DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.019

文章编号:1000-5404(1999)10-0742-04

腺病毒介导多基因在胆管癌细胞中的表达

王征旭* 何振平 吴祖泽** 马宽生 刘吉奎 张维维*** (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心)重庆,400038

提 要 **目的**:研究腺病毒介导的多基因(GM-CSF、B7-1、p53、IL-2)在胆管癌细胞系QBC939中的表达及对其生长的影响。**方法**:构建同时含GM-CSF、B7-1、p53、IL-2 4种目的基因的重组腺病毒载体Ad-multigenes,应用流式细胞仪、ELISA、免疫组化等方法,分析该重组腺病毒体包含的目的基因在靶细胞中的表达,并绘制细胞的生长曲线。**结果**:腺病毒介导的多基因在胆管癌细胞系QBC939中高效表达(IL-2不表达),并能抑制胆管癌细胞的生长。**结论**:腺病毒介导的多种基因能在胆管癌细胞QBC939中表达,并抑制肿瘤细胞的生长。

关键词 多基因腺病毒;胆管癌细胞系;基因表达;生长抑制

中图法分类号 R735.8;Q786 **文献标识码**:A

由于人们目前对肿瘤发病机制和免疫逃避机制认识的局限性,尚无公认的肿瘤基因治疗模式[1]。在肿瘤基因治疗中既要考虑导入的目的基因对肿瘤细胞生长的抑制或诱导细胞凋亡的作用,又要考虑到有利于提高肿瘤细胞的免疫原性,从而调动和增强机体对肿瘤的免疫能力。从这一目的出发,本文以E1、E3区缺失的血清5型腺病毒为载体,构建了同时含人p53、B7-1、GM-CSF、IL-2基因的重组腺病毒载体,研究该腺病毒体在胆管癌细胞系中的表达和对其生长的影响。

1 材料与方法

1.1 构建复制缺陷型重组腺病毒载体

分别构建重组质粒,包含:①p53/GM-CSF表达框:含CMV始动子、野生型人p53 cDNA、EMC-IRES(脑心肌炎病毒内部核糖体进入位点)[2]、人GM-CSF cDNA和SV40聚腺苷酸化信号;②B7-1/IL-2表达框:含人SV40早期始动子、人B7-1 cDNA、EMC-IRES、人IL-2 cDNA、BHG聚腺苷酸化信号。将2个表达框分别克隆到质粒pXCJL1(长7.0 kb)上,形成同时含p53、GM-CSF、B7-1、IL-2的表达载体。该表达载体再与重组质粒pJM17(长40.3 kb)形成同源重组,以脂质体DOTAP(Promega)介导,共转染进入293细胞,通过PCR法筛选、鉴定,得到含4个目的基因的复制缺陷型重组腺病毒Ad-multigenes,见图1。含绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein)[3]基因的重组腺病毒载体Ad-GFP,作为对照,导入该重组腺病毒体的靶细胞,在荧光显微镜下呈绿色。

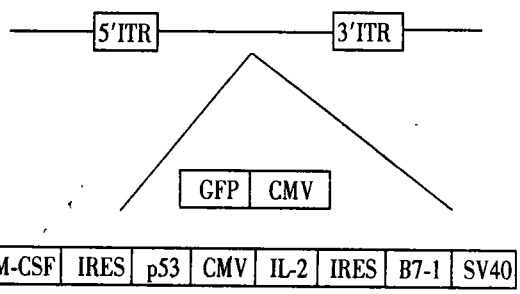


图1 含绿色荧光蛋白基因和多基因的复制缺陷型重组腺病毒体结构示意图

Fig 1 Structural analysis for replication-incompetent adenoviral gene therapy vectors encoding GFP (Ad-GFP), B7-1 and IL-2 and p53 and GM-CSF (Ad-multigenes)

1.2 细胞培养及主要试剂

胆管癌细胞系QBC939由本科王曙光博士建立并惠赠。含5型腺病毒E1片段的人胚肾细胞系293细胞,由美国Baxter医疗用品公司提供。以上细胞均培养于含10%胎牛血清(中国医学科学院血液制品研究所)的高糖型DMEM(GIBCO BRL)中,并补加HEPES、谷胺酰氨、青链霉素等。定量检测IL-2、GM-CSF的ELISA试剂盒购自Genzyme公司;FITC标记的B7-1(CD80)鼠抗人单克隆抗体购自Pharmingen;p53鼠抗人单克隆抗体(PAb1801)购自Pharmingen;低熔点琼脂糖(用于空斑实验)购自Sigma公司;氯化铯购自GIBCO公司。

* 王征旭,男,34岁,主治医师,博士,现在第二军医大学东方肝胆外科医院 上海,200438

** 军事医学科学院放射医学研究所百环生物医学研究中心 北京,100000

*** 美国Baxter医疗用品公司基因治疗部

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

1.3　腺病毒的扩增、纯化、滴度测定

当培养的 293 细胞达到 90%融合时，给予 10 MOI 纯化的腺病毒，或 5 ml 含腺病毒的培养上清，培养 36～48 h，当细胞致病变效应（CPE）达 90%～100%时（细胞变圆、间隙加大，10%～20%细胞脱落），收集细胞存－80℃，收集的 293 细胞经反复冻融 3 次，离心去掉细胞碎片，上清用氯化铯密度梯度离心法，150 000×g，10℃ 离心 1 h，收集病毒带，再次用氯化铯密度梯度离心法，10℃，150 000×g 离心 18 h，收集病毒带，用含 10%甘油的 Hank's 液透析病毒 24 h，用病毒的空斑实验（Plague assay），进行病毒的滴度测定。

1.4　胆管癌细胞系对腺病毒感染效率的检验

QBC939 细胞以 1×10^4/孔接种于 24 孔板，12 h 后感染不同 MOI 的 Ad-GFP，48 h 后在荧光倒置显微镜（OLYMPUS IX-70）下计数发绿色荧光的细胞和该视野的全部细胞数。

1.5　检测目的基因在胆管癌细胞中的表达

60 mm 平皿接种 5×10^5 细胞，12 h 后感染 50 MOI 的 Ad-multigenes，每 24 h 换 1 ml 新鲜培养液，收集上清用于 ELISA 法检测 IL-2、GM-CSF 的表达量；1×10^6 细胞接种 60 mm 平皿，感染重组腺病毒 48 h 后，用 0.25%胰蛋白酶消化细胞，FITC 标记的 B7-1（CD80）鼠抗人单克隆抗体与靶细胞在室温共同孵育 30 min，Hanks 液洗 3 遍，用于流式细胞仪（BSD 公司）检测 B7-1 的表达，计数细胞量为 15 000 个；2×10^5 细胞接种 60 mm 平皿，感染病毒后 48 h，用免疫组化法检测 p53 蛋白的表达。

1.6　绘制细胞生长曲线

QBC939 细胞以 2×10^5 数量接种于 60 mm 平皿，第 2 天感染 50 MOI 的 Ad-multigenes 或 Ad-GFP，培养基作对照，每皿重复 3 次，于感染后的不同时间收集细胞，台盼蓝染色，细胞计数，每皿重复 3 次。

2　结果

2.1　高滴度重组腺病毒体的制备和胆管癌细胞系对腺病毒的感染效率

经氯化铯密度梯度超速离心，获得高度浓缩的、高纯度的重组腺病毒，其 $OD_{260}:OD_{280}>1.3$，经空斑实验，该重组腺病毒体的滴度是：Ad-multigenes 为 2×10^{10}pfu/ml，Ad-p53 为 2×10^{11} pfu/ml，Ad-GFP 为 9×10^{10} pfu/ml。给予 50 MOI 的 Ad-GFP 时，胆管癌细胞系 QBC939 可达到 80%左右的感染效率，同时感染人肝脏原代培养成纤维细胞，见图 2。多个肝细胞癌细胞系和大鼠癌肉瘤 Walker 256 细胞，感染 50 MOI 的病毒量时，均可达到 80%～90%左右的转染效率。

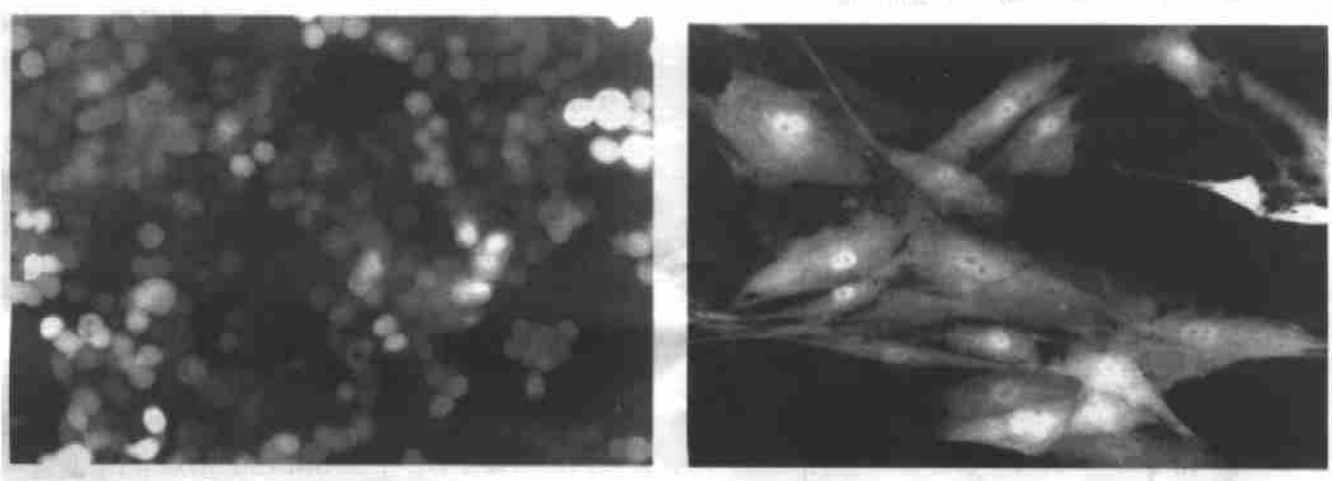


图 2　QBC939（左）和肝原代培养成纤维细胞（右）导入 50 MOI Ad-GFP 后 24 h　（×200）

Fig 2　QBC939 cell (left) and primarily cultured hepatic fibroblast (right) infected 24 h after with 50MOI Ad-GFP　（×200）

2.2　腺病毒介导的多基因在 QBC939 细胞中的表达

胆管癌细胞系感染 50 MOI 的 Ad-multigenes 后，1×10^6 细胞每 24 h 最高可表达约 16 ng GM-CSF。转导 20 MOI 的 Ad-multigenes 后 48 h，FACS 检测 B7-1 的表达水平，胆管细胞癌增加约 6 倍左右，以大鼠 Warker 256 细胞做为表达人 B7-1 蛋白的阴性对照，可见 QBC939 细胞弱表达 B7-1 分子，见图 3，随感染病毒量的增加，B7-1 的表达水平亦增加。

IL-2 的表达水平在 ELISA 试剂盒检测值的下限以下。

2.3　细胞生长动力学改变

胆管癌细胞系 QBC939 感染 50 MOI 的 Ad-multigenes 后，与亲本瘤相比，细胞生长受到不同程度的抑制，见图 4，而感染 50 MOI 对照病毒 Ad-GFP 后，细胞生长则不受影响。

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

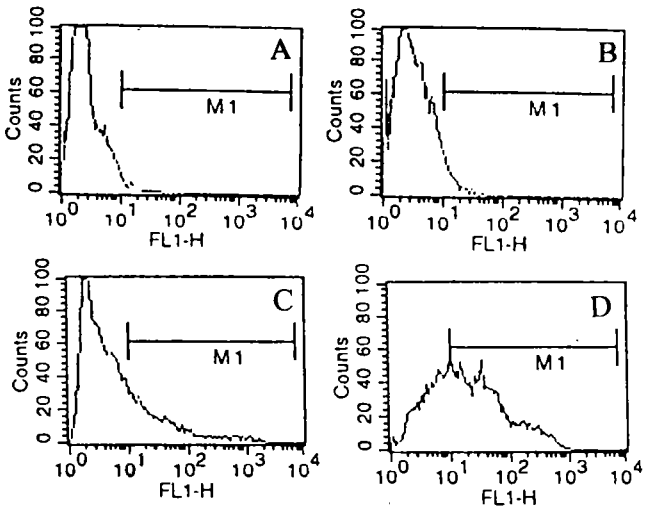


图3 QBC939细胞导入多基因后48 h FACS分析B7-1的表达

A:Walker 256细胞系;B:Walker 256细胞系(……)和QBC939细胞系(—);C:QBC939细胞系转导20 MOI Ad-multigenes;D:QBC939细胞系转导50 MOI Ad-multigenes

Fig 3 FACS analysis of B7-1 expression of QBC939 cells 48 h after transduced with Ad-multigenes

A: Walker 256 cell line; B: Walker 256 cell line(……) and QBC939 cell line (—); C: QBC939 cell line transduced with 20 MOI Ad-multigenes; D: QBC939 cell line transduced with 50 MOI Ad-multigenes

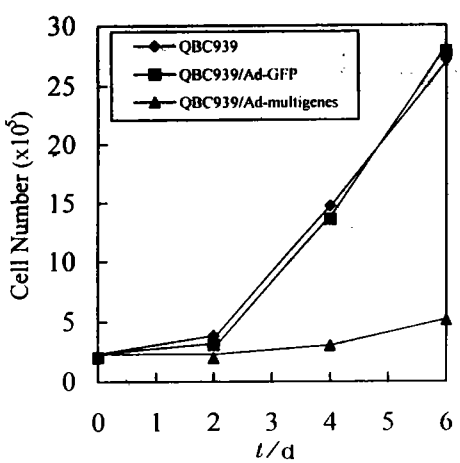


图4 导入多基因后QBC939细胞生长曲线改变

Fig 4 The growth curve of QBC939 cells after transduced with Ad-multigenes

3 讨论

因同一肿瘤类型的不同个体,其发生肿瘤免疫逃逸的机制可能并不相同,故使用一个基因进行肿瘤的基因治疗,其应用范围会十分局限。当今国际上肿瘤基因治疗的发展趋势是多基因协同,进行联合基因治疗。

我们将4种目的基因构建在同一个腺病毒载体上,可保证将几种目的基因同时导入同一个肿瘤细胞(而不是导入不同目的基因的肿瘤细胞的混合物),这样可在肿瘤免疫的不同环节发挥免疫增强作用。4种目的基因由2个启动子启动,其中2个目的基因间靠脑心肌炎病毒(EMC)的内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site)相连,可保证从一条mRNA上同时翻译2个开放阅读框[2,4]。通过Cscl密度梯度离心法,得到高滴度的复制缺陷型重组腺病毒载体。虽然腺病毒的天然靶宿主是上呼吸道,实验证实胆管癌细胞系QBC939也对腺病毒易感,50 MOI可使80%左右的细胞受感染。目的基因可在胆管癌细胞系QBC939中表达,每1×10^6细胞经24 h孵育后,可表达约16 ng的GM-CSF,且可持续表达11 d以上,这样就为GM-CSF的免疫基因治疗奠定了基础。B7-1也可在胆管癌细胞中表达高于亲本瘤细胞6倍以上。以大鼠Walker256细胞作为阴性对照,可见QBC939细胞弱表达B7-1分子[5],但导入多基因后,B7-1的表达水平明显增加。

导入多基因后QBC939细胞的生长受到一定程度的抑制,其原因主要是多基因中野生型p53抑癌基因诱导肿瘤细胞发生凋亡所致[6]。

腺病毒介导的多基因中,野生型p53基因主要发挥抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡的作用,而B7-1、GM-CSF基因则起免疫增强作用,通过提高肿瘤细胞的免疫原性,而刺激机体的抗肿瘤免疫反应。本研究构建的多基因腺病毒中,IL-2基因未见正常表达,因此起免疫增强作用的主要是B7-1和GM-CSF基因。目前已有文献报道认为,GM-CSF基因和B7基因有协同增强肿瘤细胞免疫原性的作用[7],我们相信多基因腺病毒中,B7-1和GM-CSF的联合,会更进一步增强QBC939细胞的免疫原性,提高免疫治疗效果。

参考文献

1 Roth J A, Cristiano R J. Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going? J Nat Cancer Inst, 1997,89(1):21

2 Saleh M. A retroviral vector that allows efficient coexpression of two genes and the versatility of alternate selection markers. Hum Gene Ther,1997,8(5):979

3 Martin R, Raidl M, Hofer E, *et al*. Adenovirus-mediated expression of green fluorescent protein. Gene Ther,1997,4(3):493

4 Wagstaff M J D, Lilley C E, Smith J, *et al*. Gene transfer

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

using a disabled herpes virus vector containing the EMCV IRES allows multiple gene expression *in vitro* and *in vivo*. Gene Ther, 1998, 5(7): 1566

5 Tatsumi T, Takehara T, Katayama K, *et al*. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human hepatocellular carcinoma. Hepatology, 1997, 35(4): 1108

6 Zhang W W, Fang X, Mazur W, *et al*. High-efficency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. Cancer Gene Ther, 1994, 1(1): 5

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/beigc mouse-human glioblastoma multiforme model. Human Gene Ther, 1997, 8(6): 1073

(收稿: 1999-01-30; 修回: 1999-07-20)
(编辑　汪勤俭)

Expression of adenovirus-mediated GM-CSF, B7-1, p53 and IL-2 in cholangiocarcinoma cells line

Wang Zhengxu, He Zhengping, Wu Zuze, Ma Kuansheng, Liu Jikui, Zhang Weiwei (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To study the expression rate of adenovirus-mediated human genes of GM-CSF, B7-1, p53 and IL-2 in the cells of cholangiocarcinoma cell line QBC939 and their effects on the growth of the malignant cells. **Methods**: Recombinant adenovirus was constructed to contain human genes of GM-CSF, B7-1, p53 and IL-2 and the expression rate of the genes in the cells of human cholangiocarcinoma cell line QBC939 was detected with ELISA, immunohistochemistry and FACS. In addition, the growth of the malignant cells was delineated. **Results**: Adenovirus-mediated multigenes except IL-2 were expressed in high rate in the malignant cells and they inhibited the growth of the cells. **Conclusion**: Adenovirus-mediated human genes of GM-CSF, B7-1 and p53 can be expressed in cholangiocarcinoma cell line QBC939 and inhibit the growth of the cells.

Key words GM-CSF; B7-1; p53; IL-2; cholangiocarcinoma cell line; gene expression; growth inhibition

文章编号: 1000-5404(1999)10-0745-02

胃壁结节状恶性间皮瘤 1 例报告

Report of a case of gastric malignant nodular mesothelioma

肖桃元*　吕银惠　(第三军医大学基础医学部中心实验室) 重庆, 400038
柳风轩　闫晓初　(第三军医大学附属西南医院病理科) 重庆, 400038

腹腔间皮瘤较为少见，我们诊断 1 例胃壁结节状恶性间皮瘤，具有特殊的大体和病理组织学形态，现报告如下。

1　临床资料

患者女性，34 岁。4 年前始有上腹部胀痛不适。入院前 12 d 疼痛加重并发现包块而于 1988 年 9 月 23 日入住第三军医大学附属西南医院。查体扪及剑突下包块，B 超示肝脏占位。1988 年 9 月 28 日剖腹探查，见胃小弯一堆肿块，内散在米粒大小结节。术中冰冻切片诊断“上皮样平滑肌瘤”，遂行胃大部切除。

* 肖桃元，女，47 岁，副教授，博士

2　病理资料

大体观察：次全切除胃，小弯壁内见一堆结节状肿块共 8 个，直径 1.0～6.0 cm，表面光滑突出于浆膜面，拱起于胃腔面，该处粘膜有糜烂。切面肿块无包膜，但界限清楚，灰红色，质细嫩，部分结节内有出血坏死。

光镜观察：瘤细胞小至中等大小，圆形、椭圆形或梭形。核轻度异型性，无明显核仁，偶见分裂像。胞浆丰富红染。瘤细胞呈弥漫一致小巢结构，小巢间为梭形细胞索，二者有过度，整个形态酷似合体细胞型脑膜瘤，但无砂粒体。瘤组织在胃壁中浸润生长。免疫组化瘤细胞 CK 阳性、Vimenti 阳性、actin 阴性、S-100 阴性。

(下转 749 页)

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