

HA 纳米载体介导转 hGM-CSF 基因的 HepG2 疫苗诱导的 抗肿瘤效应研究 *

曾治中¹ 段晓明^{2△} 程元星¹ 黄璐¹ 贺修胜³

(1 南华大学研究生院 湖南 衡阳 421001; 2 长沙市第四医院消化内科 湖南 长沙 410006;

3 南华大学肿瘤研究所 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的: 观察 HA 纳米颗粒载体介导转染 hGM-CSF 基因的 HepG2 细胞疫苗体外抗肿瘤效应, 为 hGM-CSF 基因修饰的 HepG2 细胞疫苗的临床应用提供依据。**方法:** HA 纳米颗粒载体介导 hGM-CSF 基因转染 HepG2 细胞制备转 GM-CSF 基因的 HepG2 细胞疫苗。密度梯度离心法分离人 PBMC, 体外诱导人 PBMC。WST-1 法测定 PBMC 的增殖活性及对 HepG2 细胞的杀伤效应, 流式细胞术分析 CD4⁺ 和 CD8⁺ 的阳性表达率, ELISA 法测定 INF- γ 的分泌。**结果:** WST-1 结果显示, 转基因 HepG2 组疫苗能诱导 PBMC 增殖, 其增殖率优于野生型疫苗 ($p < 0.05$); 其诱导的 PBMC 对 HepG2 的杀伤率高于各野生型疫苗组和各空白对照组 ($p < 0.05$)。FCM 结果显示, 转基因 HepG2 疫苗组 PBMC 中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 阳性表达率均高于各野生型疫苗组和各空白对照组 ($p < 0.05$)。ELISA 结果显示, 转基因组 PBMC 培养上清中 IFN- γ 含量为 1989.76 ± 254.21 pg/ml, 高于各野生型疫苗组和各空白对照组 ($p < 0.05$)。**结论:** HA 纳米颗粒载体介导转染 hGM-CSF 基因能增加 HepG2 细胞疫苗的免疫原性, 转 hGM-CSF 基因 HepG2 细胞疫苗可有效诱导 PBMC 增殖、分化, 增加 INF- γ 的分泌, 提高其对 HepG2 细胞的杀伤作用。

关键词: 肝肿瘤; 肿瘤疫苗; 免疫治疗; 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子; 外周血单个核细胞

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)04-672-05

Anti-tumor effects of HepG2 tumor vaccine transfected hGM-CSF gene mediated by HA nanoparticles*

ZENG Zhi-zhong¹, DUAN Xiao-ming², CHENG Yuan-xing¹, HUANG Lu¹, HE Xiu-sheng³

(1 Postgraduate Institute, Nanhua University, Hengyang 421001, China;

2 Department of Gastroenterology, Fourth Hospital of Changsha, Changsha 410004, China;

3 The Cancer Research Institute of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT Objective: To observe the HA Nanoparticles mediated transfection of hGM-CSF gene in HepG2 cells in vitro anti-tumor effect of the vaccine for the hGM-CSF gene-modified vaccine HepG2 cells provide the basis for clinical application. **Methods:** HA nanoparticles mediated gene transfer hGM-CSF preparation of HepG2 cells HepG2 cells transfected GM-CSF gene vaccine. Density gradient centrifugation were PBMC, in vitro induction of human PBMC. WST-1 method PBMC proliferation activity and killing effect on HepG2 cells, flow cytometry analysis of CD4⁺ and CD8⁺ positive expression rates, ELISA determination of INF- γ secretion. **Results:** WST-1 showed that transgenic HepG2 group of vaccine induced PBMC proliferation, the proliferation rate than wild-type vaccine ($p < 0.05$). The PBMC of the HepG2 induced high anti-vaccine groups in the wild type and the control group ($p < 0.05$). FCM results showed that transgenic HepG2 PBMC in the vaccine group CD4⁺ and CD8⁺ expression was higher than the wild-type vaccine group and control group ($p < 0.05$). ELISA results showed that the transgenic group PBMC supernatants of IFN- γ content was 1989.76 ± 254.21 pg / ml, higher than the wild-type vaccine group and control group ($p < 0.05$). **Conclusion:** HA nanoparticles mediated transfection of hGM-CSF gene can increase the immunogenicity of the vaccine HepG2 cells, transfected HepG2 cells in hGM-CSF gene vaccine can effectively induce PBMC proliferation, differentiation, increased INF- γ secretion, increase its HepG2 cells in vitro.

Key words: liver neoplasms; tumor vaccine; immune therapy; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; peripheral blood mononuclear cells

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)04-672-05

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是我国常见、难治性恶性肿瘤之一,其中 90% 为肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC),占我国恶性肿瘤死亡率的第 2 位。手术切除为肝癌治疗的首选方法,但其疗效仍欠满意,术后 5 年复发率亦高

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是我国常见、难治性恶性肿瘤之一,其中 90% 为肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC),占我国恶性肿瘤死亡率的第 2 位。手术切除为肝癌治疗的首选方法,但其疗效仍欠满意,术后 5 年复发率亦高

* 基金项目:湖南省卫生厅科研基金资助项目 (B2005-178)

作者简介:曾治中(1977-),男,硕士研究生,主要研究方向:消化道肿瘤,

电话:18774865629, E-mail: zengzhizhong@126.com

△通讯作者:段晓明, E-mail: xiaomingduan@21cn.com

(收稿日期:2010-11-06 接受日期:2010-11-30)

达 60%-70%甚至更高^[1],肿瘤复发转移仍是函待解决的难题。

随着人们对肿瘤免疫的深入研究,将对机体免疫功能具有广泛调节作用的细胞因子基因转入肿瘤细胞后制成的肿瘤疫苗在多项临床和实验研究中取得了令人鼓舞的效果^[2-4]。本实验采用 HA 纳米载体携带 GM-CSF 基因转染 HepG2 细胞,经 ⁶⁰Co 间断照射灭活,制成转 hGM-CSF 基因的 HepG2 细胞疫苗。分离人外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 将转基因疫苗与 PBMC 共同培养, 体外诱导 PBMC, 观察经其诱导后 PBMC 的增殖、分化和杀伤效应, 评价其对机体免疫功能的影响, 为转 hGMCSF 基因的 HepG2 细胞疫苗的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所。转 hGM-CSF 基因 HepG2 细胞由前期实验做成并冻存于南华大学肿瘤所。新鲜人血由健康志愿者提供, 年龄 24~35 岁, 平均 28 岁, 男性 3 人, 女性 2 人。总 RNA 提取试剂盒、RT 试剂盒、PCR 试剂盒购于 Sigma 公司。GAPDH、hGMCSF 基因 PCR 引物均由上海生工公司合成。L 谷氨酰胺购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 重组人 GMCSF 购于美国 PeproTech 公司, 重组人 IL-2 购于江苏金丝利药业有限公司; 人外周血淋巴细胞分离液 (比重 1.077) 购于天津灏洋生物公司; 抗人 FITC-CD4 mAb、抗人 PE-CD8 mAb、IgG2-FITC/IgG1-PE 购于 Ebioscience 公司; 人 GMCSF ELISA 检测试剂盒、人 INF- γ ELISA 检测试剂盒干扰素试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, WST-1 细胞毒性和增殖检测试剂盒购于碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 HA 纳米颗粒载体介导转染 hGM-CSF 基因的 HepG2 细胞疫苗制备与鉴定

HA 纳米颗粒载体介导转染 hGM-CSF 基因的 HepG2 细胞^[5], 再将其和野生型 HepG2 细胞分别经亚致死剂量的放射线间断照射后制备成转 GMCSF 基因的 HepG2 疫苗和野生型 HepG2 疫苗。RT-PCR 法对照射后转基因疫苗 hGMCSF-mRNA 的表达和整合进行鉴定, ELISA 法测定培养液中 hGMCSF 的分泌及持续时间。

1.2.2 人 PBMC 的分离

空腹无菌条件下抽取健康志愿者外周静脉血, 密度梯度离心法分离人 PBMC^[6], 加入含 10%FBS 的 1640 完全培养基制成细胞悬液, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 置入 CO_2 细胞培养箱 (37°C 、5% CO_2 、95% 湿度条件下) 备用。

1.2.3 HepG2 细胞疫苗诱导 PBMC 增殖效应的观察

将照射后的转基因 HepG2 疫苗和照射后的野生型 HepG2 疫苗用含 15%FBS 的 1640 培养基调成以 1640 培养基调节细胞浓度分别为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 、 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 、 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 、 $2.5 \times 10^4/\text{ml}$ 。加 $1 \times 10^6/\text{ml}$ PBMC 于 96 孔板, 每孔 100 μl 。向每孔加入上述各浓度的刺激细胞 100 μl , 使刺激细胞和 PBMC 细胞的比例分别为 1:40、1:20、1:10、1:5, 每种比例各设 5 复孔, 所有培养孔均补加 IL-2 液 (8000U/ml) 0.5 μl 使其最终浓度为 20U/ml。设空白对照孔两组各五复孔, 均加入培养基

100 μl , 分别加入或不加入 IL-2 液 (8000U/ml) 0.5 μl 。另设调零孔五复孔, 加入 200 μl 培养基。 37°C 、5% CO_2 培养箱共培养 3 天, 在培养结束前 4 小时加入 WST-1 20 μl /孔, 继续培养 4h 后终止培养, 把 96 孔板置于摇床上摇动一分钟, 以充分混匀待检测体系。在酶联免疫检测仪 OD450nm 处测量各孔的吸光度 (A) 值。根据各吸光度 (A) 值, 计算 PBMC 增殖率, 以刺激指数 (SI) 表示, $\text{SI} = \text{刺激细胞孔 A450 值} / \text{不加刺激细胞孔 A450 值}$ 。

1.2.4 HepG2 疫苗对 PBMC 中 CD4 和 CD8 阳性表达率的影响

根据 2.3 的结果确定各组刺激细胞和 PBMC 的比例, 将 PBMC 分为五组, 分别为转基因疫苗组 (GM-CSF-HepG2+IL-2)、野生型疫苗组 A (HepG2+IL-2)、野生型疫苗组 B (HepG2+IL-2+GMCSF)、空白对照组 A (等量培养基+IL-2)、空白对照组 B (等量培养基)。取 24 孔板, 每组 5 孔, 每孔加入 PBMC 1ml。将照射后的转基因 HepG2 疫苗和野生型疫苗, 分别以 1640 完全培养基调节细胞浓度分别为 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 。再分别加入相应刺激细胞诱导 1ml。其中转基因 HepG2 疫苗组, 加入 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 转基因 HepG2 细胞疫苗 1ml; 野生型 HepG2 疫苗组 A、B, 每孔加入 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 野生型 HepG2 细胞疫苗 1ml, 野生型 HepG2 疫苗组 B 组每天另加入 10 μl 的 hGMCSF 溶液 (1ng/ μl); 空白对照组 A, 加入 1ml 培养基。以上各组加入 IL-2 液 (8000U/ml) 5 μl , 使其终浓度 20U/ml。空白对照组 B, 加入 1ml 培养基, 不加 IL-2 液。共同培养 3 天后, 混匀 3000 转/分钟离心收集各组悬浮细胞, 采用直接免疫荧光流式细胞术检测各组 PBMC 中 CD4+ 细胞比例和 CD8+ 细胞比例, 同时留取上清液 -20°C 冰箱保存备用。

1.2.5 HepG2 疫苗诱导 PBMC 分泌 IFN γ

收集上述各组 PBMC 培养上清, ELISA 法测定培养液上清中 IFN γ 的浓度。

1.2.6 HepG2 疫苗诱导 PBMC 杀伤活性的观察

PBMC 分组和诱导同 2.4, 共培养五天。诱导结束前一天, 收集对数生长期的 HepG2 细胞, 用含 10%FBS 的 1640 完全培养基调 HepG2 细胞浓度分别为 $4 \times 10^4/\text{ml}$ 、 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 和 $1 \times 10^4/\text{ml}$, 分别接种于 96 孔培养板, 100 μl /孔, 每块 96 孔培养板间隔接种 5 列, 每列接种 5 孔, 边缘孔用无菌 PBS 填充, 5% CO_2 , 37°C 孵育。次日待细胞贴壁后加入上述各组诱导好的效应 PBMC 细胞 100 μl /孔, 使 PBMC 与 HepG2 细胞的比例 (即效靶比 E/T) 分别为 12.5:1、25:1 和 50:1。各实验组分为杀伤组 (E+T 组, 效应 PBMC 和靶细胞) 和效应细胞组 (E 组, 只有效应 PBMC, 没有靶细胞) 对照。同时设置靶细胞组 (T 组, 只加入靶细胞和完全培养基) 和培养基组 (只加入完全培养基), 5% CO_2 , 37°C 孵育 4 小时。每孔加入 20 μl WST-1 溶液, 继续培养 4h 后终止培养, 把 96 孔板置于摇床上摇动一分钟, 以充分混匀待检测体系。在酶联免疫检测仪 OD450nm 处测量各孔的吸光值。各孔吸光值减去对应培养基孔吸光度值进行校正后, 根据公式计算杀伤率: 细胞杀伤率 = $[1 - (\text{效} / \text{靶细胞组 A 值} - \text{效应细胞组 A 值}) / \text{靶细胞组 A 值}] \times 100\%$ 。

1.2.7 统计学方法

各组实验数据均用 $\bar{X} \pm S$ 表示, 采用 SPSS 18.0 软件进行

统计分析。两组均数的比较用 t 检验;多组均数之间比较行方差分析,方差后分析采取 LSD-t 检验进行两两之间的比较。P<0.05 为有统计学意义标准。

2 结果

2.1 HA 纳米颗粒载体介导转染 hGM-CSF 基因的 HepG2 细胞疫苗制备结果

成功制备转 hGM-CSF 基因 HepG2 疫苗和野生型 HepG2 疫苗。RT-PCR 结果均可扩增出 410bp 左右的条带,为内参照。经 60Co 间断照射的转基因 HepG2 细胞和未经照射的转基因 HepG2 细胞均可扩增出 260bp 左右的特异性条带,表明有 hGM-CSF mRNA 的转录。而在经 60Co 间断照射的野生型 HepG2 细胞和未经 60Co 间断照射的未出现特异性 260bp 条带(图 1)。ELISA 检测结果显示经 60Co 间断照射的转入 hGM-SF 基因的 HepG2 胞能稳定分泌 hGMCSF,分泌量为 197.28± 38.53ng/10E6cells 每 24 h。

2.2 HepG2 疫苗诱导人 PBMC 的增殖结果

在 3 天的培养过程结束时,两空白对照 PBMC 的 A 值分

别为 0.398± 0.008 和 0.375± 0.010,两者的差异无统计学意义(P>0.05),表明 20 U/mL 的 IL-2 不能单独诱导 PBMC 增殖。在诱导细胞(Inducer,I)和效应细胞(Effector,E)比例(I:E)分别为 1:40、1:10、1:20、1:5 时,在加入 IL-2(20 U/mL)的条件下,转基因 HepG2 疫苗和野生型 HepG2 疫苗刺激细胞诱导 PBMC 增殖的结果如下(表 1)(图 2)。

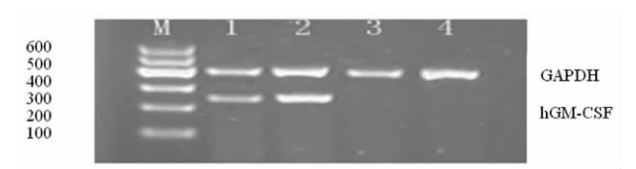


图 1 不同 HepG2 细胞的 hGMCSF 基因表达的 RT-PCR 分析
Figure 1 HepG2 cells hGMCSF different gene expression RT-PCR analysis
M: DNA maker (600bp); 1. Co60 interrupted by the irradiated transgenic HepG2; 2. Without intermittent exposure to 60Co transgenic HepG2; 3. By Co60 irradiation of wild-type HepG2 cells. 4. Co60 irradiation without the wild-type HepG2 cells

表 1 HepG2 疫苗刺激 PBMC 增殖活性测定(̄x± S,n=5)
Table 1 HepG2 determination of vaccine to stimulate PBMC proliferation(̄x± S,n=5)

group	SI			
	1:40	1:20	1:10	1:5
transgenic HepG2 group of vaccine	2.90± 0.10*	3.24± 0.06*	3.16± 0.05*	3.03± 0.04*
wild-type HepG2 group of vaccine	2.19± 0.07	2.94± 0.06	2.84± 0.08	2.66± 0.10

* With wild-type HepG2 group of vaccine, P<0.05

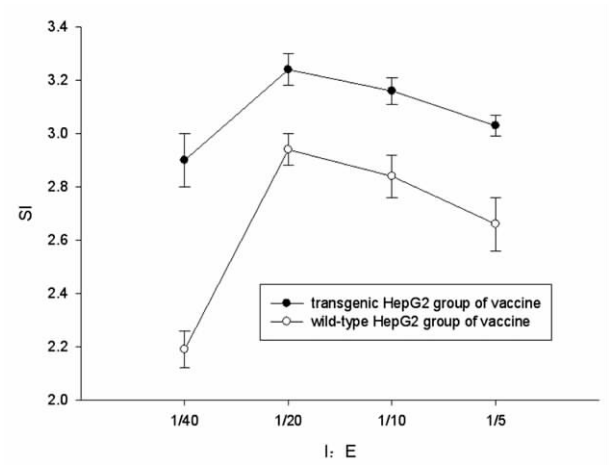


图 2 HepG2 疫苗刺激 PBMC 的增殖曲线图
Figure 2 HepG2 vaccine stimulated PBMC proliferation curve

从上我们可以看出,在不同浓度的刺激细胞诱导下,转基因 HepG2 疫苗组细胞刺激 PBMC 增殖的作用均高于野生型疫苗 A 组细胞,其增殖率差异均有统计意义(均 P<0.05),表明转入 hGMCSF 基因后 HepG2 疫苗免疫原性增强,其诱导 PBMC 增殖的能力增强。在 I:E 值为 1:20 时,转基因 HepG2 疫苗和野生型 HepG2 疫苗诱导 PBMC 增殖的能力均有最大效应,故选择之为以下各组疫苗诱导 PBMC 的浓度比。

2.3 HepG2 疫苗对 PBMC 中 CD4 和 CD8 阳性表达率的影响

在 3 天的培养过程结束时,经流式细胞术分析,空白对照组 A 和空白对照组 B 中 CD4+ 细胞百分比分别为 (32.07± 2.53)%、(30.44± 2.02)%,CD8+ 细胞百分比分别为 (23.25± 2.11)%、(23.03± 2.48)%,均 P>0.05,表明 20 U/mL 的 IL-2 不能单独诱导 PBMC 中 CD4+ 细胞和 CD8+ 细胞百分比变化。转基因疫苗组、野生型疫苗组 A、野生型疫苗组 B 中 PBMC 中 CD4+ 细胞百分比分别为 (58.72± 2.55)%、(43.43± 2.29)%、(50.07± 3.20)%,CD8+ 细胞百分比分别为 (35.14± 2.05)%、(29.41± 1.73)%、(32.17± 1.58)%,其百分比均高于空白对照组 A 中的相应细胞的比例,均 P<0.05。且转基因疫苗组 PBMC 中 CD4+ 细胞阳性比和 CD8+ 细胞阳性比均高于野生型疫苗组 A 和野生型疫苗组 B 中相应细胞的比例,均 P<0.05(表 2)(图 3)。

2.4 HepG2 疫苗诱导 PBMC 后对 INFγ 分泌的影响

在 3 天的培养过程结束时,两空白对照组 PBMC 培养上清中 IFN-γ 的含量为 757.25± 131.91pg/ml 和 692.87± 129.24pg/ml,P>0.05,两者的差异没有统计学意义,表明 20 U/mL 的 IL-2 不能单独诱导 PBMC 分泌 IFN-γ。而转基因疫苗组、野生型疫苗组 A、野生型疫苗组 B 中 PBMC 培养上清中 IFN-γ 含量分别为 1947.10± 133.69 pg/ml,1032.66± 104.79pg/ml,1334.41± 159.03 pg/ml,转基因疫苗组 PBMC 培养上清中 IFN-γ 含量高于空白对照组 A、野生型疫苗组 A 和

野生型疫苗组 B,均 $P<0.05$ (表 3)(图 4)。

2.5 HepG2 疫苗诱导 PBMC 后的杀伤作用

在 5 天的培养过程结束,各效靶比(E:T)例分别为 12.5:1,25:1 和 50:1 时转基因疫苗组 PBMC 对 HepG2 细胞的杀伤率分别为 56.26 ± 4.56 , 62.74 ± 4.82 , 79.29 ± 4.68 , 其杀伤能力与效应细胞数量成正相关,高于空白对照组、野生型疫苗组 A 和野生型疫苗组 B 的杀伤率,均 $P<0.05$,差异有统计学意义。野生型疫苗组 B 对 HepG2 细胞的杀伤率高于野生型疫苗组 A,但 $P>0.05$,差异没有统计学意义(表 4)(图 5)。

表 2 各组 PBMC 中 CD4 和 CD8 的阳性表达率(%, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 PBMC of each group in the CD4 and CD8 positive expression rate(%, $\bar{x}\pm s$)

分组	CD4+	CD8+
transgenic HepG2 group of vaccine	58.72 ± 2.55 * ▲△	35.14 ± 2.05 * ▲△
wild-type HepG2 group of vaccine A	43.34 ± 2.29 * △	29.41 ± 1.73 * △
wild-type HepG2 group of vaccine B	50.07 ± 3.20 *	32.17 ± 1.58 *
control group A	32.07 ± 2.53	23.25 ± 2.11
control group B	30.44 ± 2.02	23.03 ± 2.48

* comparison with the control group A, $P<0.05$

▲ comparison with the wild-type HepG2 group of vaccine A, $P<0.05$

△ comparison with the wild-type HepG2 group of vaccine B, $P<0.05$

表 3 各组 HepG2 疫苗诱导 PBMC 合成 IFN- γ 的作用(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

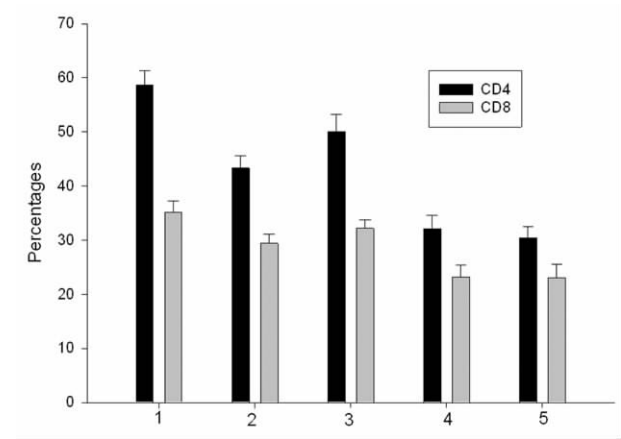
Table 3 PBMC of each group HepG2 synthetic vaccine induced the role of IFN- γ (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	The secretion of IFN- γ
transgenic HepG2 group of vaccine	1947.10 ± 133.69 *▲△
wild-type HepG2 group of vaccine A	1032.66 ± 104.79 * △
.wild-type HepG2 group of vaccine B	1334.41 ± 159.03 *
control group A	757.25 ± 131.91
control group B	692.87 ± 129.24

* comparison with the control group A, $P<0.05$

▲ comparison with the wild-type HepG2 group of vaccine A, $P<0.05$

△ comparison with the wild-type HepG2 group of vaccine B, $P<0.05$



1.transgenic HepG2 group of vaccine

2.wild-type HepG2 group of vaccine A

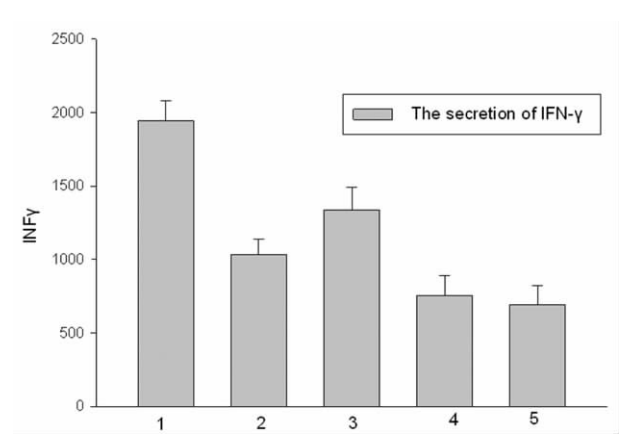
3.wild-type HepG2 group of vaccine B

4.control group A

5. control group B

图 3 各组 PBMC 中 CD4 和 CD8 的阳性表达率(%, $\bar{x}\pm s$)

Figure 3 PBMC of each group in the CD4 and CD8 positive expression rate(%, $\bar{x}\pm s$)



1.transgenic HepG2 group of vaccine

2.wild-type HepG2 group of vaccine A

3.wild-type HepG2 group of vaccine B

4.control group A

5. control group B

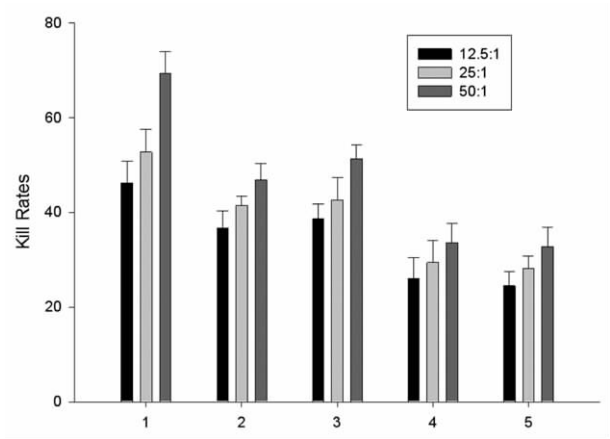
图 4 各组 HepG2 疫苗诱导 PBMC 合成 IFN- γ 的作用(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Figure 4 HepG2 vaccine induced PBMC of each group synthesis role of IFN- γ

表 4 各组诱导的 PBMC 对 HepG2 细胞杀伤率(%, $\bar{x}\pm s$)
Table 4 groups on the HepG2 cells induced killing rate of PBMC(%, $\bar{x}\pm s$)

group	E:T		
	12.5:1	25:1	50:1
transgenic HepG2 group of vaccine	46.26± 4.56* $\Delta\Delta$	52.74± 4.82 * $\Delta\Delta$	69.29± 4.68* $\Delta\Delta$
wild-type HepG2 group of vaccine A	36.78± 3.49 *	41.42± 2.09 *	46.88± 3.48 *
wild-type HepG2 group of vaccine B	38.67± 3.15*	42.63± 4.76 *	51.34± 3.00*
control group A	26.06± 4.34	29.45± 4.55	33.66± 3.98
control group B	24.49± 2.97	28.13± 2.60	32.80± 4.14

* comparison with the control group A, P<0.05
 Δ comparison with the wild-type HepG2 group of vaccine A, P<0.05
 $\Delta\Delta$ comparison with the wild-type HepG2 group of vaccine B, P<0.05



1.transgenic HepG2 group of vaccine
2.wild-type HepG2 group of vaccine A
3.wild-type HepG2 group of vaccine B
4.control group A
5. control group B

图 5 各组诱导的 PBMC 对 HepG2 细胞杀伤率(%, $\bar{x}\pm s$)
Figure 5 in each group of HepG2 cells induced killing rate of PBMC

3 讨论

肿瘤疫苗是用肿瘤细胞、肿瘤细胞裂解物或肿瘤抗原刺激机体免疫系统产生特异性抗肿瘤免疫效应的新型的肿瘤治疗方法,但自体 and 异体的全细胞疫苗刺激免疫反应的作用十分有限,提高肿瘤的免疫原性制备高效的肿瘤疫苗成为免疫治疗的关键。肿瘤基因工程疫苗通过基因重组技术,将不同目的基因如细胞因子、辅助刺激分子、MHC-I 类抗原分子等导入细胞^[7],从而改变局部的免疫环境,增强抗原递呈细胞和肿瘤特异性 T 细胞的活性。而 GM-CSF 则是迄今为止所评价的 33 个基因产物中作用效力最强的一个^[8]。GM-CSF 作为一种有着多重免疫调节功能的细胞因子,经 GM-CSF 基因修饰的细胞可长时间表达 GMCSF,可以吸引大量体内抗原呈递细胞至注射部位,这些细胞在这里捕获 " 肿瘤细胞 " 含有的肿瘤抗原,并在 GM-CSF 的作用下分化、活化、成熟,将分解的抗原呈递给 T 淋巴细胞,最终产生能够杀伤肿瘤细胞的活化 T 淋巴细胞^[9]。GM-CSF 基因修饰的肿瘤疫苗在黑色素瘤^[10]、前列腺癌^[11]、肺癌^[12]和肾癌^[13]等的实验和临床研究中显示了潜在的临床应用价值。但 GM-CSF 基因修饰的肝癌疫苗尚未见相关报道。

我们在前期实验的基础上用 HA 纳米颗粒载体介导转染 hGM-CSF 基因成功制备转基因 HepG2 细胞疫苗,通过体外诱导人外周血单个核细胞 PBMC,观察诱导后 PBMC 的增殖、分化及对 HepG2 细胞的杀伤效应。从实验结果来看,转基因 HepG2 细胞疫苗可促进 PBMC 增殖,上调 CD4+ 和 CD8+ 细胞的表达,增加 INF- γ 的分泌,提高其对 HepG2 细胞的杀伤效应,其免疫效应不仅强于单纯的野生型 HepG2 疫苗组和空白对照组,而且优于野生型疫苗和相当剂量的 hGM-CSF 混合组,提示转 hGM-CSF 基因的 HepG2 细胞疫苗诱导抗瘤效应的增加除了与 GM-CSF 分泌的局部作用外,还可能与转入 hGM-CSF 基因后抗原结构的改变致使其免疫原性的增加有关。我们也注意到肝癌患者存在免疫缺陷^[14],但由于血液样本收集困难,本实验未能采用肝癌术后病人外周血;同时,体外环境和体内环境也是有差别的。因此需要在评估其安全性后对疫苗进行进一步的临床和实验观察。

总之,HA 纳米载体介导转染 hGM-CSF 基因的 HepG2 细胞疫苗在体外试验中显示了良好的免疫效应,有望成为治疗和预防 HCC 转移复发的新途径。

参考文献(References)

[1] Wakai, T., et al., Hepatitis viral status affects the pattern of intrahepatic recurrence after resection for hepatocellular carcinoma [J]. Eur J Surg Oncol, 2003, 29(3): 266-71
[2] Tepper RI, Mule JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene2modified tumor cells[J].Hum Gene Ther, 1994,5(2): 153-164
[3] Pardoll DM. Paracrine cytokine adjuvants in cancerimmunotherapy. [J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13:339-415
[4] Morita T,Ikeda K, Douzona M, et al. Tumor Vaccination with-macrophage colony-stimulating factor producing Lewis lungcarcinoma in mice[J]. Blood, 1996,88(3):955-961
[5] 郭滢华, et al., 羟基磷灰石纳米颗粒载体介导 hGM-CSF 基因转染 HepG2 细胞及其生长的影响[J]. 肿瘤, 2008. 28(3): 224-227
Guo Gan-hua, et al. Hydroxyapatite nanoparticles mediated hGM-CSF gene transfection HepG2 cells and their growth. Cancer, 2008. 28 (3): 224-227
[6] 杜英, 阿托伐他汀对脂多糖刺激下 PBMC 分泌 TNF- α 、IL-1 β 的影响[J]. 山东医药, 2009. 49(20): 10
Du Ying. Effects of atorvastatin on LPS-stimulated PBMC secretion of TNF- α , IL-1 β effect[J]. Shandong Medicine, 2009, 49 (20): 10

(下转第 671 页)

- Sun Xin, Gu Yi, Li Xiao-feng, et al. Effect of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside against MPP induced apoptosis in PC12 cells[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2009, 30(24):2910-2913 (In Chinese)
- [5] Battisti C, Formichi P, Radi E, et al. Oxidative stress induced apoptosis in PBLs of two patients with Parkinson disease secondary to a-synuclein mutation[J]. J Neurol Sci, 2008, 267(1-2):120-124
- [6] Makarov SS. NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent Advances [J]. Mol Med Today, 2000, 6(11):441-448
- [7] Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders[J]. J Clin Invest, 2001, 107(3):247-254
- [8] Thanos D, Maniatis T. NF-kappaB: a lesson in family values[J]. Cell, 1995, 80(4):529-532
- [9] Hunot S, Brugg B, Ricard D, et al. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(14):7531-7536
- [10] Youdim MB, Grunblatt E, Mandel S. The pivotal role of iron in NF-kappaB activation, and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. Prospects for neuroprotection in Parkinson's disease with iron chelators[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 890: 7-25
- [11] Liang ZQ, Li YL, Zhao XL, et al. NF-kappaB contributes to 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of nigral dopaminergic neurons through p53[J]. Brain Res, 2007, 1145:190-203
- [12] Ghosh A, Roy A, Liu X, et al. Selective inhibition of NF-kB activation Prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, 104(47): 18754-18759

(上接第 676 页)

- [7] Ulmer, J.B., B. Wahren, and M.A. Liu, Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances [J]. Trends Mol Med, 2006, 12(5): 216-22
- [8] Hege, K.M., K. Jooss, and D. Pardoll, GM-CSF gene-modified cancer cell immunotherapies: of mice and men [J]. Int Rev Immunol, 2006, 25(5-6): 321-52
- [9] Eager, R. and J. Nemunaitis, GM-CSF gene-transduced tumor vaccines [J]. Mol Ther, 2005, 12(1): 18-27
- [10] Soiffer, R., et al., Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(17): 3343-50
- [11] Simons, J.W., et al. Phase I/II trial of an allogeneic cellular immunotherapy in hormone-naïve prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(11 Pt 1): 3394-401
- [12] Nemunaitis, J., et al., Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic GVAX vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13(6): p. 555-62
- [13] 张维红, et al., Gm-Csf 基因修饰同种异体肺癌细胞疫苗诱导 cd8⁺T 细胞的免疫反应[J]. 免疫学杂志, 2008. 24(5): 545-548. Zhang Wei-hong, et al. Gm-Csf gene-modified allogeneic lung cancer cell vaccine induced cd8⁺ T cells in the immune response[J]. Immunology, 2008, 24 (5): 545-548
- [14] Chen, S., et al. Absence of CD83-positive mature and activated dendritic cells at cancer nodules from patients with hepatocellular carcinoma: relevance to hepatocarcinogenesis [J]. Cancer Lett, 2000. 148 (1): 49-57