

TNF- 基因修饰联合冷冻法制备的疫苗抗肝癌作用的研究

刘剑勇¹, 张力图², 张春燕², 李挺¹, 张丽生², 杨南武¹, 覃宇周¹, 吴飞翔¹, 唐凯²

摘要: 目的 探索用 TNF- 基因修饰联合冷冻法制备更高效能的抗肝癌疫苗的可能性。方法 用 TNF- 基因修饰和冷冻处理的 H22 细胞制成疫苗 A, 用 TNF- 基因修饰未经冷冻处理的 H22 细胞制成疫苗 B; 另外, 用未经 TNF- 基因修饰行冷冻处理和未行冷冻处理的 H22 细胞, 分别制备疫苗 C 和 D。比较这 4 种疫苗的抗小鼠接种性肝癌的作用。结果 用 TNF- 基因修饰和冷冻处理 H22 细胞制成的疫苗, 其降低接种性肝癌发生率的作用, 提高脾淋巴细胞 IL-2 和 TNF 诱生水平及脾脏 CTL 对 H22 细胞的杀伤活性的作用, 均明显优于其他 3 种疫苗。结论 冷冻处理 TNF- 基因修饰的 H22 细胞, 可提高该细胞的免疫原性, 从而可提高疫苗的抗小鼠接种性肝癌的效能。

关键词: TNF- ; 基因修饰; 冷冻; 疫苗; 肝癌

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2002) 04-0295-03

Astud yonanti -hepatocarcinomaeffectInducedb yvaccinesmadeu pof cellstreatedb ymethodofTNF - genemodif yingcombinedwithfreezin g
LIUJian -yong,ZHANGLi -tu,ZHANGCHun -yan,etal

Affiliated Cancer Hospital of Guan gxi Medical Universit y, Nannin g 530021, China

Abstract: Objective To investigate the possibility of producing a vaccine with high effect against hepatocarcinoma by means of freezing the tumor cells which have been TNF- -genemodified before. **Methods** The A and B vaccines were H22 cells modified by TNF- -genes and were treated by freezing, or not. The C and D vaccines were the H22 cells were modified by TNF- -genes or were treated by freezing, or not. Effects of these four kinds of vaccines on anti- -plant-hepatocarcinoma in mice were compared. **Results** Effects of decreasing the incidence rate of plant-hepatocarcinoma, of increasing the levels of lectin -induced IL-2, TNF froms plenocytes, and the plenty of CTL activity, were all obviously seen in the four vaccines made up of H22 cells modified by TNF- -genes and treated by freezing, than that in other three kinds of vaccines. **Conclusion** Method of freezing, after procedure of TNF- -genemodif ying, could raise up the immunogenicity of the tumor cells, thereby enhancing the anti- -plant-hepatocarcinoma effect in mice induced by the vaccines.

Keywords: TNF- ; Genemodif ying; Freezin g; Vaccine; He patocarcinoma

把 TNF- 基因修饰肿瘤细胞应用在抗肿瘤实验中已获得了较好的效果^[1]。现代低温生物学研究表明, 如果对肿瘤细胞实施冷冻, 冷冻可使覆盖于肿瘤细胞表面的唾液酸等变性、破坏, 从而导致肿瘤细胞的肿瘤特异性抗原显露, 免疫原性提高^[2]。为了获得具有高抗瘤效果的疫苗, 我们联合应用 TNF- 修饰和冷冻肿瘤细胞制作成肿瘤疫苗, 在小鼠中进行抗

肝癌实验研究, 取得了较理想的效果, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物 BALB/c 小鼠 125 只, 雌性, 体重 20~22 克, 由中科院上海实验动物中心提供。

1.2 载体和细胞株 逆转录病毒载体 LXS N 由美国华盛顿州立大学 ZFXian g 博士惠赠。小鼠肝癌 H22 细胞购自中科院上海药物研究所。H22-TNF- 细胞为经含 TNF- 基因的 L (TNF-) SN 缺陷型逆转录病毒感染的克隆。H22-TNF- 细胞持续分泌有活性 TNF- 1600U/1 × 10⁷ cells/ml/24h。

1.3 主要试剂 RPMI1640 培养基由美国 GIBCO BRL 公司提供; MTT 购自 Fluka 公司, IL-2 标准品

收稿日期: 2001-05-24; 修回日期: 2002-03-20

基金项目: 广西卫生厅医药卫生科研项目 (Z9709)

作者单位: 1.530021 南宁, 广西医科大学附属肿瘤医院普瘤外科, 2. 分子生物学研究室

由中国药品生物制品检定所提供的;TNF- 标准品购自 Genzyme 公司;ConA、PHA 由 Sigma 公司提供;⁵¹Cr- 铬酸纳溶液购自 Amersham 公司, 比活度为 0.37 $\times 10^9 \sim 1.3 \times 10^9$ Bq/ml。

1.4 疫苗的制备 将 H22-TNF- 细胞悬液(浓度为 1×10^7 cells/ml, 含 10% 二甲基亚砜)按每管 1.5ml 的量, 分装于冻存小管内, 拧紧管盖, 将冻存小管放入普通冰箱下层(4 ~ 8), 约 40min, 接着置于-10 ~ -20 冰箱 30 ~ 60min, 再于-30 放置 30min 左右, 然后在-70 ~ -80 下过夜, 最后将冻小管投入液氮保存。第 2d 按常规对冻存细胞进行复苏。然后使用⁶⁰Co 照射(强度为 4000rad), 制成疫苗 A, H22-TNF- 细胞经上述处理后仍能持续分泌有活性的 TNF- 10d 以上。另外, 对未经冷冻处理的 H22-TNF- 细胞(浓度亦为 1×10^7 cells/ml) 使用⁶⁰Co 照射(强度为 4000rad), 制成疫苗 B, H22-TNF- 细胞经上述处理后仍能持续分泌有活性的 TNF- 10d 以上。对 H22 细胞(细胞浓度也是 1×10^7 cells/ml) 采用上述的冷冻法和不行冷冻, 然后使用⁶⁰Co 照射(强度为 4000rad) 制成疫苗 C 和 D。

1.5 将 125 只小鼠随机分为 A、B、C、D 和 E 组, 每组 25 只。在每只 A、B、C 和 D 组小鼠左腋窝皮下相应接种疫苗 A、B、C 和 D, 0.2ml, E 组小鼠则未予接种疫苗。在第 7d, 分别在 A、B、C、D 和 E 组小鼠右腋窝皮下接种 H22 细胞, 每只小鼠接种剂量是: 细胞浓度为 2.5×10^6 cells/ml, 0.2ml。在第 21d, 将各组小鼠脱颈处死, 经病理检查, 计算其接种肿瘤发生率。

1.6 小鼠脾淋巴细胞 IL-2、TNF 的诱生及检测: 参考文献[3]。

1.7 小鼠脾细胞 CTL 活性检测 为了检测小鼠脾脏 CTL 活性, 取小鼠脾脏, 制成脾细胞悬液, 与⁶⁰Co 照射灭活的 H22 细胞共培养 5d, 应用 5h ³Cr 释放法检测 CTL 对 H22 细胞的杀伤活性。

1.8 统计学处理 应用 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 小鼠的接种肿瘤发生率 A、B、C、D 和 E 组小鼠的接种肿瘤发生率分别为 5/25 (20.00%)、14/25 (56.00%)、16/25 (64.00%)、25/25 (100.00%) 和 25/25 (100.00%)。表现为 B 组和 C 组比较差异无显著性($P > 0.05$), D 组和 E 组比较差异无显著性($P > 0.05$), 但 B 组和 C 组又分别低于 D 组和 E 组($P < 0.01$), 而 A 组又分别低于 B 组和 C 组($P < 0.01$), 见表 1。

2.2 小鼠脾淋巴细胞 IL-2、TNF 诱生水平 表现为 B 组和 C 组比较差异无显著性($P > 0.05$), D 组和 E 组比较差异无显著性($P > 0.05$), 但 B 组和 C 组又分

别高于 D 组和 E 组($P < 0.01$), 而 A 组又分别高于 B 组和 C 组($P < 0.01$), 见表 2。

表 1A B、C、D 和 E 组小鼠的接种肿瘤发生率

组别	n	接种肿瘤发生率
A 组	25	5/25 (20.00%) *
B 组	25	14/25 (56.00%) **
C 组	25	16/25 (64.00%) ***
D 组	25	25/25 (100.00%)
E 组	25	25/25 (100.00%)

* 与其他组分别比较 $P < 0.01$; ** 与 A、D 和 E 组分别比较 $P < 0.01$, 与 C 组比较 $P > 0.05$; *** 与 A、D 和 E 组分别比较 $P < 0.01$, 与 B 组比较 $P > 0.05$

表 2A B、C、D 和 E 组小鼠

脾淋巴细胞诱生的 IL-2、TNF 水平检测

组别	n	细胞因子水平($\bar{x} \pm s$)	
		IL-2(u/ml)	TNF(u/ml)
A 组	25	58.20 ± 6.23 *	48.43 ± 6.05 *
B 组	25	37.59 ± 5.37 **	34.51 ± 5.21 **
C 组	25	36.33 ± 5.22 ***	33.49 ± 5.17 ***
D 组	25	25.72 ± 4.38	21.75 ± 4.14
E 组	25	25.05 ± 4.16	22.06 ± 4.05

* 同项目与其他组分别比较 $P < 0.01$; ** 同项目与 A、D 和 E 组分别比较 $P < 0.01$, 与 C 组比较 $P > 0.05$; *** 同项目与 A、D 和 E 组分别比较 $P < 0.01$, 与 B 组比较 $P > 0.05$

2.3 A、B、C、D 和 E 组小鼠脾细胞 CTL 对 H22 细胞的杀伤性分别为 (33.54 ± 4.02)%、(20.16 ± 2.97)%、(19.45 ± 2.86)%、(8.29 ± 1.57)% 和 (8.71 ± 1.69)%。表现为 B 组和 C 组比较差异无显著性($P > 0.05$), D 组和 E 组比较差异无显著性($P > 0.05$), 但 B 组和 C 组又分别高于 D 组和 E 组($P < 0.01$), 而 A 组又分别高于 B 组和 C 组($P < 0.01$), 见表 3。

表 3A B、C、D 和 E 组小鼠

脾细胞 CTL 对 H22 细胞杀伤活性

组别	n	杀伤活性($\bar{x} \pm s$ %)
A 组	25	33.54 ± 4.02 *
B 组	25	20.16 ± 2.97 **
C 组	25	19.45 ± 2.86 ***
D 组	25	8.29 ± 1.57
E 组	25	8.71 ± 1.69

* 与其他组分别比较 $P < 0.01$; ** 与 A、D 和 E 组分别比较 $P < 0.01$, 与 C 组比较 $P > 0.05$; *** 与 A、D 和 E 组分别比较 $P < 0.01$, 与 B 组比较 $P > 0.05$

3 讨论

TNF 功能广泛, 能够通过存在于几乎所有细胞表面的 TNF 受体介导而发挥作用^[4]。TNF 具有较强的抑制或杀伤肿瘤细胞的作用。据报道, TNF-

基因修饰不同肿瘤细胞后,能使肿瘤细胞的致瘤性降低^[5,6]。作者等人^[7]曾报道,由于冷冻能提高肿瘤细胞的免疫原性,使用冷冻方法制作出肝癌疫苗,用该疫苗来激活肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL),TIL 的体外抗瘤活性得到了明显的提高。因此,我们将 TNF- 基因修饰的肿瘤细胞通过冷冻处理制成疫苗,以期通过 TNF- 基因修饰和冷冻的协同作用提高疫苗的效能,激活体内的特异性和非特异性免疫应答而获得更强的抗瘤能力。

本研究的结果显示,用 H22 细胞制成的疫苗(疫苗 D),无明显的抗小鼠接种性肝癌的效能。TNF- 基因修饰 H22 细胞后制成的疫苗(疫苗 B)和 H22 细胞通过冷冻处理后制成的疫苗(疫苗 C),均能使小鼠的接种肿瘤发生率明显降低,小鼠脾淋巴细胞 IL-2、TNF 诱导水平和脾脏 CTL 对 H22 细胞的杀伤活性明显增高,原因分别可能是:TNF- 修饰的 H22 细胞能在局部产生较高浓度的 TNF-,对 H22 细胞生长有直接的抑制作用,并能提高其机体整体的抗肿瘤免疫功能;H22 细胞通过冷冻处理后,冷冻能使覆盖于肿瘤细胞表面的唾液酸等变性、破坏,从而导致肿瘤细胞的肿瘤特异性抗原显露,免疫原性提高,进而激发小鼠机体产生更强的主动性抗肿瘤免疫。而 TNF- 基因修饰 H22 细胞后经过冷冻处理制成的疫苗(疫苗 A),能使小鼠的接种肿瘤发生率进一步降

低,小鼠脾淋巴细胞 IL-2、TNF 诱导水平和脾脏 CTL 对 H22 细胞的杀伤活性进一步提高,机理可能是上述的原因综合的结果。总的来说,TNF- 基因修饰联合冷冻法处理 H22 细胞,可获得高效的抗小鼠肝癌疫苗。本研究对研制高效的肿瘤疫苗进行了一些探索,为进一步的深入研究提供了有益的理论和实验依据。

参考文献:

- [1] 冯学胜,汤钊猷,郑仲承,等.人原发性肝癌基因治疗的实验研究[J].中华肿瘤杂志,1995,17 (3):167-169.
- [2] 刘金刚,刘作斌.低温医学[M].北京:人民卫生出版社,1993.338-351.
- [3] 曹雪涛,于益芝,徐志工,等.IL-4 基因转染瘤苗体内抗肿瘤转移作用及其免疫机理的初步研究[J].中华微生物和免疫学杂志,1995,15 (1):53-57.
- [4] RotheJ,GehrG,LoetscherHetal.Tumornecrosisfactorreceptor-structureandfunction[J].ImmunolRes,1992,11 (1):80-90.
- [5] AsherAL,MuleJJ,KasaiA,etal.Murinetumorcellstransduced withthe genefortumornecrosisfactor-[J].JImmunol,1991,146 (9):3227-3234.
- [6] BlankensteinT,QinZ,Uberalaketal.Tumorsuppressionafter tumorcelltar getedtumornecrosisfactoralpha genetransfer[J].J ExpMed,1991,173 (5):1047-1052.
- [7] 刘剑勇,李挺,刘剑仑,等.肝癌疫苗激活的 TIL 在体外抗肿瘤活性的研究[J].广西医科大学学报,1998,15 (3):8-9.

(周永红校对)

《肿瘤》期刊 2003 年征订启事

《肿瘤》期刊创刊于 1981 年,公开发行《肿瘤》是肿瘤专业的学术期刊,为国内中文科技核心期刊,入选《中文核心期刊要目总览》肿瘤学类核心期刊。为国内众多医学院校指定的博士、硕士生科研论文刊登期刊,深受广大肿瘤研究工作者的厚爱。本刊主要报道有关肿瘤的基础和实验研究以及西医、中西医结合的临床研究成果。设有肿瘤研究的著名学者撰写论文的专家论坛、国内外肿瘤前沿研究的快速报道以及流行病学研究、基础研究及临床研究、综述等栏目。主要读者对象为从事肿瘤防治和研究工作的中、高级医务科技人员和医学院校的师生。欢迎广大作者投稿。

《肿瘤》邮发代号,4-289,双月刊,大 16 开本,每期 88 页,每册定价 9.00 元,全年 54.00 元。全国各地邮局均可订阅,欢迎订阅。如邮局订阅延误可汇款到上海市斜土路 2200 弄 25 号(邮编 200032)上海市肿瘤研究所《肿瘤》编辑部补订。

联系电话:(021) 64047029-2301

E-mail: tumor@sci.shmu.edu.cn

《肿瘤》编辑部

2002 年 6 月 30 日