DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.012

B7-1基因修饰的肿瘤细胞瘤苗抗小鼠胃癌效应的实验研究*

杨金亮** 房殿春 黄晋生*** 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨 B7-1基因修饰的肿瘤细胞作为瘤苗对小鼠胃癌的治疗效果。方法: 在已建立高表达 B7-1分子的小鼠前胃癌细胞系 MFC-B7的基础上,观察 MFC-B7细胞体外激活脾淋巴细胞的能力,体内成瘤性变化及作为瘤苗对荷瘤鼠胃癌的治疗效果。结果: MFC-B7细胞在体外能有效诱导脾淋巴细胞的活化增殖和特异性 CTL(Cytotoxic T lymphocytes)活性的产生,在体内的成瘤能力明显下降,作为瘤苗接种对荷瘤鼠胃癌有较好的治疗效果。结论: B7-1基因修饰的肿瘤细胞免疫原性明显增强,有希望作为瘤苗用于此类肿瘤的治疗。

关键词 B7-1基因;胃肿瘤;免疫治疗;基因治疗
中图法分类号 R735.2

T细胞是机体的主要抗肿瘤效应细胞,而 T细胞的有效活化至少需要两个信号[1]。尽管多数肿瘤细胞能够把抗原通过 MHC-Ⅰ类分子呈递给 CD8+ T细胞,但由于肿瘤细胞本身缺乏 B7等辅助刺激分子或其表达低下,不能为 T细胞活化提供所必需的辅助刺激信号,而使 T细胞处于无反应状态,最终发生免疫逃避[2,3]。B7(B7-1, B7-2)是目前已知最重要的辅助刺激分子,采用基因转染方法使肿瘤细胞表达 B7分子,有可能通过增强或添加辅助刺激信号,有效地激发机体的抗肿瘤免疫。为此,我们在已建立高表达 B7-1分子的小鼠前胃癌细胞系 MFC-B7的基础上,进一步探讨了转染与表达 B7-1分子的胃癌细胞能否有效地激发机体的免疫反应及作为瘤苗对荷瘤鼠胃癌的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 细胞系

615小鼠前胃癌细胞系 MFC,由中国医学科学院基础所提供。表达 B7-1分子的 MCF-B7细胞系,由本室建立并保存[4]。

1.2 动物

615纯系小鼠,雌性或雄性,4~6周龄,18~20 g,购自中国医学科学院实验动物研究所。

1.3 MFC细胞特异性 CTL的诱导和细胞毒活性的测定

CTL的诱导: 采用肿瘤淋巴细胞混合培养法。常规分离鼠脾淋巴细胞,调细胞浓度至 4×10⁶/ml,于 6孔培养板上分别加入淋巴细胞 2.5 ml及丝裂霉素灭活的肿瘤细胞 1 ml(1×10⁶)培养 5 d,其间半量换液 1次,于第 3、5天分别计数淋巴细胞 1次。

CTL细胞毒活性测定[5]: 采用 LDH释放法,在 Beckman全自动生化分析仪上用速率法测 LDH活性(IU/ml),计算 CTL活性。CTL活性(%)=(实验孔 LDH活性-自然释放孔 LDH活性)/(最大释放孔 LDH活性-自然释放孔 LDH活性)×100%。

1.4 MFC-B7细胞体内致瘤能力的观察

取 12只 4~6周龄的 615小鼠(雄性),随机分为 2组,分别于右侧背部皮下注射 MFC、MFC-B7细胞各 2×10⁶(0.2 ml)。种瘤后每天观察记录肿瘤生长情况(触诊法),待肿瘤结节长至约 2 mm时(约 6~10 d),每隔 3 d用游标卡尺测量一次肿瘤最大面积处的长径和短径,取二者平均值为肿瘤的直径。同时记录荷瘤鼠的存活时间。

1.5 MFC-B7细胞瘤苗治疗实验

荷瘤鼠制备: 于每只鼠背部右侧皮下接种 2×10⁶个 MFC细胞(0.2 ml)(共 24只鼠,雌性),待肿瘤结节长至 2~3 mm时,开始治疗实验。瘤苗制备: 收获对数生长期的 MFC和 MFC-B7细胞,调浓度至 5×10⁶/ml,用 100μg/ml丝裂霉素灭活 2 h,洗去丝裂霉素,用无血清 RPMI-1640调浓度至 2×10⁷/ml,备用。瘤苗治疗及效果观察: 接种亲本 MFC细胞 6 d时,肿瘤直径已长至 2 mm左右,将 24只小鼠随机分为 3组(MFC-B7瘤苗治疗组、MFC瘤苗治疗组和对照组,8只/组),于左侧背部皮下分别注射 4×10⁶个 MFC-B7细胞、4×10⁶MFC细胞和 0.2 ml RPMI 1640培养液,共治疗 2次,间隔 1周,治疗开始后每天观察记录肿瘤生长情况。

1.6 统计学处理

采用 *t*检验。

* 国家教委细胞增殖及调控生物学开放实验室开放课题基金资助项目
** 杨金亮,男,30岁,主治医师,博士 *** 海军总医院中心实验科 北京, 100000
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 MFC-B7细胞对脾细胞的活化增殖和特异性CTL活性的诱导作用

在肿瘤淋巴细胞混合培养实验中,MFC-B7细胞能有效地刺激鼠脾淋巴细胞的活化增殖,培养 5d后,鼠脾细胞平均增殖 2.3± 0.65倍,并产生了特异性的 CTL活性,而 MFC细胞无此效应,见表 1

表 1 MFC-B7细胞对脾细胞 MFC特异性 CTL活性(%)的诱导作用

Tab 1 The inductive effect of MFC-B7 cells on the specific CTL of spleen cells

Target cells	Effect cells (E: T= 25: 1)		
	Navie S. C.	MFC-activated S. C.	MFC-B7-activated S. C.
H22	10.7± 3.1[a]	ND	14.4± 4
MFC	9.6± 1.3	12± 2[b]	38± 6

*: $P < 0.05$ *vs* a or b; E: Effect cell; T: Target cell; S. C: spleen cells; ND: Not determinate

2.2 MFC-B7细胞在体内的成瘤能力

皮下接种 2× 10[5]个 MFC和 MFC-B7细胞后,肿瘤出现的时间分别为(3.83± 1.33)d和(6.33± 3.20)d,二者差异不明显($P > 0.05$)。但 MFC-B7肿瘤在体内生长增速度明显慢于亲本 MFC肿瘤($P < 0.05$),见图 1,而且荷 MFC-B7瘤小鼠的存活期明显延长($P < 0.05$),并有 3只荷瘤鼠在 30 d左右时肿瘤完全消退并长期存活(观察 3月)。此结果说明 MFC-B7细胞在体内的成瘤能力明显下降。

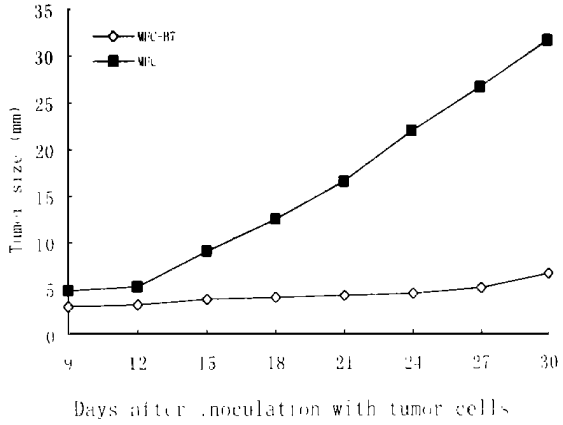


图 1 MFC-B7和亲本 MFC细胞在体内生长能力的评价

Fig 1 Assessment of growth kinetics of MFC-B7 cells and parental MFC cells *in vivo*

2.3 MFC-B7细胞瘤苗接种对荷瘤鼠胃癌(MFC)的治疗作用

经 MFC-B7瘤苗治疗后,肿瘤生长明显减慢,荷瘤鼠的存活期明显延长,并有 37.5%(3/8)长期存活(观察 3个月),而 MFC细胞瘤苗未显示出任何治疗作用($P < 0.05$),见图 2 3

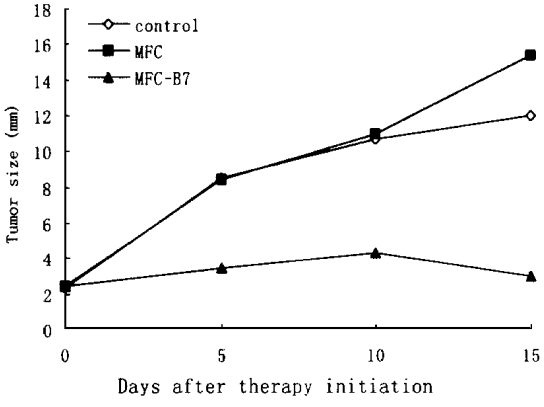


图 2 经 MFC-B7细胞瘤苗治疗后荷瘤鼠肿瘤的生长曲线

Fig 2 Curve of the therapeutic potential of B7-1-transfected MFC cells (MFC-B7) for mice bearing established parental MFC tumors

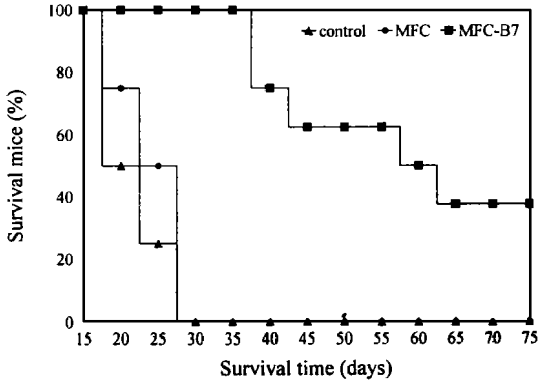


图 3 经 MFC-B7细胞瘤苗治疗后荷瘤小鼠的存活期

Fig 3 Survival period of mice bearing established parental MFC tumors treated by vaccine of MFC-B7 cells

3 讨论

近年来的研究认为,多数肿瘤细胞存在有肿瘤特异性抗原和/或肿瘤相关抗原,但仍能逃避免疫监视,其重要原因之一是:肿瘤细胞缺乏 B7等辅助刺激分子,不能为 T细胞活化提供所必需的第二信号[2,3]。若能使肿瘤细胞表达 B7分子,则可能逆转这种免疫无能状态而诱导肿瘤排斥反应。已有研究发现将人乳头状瘤病毒的 E7基因(其表达产物作为抗原)和 B7-1基因导入黑色瘤细胞系 K1735,可使其致瘤性丧失,作为瘤苗接种可治愈 40%早期荷瘤鼠的肿瘤[6]。许多研究都得到了类似的结果[7~10],但这些研究仅局限于黑

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

色素瘤、血液肿瘤等几种肿瘤。

在本实验中,我们将 B7-1基因转染甲基苄基亚硝胺诱导的低分化、高转移的小鼠胃癌细胞株 MFC,发现 B7-1/MFC细胞免疫性明显增强,在体外不仅能诱导淋巴细胞活化增殖,还能诱导出特异性 CTL活性,在同系鼠中成瘤性明显降低,作为瘤苗接种对早期荷瘤鼠的肿瘤有明显的治疗作用,表现为肿瘤生长变慢、生存期延长,甚至消退。这充分说明了 B7-1基因转染的 MFC细胞免疫原性增强,能启动并诱导机体产生强烈的抗肿瘤免疫反应,同时提示其对胃癌的转移也可能有抑制作用。

比较不同学者的实验结果,我们还发现,转染 B7-1基因的肿瘤细胞所诱导的抗肿瘤免疫反应强弱程度相差很大,这可能是因为所选择的细胞系及实验条件不同所致[6~10]。不同的肿瘤细胞免疫原性强弱、MHC分子和辅助刺激分子(如 ICAM-1、LFA-3)表达水平不同,可能是导致所诱导免疫反应存在差别的主要原因。B7基因只有转染有免疫原性肿瘤细胞,才能诱导机体产生有效的抗瘤免疫反应,而且只有在肿瘤发生的早期(一般种瘤后 1周以内)及肿瘤负荷较小时用瘤苗治疗才会收到较好的效果。

以上说明 B7-1基因转染的肿瘤细胞能够启动并诱导机体产生抗肿瘤免疫反应,以此作为瘤苗用于防治人类此类肿瘤很可能有潜在的应用价值,值得进一步探索。

参考文献

1 Chen L, Linsley P S, Hellstorm K E. Costimulation of T cells for tumor immunity. Immunol Today, 1993, 14(10): 483

2 Chen L, McGowan P, Ashe S, *et al*. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation of T cell-mediated tumor immunity. J Exp Med, 1994, 179(2): 523

3 Hersey P, Si Z, Smith M J, *et al*. Expression of the costimulatory molecule B7 on melanoma cells. Int J Cancer, 1994, 58(2): 527

4 杨金亮,黄晋生,严明山,等.人 B7-1分子能为小鼠淋巴细胞的活化提供辅助刺激信号.基础医学与临床, 1997, 17(6): 56

5 曹雪涛 主编.白介素 2的基础与临床.北京: 科学技术出版社, 1990. 136~137

6 Chen L, Ashe S, Brady W A, *et al*. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counter receptor for T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. Cell, 1992, 71(11): 1093

7 Townsend S E, Allison J P. Tumor rejection after direct costimulation of $CD8^+$ T cells. Science, 1993, 259(4): 368

8 Li Y, McGowan P, Hellstrom I, *et al*. Costimulation of tumor reactive $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes by B7, a natural ligand for CD28 can be used to treat established mouse melanoma. J Immunol, 1994, 153(2): 421

9 Chen L, McGowan P, Ashe S, *et al*. B7-1/CD80-transduced tumor cells elicit better systemic immmunity than wild type tumor cells admixed with *corynebacterium parvum*. Cancer Res, 1994, 54(22): 5420

10 Townsend S E, Fannie W S, Atherton J M, *et al*. Specificity and longevity of antitumor immune responses induced by B7-transfected tumor cells. Cancer Res, 1994, 54(24): 6477

(收稿: 1997-12-11;修回: 1998-10-16)
(编辑 汪勤俭)

Antitumor effects of B7-1 gene-modified tumor cells on gastric cancer in mice

Yang Jinliang, Fang Dianchun, Huang Jingsheng, Liu Weiwen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To explore the therapeutic effects of the vaccine, B7-1 gene-modified tumor cells, on gastric cancer in mice. **Methods**: After the MFC-B7 cell line was established by transfection of B7-1 gene, the capacity of MFC-B7 cells to activate spleen lymphocytes was determined in vitro and the therapeutic effects of the cells being used as vaccine on gastric cancer were investigated in mice. **Results**: B7-1 gene-modified MFC cells effectively induced the activation and proliferation of the spleen cells and the production of CTL cytotoxicity *in vitro*. The tumorogenicity of MFC-B7 cells was remarkably lowered *in vivo*. The cells could exert good effects on gastric cancer in the mice. **Conclusion**: The immunogenicity of B7-1 gene-modified tumor cells is increased and can effectively inhibit the growth of gastric cancer in the host. Therefore, they might be used to treat patients with gastric cancer.

Key words B7-1 gene; gastric cancer; immunotherapy; gene therapy

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