

免疫细胞联合腺病毒 Ad205-IL-15 对 肝癌细胞的杀伤研究

徐 科, 胡 贲, 苏 虹, 胡徐庞, 刘 佳, 杨 智, 刘 立, 钱 程, 魏旭斌

(浙江理工大学新元医药研究所, 杭州 310018)

摘 要: 在已有腺病毒 Ad205-IL-15 的基础上尝试与过继免疫细胞 CIK、NK92 等联合开展对肝癌细胞的杀伤性研究。首次通过荧光化学发光的原理构建出携带表达萤光素酶报告基因的肝癌细胞系 Huh7-Luc、MHCC97H-Luc 来检测细胞的存活率。结果表明:免疫细胞联合 Ad205-IL-15 对 Huh7-Luc、MHCC97H-Luc 两株肝癌细胞表现出了较高协同杀伤作用。证明将免疫细胞与腺病毒联合可以相互弥补各自治疗的不足之处,提高了抗肿瘤效果。同时,由于操作方便,萤光素酶报告基因测定法也为检测细胞存活率提供了新的技术手段。

关键词: 腺病毒 Ad205-IL-15; CIK; NK92; 过继免疫; 萤光素酶报告基因

中图分类号: Q786

文献标识码: A

0 引 言

肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国最常见的恶性肿瘤之一,死亡率高^[1]。目前肝癌临床治疗首选的方案仍是手术、放疗、化疗等传统疗法。但对于中晚期肝癌的治疗,传统疗法往往束手无策。因此临床上亟待寻找一种更有效的治疗方法以取代或辅助现有的传统治疗方法^[2]。近些年来肿瘤生物学治疗的兴起为人们治愈恶性肿瘤带来了新的曙光,利用基因工程手段对肝癌进行基因治疗、免疫治疗是目前肝癌治疗研究的热点^[3-6]。

CIK 细胞 (cytokine-induced killer) 是将人外周血单核细胞在体外用多种细胞因子 (如抗 CD3McAb、IL-2、IFN- γ 、IL-1 α 等) 共同培养一段时间后获得的一群异质细胞。由于该种细胞同时表达 CD3+ 和 CD56+ 两种膜蛋白分子,故又被称为 NK 细胞样 T 淋巴细胞。它兼具有 T 淋巴细胞强大的抗肿瘤活性和 NK 细胞的非主要组织相容性复合物 (MHC) 限制性杀伤肿瘤的优点^[7]。

NK92 细胞是来源于人非何杰金氏淋巴瘤的自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞系,其表型及生物学功能最接近正常的新鲜 NK 细胞,对多种肿瘤细胞均具有杀伤活性,且具有永生性,可在体外长期培养、大量扩增。其活化无 MHC 限制,无需抗原预先致敏,对人体正常细胞无影响,是肿瘤过继性免疫治疗 (adoptive immunotherapy, AIT) 的理想细胞系。可代替外周血 NK 细胞进行过继免疫治疗^[8-9]。

溶瘤腺病毒 Ad205-IL-15 不但具有溶瘤腺病毒在肿瘤细胞内特异性地增殖且杀伤肿瘤细胞^[10] 的特性,而且还能发挥 IL-15 在 NK 细胞增殖和分泌细胞因子,增强 NK 细胞和毒性 T 淋巴细胞活性^[11-13] 的特点。

本实验拟采取 Ad205-IL-15 联合过继免疫细胞 CIK、NK92 的疗法,进行对肝癌细胞系杀伤效果的研究,以期为肝癌治疗研究寻找到有效的途径。

1 材料与方法

1.1 材 料

慢病毒体: pRRLSIN, cPPT, PGK-GFP/Luc.

收稿日期: 2011-01-17

基金项目: 国家自然科学基金国际合作重大项目 (81020108026)

作者简介: 徐 科 (1985-), 男, 浙江兰溪人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤基因病毒治疗方面的研究。

通讯作者: 魏旭斌, 电子邮箱: runnerupstone@sohu.com

WPR 及 3 个包装质粒(pMD2. G、pMDlg/pRRE 及 pRSV-Rev)由本实验室保存。腺病毒载体 Ad205-IL15 及对照病毒 Ad205-GFP 由本实验室构建并完成。HEK-293FT 细胞、Huh7-Luc、MHCC97H-Luc 细胞由本实验室构建。PBMC 细胞购于西南医院血液中心。CIK 细胞本实验室保存。NK92 由第三军医大学卞修武教授惠赠。

1.2 试剂

1640 培养基、DMEM 培养粉及胎牛血清(FBS)为美国 Gibco 公司产品。胰蛋白酶(trypsin, 1:250)为 Sigma 公司产品。双蒸水自制,其余试剂均为国产分析纯。pGL3 Luciferase Reporter Vectors, Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 购自美国 Promega 公司。脂质体转染试剂盒 Effectene Transfection Reagent 购自 Qiagen 公司。胎牛血清、DMEM 细胞培养液,1640 培养基购自美国 Gibco 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 脂质体转染法包装慢病毒并感染肿瘤细胞

转染前 12 h,将 HEK-293FT 细胞以 5×10^5 个/孔的密度铺于 6 孔细胞培养板中,加入 2 mL 含 5% FBS 的 DMEM 培养液。将上述慢病毒质粒于 1.5 mL EP 管中按(1:1:1:1)比例混合好,加入 8 μ L Enhancer buffer,用振荡器混合 1 s;混合均匀后于室温放置 2~5 min;加入转染试剂 effectene 5 μ L,用振荡器混合 10 s;混合均匀后室温下放置 5~10 min;向混合后的溶液中加入 DMEM 培养液至总体积 600 μ L,用移液枪混匀后逐滴加入细胞中。转染 12~16 h 后细胞培养液更换 2 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液继续培养。转染 48 h 后收集培养上清,用 0.45 μ m 孔径滤膜过滤后加入到事先铺 1×10^5 个/孔的 Huh7 和 MHCC97H 的培养皿中。经过反复感染 3 次后用荧光素酶检测系统和荧光检测仪计算荧光强度标准曲线。

1.3.2 荧光化学发光检测细胞存活

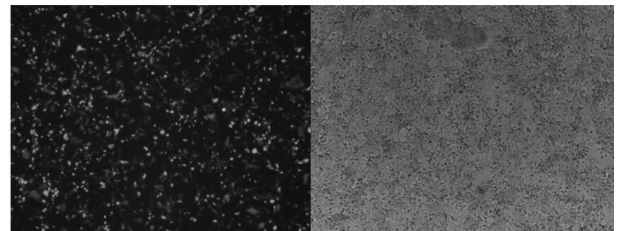
将肝癌细胞株 MHCC97H-Luc 和 Huh-Luc7 以 1×10^4 每孔的量接种入 96 孔板,待细胞贴壁后,分成 8 组分别加入每孔 NK92/CIK(效靶比 10:1)、AdCN205-GFP(5MOI)、AdCN205-hIL-15 (5MOI)、NK/CIK(效靶比 10:1) + AdCN205-GFP(5MOI)、NK92/CIK(效靶比 10:1) + AdCN205-hIL-15 (5MOI),以不加病毒和 CIK 细胞的孔作为对照,各做 6 个复孔。于 37℃、5%培养箱中继续培养。在加入病毒感染细胞后 24、48、72 h,使用 $1 \times$ PBS 清洗细胞 3 次,加入 20 μ L $1 \times$ passive lysis buffer,常

温晃匀后使细胞充分裂解,然后每孔吸出 10 μ L 加入到事先准备好的棕色 96 孔酶标板中,置于冰上,准备好荧光素酶检测试剂底物,将细胞裂解液棕色 96 孔酶标板放入荧光检测仪中检测荧光强度。以时间为横轴,实验孔与对照孔荧光强度比值为纵轴绘制细胞生长曲线。

2 实验结果

2.1 构建稳定表达 Luciferase 荧光素酶的肝癌细胞系

Lv-pRRLSIN. cPPT. PGKGFP. WPRE 和 Lv-pRRLSIN. cPPT. PGK-luc. WPRE 分别多次感染 Huh7 细胞系,通过倒置荧光显微镜观察细胞 GFP 荧光表达情况,由此推测 Lv-pRRLSIN. cPPT. PGK-luc. WPRE 在 Huh7 细胞中 Luciferase 的表达效果。由图 1 可以显示出,经多次感染后大多数细胞都能表达 GFP。间接证明了 Luciferase 也具有同样的表达效果。



(a) 荧光显微镜下观察

(b) 明场视野下观察

图 1 Lv-pRRLSIN. cPPT. PGKGFP. WPRE 多次反复感染细胞后的细胞形态及荧光(50 \times)

2.2 Huh7-Luc 细胞个数与发光强度的关系

将肝癌细胞株 Huh7-Luc 以 3 000、5 000、10 000、15 000 个/孔的细胞梯度接种入 96 孔板,各设 6 个复孔。待细胞贴壁后 24 h 裂解细胞,加入荧光素酶检测试剂底物,测定荧光强度标准曲线,如图 2。由图 2 可以看出荧光强度是随着细胞数的增多而变强的线性关系。

2.3 荧光化学发光法检测细胞存活率

图 3 结果所示,对于 Huh7-Luc 细胞,CIK 细胞、NK92 细胞、AdCN205-GFP 和 AdCN205-hIL-15 对肿瘤细胞有一定的杀伤作用,而 CIK /NK92 + AdCN205-GFP 和 CIK/NK92 + AdCN205-hIL-15 对肿瘤细胞具有很强的杀伤效果,特别是到了 72 h,CIK/NK92 + AdCN205- hIL-15 能够杀死 93%以上肿瘤细胞,较 CIK/NK92+AdCN205-GFP 组而言效果极其显著。实验结果表明 CIK/NK92 联合 AdCN205-hIL-15 能发挥很强的协同效应,能

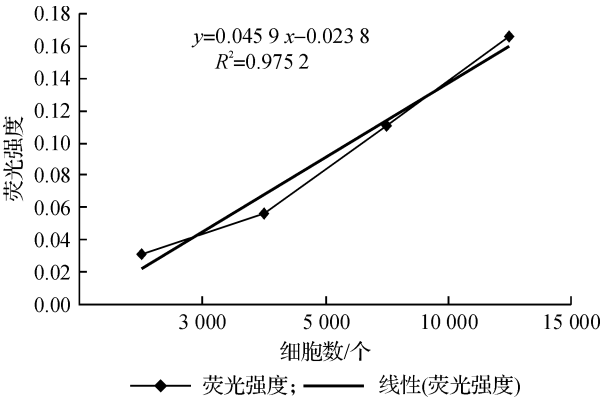


图 2 Huh7-Luc 细胞荧光强度

数据以 3 次独立实验的平均± SD 表示 ($P<0.01$)

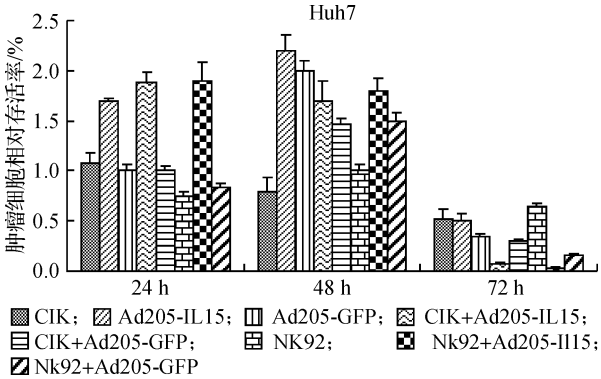


图 3 CIK 细胞联合病毒杀伤 Huh7-Luc 细胞的存活率
高效地杀伤肿瘤细胞。

对于 MHCC97H-Luc 而言,从实验到达 72 h 后可以看出单独的免疫细胞或者病毒杀伤效果都不理想,两者的联合治疗可以起到部分杀伤或抑制肿瘤细胞生长的作用,但是效果没有 Huh7-Luc 敏感(见图 4)。

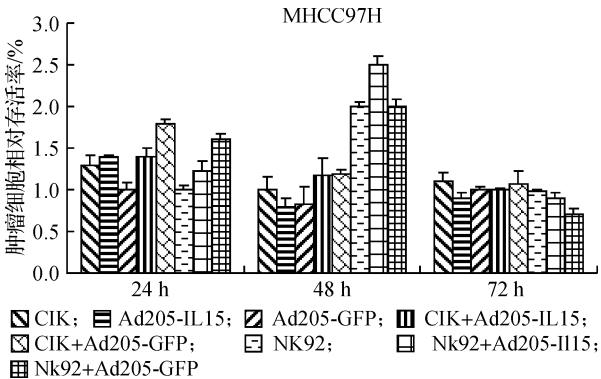


图 4 CIK 细胞联合病毒杀伤 MHCC97H-Luc 细胞的存活率

荧光化学发光实验检测 AdCN205-GFP、AdCN205-hIL-15、CIK、CIK + AdCN205-GFP、CIK + AdCN205-hIL-15、NK、NK + AdCN205-GFP、NK + AdCN205-hIL-15 感染肿瘤细胞 (Huh7-Luc、MHCC97H-Luc) 后肿瘤细胞的存活率。数据

以 3 次独立实验的平均± SD 表示 ($P<0.01$)。

3 结论和讨论

溶瘤腺病毒治疗肝癌在以往的研究中虽已经取得了较好的效果,但仍存在诸多不足之处:如①溶瘤腺病毒的给药方式常常是瘤体原位注射,但是许多恶性肿瘤呈弥散性生长或全身转移而难以进行有效的全身治疗;②在单独的病毒治疗中病毒只能携带直接杀伤或抑制肿瘤的基因,对于那些不能直接杀伤但却能激活免疫反应的基因只能望而却步。本研究通过将细胞过继免疫治疗与病毒基因治疗相结合,弥补了上述病毒治疗的缺陷,该方案具有以下特点:a)充分利用了溶瘤腺病毒的侵染和复制以及本身就能有效杀伤肿瘤细胞的优势;b)以病毒本身复制来带动治疗基因的高效表达,使基因刺激免疫细胞(如 CIK 和 NK)的活性,激活全身免疫反应,从而达到良好的抗肿瘤效果。二者完美结合不仅能相互弥补各自治疗的不足之处,而且还使其协同抗肿瘤效果得到最大的优化。体外实验中也证实了上述观点,在荧光化学发光检测杀伤 72 h 时单独的病毒组和免疫细胞组能够杀伤 50% 左右的肿瘤细胞,而 CIK/NK92 + AdCN205- hIL-15 几乎能够将肿瘤细胞全部杀死,效果极其显著。

另外,本实验采用荧光化学发光原理来检测细胞的存活率,方法独特快捷。根据细胞代谢活动与活细胞数的相关性,通过测定靶细胞代谢活性的减少来反映效应细胞所致靶细胞的死亡。无需设置免疫细胞本底组做对照,且操作简单。为检测细胞存活率开辟了新的方法。

参考文献:

- [1] Levin B, Amos C. Therapy of unresectable hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 1995, 33(2): 1294-1296.
- [2] Li Y, Yu D C, Chen Y, et al. A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant CV890 eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin[J]. Cancer Res, 2001, 61(17): 6428-6436.
- [3] Kaneko S, Hallenbeck P, Kotani T, et al. Adenovirus-mediated gene therapy of hepatocellular carcinoma using cancer-specific gene expression[J]. Cancer Res, 1995, 55(22): 5283-5287.
- [4] Schmitz V, Qian C, Ruiz J, et al. Gene therapy for liver diseases: recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies[J]. Gut, 2002, 50(1): 130-135.

- [5] Lu S Y, Sui Y F, Li Z S, et al. Construction of a regulable gene therapy vector targeting for hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(4): 688-691.
- [6] Shibata T, Giaccia A J, Brown J M. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(6): 493-498.
- [7] Kim H M, Lim J, Yoon Y D, et al. Anti-tumor activity of ex vivo expanded cytokine-induced killer cells against human hepatocellular carcinoma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(13): 1793-801.
- [8] Koehl U, Sorensen J, Esser R, et al. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2004, 33(3): 261-266.
- [9] Gong J H, Maki G, Klingemann H G. Characterization of a human cell line (NK92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells[J]. *Leukemia*, 1994, 8(4): 652-658.
- [10] Wu S, Fischer L, Gok buget N, et al. Expression of interleukin 15 in primary adult acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cancer*, 2010, 116(2): 387-392.
- [11] Burton J D, Bamford R N, Peters C, et al. A lymphokine, provisionally designated interleukin-T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer-cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(11): 4935-4939.
- [12] Carson W E, Giri J G, Lindemann M J, et al. Interleukin IL-15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor[J]. *J Exp Med*, 1994, 180(4): 1395-1403.
- [13] Armitage R G, Macduff B M, Eisenman J, et al. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation[J]. *J Immunol*, 1995, 154(2): 483-490.

Anti-Tumor Efficacy by Immune Cells Combined with Adenovirus Ad205-IL-15 in HepatOcellular Carcinoma Cells

XU Ke, HU Ben, SU Hong, HU Xu-pang, LIU Jia, YANG Zhi, LIU Li, QIAN Cheng, WEI Xu -bin
(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, Zhejiang Sci-Tech University,
Hangzhou 310018, China)

Abstract: To study the anti-tumor effects of immune cells (CIK, NK92) in combination with adenovirus Ad205-IL-15 on liver cancer, the authors construct and examine the expression of luciferase reporter gene in Huh7、MHCC97H cell lines, and then using fluorescent chemical light successfully the authors detect the anti-cancer effects of immune cells, oncolytic adenovirus Ad205-IL15, and combination of two agents respectively. The results show that combination of immune cells and AdCN205-IL-15 increases anti-tumor efficacy in vitro compared to either alone. At the same time, the luciferase reporter gene assay, due to ease of operation, also provides a new detection technological means of cell viability.

Key words: adenovirus Ad205-IL-15; CIK; NK92; adoptive immunotherapy; luciferase reporter gene
(责任编辑: 许惠儿)