

# tk 基因治疗脑胶质瘤时的免疫反应与旁观者效应的关系

李玲莉<sup>1</sup>,李 涛<sup>2</sup>,李承晏<sup>2</sup>

**摘要:**目的 探讨 tk 基因(thymidinekinase gene)治疗脑胶质瘤时的免疫反应与旁观者效应的关系。**方法** 将 C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup>与 C<sub>6</sub>tk<sup>-</sup>按 0%tk<sup>+</sup>,10%tk<sup>+</sup>,30%tk<sup>+</sup>,50%tk<sup>+</sup>,100%tk<sup>+</sup>5 种比例混合,接种于 SD 鼠右侧顶叶,7d 后腹腔注射 GCV(更昔洛韦),剂量为 30mg/kg/d,共 10d。细胞接种 3 周后,处死动物,计算成瘤率,作病理检查,并作 CD4+、CD8+ 的免疫组化染色。**结果** 50% 及 100% C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup>组的成瘤率明显小于其余 3 组( $P < 0.05$ ),病理检查发现 50% 及 100% tk<sup>+</sup>组有淋巴细胞及浆细胞浸润。免疫组化显示每一组之间均有差异,提示有免疫反应存在。**结论** tk 基因治疗脑胶质瘤时,可激起机体内的免疫反应,增强抗肿瘤作用,它是旁观者效应的作用机制之一。

**关键词:** tk 基因;基因治疗;神经胶质瘤;免疫反应;旁观者效应

中图分类号:R73-35<sup>14</sup> 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2002)04-0280-03

## Relation between immuneresponse and bystander effect when using tk gene to treat the glioma

LILin g-li,LiTao,LiChen g-yan,etal

Renmin g Hospital of Wuhan Universit y, Wuhan 430060 , China

**Abstract: Objective** To investigate the relation between immuneresponse and bystander effect when using tk gene for the glioma. **Methods** tk<sup>+</sup> and tk<sup>-</sup> C<sub>6</sub> cells were mixed at the ratios of 0%tk<sup>+</sup>, 10%tk<sup>+</sup>, 30%tk<sup>+</sup>, 50%tk<sup>+</sup>, 100%tk<sup>+</sup>. The mixed cells were implanted directly into the right parietal lobe of the SD rats. Seven days after cell implantation, all rats were given GCV 30mg/kg/d for 10 days. Three weeks after cell implantation, all rats were killed. The rate of tumor growth, the pathological and immunohistochemical characters of tumor tissues were measured. **Results** The rate of tumor growth of 50% and 100% C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> groups was significantly lower than those of the other three groups ( $P < 0.05$ ). Pathological studies showed significant T lymphocytes and plasma cell infiltration in tumor tissues of 50% and 100% C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> groups. Immunohistochemical analysis displayed significant differences among all groups. **Conclusion** Immuneresponse can be induced in the tk/GCV therapy of glioma and it can enhance the efficiency of antitumor. It may be one of the mechanisms of bystander effect.

**Keywords:** tk gene;Genetherapy;Glioma;Bystander effect;Immuneresponse

脑胶质瘤的基因治疗是当前研究的热点课题之一。用 tk 基因治疗脑胶质瘤时发现部分未经基因修饰的肿瘤细胞也发生死亡,这一现象称为旁观者效应(bystander effect)。旁观者效应的机理不清楚,本研究旨在探讨 tk 基因治疗脑胶质瘤的旁观者效应与免疫反应的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料 STK 质粒由 MooltenFL 教授惠赠,大

鼠神经胶质瘤细胞 C<sub>6</sub>购自上海细胞所,PA317 细胞由上海肿瘤研究所提供。大肠杆菌 DH5 为本实验室保存。质粒提取纯化试剂盒、DMEM 培养基、G418、DOSPER、ClaI、HindIII 为 Promega 公司产品,新生小牛血清为亚法公司产品,MTT 为 Sigma 公司产品,GCV 由丽珠公司提供,山羊抗大鼠 CD4,CD8 抗体为博士德公司产品,SABC 免疫组化染色试剂盒为亚法公司提供。

## 1.2 方法

1.2.1 质粒的转化、鉴定、提取、纯化、病毒包装、病毒感染和 tk<sup>+</sup>细胞筛选:用氯化钙法将 STK 转入大肠杆菌 DH5 中,在 LB 培养基中扩增阳性菌落,质粒提

收稿日期:2001-07-31;修回日期:2002-03-26

基金项目:湖北省科委自然科学基金资助(SJ:97J069)

作者单位:1.430060 武汉大学人民医院急诊科,2. 神经内科

取纯化试剂盒提取纯化质粒,酶切鉴定。用脂质体转染法将 STK 质粒转入 PA317 细胞,G418 筛选,收集病毒上清,感染 C<sub>6</sub> 细胞后,再用 G418 筛选,将 C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 细胞培养传代。

1.2.2 将 C<sub>6</sub>、C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 细胞传代 48h 后用 2% 胰蛋白酶消化,计数后离心,用 PBS 制成 2 × 10<sup>6</sup> 个/毫升细胞悬液。将 C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 与 C<sub>6</sub> 混合,分别制成含有 10%、30%、50% C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 的细胞悬液,密度约为 2 × 10<sup>6</sup> 个/毫升。

1.2.3 动物模型制备 40 只鼠,随机分为 5 组,每组 8 只,分别接种 C<sub>6</sub>、10%tk<sup>+</sup>、30%tk<sup>+</sup>、50%tk<sup>+</sup>、100%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 的细胞悬液,术后 7d,腹腔注射 GCV30 mg/kg/day,连续 10d。接种细胞后 3 周处死动物,取脑组织,部分作冰冻切片,部分作 HE 染色。

1.2.4 切片制备部分脑组织用石蜡包埋切片,片厚 4~5um,HE 染色光镜下观察。另一部分作冰冻切片,片厚 12~15um,纯丙酮固定 30min 后,室温干燥,-40 低温冰箱保存。

1.2.5 免疫组化将冰冻切片取出,用蒸馏水洗净,纯甲醇加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 至 0.5%,室温浸泡 30min,蒸馏水洗 3 次,抗原修复液处理 10min,蒸馏水洗 2 次,加正常血清封闭液(兔血清),室温 20min,甩去多余液体,不洗,分别滴入即用型的山羊抗大鼠 CD4 抗体,CD8 抗体,37 60min,用 0.01MPBS 洗 2min × 3 次,滴入生物素化兔抗山羊抗体,37 20min,0.01MPBS 洗 2min × 3 次,滴入试剂 SABC,37 20min,0.01MPBS 洗 5min × 4 次。DAB 显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。显微镜观察。以正常 SD 大鼠淋巴结为阳性对照,大鼠正常脑组织为阴性对照。未着色的为阴性,深于阴性对照浅于阳性对照的为 1 个“+”号,与阳性对照相似的为 2 个“+”号,深于阳性对照的为 3 个“+”号。

1.2.7 统计学方法用 SAS 统计软件处理。

## 2 结果

2.1 成瘤率,见表 1。C<sub>6</sub>、10%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 和 30%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 组的成瘤率明显高于 50%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 及 100%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 组 (P < 0.05),表明 tk<sup>+</sup> 细胞的浓度对疗效有影响。

表 1 各组动物肿瘤成瘤率及 3 周生存数

序号	组别	n	成瘤个数	3 周生存数	成瘤率 (%)
1	C <sub>6</sub>	8	8	4	100
2	10%C <sub>6</sub> tk <sup>+</sup>	8	7	5	87.5
3	30%C <sub>6</sub> tk <sup>+</sup>	8	7	6	87.5
4	50%C <sub>6</sub> tk <sup>+</sup>	8	4 *	8	50.0
5	100%C <sub>6</sub> tk <sup>+</sup>	4	1 *	4	25.0

经直接概率法分析:1 与 4 P < 0.05;1 与 5 P < 0.05;其余各组之间差异均无显著性。

2.2 病理改变 C<sub>6</sub> 组肿瘤细胞在脑组织内呈浸润性增长,有较多的病理性核分裂相,瘤细胞浸润血管,形成瘤栓,几乎未见淋巴细胞。10%tk<sup>+</sup> 及 30%tk<sup>+</sup> 组瘤组织与正常脑组织分界处有变性和坏死,血管周边有肿瘤细胞浸润,可见淋巴细胞和浆细胞,瘤栓少见。50%tk<sup>+</sup> 和 100%tk<sup>+</sup> 组瘤周、瘤内有大片坏死,血管内壁有较多淋巴细胞,可见浆细胞。

2.3 免疫组化染色结果 CD4+ 系列 除 10%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 与 30%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup>,30%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 与 50%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 之间无显著性差异。其余各组之间均有显著性差异(10% 组对 C<sub>6</sub> 和 50%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 组为 P < 0.05,30%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 和 50%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 组对 C<sub>6</sub> 组为 P < 0.01),见表 2。CD8+ 系列:30%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 和 50%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 组对 C<sub>6</sub> 组差异有显著性 (P < 0.01),50%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 组对 10%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 组差异有显著性 (P < 0.05),见表 3。说明 tk<sup>+</sup> 细胞比例高组的免疫反应的程度高于 tk<sup>+</sup> 细胞比例低组。

表 2 CD4+ 免疫组化染色结果

序号	组别	n	染色阳性程度			
			-	+	++	+++
1	C <sub>6</sub>	4	4	0	0	0
2	10%C <sub>6</sub> tk <sup>+</sup> *	5	1	4	0	0
3	30%C <sub>6</sub> tk <sup>+</sup> **	6	0	3	3	0
4	50%C <sub>6</sub> tk <sup>+</sup> ***	8	0	1	3	4

经 AVWC(累积-权重-方差分析)法, F = 30.22, P < 0.01, 表明不同组的染色程度不同, 2 vs 4 P < 0.01, 差别有高度显著性。

表 3 CD8+ 免疫组化染色结果

序号	组别	n	染色阳性程度				F	P
			-	+	++	+++		
1	C <sub>6</sub>	4	4	0	0	0		
2	10%C <sub>6</sub> tk <sup>+</sup> *	5	2	3	0	0		
3	30%C <sub>6</sub> tk <sup>+</sup> **	6	0	3	3	0	19.99	< 0.01
4	50%C <sub>6</sub> tk <sup>+</sup> ***	8	0	2	3	3		

经 AVWC 法, P < 0.01, 差别有高度显著性,且两两比较 1 与 4 组 F = 12.05,2 与 4 组 F = 5.62, P < 0.01。即 C<sub>6</sub> 与 30%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 和 50%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 染色阳性程度不同。C<sub>6</sub> 染色阴性,而后两组均为阳性。

## 3 讨论

由于肿瘤细胞缝隙连接的表达水平不一<sup>[1]</sup>,且只在肿瘤局部起作用,所以在增加自杀基因系统的疗效方面作用有限。免疫反应不仅能在局部直接杀伤肿瘤细胞,还能诱发机体回忆应答,预防复发。而研究免疫效应则可以另辟蹊径,为增强 tk/GCV 系统的旁观者效应提供了新的思路。

本实验结果表明 50%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 组与 100%C<sub>6</sub>tk<sup>+</sup> 组无显著性差异说明 tk<sup>+</sup> 肿瘤细胞被 GCV 杀死的同时,部分 tk<sup>-</sup> 肿瘤细胞也被杀死,这就是所谓的旁观者效应。CD4+ 和 CD8+ 细胞属于 T 细胞亚群,它们在

免疫调节中起重要作用。T 细胞免疫应答又称细胞介导的免疫应答,通过抗原诱导、活化等一系列中间过程的作用后,被激活的 CD4+ 亚群参与炎症反应,CD8+ 亚群则参与细胞毒作用直接破坏表达 MHC I 抗原的靶细胞,这种效应在抗肿瘤免疫中起主要作用。本实验免疫组化结果表明 CD4+ 系列与 CD8+ 系列染色结果趋势相似,均表现为含 tk+ 细胞比例高组较 tk+ 细胞比例低组阳性程度高,如 50% C6tk+ 组和 30% C6tk+ 对 C6 组和(或)10% C6tk+ 组差异有显著性。镜检发现 tk- 组很难见到淋巴细胞。10% C6tk+ 组与 30% C6tk+ 组可见血管及管周中有淋巴细胞浸润,每个高倍视野下(×400)有 1~2 个浆细胞,50% C6tk+ 组有淋巴细胞浸润,每高倍视野下有 3~5 个浆细胞。说明不同浓度的 tk+ 组经 GCV 治疗后,免疫反应的强弱不同,它参加了旁观者效应。炎症反应使血管通透性增高有利于抗原提呈细胞和淋巴细胞进入肿瘤微环境<sup>[2,3]</sup>。抗 CD 染色阳性说明存在细

胞免疫,浆细胞的出现说明同时有体液免疫。产生免疫反应的具体机制还有待进一步研究。

#### 4 结论

本研究结果表明体内免疫反应是旁观者效应的机制之一,通过提高机体免疫力可增强旁观者效应。

#### 参考文献:

- [1] Shinoura N, Chen L, Wan J, et al. Protein and Messen ger RNA expression of connexin 43 in astrocytomas: implications in brain tumor genesis [J]. J Neurosurg, 1996, 84 (5): 839-845.
- [2] Vile RG, Castleden S, Marshall J. Generation of an anti-tumor immune response in a non-immunogenic tumor: HSV-tk lillin g in vivo stimulates a mononuclear cell infiltrate and a Th1-like profile of inflammatory cytokine expression [J]. Int J Cancer, 1997, 71 (2): 267-274.
- [3] Mullen CA, Anderson L, Woods K, et al. Ganciclovir chemotherapy of a pest ymidine kinase suicide gene-modified tumor produces tumor necrosis and induces systemic immune responses [J]. Hum Gene Ther, 1998, 9 (14): 2019-2030.

(熊 静校对)

(上接第 279 页)

示,在肝癌组织中,有 HC56 和 HC71 基因的杂合子性缺失和表达异常。把 HC56 和 HC71 转染原发性肝癌细胞株 SMMC7721 细胞,可明显抑制肿瘤细胞的集落形成<sup>[5,6]</sup>。

我们用脂质体介导的基因转染方法显示,HC56 和 HC71 基因产物可明显抑制 Jurkat 细胞的活力,其中尤以 HC56 基因产物的作用更为明显;而 HC90 基因产物对 Jurkat 细胞活力的抑制不很明显。

我们的结果提示,HC56 和 HC71 基因,除了抑制肝癌细胞的生长以外,对淋巴瘤细胞的活力也有明显的抑制,因此,HC56 和 HC71 基因可能为候选的抑瘤基因,其基因产物对淋巴瘤/白血病细胞的增殖和凋亡的作用,值得进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 覃文新,顾建人. 人类恶性肿瘤中染色体 17p13.3 区带的杂合性丢失[J]. 生命科学, 1999, 11 (2): 75-77.
- [2] Hoff C, Seranski P, Mollenhauer J, et al. Physical and transcriptional analysis of the human 17p13.3 region [J]. Genomics, 1999, 53 (2): 181-188.

tional mapping of the 17p13.3 region that is frequently deleted in human cancer [J]. Genomics, 2000, 70 (1): 26-33.

[3] Cuneo A, Bignami R, Roberti MG, et al. Molecular and cytogenetic characterization of marginal zone B-cell lymphoma: correlation with clinicopathologic findings in 14 cases [J]. Haematology, 2001, 86 (1): 64-70.

[4] Sankar M, Tanaka K, Kumaravel TS, et al. Identification of a commonly deleted region at 17p13.3 in leukemia and lymphoma associated with 17p13.3 abnormalities [J]. Leukemia, 1998, 12 (4): 510-516.

[5] 万大方, 蒋惠秋、任功一, 等. 新基因 HC56 对人肝癌细胞 (SMMC7721) 基因表达的影响 [J]. 肿瘤, 2001, 21 (6): 435-437.

[6] Wenxin Qin, Da Fan, Gang Wan, Fen Yon, Gang Sun, et al. cDNA cloning and genomic structure of a novel gene (C17orf25) from the deletion region on chromosome 17p13.3 in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Research, 2001, 11 (3): 209-216.

[7] Lai JL, Preudhomme C, Zandeki M, et al. Yelodysplastic syndrome and acute yeloid leukemia with 17p deletion: A entity characterized by specific yeloid leukemic cells and high incidence of p53 mutations [J]. Leukemia, 1995, 9 (3): 370-381.

(熊 静校对)