DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.07.003

逆转录病毒介导IFN-γ基因对胆管癌细胞株的影响

王征旭* 何振平 李春海** 冯东晓** 王 鑫*** 孔繁华**** (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**:研究人IFN-γ基因对胆管癌细胞株免疫原性的影响。**方法**:构建携带人IFN-γ cDNA的逆转录病毒载体pZIP-IFN-γ,导入人胆管癌细胞系QBC939,运用Western Blot法分析MHC Ⅰ类分子的表达,体外混合淋巴细胞、肿瘤细胞培养(MLTR)和淋巴细胞杀伤试验研究导入IFN-γ基因的QBC939细胞免疫原性的变化。**结果**:G418阳性QBC939-IFN-γ细胞分泌IFN-γ活性为每48 h 0～9.5 IU/10^6, Southern Blot和Slot Blot证实了目的基因的整合及表达。Western Blot证明MHC Ⅰ类分子表达水平是未转基因亲本瘤细胞的1.78倍。MLTR证实该瘤苗能明显刺激胆管癌病人外周血淋巴细胞的增殖,并能增强HLA A2位点相匹配的胆管癌病人外周血淋巴细胞的杀伤活性。**结论**:IFN-γ基因修饰瘤苗能增强胆管癌细胞系QBC939的免疫原性。

关键词 胆管癌细胞系;基因治疗;干扰素-γ;肿瘤疫苗;免疫原性
中图法分类号 R394;R735.8

肿瘤生物治疗是当今恶性肿瘤四大主要疗法之一,且越来越引起人们的重视。如何提高肿瘤的免疫原性,增强机体特异性细胞毒性T淋巴细胞的杀伤活性,是当今肿瘤免疫基因治疗领域的主要课题之一[1]。本研究以逆转录病毒载体介导,将人干扰素-γ(IFN-γ)基因导入胆管癌细胞系,研究该基因修饰瘤苗免疫原性的改变。

1 材料与方法

1.1 逆转录病毒载体的构建及导入包装细胞系

质粒pGEM-1-IFN-γ携带人IFN-γ cDNA,长1.1Kb,克隆到逆转录病毒载体pZIP. Neo. SV(x)1的*BamH*I位点上,受5′-LTR控制,构成pZIP-IFN-γ。将此重组载体用Lipofectamin (GIBCO)介导,导入单向性逆转录病毒包装细胞系Ψ-2细胞,经G418(GIBCO)筛选,克隆细胞上清感染双向性逆转录病毒包装细胞系PA317细胞,G418筛选,收集培养上清,存－80℃。

1.2 靶细胞的感染及靶细胞培养上清IFN-γ的活性测定

将上述培养上清感染胆管癌细胞系QBC939(本科室王曙光博士建立并惠赠),G418筛选阳性克隆并扩增培养。用干扰素的抗病毒活性来检测IFN-γ的生物学活性。VSV(水泡性口炎病毒)和WISH细胞由军事医学科学院五所王汝懿教授提供。

* 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,200433
** 军事医学科学院附属医院肿瘤分子生物学室 北京,100000
*** 军事医学科学院基础医学研究所 北京,100070
**** 军事医学科学院附属医院免疫室 北京,100000

1.3 DNA、蛋白杂交及PCR分析

提取含目的基因克隆细胞DNA、RNA,用地高辛标记(Boehringer Mannheim) IFN-γ基因片断,进行Southern Blot和Slot Blot。PCR法扩增克隆细胞基因组中新霉素抗性基因(Neo基因)的特异性序列,扩增片段长433bp,引物序列:上游引物:5′-TCCATCATGGCTGATGCAATGCGGC-3′,下游引物:5′-GATAGAAGGCGAT GCG CTGCGAATCG-3′。提取培养细胞蛋白质,行Western Blot。鼠抗人HLA-ABC单抗购自华美公司(1∶50稀释),HRP-标记兔抗鼠IgG(1∶1 500稀释)由军科院肿瘤分子生物学室自建,显色底物为二氨基联苯胺(DAB)。杂交结果用激光扫描仪进行定量分析。

1.4 混合淋巴细胞、肿瘤细胞培养(Mixed lymphocyte and tumor cell reation, MLTR)[2]和淋巴细胞杀伤功能实验[3]

取胆管癌病人外周血,用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞,培养2 h以去掉贴壁的单核细胞,未贴壁的淋巴细胞与QBC939-IFN-γ细胞或QBC939细胞(均用5 000rads ^{60}Coγ线照射)共同培养5 d,^{3}H-TdR(中国原子能研究院)渗入法测培养细胞的Bq值。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(上海市血液中心产血清盘)。HLA A2位点相匹配者行CTL杀伤实验,效应细胞为已培养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,采用MTT (Fluka)比色法测定。

1.5 统计学处理

采用t检验。

2 结果

2.1 重组逆转录病毒载体的酶切鉴定

重组质粒用*BamH* Ⅰ酶切,产生1.1 kb和10.2 kb两个片断,表明重组连接成功。用*Hind* Ⅲ酶切重组质粒,产生3.2 kb

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

和 8.1 kb 两个片断，分离回收含 IFN-γ cDNA 的 3.2 kb 片断，再用 *Bgl* I 不对称酶确定连接方向，正向连接应出现 2.25 kb 和0.95 kb 两条带，电泳示重组符合正向连接，见图 1。

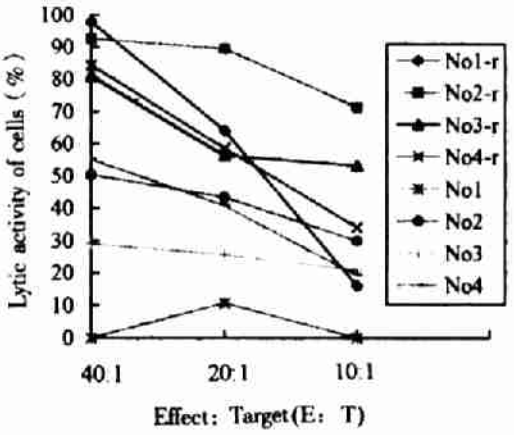


图 1 IFN-γ 重组逆转录病毒载体的酶切鉴定

Fig 1 Enzymatic assay of recombinant retroviral vector conclude IFN-γ cDNA

M：λDNA/*EcoR* I ＋*Hind* Ⅲ Markers；1：pZip-IFN-γ/*Hind* Ⅲ；2：pZip-IFN-γ；3：pZip-IFN-γ/*BamH* I；4：pZip-IFN-γ/*Hind* Ⅲ /*Bgl* I

2.2 培养上清 IFN-γ 活性测定及 DNA、蛋白杂交和 PCR

PA317-IFN-γ 培养上清感染 QBC939 后，经 G418 筛选，挑选 24 个克隆，并扩增培养，测 48 h 培养上清 IFN-γ 活性，结果最高为每 48 h 9.5 IU/10^6（明显低于肝癌细胞系 HepG2）。Southern Blot 显示目的基因已整合到靶细胞基因组 DNA 上，PCR 可见靶细胞基因组中逆转录病毒载体 Neo 基因的表达，Western Blot 证明转 IFN-γ 基因的瘤苗 MHC Ⅰ类抗原表达水平增高，其杂交密度是亲本瘤的 1.78 倍，见图 2。



图 2 Western Blot 结果分析

Fig 2 Result of Western Blot assay

1：Introduced IFN-γ cDNA；2：Introduced IL-2 cDNA；3：Parent cell

2.3 MLTR 和淋巴细胞杀伤功能试验结果

MLTR 分析 7 例胆管癌病人外周血，用 QBC939-IFN-γ 刺激培养后，Bq 值均升高（$P<0.01$）。经微量淋巴细胞毒试验，QBC939 细胞系的 HLA 分型为 A2，10 B51(5)，12，7 例胆管癌病人，有 6 例存在 HLA A2 位点，其中 4 例出现淋巴细胞裂解活性升高（$P<0.01$），见图 3。

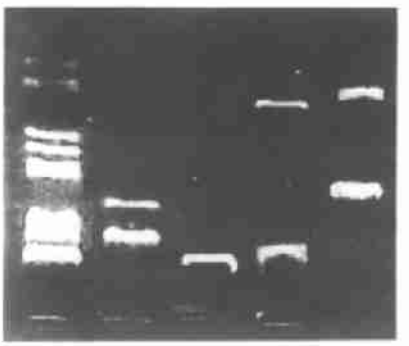


图 3 导入 IFN-γ 基因后 PBLC 裂解靶细胞活性改变

Fig 3 PBLC lystic activities assay after transduced by IFN-γ gene

3 讨论

疫苗主要是用于疾病的预防，而肿瘤疫苗的治疗对象则是已患肿瘤的病人，用于治疗术后转移、复发、及术中无法清除的残留灶。目前国际上用于肿瘤疫苗研究的基因中，公认为导入 IL-2、IFN-γ、GM-CSF、B7 基因的治疗效果最佳[4]，其中 IFN-γ 的基因治疗，近年来越来越引起人们的重视[5]。到 1996 年底世界上共批准了 1 430 例肿瘤基因治疗病例[6]，其中利用 IFN-γ 基因治疗的病例为 168 例，占 11.75%。导入 IFN-γ 基因可以①诱导肿瘤细胞 MHC Ⅰ Ⅱ类分子的表达[7]；②防止接种的瘤苗过早被机体非特异性免疫系统所排斥[8]；③IFN-γ 的直接杀瘤细胞作用；④与其它细胞因子协同抗肿瘤作用[9]。胆管癌目前发病率有上升的趋势，且一旦发现多为晚期，病死率高，愈后极差，临床急需新的治疗方法。我们以胆管癌为研究对象，构建了含人 IFN-γ 基因的逆转录病毒载体，并能有效整合到胆管癌细胞基因组中，且持续分泌一定浓度的 IFN-γ。该基因修饰的瘤苗 MHC Ⅰ类分子的表达水平，是未转基因亲本瘤的 1.78 倍。将已致敏胆管癌病人外周静脉血淋巴细胞与该瘤苗共同培养，能明显刺激淋巴细胞的增殖反应，且诱导胆管癌病人外周血淋巴细胞的杀伤活性增强，6 例 HLA A2 阳性病人，有 4 例淋巴细胞杀亲本瘤细胞的作用升高（$P<0.01$）。

我们的研究认为：IFN-γ 基因修饰的胆管癌瘤苗，能增强胆管癌的免疫原性，并刺激机体淋巴细胞的增殖和增强外周血淋巴细胞裂解肿瘤细胞的活性，具有潜在的临床应用前景。

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

参考文献

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

2 Wendtner C M, Nolte A, Mangold E, *et al*. Gene transfer of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 into human multiple myeloma cells by recombinant adeno-associated virus enhances the cytolytic T cell response. Gene Ther, 1997, 4 (12)：4726

3 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及其在重组痘苗病毒活疫苗细胞免疫研究中的应用. 中华实验和临床病毒学杂志，1994，8(4)：308

4 Blankenstein T, Qin Z. Cancer vaccines in gene therapy. Gene Ther, 1996, 3(1)：95

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

6 Marcel T, Grausz J D. The TMC worldwide gene therapy enrollment report, end 1996. Human Gene Ther, 1997, 8 (4)：775

7 Xu X, Dai Y F, Heidenreich O, *et al*. Adenovirus-mediated interferon-γ transfer inhibits growth of transplanted HTLV-1 Tax tumor in mice. Human Gene Ther, 1996, 7 (3)：471

8 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. Euro J Cancer, 1996, 32A(8)：1408

9 Sullivan C M, Smith D M, Matsui N M, *et al*. Identification of constitutive and γ-interferon and interleukin-4 regulated proteins in the human renal carcinoma cell line ACNH. Cancer Res, 1997, 57(5)：1137

（收稿：1998-09-21；修回：1999-03-14）

（编辑　刘　鹏）

Effects of retrovirus-mediated human interferon-γ gene on cholangiocarcinoma cell line

Wang Zhengxu, He Zhenping, Li Chunhai, Feng Dongxiao, Wang Xin, Kong Fanhua (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract　**Objective**: To investigate the changes of the immunogenicity of the cholangiocarcinoma cell line QBC 939 transduced with human interferon-γ gene. **Methods**: Retroviral vector pZIP-IFN-γ carrying human IFE-γ cDNA was constructed and transduced to QBC 939 cells. The expression of MHC class I antigen and the changes of the immunogenicity of the transduced QBC 939 cells were studied with Western blot, mixed lymphocyte and tumor cell reaction (MLTR) and assay of cytotoxicity on lymphocytes respectively. **Results**: The IFN-γ activity secreted by the G418 positive QBC939-IFN-γ cells was 0～9.51 IU/10^6 cells/48 h. Southern blot and Slot blot confirmed the presence of the incorporation and expression of the target gene. The expression level of MHC class I antigen was 1.78 times higher in the transduced cells than in the untransduced ones. MLTR revealed marked proliferation of lymphocytes in the peripheral blood of patients with cholangiocarcinoma. Enhancement of lymphocytic lysis was found in HLA A2 matched patients. **Conclusion**: The immunogenicity of QBC 939 cells was enhanced after the transduction interferon-γ gene.

Key words　cholangiocarcinoma cell line; gene therapy; interferon-γ; tumor vaccine; immunogenecity

（上接 468 页）

①积极脱水降颅压，减轻脑水肿，并处理好与低血压、低血容量之间的矛盾。为避免脱水所致血压波动和血容量不足，采用了人体白蛋白与血浆交替脱水的疗法，并加大补液量。临床治疗效果佳。②控制好血压，保证脑灌流。本例患者血压低，血容量不足，为避免低血容量所致脑灌流不足，脑损伤加重，在加大补液量的同时，予多巴胺，阿拉明升血压，保持血压稳定在适当范围内。③积极预防和治疗肺部感染。患者为老年人，先后合并肺部细菌、真菌感染，予舒普深、泰能抗炎、大蒜素抗霉菌等治疗后，复查胸部 CT 提示右上肺浸润性肺结核，并予口服抗痨药物治疗，病情复杂危重，救治及时。从本例患者治疗中体会，我们只有早期联合用药，并注意舒普深、泰能等强抗生素用药 3 d 都会出现霉菌感染，才能有效控制肺部感染。④积极控制血糖并处理好胰岛素用量的问题。患者虽为高血糖状态，在救治中仍要适当补充糖水和能量。高血糖状态易致酸碱平衡失调而加重脑细胞损害，也可发生酮症酸中毒而导致死亡。故控制好血糖具有极为重要的意义。胰岛素用量不足，仍为高血糖状态，胰岛素用量过大，易致低血糖昏迷加重脑损伤，这就要求胰岛素用量个体化，在用药的同时不断监测患者血糖变化，随时调整剂量，以保证血糖控制在适当范围。⑤加强营养支持，维持机体水、电解质和酸碱的平衡，保证脑部内环境的稳定。

关键词　脑干出血；治疗

中图法分类号　R743.34

参考文献

1 Komiyama M, Tashihiro Y, Yagura H, *et al*. Computed tomographic evaluation of bleeding sites in primary pontine hemorrhages. Stroke, 1991, 22：1309

2 史玉泉，周孝达，汪无级 编. 实用神经病学. 第 2 版. 上海：上海科学技术出版社，1994. 646～647

（收稿：1999-01-15；修回：1999-05-12）

（编辑　刘　鹏）

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