 473－477.

(编辑 张大春)

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