

· 实验研究 ·

转 GM-CSF 基因瘤苗治疗白血病的实验研究

付素珍¹, 原志庆²

(1. 新乡医学院第一附属医院儿科, 河南 卫辉 453100; 2. 新乡医学院病理教研室, 河南 卫辉 453003)

【摘要】目的 由于白血病细胞的不局限性, 其治疗方法受到很大的限制。本研究旨在探讨转粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)基因瘤苗在白血病免疫治疗中的有效性和可行性。**方法** 通过细胞生长曲线和动物致瘤性实验检测 GM-CSF 基因对红白血病细胞系 FBL-3 细胞生物学特性的影响; 用丝裂霉素灭活 FBL-3-GM-CSF 细胞制备转 GM-CSF 基因瘤苗, 通过转基因瘤苗免疫预防和免疫治疗动物实验探讨其预防和治疗白血病的可行性。**结果** FBL-3-GM-CSF 细胞体外生物学特性与 FBL-3-vect 和 FBL-3 细胞相比没有明显差异。细胞形态和生长速度均无差别。动物致病等实验显示, 分别接种 FBL-3-GM-CSF、FBL-3-vect 和 FBL-3 细胞, 各组肿瘤均持续生长, 但同一接种数量间相比, FBL-3-GM-CSF 平均出瘤时间比 FBL-3-vect 和 FBL-3 晚, 肿块平均体积也相应较小。丝裂霉素灭活 FBL-3-GM-CSF 细胞后作为瘤苗, 免疫小鼠产生的免疫保护力明显强于灭活的 FBL-3-vect 和 FBL-3。FBL-3-GM-CSF 组与 FBL-3-vect、亲本 FBL-3 细胞和 PBS 对照组相比出瘤时间晚、肿瘤生长速度慢、小鼠生存期延长, 其中有 4/10 的小鼠长期存活(超过 60 天)。另外, 转基因瘤苗免疫治疗动物实验结果也显示: 与 FBL-3-vect、亲本 FBL-3 细胞和 PBS 对照组相比 FBL-3-GM-CSF 组肿瘤生长速度受到明显抑制, 其中 2/10 只小鼠肿瘤完全消失; 小鼠生存期延长, 其中有 2/10 的小鼠长期存活(超过 60 天)。**结论** 丝裂霉素灭活 FBL-3-GM-CSF 后作为瘤苗可有效对白血病进行免疫治疗, 有良好的临床研究和应用前景。 [中国当代儿科杂志, 2005, 7(4): 337-340]

【关键词】 白血病; 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; 瘤苗; 预防治疗; 免疫治疗; 小鼠

【中图分类号】 R725.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2005)04-0337-04

Experimental study on the treatment of leukemia using GM-CSF gene-modified cancer vaccines

Su-Zhen FU, Zhi-Qing YUAN. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, Xinxiang Medical College, Weihui, Henan 453100, China (Yuan Z-Q, Email: qxlfsus@163.com)

Abstract: Objective The treatment of leukemia is limited by diffusion of leukemia cells. The aim of this study was to investigate the effectiveness and feasibility of immune therapy for leukemia by vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF). **Methods** The biological characteristics of FBL-3-GM-CSF cells were studied by the growth curve and tumorigenicity experiment in vivo. The GM-CSF gene-modified tumor vaccines were prepared with mitomycin-C inactivated FBL-3-GM-CSF cells. The effects of vaccination with mitomycin-C inactivated FBL-3-GM-CSF on immune prophylaxis and immune therapy of leukemia were investigated in animal experiments. **Results** There was no significant difference in the biological characteristics (cellular morphology and growth rate) between FBL-3-GM-CSF, FBL-3-vect and FBL-3 cells. In mice vaccinated with the FBL-3-GM-CSF cells, tumor formation was later and the tumor volume was smaller than those vaccinated with FBL-3-vect or FBL-3 cells. Vaccination with mitomycin-C inactivated FBL-3-GM-CSF in mice could significantly induce potent anti-tumor immune reaction compared with that with FBL-3-vect cells, FBL-3 cells or PBS. The growth rate of tumor in mice vaccinated with FBL-3-GM-CSF was markedly slower and the survival time was dramatically longer compared with in those vaccinated with the FBL-3-vect cells, FBL-3 cells or PBS. **Conclusions** The vaccination with mitomycin-C inactivated FBL-3-GM-CSF for the treatment of leukemia is effective and feasible. The study provided experimental and theoretical data for further clinical study and application of GM-CSF gene-modified cancer vaccines. [Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(4): 337-340]

Key words: Leukemia; Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Cancer vaccines; Preventive therapy; Immunotherapy; Mice

[收稿日期] 2004-12-22; [修回日期] 2005-04-20

[基金项目] 河南自然科学基金资助项目(NO. 0111021200)

[作者简介] 付素珍(1967年-), 女, 硕士, 主治医师, 主攻方向为白血病的免疫治疗及肾病发病的分子机制。

[通讯作者] 原志庆, 河南省新乡医学院病理教研室。

白血病是儿童和青少年常见的恶性肿瘤之一,在我国各种恶性肿瘤死亡率中,白血病居第6位或第7位,但在儿童和青少年恶性肿瘤中,白血病居第1位。鉴于白血病细胞的不局限性,其治疗方法受到很大的限制。抗肿瘤免疫反应主要是由T细胞介导的细胞免疫^[1]。肿瘤细胞常不能有效地向T细胞递呈抗原,也不能有效地激活T细胞产生抗肿瘤免疫应答^[2]。肿瘤抗原须经过抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)的加工、递呈才能有效激活T淋巴细胞。树突状细胞(dendritic cell, DC)是专职的、最重要的APC,在抗肿瘤免疫应答过程中发挥重要作用^[3]。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)能促进树突状细胞分化、成熟,刺激主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子和共刺激分子表达,并具有诱导粒细胞和巨噬细胞分化和调节免疫应答的作用^[4]。将GM-CSF基因导入肿瘤细胞后用射线或丝裂霉素灭活,使瘤细胞不致瘤,但灭活的瘤细胞仍能保持一段时间分泌GM-CSF,此即转GM-CSF基因瘤苗。转GM-CSF基因瘤苗治疗肾细胞癌、肝细胞癌、胰腺癌、骨髓瘤和淋巴瘤等有效^[5~8],但未见用于白血病的研究。本研究将转染mGM-CSF真核表达质粒pcDNA3-GM-CSF并能稳定高表达该基因、具有生物学活性的红白血病细胞(FBL-3-GM-CSF),用丝裂霉素灭活制备转GM-CSF基因瘤苗,以探讨其预防和免疫治疗白血病的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及材料

丝裂霉素、PRMI-1640培养基和新生牛血清分别为GIBCO/BRL公司和Hyclone公司产品,红白血病细胞系FBL-3(C57BL/6小鼠来源)和转染mGM-CSF真核表达质粒pcDNA3-GM-CSF并能稳定高表达该基因、具有生物学活性的红白血病细胞FBL-3-GM-CSF为本室保存。C57BL/6小鼠购于中国医学科学院实验动物所。

1.2 FBL-3最小致瘤量实验

将小鼠随机分为5组,每组5只,分别皮下接种 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 亲本FBL-3细胞,观察小鼠成瘤情况,以一组中每只小鼠均长出肿瘤,且肿瘤持续生长直至小鼠死亡最小细胞接种数量为FBL-3的最小致瘤量。

1.3 GM-CSF基因对FBL-3细胞生物学特性的影响

1.3.1 细胞生长曲线 取对数生长期FBL-3-GM-CSF、FBL-3-vect和亲本FBL-3细胞分别接种于

培养瓶,每瓶接种细胞量为 1×10^5 ,每日每组取3瓶计数,以平均数绘制细胞生长曲线。

1.3.2 转基因FBL-3细胞动物致瘤性实验 将FBL-3-GM-CSF、FBL-3-vect和亲本FBL-3细胞分别肋腹侧皮下接种,每种细胞接种量分为 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 三组,共设9组动物,每组10只。观察出瘤时间、肿瘤大小(肿瘤体积 = 长径 $\times$ 短径²/2)及死亡情况。

1.4 丝裂霉素灭活肿瘤细胞

将要处理的肿瘤细胞24h前换液,收集细胞,用RPMI-1640调细胞浓度为 1×10^6 /mL,加丝裂霉素1.5 mg/mL,37℃,2h,每20min振摇一次,PBS洗3次。

1.5 转基因瘤苗免疫预防动物实验

将丝裂霉素灭活的FBL-3-GM-CSF、FBL-3-vect和亲本FBL-3细胞,小鼠双侧腹股沟接种灭活肿瘤细胞 5×10^6 个,另设PBS对照组,每组10只,共4组。免疫后10d,小鼠用 1×10^6 亲本FBL-3细胞肋腹侧皮下接种,观察出瘤时间、肿瘤大小及死亡情况。

1.6 转基因瘤苗免疫治疗动物实验

将小鼠随机分为4组,每组10只,均用 1×10^6 亲本FBL-3细胞肋腹侧皮下接种,待接种局部长出肿瘤。将丝裂霉素灭活FBL-3-GM-CSF、FBL-3-vect和亲本FBL-3细胞,小鼠双侧腹股沟分别接种每种细胞 5×10^6 个,设PBS对照组。1周后加强免疫1次。观察肿瘤大小和动物死亡情况。

1.7 统计学方法

采用Fisher精确概率法。

2 结果

2.1 GM-CSF基因对FBL-3细胞生物学特性的影响

2.1.1 细胞形态及体外生长速度 FBL-3-GM-CSF、FBL-3-vect和FBL-3细胞形态间无差别,FBL-3-GM-CSF、FBL-3-vect和FBL-3细胞生长曲线显示:三者生长速度亦无明显差别。见图1。

2.1.2 体内致瘤性 最小致瘤量实验结果表明:FBL-3最小致瘤量为 1×10^6 。动物致瘤性实验结果显示:各组肿瘤均持续生长,但与同一接种数量组相比,FBL-3-GM-CSF平均出瘤时间比FBL-3-vect和FBL-3晚,肿块平均体积也相应较小(图2)。

2.2 转基因瘤苗免疫预防动物实验

FBL-3-GM-CSF组与FBL-3-vect、亲本FBL-3细胞和PBS对照组相比出瘤时间晚、肿瘤生长速度慢(图3)、小鼠生存期延长($P < 0.05$),其中4/10的小鼠可长期存活(超过60天)(表1)。

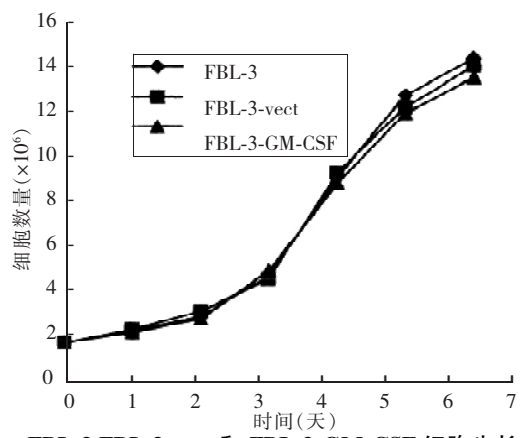


图1 FBL-3 FBL-3-vect 和 FBL-3-GM-CSF 细胞生长曲线

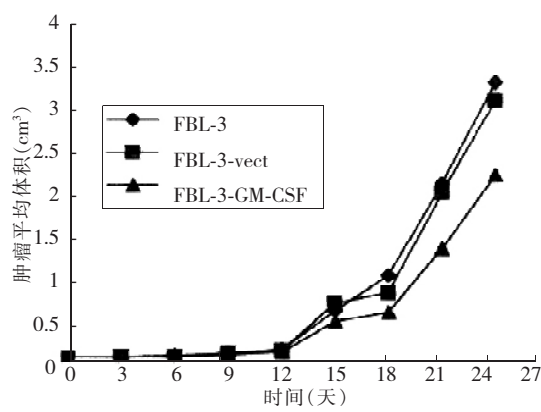


图2 FBL-3 FBL-3-vect 和 FBL-3-GM-CSF 细胞的肿瘤生长曲线 (接种 2×10^6 细胞)

表1 丝裂霉素灭活的 FBL-3 FBL-3-vect 和 FBL-3 -GM-CSF 免疫接种后用 FBL-3 细胞皮下攻击小鼠生存情况

免疫接种类型	小鼠生存时间(天)	
	30	45
FBL-3	3(30%)	0(0)
FBL-3-vect	4(40%)	0(0)
FBL-3 -GM-CSF	9(90%)	4(40%)
PBS	3(30%)	0(0)

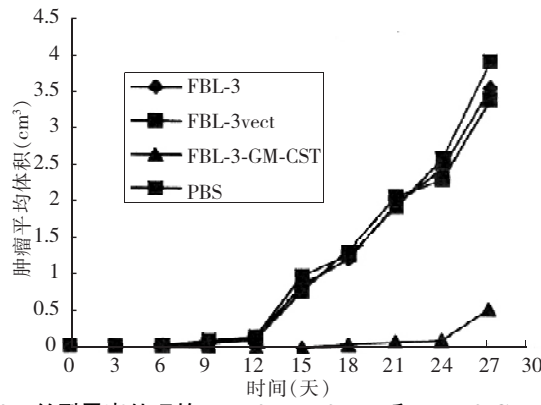


图3 丝裂霉素处理的 FBL-3 FBL-3-vect 和 FBL-3-GM-CSF 免疫接种后用 FBL-3 细胞皮下攻击肿瘤生长曲线

2.3 转基因瘤苗免疫治疗动物实验

与 FBL-3-vect、亲本 FBL-3 细胞和 PBS 对照组相比,FBL-3-GM-CSF 组肿瘤生长速度受到明显抑制(图4),其中2只小鼠肿瘤完全消失,小鼠生存期延长($P>0.05$)(表2),其中有2/10的小鼠长期存活(超过60天)。而 FBL-3-Vect、亲本 FBL-3 细胞组与 PBS 组比较无明显差异($P>0.05$)。

表2 转基因 GM-CSF 瘤苗免疫治疗动物实验小鼠生存情况

瘤苗类型	小鼠生存时间(天)	
	30	45
FBL-3	2(20%)	0(0)
FBL-3-vect	2(20%)	0(0)
FBL-3 -GM-CSF	7(70%)	2(20%)
PBS	1(10%)	0(0)

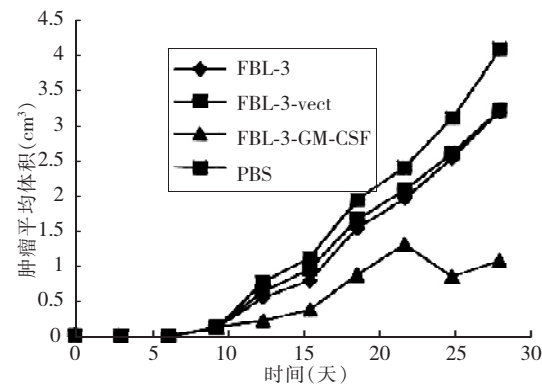


图4 转 GM-CSF 基因瘤苗免疫治疗动物实验结果

3 讨论

本研究结果显示 FBL-3-GM-CSF 细胞体外生物学特性与 FBL-3-vect 和 FBL-3 细胞相比没有明显差异,它们的细胞形态间无差别,生长速度亦相似。体内致瘤性实验中,各组肿瘤均持续生长,但同一接种数量间相比,FBL-3-GM-CSF 平均出瘤时间比 FBL-3-vect 和 FBL-3 晚,肿块平均体积也相应较小。这一点与 Nagai 等^[9]的报道不完全相同,形成这种差异的原因可能是所用细胞系不同,GM-CSF 分泌量不同或转染方法不同所引起。

有文献^[9]报道,转 GM-CSF 基因的瘤细胞经 γ -射线灭活后可作为有效的瘤苗。但也有相反的报道:Arca 等^[10]报道用逆转录病毒转染的 B16BL6 黑素瘤细胞,尽管 24 h 内可分泌 $450\text{ng}/10^6\text{ cells}$ GM-CSF, γ -射线灭活后免疫同基因小鼠仍不能抵抗亲本肿瘤细胞的再攻击。产生这些差异的原因难以确定,因为被检测的细胞类型和实验过程在不同的

实验室是不同的。Nagai 等^[9]认为产生高效的免疫力并不单单依靠肿瘤细胞产生的 GM-CSF 的量, GM-CSF 须在接种肿瘤细胞部位以一定的水平维持一定的时间,这样才能够活化 APC(如 DC)。

丝裂霉素灭活 FBL-3-GM-CSF 后作为瘤苗免疫小鼠,产生的免疫保护力明显强于 FBL-3-vect 和 FBL-3 组。FBL-3-GM-CSF 组与 FBL-3-vect、亲本 FBL-3 肿瘤细胞和 PBS 对照组相比出瘤时间晚、肿瘤生长速度慢、小鼠生存期延长。另外,转基因瘤苗免疫治疗动物实验结果也显示:与 FBL-3-vect、亲本 FBL-3 肿瘤细胞和 PBS 对照组相比 FBL-3-GM-CSF 组肿瘤生长速度受到明显抑制,其中 2 只小鼠肿瘤完全消失;小鼠生存期延长。这可能是由于将 GM-CSF 基因导入肿瘤细胞后再用丝裂霉素灭活,使瘤细胞不致瘤,但灭活的转 GM-CSF 基因瘤苗接种于局部皮肤后,仍能保持一段时间分泌 GM-CSF, GM-CSF 可募集、诱导 DC 增生并有效捕捉肿瘤抗原,进而到淋巴结中激活 T 淋巴细胞,激活抗肿瘤免疫。本研究显示丝裂霉素灭活 FBL-3-GM-CSF 后作为瘤苗可以预防和免疫治疗白血病。

[参 考 文 献]

- [1] Catros-Quemener V, Bouet F, Genetet N. Antitumor immunity and cellular cancer therapies[J]. Med Sci (Paris), 2003, 19(1):43-53.
- [2] Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, et al. Identification of human cancers deficient in

- antigen processing[J]. J Exp Med, 1993, 177(2):265-272.
- [3] Nencioni A, Muller MR, Grunebach F, Garuti A, Mingari MC, Patrone F, et al. Dendritic cells transfected with tumor RNA for the induction of antitumor CTL in colorectal cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(3):209-214.
- [4] Demir G, Klein HO, Tuzuner N. Low dose daily rhGM-CSF application activates monocytes and dendritic cells in vivo[J]. Leuk Res, 2003, 27(12):1105-1108.
- [5] Shtil AA, Turner JG, Durfee J, Dalton WS, Yu H. Cytokine-based tumor cell vaccine is equally effective against parental and isogenic multidrug-resistant myeloma cells; the role of cytotoxic T lymphocytes[J]. Blood, 1999, 93(6):1831-1837.
- [6] Simons JW, Jaffee EM, Weber CE, Levitsky HI, Nelson WG, Carducci MA, et al. Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer[J]. Cancer Res, 1997, 57(8):1537-1546.
- [7] Simons JW, Mikhak B. Ex-vivo gene therapy using cytokine-transduced tumor vaccines: molecular and clinical pharmacology[J]. Semin Oncol, 1998, 25(6):661-676.
- [8] Shi M, Wang FS, Wu ZZ. Synergetic anticancer effect of combined quercetin and recombinant adenoviral vector expressing human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes on hepatocellular carcinoma cells in vitro[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(1):73-78.
- [9] Nagai E, Ogawa T, Kielian T, Ikubo A, Suzuki T. Irradiated tumor cells adenovirally engineered to secrete granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor establish antitumor immunity and eliminate pre-existing tumors in syngeneic mice[J]. Cancer Immunol Immunother, 1998, 47(2):72-80.
- [10] Arca MJ, Krauss JC, Strome SE, Cameron MJ, Chang AE. Diverse manifestations of tumorigenicity and immunogenicity displayed by the poorly immunogenic B16-BL6 melanoma transduced with cytokine genes[J]. Cancer Immunol Immunother, 1996, 42(4):237-245.

(本文编辑:钟乐)

· 消息 ·

《国际神经病学神经外科学杂志》2006 年征订启事

为适应我国神经科学发展的需要及新形势下办刊模式的转变,经国家科技部、国家新闻出版署批准,原《国外医学神经病学神经外科学分册》自 2005 年第 4 期起更名为《国际神经病学神经外科学杂志》,仍由国家教育部主管、中南大学主办、中南大学湘雅医院承办。原《国外医学神经病学神经外科学分册》是国家级专业性学术期刊、神经科学类核心期刊,创刊 32 年来深受广大读者的好评和喜爱。已被《中国学术期刊(光盘版)》全文收录并稳居中国科技期刊被引用频次最高 500 名排行榜。《国际神经病学神经外科学杂志》在保留原有综述栏目的基础上,将以论著、临床研究、疑难病例讨论、病例报道、专家讲座等栏目为主。杂志立足于国内神经病学、神经外科学领域的前沿研究,及时报道国内外神经科学领域最新的学术动态和信息。促进国内外学术的双向交流,为中国神经科学走向世界搭建新的平台。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。

《国际神经病学神经外科学杂志》为双月刊,全国公开发行。刊号为 CN43-1456/R,ISSN 1673-2642。邮发代号 42-11。大 16 开,每期定价 9.8 元,全年定价 58.8 元。欢迎各级医师到当地邮局订阅。杂志社也可办理邮购。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号(中南大学湘雅医院内)《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部,邮编:410008,电话及传真:0731-4327401, E-mail 地址:neurogxm@public.cs.hn.cn 或 gwyyx_neurobjb@163.com。