DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.013
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
146 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0146-03

病毒介导多种基因对胆管癌细胞免疫原性的影响

王征旭[1],何振平[2],胡桂芳[1],吴祖泽[3] ([1]兰州军区兰州总医院普通外科,兰州 730050;[2]第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038;[3]军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

提 要:目的 探讨IFN-γ、IL-2或B7-1基因修饰对胆管癌细胞免疫原性的作用。方法 构建携带人IFN-γ或IL-2基因的逆转录病毒表达载体,和含人B7-1基因的腺病毒载体,导入胆管癌细胞系QBC939,运用淋巴细胞杀伤试验、肿瘤细胞在裸鼠体内成瘤性分析、混合淋巴细胞和肿瘤细胞培养,研究导入的目的基因对QBC939细胞免疫原性的影响。结果 导入IFN-γ基因的QBC939细胞体外能增强胆管癌病人外周血淋巴细胞杀伤亲本瘤细胞的活性;导入IL-2基因的QBC939细胞在裸鼠体内的成瘤性降低;导入B7-1基因的QBC939细胞能刺激外周血T淋巴细胞的增殖。结论 人IFN-γ、IL-2或B7-1基因修饰能增强胆管癌QBC939细胞的免疫原性。

关键词:胆管癌;干扰素-γ;白细胞介素-2;B7-1;免疫原性
中图法分类号:R394;R735.8 文献标识码:A

Effect of immunogenicity of viral vector-mediated several kinds of genes on cholangiocarcinoma cells

WANG Zheng-xu, HE Zhen-ping, HU Gui-fang, WU Zu-ze (Department of General Surgery, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Objective To investigate the change of immunogenicity of cholangiocarcinoma cell line QBC939 modified by human interferon-γ, IL-2 or B7-1 genes. Methods The retroviral vector of IL-2 or IFN-γ cDNA, and adenoviral vector containing B7-1 cDNA were constructed and transduced into QBC939 cell line. Cytotoxicity lymphocyte assay, tumorigenicity of tumor cell in nude mice, and mixed lymphocyte and tumor cell coculture were employed to study the change of immunogenicity of the cholangiocarcinoma cell line QBC939 transduced with interferon-γ, IL-2, or B7-1 gene. Results The cytolytic activity of cholangiocarcinoma patient's peripheral blood lymphocytes against parental cells could be enhanced by in vitro QBC939 after modification with IFN-γ gene. The tumorigenicity of QBC939 cell transduced with IL-2 gene could be reduced in nude mice. QBC939 tranduced with B7-1 could stimulate the proliferation of human peripheral blood T lymphocytes. Conclusion The immunogenicity of QBC939 cell lines could be enhanced by human interferon-γ, IL-2, or B7-1 cDNA.

Key words: cholangiocarcinoma; interferon-γ; interleukin-2; B7-1; immunogenicity

胆管癌在我国发病率有逐年增加的趋势,传统手术、放化疗的疗效十分有限,5年生存率低于30%[1]。肿瘤基因治疗作为一种新型的肿瘤治疗尝试,具有广阔的临床应用前景,虽然目前尚无公认的、普遍采用的肿瘤基因治疗模式,但大量的实验证实IL-2、IFN-γ、B7-1、GM-CSF基因修饰能明显增强多种肿瘤细胞的免疫原性[2]。本实验研究IFN-γ、IL-2或B7-1三种基因修饰对胆管癌细胞QBC939免疫原性的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、细胞和实验动物

重组人IL-2购自军事医学科学院基础所;MTT(四甲基偶氮唑盐)购自Fluka(美国);共刺激分子CD80(B7-1/BB1)鼠抗人单克隆抗体购自Pharmingen公司(美国);同位素^{3}H-TdR(3.7×10^7 Bq/ml)购自中国原子能研究院;人T细胞富集柱购自R&D公司(美国);人胆管细胞癌细胞系QBC939由第三军医大学附属西南医院王曙光博士建立并惠赠,体外培养于含15%胎牛血清的DMEM或IMDM(Gibco BRL,美国)中;BALB/c nu/nu裸鼠,雌性,体重18~24 g,4~6周龄,购自卫生部药品生物制品鉴定所动物中心。

1.2 含目的基因的重组逆转录病毒和腺病毒载体

重组逆转录病毒表达载体[3] pZIP-IL-2和pZIP-IFN-γ,分别含人IL-2或IFN-γ cDNA,导入QBC939细胞后,10^6克隆细胞分泌IL-2为120 U/48 h(用IL-2依赖性细胞株CTLL-2测定),分泌IFN-γ为9.5 IU/48 h[3]。重组腺病毒载体[4] Ad-multigenes同时含人p53、B7-1、GM-CSF、IL-2四种目的基因,感染胆管癌QBC939细胞后,其中IL-2基因不表达,余三种目的基因均同时高效表达[4]。重组腺病毒载体Ad-p53仅含人野生型p53抑癌基因,作为对照重组腺病毒载体。

1.3 淋巴细胞杀伤活性试验

取6例胆管癌病人外周静脉血(其中4例含HLA A_2位点),用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞(Peripheral Blood Lymphocyte, PBL),常规培养2 h以去掉贴壁的单核细胞,取未贴壁的淋巴细胞与QBC939细胞或导入IFN-γ基因的QBC939细胞(用50 Gy的^{60}Co γ照射灭活,淋巴细胞:肿瘤细胞为5:1)共同培养7 d(补加IL-2至终浓度50 U/ml)。胆管癌病人外周血淋巴细胞及QBC939细胞均用微量淋巴细胞毒法进行HLA分型[3],HLA A2位点相匹配者再行淋巴细胞杀伤试验,效应细胞为已

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000077)
作者简介:王征旭(1965—),男,辽宁省辽阳市人,博士,副主任医师,主要从事肝胆恶性肿瘤的基因治疗和细胞信号转导方面的研究,发表论文32篇。电话:(0931)8975301
收稿日期:2001-04-15;修回日期:2001-08-23

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

刺激培养 7 d 的胆管癌病人外周血淋巴细胞, 靶细胞为未转基因的 QBC939 细胞(效∶靶为 40∶1), 采用 MTT 比色法进行测定[5]。

1.4　裸鼠成瘤性改变

24 只裸鼠被随机分为 4 组, 每组 6 只鼠。经不同处理的 QBC939 细胞用无血清 DMEM 调整细胞浓度, 每只裸鼠右肩胛背部皮下接种 10^6 个细胞。裸鼠分组为: ①QBC939 组: 仅接种亲本瘤 QBC939 细胞; ②QBC939-IL-2 组: 接种转 IL-2 基因的 QBC939 细胞; ③QBC939-IFN-γ 组: 接种转 IFN-γ 基因的 QBC939 细胞; ④QBC939-PBL 组: 接种 QBC939 细胞后 2 周, 当肿瘤直径达 5 mm 时, 裸鼠尾静脉内注射 10^7 个体外刺激培养的胆管癌病人外周血淋巴细胞(PBL)。接种肿瘤细胞后 1 周开始, 每 3 d 测量肿瘤最长径和最宽径, 37 d 后处死裸鼠。计算肿瘤大小(mm)=(长径+宽径)/2。

1.5　淋巴细胞、肿瘤细胞混合培养

两份健康人外周静脉血分别用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞, 过 T 细胞富集柱以去掉单核细胞和 B 淋巴细胞, 所收集的 T 淋巴细胞(纯度可达 97% 以上)用含 15% 胎牛血清的 IMDM 调细胞浓度, 在 U 型底 96 孔细胞培养板上, 加淋巴细胞 10^5 个/孔, 和经感染 50 MOI (Multiful of infection)的 Ad-multigenes 或 Ad-p53 的 QBC939 细胞瘤苗(经 50 Gy 的 ^{60}Co γ 照射灭活) 5×10^3 个/孔(淋巴细胞∶肿瘤细胞为 20∶1), 以未经感染的 QBC939 作为对照(经 50 Gy 的 ^{60}Co γ 灭活), 部分孔内补加 B7-1 单克隆抗体(终浓度为 5 mg/L), 每孔终体积为 200 μl, 培养 6 d 后加入同位素 ^{3}H-TdR 3.7×10^4 Bq/孔, 继续培养 18 h, 收集的细胞用β 液体闪烁计数仪检测每分钟脉冲数(Counts per minute, cpm)。

1.6　统计学处理

使用 POMS 统计分析软件(上海第一医科大学与中山医科大学合编)进行 t 检验。

2　结果

2.1　外周血淋巴细胞杀伤活性试验

QBC939 细胞含 HLA 的 A2 位点[3], 4 例存在 A2 位点的胆管癌病人外周血淋巴细胞, 与导入 IFN-γ 基因的 QBC939 瘤苗共同培养 7 d 后, PBL 杀伤亲本瘤细胞的活性均明显升高, 见图 1。

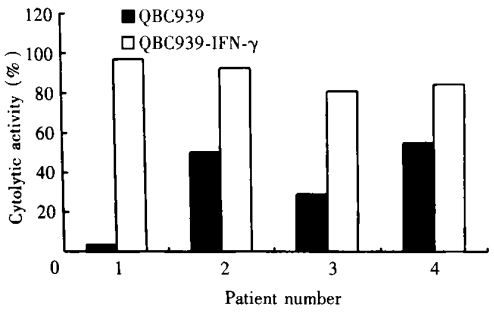


图 1　导入 **IFN-γ** 基因的 **QBC939** 细胞诱导 **PBL** 裂解靶细胞的活性增强　(效应细胞∶靶细胞为 40∶1)

Fig 1　Enhanced PBL cytolytic activity induced by QBC939 cells transduced with IFN-γ gene　(Effect∶Target was 40∶1)

2.2　裸鼠成瘤性改变

转导人 IFN-γ 基因的 QBC939-IFN-γ 组, 裸鼠成瘤大小与亲本瘤 QBC939 组相比, 无显著差异($P>0.05$); 接种转导 IL-2 基因 QBC939 细胞的裸鼠, 开始个别鼠长出肉眼可见的肿瘤, 16 d 后肿瘤逐渐消褪, 见图 2, 到 22 d 皮下已扪及不到肿瘤结节($P<0.01$)。接种 QBC939 细胞后, 当肿瘤直径达 5 mm 左右时, 从裸鼠尾静脉过继输注体外刺激培养的 PBL 细胞, 肿瘤的生长受到一定程度的抑制, $P<0.05$, 见图 3。



1～2: QBC939; 3～4: QBC939-IFN-γ; 5～6: QBC939+PBL; 7～8: QBC939-IL-2

图 2　**QBC939** 细胞导入目的基因及体内注射体外激活的 **PBL** 后 **37 d** 在裸鼠体内生长变化

Fig 2　QBC939 cells in nude mice transduced with therapeutic gene or inoculated with PBL activated *in vitro* after 37 d

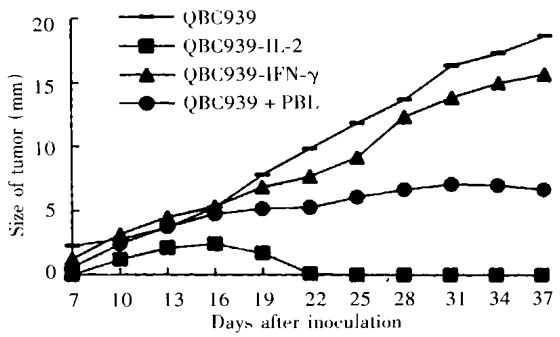


图 3　**QBC939** 细胞导入目的基因及体内注射体外激活的 **PBL** 后在裸鼠体内的成瘤性改变

Fig 3　Tumorigenicity in the nude mice with the inoculation of QBC939, QBC939-IL-2 or QBC939-IFN-γ cells or with the injection of PBL activated *in vitro* 2 weeks after QBC939 cell inoculation

2.3　淋巴细胞和肿瘤细胞的混和培养

转导含 B7-1 基因的 Ad-multigenes 而制备的 QBC939 细胞瘤苗, 体外能刺激人外周血 T 淋巴细胞的增殖, 而未转基因的对照胆管癌细胞瘤苗, 或经转导含 p53 基因的 Ad-p53 而制备的细胞瘤苗却无此作用。转多基因瘤苗刺激人外周血 T 淋巴细胞增殖的作用, 能被人 B7-1 单克隆抗体所封闭。从两个正常人外周血所分离的 T 淋巴细胞, 分别与转基因或未转基因的 QBC939 细胞瘤苗共同培养, 均得到了相似的结果, 见图 4。

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

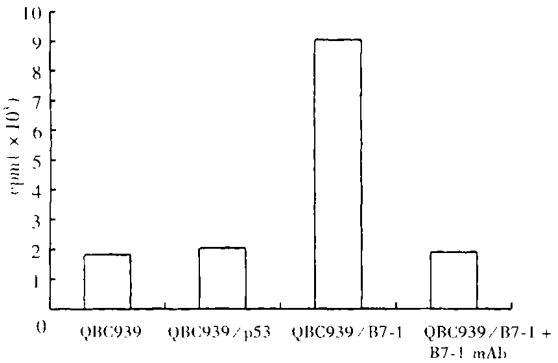


图 4 **QBC939** 细胞导入 **B7-1** 基因后刺激外周血 **T** 淋巴细胞的增殖 （两 个人的平均值，1 cpm= 36 Bq）

Fig 4 T lymphocyte proliferation stimulated by QBC939 cells transduced with B7-1 gene (Average data of two persons, 1 cpm= 36 Bq)

3 讨论

胆管癌因其易转移、高复发、预后差等生物学特性，临床上寻找有效的治疗途径和方法已成为当务之急，而转基因瘤苗可望成为主要的辅助治疗手段之一，以消除术后转移灶、残余癌细胞，及预防术后复发等。目前对于胆管癌免疫逃避机制的认识尚十分肤浅，国内外罕见胆管癌基因治疗研究的文献报道。我们利用目前较为公认的免疫修饰基因 IFN-γ、IL-2 和 B7-1，进行胆管癌基因治疗的实验研究，结果显示：转导 IFN-γ 基因的 QBC939 细胞，体外能激发胆管癌病人 PBL 裂解靶细胞的活性，4 例与 QBC939 细胞 A2 位点相匹配的胆管癌病人 PBL，与 QBC939-IFN-γ 共培养后，其细胞裂解活性均得到增强，原因主要是转染 IFN-γ 基因的 QBC939 细胞，MHC Ⅰ 类抗原的表达水平增加[3]，而增加 MHC Ⅰ 类抗原的表达水平，能够提高受 MHC 限制的人 PBL 裂解靶细胞的活性[6]。导入人 IL-2 基因的 QBC939 细胞接种裸鼠后，开始尚有部分鼠长出肿瘤，到第 22 天时，长出的肿瘤已消褪，其原因主要是人的 IL-2 因子可以作用于鼠，使接种瘤苗的局部不断分泌 IL-2 因子，激活裸鼠体内巨噬细胞、NK 细胞等非特异性杀伤细胞[7]，从而抑制肿瘤的生长，而接种 QBC939-IFN-γ 瘤苗，因人的 IFN-γ 不能作用于鼠（种属特异性），因此与接种亲本瘤细胞相比，肿瘤的大小差异不显著。裸鼠接种亲本瘤后，尾静脉内再过继输注体外已激活的人外周血淋巴细胞（PBL），肿瘤的生长受到一定程度的抑制（$P<0.05$），因这种杀伤细胞体外经与转 IFN-γ 基因的胆管癌细胞共同培养，因此考虑可能具有一定的靶细胞特异性。我们已通过流式细胞仪测定发现，未转基因的 QBC939 细胞弱表达 B7-1 分子[4]，但在体外并不能刺激人体外周血 T 淋巴细胞的增殖，当导入含人共刺激分子 B7-1 基因的 Ad-multigenes 后，则能明显刺激 T 淋巴细胞的增殖，说明使 QBC939 细胞过度表达 B7-1 分子，能明显增强其免疫原性[8]。当培养液中加入 B7-1 分子的单克隆抗体进行封闭，能显著抑制这种刺激增殖作用，说明这种刺激作用是由 Ad-multigenes 中的 B7-1 基因所致[9]。

研究结果显示，胆管癌细胞系 QBC939 导入人 IFN-γ、IL-2 或 B7-1 三种目的基因后，其免疫原性均能得到增强，提示这三种目的基因都可做为进行胆管癌基因治疗的候选治疗基因之一。实验中我们将三种治疗基因分别导入 QBC939 细胞，若同时导入这三种基因，将会在胆管癌细胞免疫的不同环节进行免疫增强，可能会起到进一步的免疫协同作用，有待后续实验研究。

参考文献：

[1] Hsing A W, Gao Y T, Devesa S S, *et al*. Rising incidence of biliary tract cancers in Shanghai China [J]. Int J Cancer, 1998, 75(3): 368－373.

[2] 王征旭，何振平，吴祖泽. 肿瘤基因工程瘤苗研究进展[J]. 国外医学：肿瘤学分册，1998，25(1)：1－3.

[3] 王征旭，何振平，李春海，等. 逆转录病毒介导干扰素-γ 基因对胆管癌细胞株的影响[J]. 第三军医大学学报，1999，21(7)：469－471.

[4] 王征旭，何振平，吴祖泽，等. 腺病毒介导多基因在胆管癌细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报，1999，21(10)：742－745.

[5] 王新江，李 燕，谷淑燕，等. 特异性细胞毒性 T 细胞检测方法的建立极其在重组痘苗病毒活疫苗细胞免疫研究中的应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志，1994，8(4)：308－310.

[6] Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D, *et al*. A phase I clinical trail of immunotherapy with interferon-γ gene-modified autologous melanoma cells[J]. Cancer, 1997, 80(2): 401－427.

[7] Zier K S, Gansbacher B. Tumor cell vaccines that secrete interleukin-2 (IL-2) and Interferon-γ (IFN-γ) are recognised by T cell while resisting destruction by natural killer (NK) cells [J]. Euro J Cancer, 1996, 32A (8): 1 408－1 412.

[8] Tatsumi T, Takehara T, Katayama K, *et al*. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 1997, 25(5): 1 108－1 112.

[9] Komata T, Tanaka R, Yamamot K, *et al*. B7-1 (CD80)-transfected human glima cells and interleukin-12 directly stimulate allogeneic $CD8^+$ T cells [J]. J Immunother, 1997, 20(4): 256－261.

（编辑 薛国文）

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