DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.032
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
72 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)01-0062-03

腺病毒介导多基因对大鼠脾淋巴细胞毒作用的影响

王征旭[1],何振平[1],吴祖泽[2] ([1]第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心,重庆 400038;[2]军事医学科学院放射医学研究所百环生物医学研究中心,北京 100850)

提 要:目的 研究含多基因(p53、GM-CSF、B7-1、IL-2)的重组腺病毒载体Ad-multigenes,对大鼠脾脏淋巴细胞毒作用的影响及对淋巴细胞分泌IL-2的刺激作用。方法 应用人外周血淋巴细胞和肿瘤细胞混合培养,分析导入目的基因的肝癌细胞系体外刺激人T淋巴细胞分泌IL-2的作用;利用大鼠脾淋巴细胞杀伤活性试验,分析导入目的基因的大鼠癌肉瘤Walker256细胞,其免疫原性的变化。结果 导入Ad-multigenes的肝癌细胞系体外刺激人外周血T淋巴细胞分泌IL-2的水平增加;导入Ad-multigenes的大鼠Walker256细胞,能增强大鼠脾脏淋巴细胞的杀亲本瘤细胞活性。结论 腺病毒介导多基因Ad-multigenes,能增强大鼠癌肉瘤Walker256细胞的免疫原性,和T细胞分泌IL-2的水平增加。

关键词:腺病毒;基因治疗;CTL活性
中图法分类号:R373.1;R392.11;R735.8 文献标识码:A

Effect of adenovirus-mediated multigenes on cytotoxicity of rat spleen lymphocyte *in vitro*

WANG Zheng-xu, HE Zhen-ping, WU Zu-ze (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of the cytotoxicity of rat spleen lymphocyte and the level of IL-2 secreted by human T lymphocyte after the induction of adenovirus-mediated multigenes (Ad-multigenes, containing p53, GM-CSF, B7-1, IL-2 genes). Methods After human lymphocytes of peripheral blood and tumor cells were cultured together, the level of IL-2 secreted by T lymphocytes was determined after they were stimulated by liver cancer cells with pre-transfer of Ad-multigenes *in vitro* by ELISA. The change of the immunogenicity of rat carcinosarcoma cell Walker 256 transduced with multigenes was studied by cytotoxicity assay of rat spleen lymphocytes. Results The level of IL-2 secreted by peripheral blood T lymphocytes was increased *in vitro* after the T cells were co-cultivated with Ad-multigene-transducted liver cancer cells. Stimulated by Ad-multigene-transducted Walker 256 cells, the cytotoxicity activities of rat spleen lymphocyte were significantly elevated. Conclusion The immunogenicity of rat carcinosarcoma cell Walker 256 is enhanced, and the IL-2 production level which was secreted by T lymphocyte is increased after the mediation of Ad-multigenes.

Key words: adenovirus; gene therapy; cytotoxic T lymphocyte activity

我们已构建了同时含人GM-CSF、B7-1、p53、IL-2四种目的基因的重组腺病毒载体[1],并证实目的基因p53、B7-1、GM-CSF能同时在肝癌细胞中高效表达[2],和诱导肝癌细胞发生凋亡[3]。本研究探讨该重组腺病毒载体中GM-CSF、B7-1基因的免疫修饰作用。

1 材料和方法

1.1 重组腺病毒载体及主要试剂

重组腺病毒载体Ad-multigenes同时含人p53、B7-1、GM-CSF、IL-2四种目的基因[1],感染肝癌细胞后,其中的IL-2基因未见正常表达[2],其余3种目的基因均同时高效表达;仅含绿色荧光蛋白(GFP)基因或人野生型p53抑癌基因的重组腺病毒载体Ad-GFP、Ad-p53,作为对照载体。重组人IL-12购自R&D公司;GM-CSF、IL-2 ELISA检测试剂盒和人T细胞富集柱,购自R&D公司;非放射性检测细胞杀伤活性试剂盒Cyto Tox96(Non-Radioactive Cytotoxicity Assay)购自Promega公司。

1.2 动物和细胞株

人肝细胞癌细胞系HepG2、BEL-7402由军事医学科学院二所三室提供;Wistar大鼠近交系癌肉瘤Walker 256细胞,购自美国ATCC公司,体外培养于含15%胎牛血清的RPMI 1640(Gibco BRL)培养液中,体内Wistar大鼠腹水传代培养。雌性Wistar大鼠,体重60~80 g(用于腹水传代培养)和180~200 g(用于免疫接种),购自军事医学科学院实验动物中心。

1.3 瘤苗的制备

HepG2、BEL-7402细胞感染50 MOI的Ad-multigenes或Ad-p53后12 h,分别给予10、20 Gy的^{60}Co-γ线(剂量率为2.07~2.23 Gy/min)照射。Walker 256细胞感染50 MOI的重组腺病毒后3 h,给予30 Gy的^{60}Co-γ线照射。瘤苗均于照射后当天行混合淋巴细胞、肿瘤细胞培养,或接种在大鼠皮下。

基金项目:中美合作美国Baxter医疗用品公司基因治疗部基金资助项目
作者简介:王征旭(1965-),男,辽宁省人,博士,主治医师,主要从事肝癌的基因治疗和细胞信号转导方面的研究,发表论文18篇。电话:(021)65564166-75322
收稿日期:2000-11-03;修回日期:2000-12-29

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

1.4 Walker256 细胞对腺病毒感染效率和分泌GM-CSF水平

利用含绿色荧光蛋白基因的重组腺病毒载体 Ad-GFP, 检测 Walker 256 细胞对腺病毒的感染效率。每日取转染 Ad-multigenes 或 Ad-p53, 经 ^{60}Co-γ 线照射的 Walker 256 细胞培养上清, 用 ELISA 法检测其中 GM-CSF 的含量变化。

1.5 淋巴细胞分泌 IL-2 活性测定

取 2 人份肝素抗凝健康人外周静脉血, 用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞, 过无菌 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(纯度达 97%以上), 用含 15% 胎牛血清的 IMDM (Gibco BRL)调淋巴细胞浓度, 与上述制备的 HepG2、BEL-7402 细胞瘤苗以 20∶1 混合培养于 24 孔板, 每孔加淋巴细胞 10^6 个, 肿瘤瘤苗 5×10^4 个, 部分孔补加人 IL-12(终浓度为 100 ng/L), 3 d 后取培养上清, 用 IL-2 ELISA 定量检测试剂盒检测培养上清中 IL-2 的分泌水平。

1.6 大鼠脾脏淋巴细胞杀伤活性检测

上述制备的导入目的基因的大鼠 Walker 256 细胞瘤苗, 用 PBS 调细胞浓度为 10^8/ml, 在每只大鼠右前肢腋下接种 0.2 ml (2×10^7 个), 1 周后再用同样方法加强免疫 1 次, 2 周后无菌取脾, 碾碎鼠脾, 过 200 目不锈钢网, 用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞, 于 37 ℃培养淋巴细胞 1.5 h, 去掉贴壁的单核细胞, 取出未贴壁的淋巴细胞(主要是 T、B 细胞), 用含 15%胎牛血清的 IMDM 调细胞浓度, 每 25 cm^2 培养瓶接种 4×10^6 个淋巴细胞和 4×10^5 个肿瘤细胞(经 30 Gy 的 ^{60}Co-γ 线照射的未转基因的 Walker 256 细胞), 每日补加重组人 IL-2 (终浓度为 50 U/ml), 37 ℃、5% CO_2 培养 7 d。取体外刺激培养的鼠脾淋巴细胞, 与未转基因的亲本瘤 Walker 256 细胞(未照射), 以不同比例混合培养于 U 型底 96 孔板, 37 ℃共同培养 4 h, 离心去掉细胞, 取培养上清测乳酸脱氢酶(LDH)的活性(根据肿瘤细胞释放 LDH 的量, 来判断靶细胞的死亡程度), 具体方法按试剂盒说明书操作, 计算细胞毒性(%):

$$\text{细胞毒性}=\frac{\text{实验组 } D_\lambda \text{ 值}-\text{效应细胞自然释放 } D_\lambda \text{ 值}-\text{靶细胞自然释放 } D_\lambda \text{ 值}}{\text{靶细胞全部裂解最大释放 } D_\lambda \text{ 值}-\text{靶细胞自然释放 } D_\lambda \text{ 值}}\times 100\%$$

2 结果

2.1 Walker 256 细胞对腺病毒感染效率和分泌GM-CSF水平

感染 50 MOI 的 Ad-GFP, 荧光倒置显微镜下可见约 80% 的 Walker 256 细胞(悬浮生长)发绿色荧光, 提示 Walker 256 细胞对腺病毒易感(稍低于贴壁生长细胞的转染效率)。感染 50 MOI 的 Ad-multigenes 后经照射灭活的 Walker 256 细胞, 培养上清中 GM-CSF 分泌水平最高达 40 ng/10^6 细胞/24 h 左右, 以感染后 72 h 表达水平最高, 以后逐渐下降, 可维持至少 7 d。

2.2 IL-2 的产生

用感染 Ad-multigenes 的肝癌 HepG2 细胞而制备的瘤苗, 能刺激人外周血 T 淋巴细胞分泌 IL-2 的水平增高(多基因中虽然含 IL-2 基因, 但由于表达水平极低, 故所检测到的 IL-2 因子, 是由T 淋巴细胞分泌所致), 当加入 100 ng/L 的人 IL-12 时, 还能进一步刺激 IL-2 的产生, 见图 1。而感染 Ad-p53 的肝癌细胞无此作用。用 BEL-7402 肝癌细胞也得到了类似的结果。

2.3 大鼠脾脏淋巴细胞杀伤活性变化

用转多基因瘤苗免疫过的大鼠, 其脾脏淋巴细胞杀伤亲本瘤 Walker 256 细胞的活性明显高于用转 p53 基因的瘤苗, 或亲本瘤细胞瘤苗免疫过的大鼠, 见图 2。

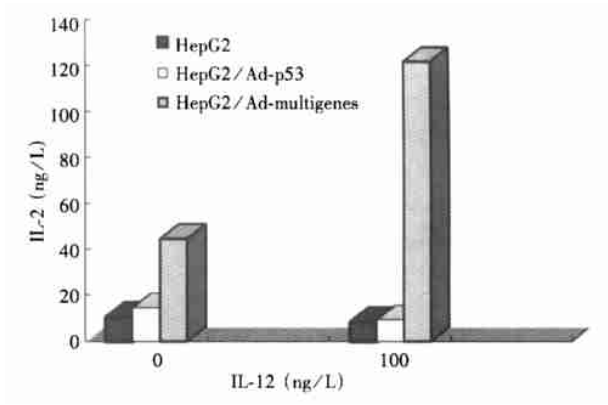


图 1　IL-12(100 ng/L)对 HepG2 瘤苗刺激 T 淋巴细胞产生的 IL-2 的增强作用

Fig 1　IL-2 production of T cells stimulated by HepG2 vaccine and enhanced by IL-12 (100 ng/L)

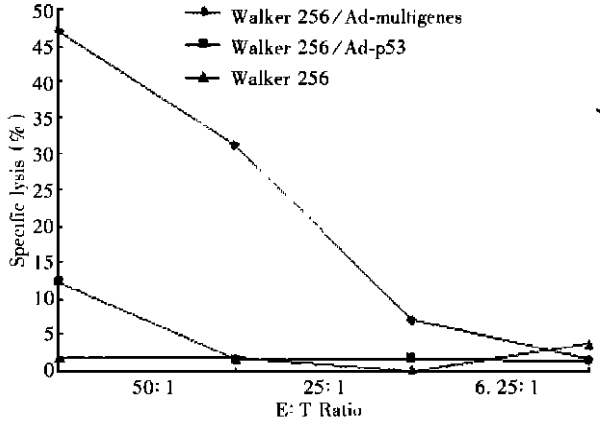


图 2　Walker 256 细胞感染 Ad-multigenes 后刺激大鼠脾脏淋巴细胞裂解亲本瘤细胞的活性增强

Fig 2　Enhancement of rat spleen lymphocyte cytolytic activity by stimulation of Walkar 256 cells infected with Ad-multigenes

3 讨论

肝癌细胞系 HepG2、BEL-7402 导入 Ad-multigenes 基因后, 体外能明显增强 T 淋巴细胞分泌 IL-2 的水平, 提示T 淋巴细胞被刺激激活, 原因主要是多基因中 B7-1 基因对肿瘤细胞的免疫修饰所致[4]。导入 Ad-multigenes 基因的肝癌细胞加入 IL-12 后, 刺激 T 淋巴细胞分泌 IL-2 的水平进一步增加, 而感染Ad-p53的肝癌细胞加入 IL-12 后却无此作用, 提示 IL-12 因子与B7-1 基因具有免疫协同作用[5], 能进一步增强肝癌细胞的免疫原性。转导多基因的 Walker 256 细胞瘤苗, 能够诱导大鼠脾淋巴细胞产生强烈的抗肿瘤免疫反应, 其脾脏淋巴细胞的杀伤活性明显高于转 p53 基因或亲本瘤瘤苗所诱导的脾淋巴细胞, 由于人的 B7-1 基因并不能作用于大鼠, 而人的GM-CSF 基因能够作用于大鼠 (GM-CSF 基因具有较

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

强的种属特异性[6]，因此推论转 Ad-multigenes 基因瘤苗所诱导的大鼠脾淋巴细胞毒活性增强，原因是由多基因中人 GM-CSF 基因所致，由于 GM-CSF 因子刺激大鼠抗原提呈细胞对 Walker256 细胞的提呈能力增强等原因所致。实验中通过贴壁生长方式已去掉大部分单核细胞、粒细胞等免疫效应细胞，因此推论大鼠脾细胞的杀伤活性是 T 淋巴细胞特异性的细胞毒反应。有研究认为，GM-CSF 基因和 B7 基因具有协同增强肿瘤细胞免疫原性的作用[7]，我们相信Ad-multigenes中 B7-1 和GM-CSF 基因的联合导入，在体内会更进一步提高肿瘤的免疫基因治疗效果。

参考文献：

[1] 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.
[2] 王征旭，何振平，吴祖泽. 腺病毒介导人 p53、B7-1、GM-CSF、IL-2 基因在肝癌细胞中的表达[J]. 中华肿瘤杂志，2000，22(2)：126－127.
[3] 王征旭，何振平，吴祖泽. 腺病毒介导多基因对肝癌细胞凋亡的诱导作用[J]. 中华肝脏病杂志，2000，8(4)：224－226.
[4] 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): 1 108－1 114.
[5] Komata T, Tanaka R, Yamamot K, *et al*. B7-1 (CD80)-transfected human glioma cells and interleukin-12 directly stimulate allogeneic CD8＋ T cells [J]. J Immunother, 1997, 20(4): 256－269.
[6] Sanda M G, Ayyasari S R, Jaffee E M, *et al*. Demonstration of a rational strategy for human prostate cancer gene therapy[J]. J Urol, 1994, 151(3): 622－628.
[7] Parney I F, Petruk K C, Zhang C, *et al*. Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor and B7-2 combination immunogene therapy in an allogeneic Hu-PBL-SCID/beige mouse-human glioblastoma multiforme model[J]. Human Gene Ther, 1997, 8(6): 1 073－1 085.

（编辑　郭建秀）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2001)01-0074-01

鲜红斑痣的激光治疗及护理

Nursing and treatment of port-wine stain by laser

李秀华　（第三军医大学附属西南医院星源激光医疗中心，重庆 400038）

我科于 1998 年 4 月至 2000 年 9 月用 VPW532 nm 激光治疗鲜红斑痣共计 302 例。现将其治疗及护理体会报告如下。

1　临床资料

302 例中，男 76 例，女 226 例，年龄 1 个月至 60 岁，平均 21.46 岁。过去治疗情况：未治疗 264 例(87.42%)，曾经其它方法治疗无效者 38 例(12.58%)。皮损在躯干及四肢者 23 例(7.62%)，面颈部者 279 例(92.38%)。皮损面积最小 1 cm^2，最大 400 cm^2。

激光治疗仪：系美国科以人公司生产的维纳斯可调脉宽(VPW)倍频 Nd:YAG 激光。波长 532 nm，由光纤输出。工作物质为掺钕钇铝石榴石(Nd:YAG)，通过倍频转换出 532 nm 波长激光。脉冲宽度分 2、5、7、10 ms 4 挡，重复频率 1～6 Hz，光斑 2～10 mm，最小能量密度 0.26 J/cm^2，最大能量密度 38 J/cm^2。

2　治疗方法与效果

治疗参数一般设定在能量密度 7～14 J/cm^2，脉宽 7～10 ms，冷却头温度控制在 4～5 ℃。在颈部、眼睑部位及儿童皮肤应相对降低能量。扫描时，皮损区可 80%～100%的光斑重叠照射 1～3 次，以皮肤变成灰紫色或略变白色为度。2～3 个月治疗 1 次。

疗效判定标准：痊愈为皮损完全消退，基本呈正常肤色；显效为皮损减轻或消退大于 60%；有效为皮损减轻或消退 30%～60%；无效为皮损无变化[1]。

治疗效果：本组病例治疗 1 次有 140 例，治疗 2 次者 75 例，治疗 3 次 32 例，治疗 4 次 25 例，治疗 5 次 11 例，治疗 6～11 次者共计 19 例。有 60 例治疗 1 次无法判定疗效，故有效统计数字为 242 例。其中痊愈 45 例(18.60%)，显效 110 例(45.45%)，有效 74 例(30.17%)，无效 13 例(5.37%)。有 4 例(1.65%)术后出现局限性瘢痕，面积最大 5 cm^2，最小 1 cm^2。有 42 例(17.36%)出现色素减退，未见其他并发症。

3　护理体会

3.1　术前准备

热情接待病人，并耐心向每一位病人说明整个治疗过程与简单的激光常识、治疗原理以及对鲜红斑痣的治疗现状、预期的治疗效果和可能出现的并发症。必要时把治疗成功的病人照片提供其参考，提高感性认识，签署手术同意书。并留取照片，要求每一次拍摄前清洁皮肤，充分暴露皮损区并保持体位、暴光条件一致。然后进行麻醉，一般地，成人及忍耐力较强的儿童，我们采用表面局部麻醉法。即用瑞典产 5% EMLA 乳膏按 1～1.5 g/10 cm^2 涂于皮损区，再用 3 MFegaderm 密封膜或食品保鲜膜封闭，1～2 h 后进行治疗，皮损在 5 cm^2 以下或婴幼儿可用 1%奴夫卡因或 1%～2%利多卡因局部注射麻醉，对于面积较大，忍耐力较弱的儿童则需在全麻下进行。全麻需提前1 d 与麻醉科联系并做好全麻前准备，通知病人禁食 12 h。

3.2　术后护理

术后立即用冰袋冰敷，并衬垫 2～4 层消毒纱布。面颈部

（下转 77 页）

作者简介：李秀华(1963－)，女，四川省眉山市人，主管护师，主要从事激光治疗的护理方面的研究。电话：(023)68754495

收稿日期：2000-06-21；修回日期：2000-10-19

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