

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.003

· 研究快报 ·

缺氧微环境对 TSST-1 诱导的抗 CEA⁺ 结肠癌 LoVo 细胞免疫治疗的调控

王炜, 孙学军, 王伟, 田勇, 郑见宝, 成亮, 张超(西安交通大学医学院第一附属医院 普通外科, 陕西 西安 710061)

专家点评 缺氧微环境是绝大多数实体瘤的固有特征之一,作为一种选择压力可加速肿瘤细胞基因组突变,促进肿瘤细胞浸润及转移,同时缺氧也是引发肿瘤辐射抗拒、耐药等现象的重要因素。正是基于对肿瘤缺氧特征的深刻认识,缺氧已成为肿瘤靶向治疗的一个重要靶点,如缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)调控下的缺氧特异性细胞毒药物、缺氧细胞放射增敏剂、缺氧特异性溶瘤病毒等均展现出可喜的应用前景。增强机体免疫反应一直是肿瘤治疗的一个重要努力方向。超抗原刺激 T 细胞、B 细胞活化的多克隆激活剂,其无需抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)加工处理即可诱导具有相同 TCR β 的多克隆 T 细胞大量活化增殖,激发强烈的免疫反应,但直接应用超抗原容易诱发严重的不良反应,因而需对超抗原进行修饰改造,限制其作用部位,使其只在肿瘤局部发挥免疫增强作用。

本期刊登的王炜博士等人的论文,报道了逆转录病毒介导、缺氧特异性表达修饰的超抗原——中毒性休克综合征毒素-1(toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1)膜锚定蛋白活化外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)对肿瘤细胞的体外杀伤作用研究。该修饰后 TSST-1 超抗原的表达由癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)启动子-HRE 共同调控,由 TSST-1 与 CD80 跨膜区肽段融合构成膜锚定蛋白,融合蛋白表达框通过逆转录病毒介导整合到肿瘤细胞基因组中。RT-PCR 和 Western blotting 证实,缺氧模拟剂 CoCl₂ 诱导的缺氧微环境能有效上调病毒转导后 CEA⁺ 结肠癌 LoVo 细胞(5HCTC/LoVo 细胞)中 TSST-1 mRNA 和蛋白的表达,而 CEA⁻ HeLa 细胞无论在常氧还是缺氧条件下均无 TSST-1 的表达,显示 CEA 启动子-HRE 系统对 TSST-1 严格的调控作用。将感染病毒后的肿瘤细胞与人 PBL 共同孵育,通过³H-TdR 掺入法检测人 PBL 的增殖情况,结果显示,5HCTC/LoVo 细胞对人 PBL 的增殖诱导作用在缺氧条件下显著提高。MTT 法细胞活性测定表明,缺氧环境下 PBL 对 5HCTC/LoVo 细胞的杀伤率明显高于常氧环境;而 CEA⁻ HeLa 细胞在常氧或缺氧条件下均不能刺激 PBL 增殖,PBL 对其也无抑制作用。以上结果显示,该逆转录病毒介导的 CEA-HRE 特异性 TSST-1 超抗原膜锚定蛋白治疗系统有助于在肿瘤局部激活 T 细胞,增强肿瘤免疫反应,发挥抗肿瘤作用。尽管该治疗系统离临床应用仍存在较大距离,但本文对于探索肿瘤特异性免疫激活策略,以及基因治疗与免疫治疗的联合应用,不失为一次非常有意义的探索和尝试。

第二军医大学东方肝胆外科医院基因-病毒治疗实验室主任、
生物治疗科主任,浙江省基因治疗中心常务副主任,国家杰出青年基金获得者,上海市领军人才及优秀学科带头人



[摘要] 目的:研究缺氧微环境对靶向性表达的超抗原中毒性休克综合征毒素-1(toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1)活化外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)对 CEA⁺ 结肠癌 LoVo 细胞杀伤作用的调控。方法:包装、收集前期构建的缺氧反应元件(hypoxia-response elements, HRE)和癌胚抗原启动子 CEAp 联合调控的逆转录病毒载体 pLEGFP-N1-5HRE-CEAp-TSST-1-linker-CD80TM(简称 pLEGFP-N1-5HCTC),感染 CEA⁺ LoVo 细胞及 CEA⁻ 宫颈癌 HeLa 细胞,获取稳定表达跨膜型超抗原 TSST-1-linker-CD80TM 蛋白(TC 融合蛋白)的肿瘤细胞。用缺氧模拟试剂 CoCl₂ 模拟缺氧微环境,RT-PCR 和 Western blotting 分别检测缺氧调控下 TSST-1 的表达水平。将健康人 PBL 与 pLEGFP-N1-5HCTC 感染后的肿瘤细胞共培养,³H-TdR 掺入法检测缺氧调控下 PBL 的增殖能力,MTT 法检测缺氧调控下 PBL 对肿瘤细胞的杀伤效应。结果:pLEGFP-N1-5HCTC 病毒成功感染 CEA⁺ LoVo 细胞(5HCTC/LoVo),RT-PCR 和 Western blotting 证实,缺氧可上调 5HCTC/LoVo 细胞中 TSST-1

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672070, No. 30400430);陕西省科学技术研究发展计划资助项目(No. 2009K01-70)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672070, No. 30400430), and the Science and Technology Foundation of Shaanxi Province (No. 2009K01-70)

[作者简介] 王炜(1982-),男,陕西省西安市人,博士生,主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究。E-mail: macabre@stu.xjtu.edu.cn

[通信作者] 孙学军(SUN Xue-jun, corresponding author), E-mail: sunxy@mail.xjtu.edu.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20111111.1120.008.html>

mRNA和蛋白的表达,CEA⁻ HeLa 细胞在常氧和缺氧条件下均无 *TSST-1* 的表达。缺氧可上调 5HCTC/LoVo 细胞诱导的人 PBL 的增殖(7.3×10^3 vs 3.1×10^3 cpm, $P < 0.05$),缺氧环境下 PBL 对 5HCTC/LoVo 细胞的杀伤率明显高于常氧环境(82.69% vs 53.50% , $P < 0.01$);CEA⁻ HeLa 细胞不能刺激 PBL 增殖,PBL 对其也无抑制作用。结论: 缺氧微环境可显著上调靶向性表达的超抗原 *TSST-1* 诱导的对 CEA⁺ LoVo 细胞的杀伤作用。

[关键词] 缺氧微环境;中毒性休克综合征毒素-1(*TSST-1*);CEA⁺ 结肠癌细胞;LoVo 细胞;HeLa 细胞;逆转录病毒;外周血淋巴细胞

[中图分类号] R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0597-08

Hypoxia microenvironment regulates immunotherapy effect of *TSST-1* on CEA positive colon cancer LoVo cells

WANG Wei, SUN Xue-jun, WANG Wei, TIAN Yong, ZHENG Jian-bao, CHENG Liang, ZHANG Chao (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the regulation of hypoxia microenvironment on cytotoxicity effect of peripheral blood lymphocyte (PBL) activated by the superantigen of toxic shock syndrome toxin-1 (*TSST-1*) against CEA⁺ human colon cancer cell line LoVo. **Methods:** The recombinant retroviral vector pLEGFP-N1-5HRE-CEAp-*TSST-1*-linker-CD80TM (pLEGFP-N1-5HCTC) containing a CEA promoter and 5 copies of the hypoxia-response elements (HRE) enhancer, which was constructed in our previous study, was packaged and collected. pLEGFP-N1-5HCTC was then transduced into CEA⁺ LoVo cells or CEA⁻ human cervical carcinoma HeLa cells, and LoVo or HeLa cells with stable expression of transmembrane superantigen fusion gene *TSST-1*-linker-CD80TM protein (TC fusion protein) were obtained. Hypoxia microenvironment was simulated by CoCl_2 , and RT-PCR and Western blotting were employed to examine the expression of *TSST-1* regulated by hypoxia. Human PBL was extracted and co-cultured with transgene tumor cells infected with pLEGFP-N1-5HCTC retrovirus; $^3\text{H-TdR}$ assay was employed to detect the proliferation of PBL regulated by hypoxia; and the cytotoxicity effect of PBL regulated by hypoxia against the transgene tumor cells was detected by MTT assay. **Results:** CEA⁺ LoVo cells infected with recombinant retrovirus pLEGFP-N1-5HCTC were obtained (5HCTC/LoVo). The expression of *TSST-1* mRNA and protein in 5HCTC/LoVo cells was further increased with hypoxia, which was confirmed by RT-PCR and Western blotting. There was no *TSST-1* expression in CEA⁻ HeLa cells under either hypoxic condition or normoxic condition. The proliferation of PBL activated by 5HCTC/LoVo cells was increased with hypoxia (7.3×10^3 vs 3.1×10^3 cpm, $P < 0.05$); and the cytotoxicity of PBL on 5HCTC/LoVo cells was more effective in hypoxia condition than in normoxic condition (82.69% vs 53.50% , $P < 0.01$). There was no proliferation of PBL activated by CEA⁻ HeLa cells, and PBL also could not inhibit the proliferation of CEA⁻ HeLa cells. **Conclusion:** Hypoxia microenvironment can increase the cytotoxicity effect of targeting expressed superantigen *TSST-1* on CEA⁺ LoVo cells.

[Key words] hypoxia environment; toxic shock syndrome toxin-1 (*TSST-1*); CEA⁻ positive tumors cells; LoVo cell; HeLa cell; retrovirus; peripheral blood lymphocyte

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(6): 597-604]

肿瘤组织内部的缺氧现象由上世纪 50 年代 Thomlinson 发现,随着研究的深入以及缺氧检测技术的逐步完善,现已认识到组织缺氧(如氧分压 ≤ 2.5 mmHg, 1 mmHg = 0.133 kPa)是进展期肿瘤组织特异性病理生理学特征^[1]。研究^[2-3]发现,正常组织中的氧分压介于 40 ~ 60 mmHg;而将近 50% 的实体瘤中平均氧分压不足 10 mmHg,有些肿瘤甚至 ≤ 5 mmHg。缺氧环境下多种肿瘤相关基因表达被激活,缺氧因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)作为缺氧诱导下最重要的转录

因子,参与调控一系列缺氧诱导的靶基因表达。缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)是位于低氧相关基因 3'或 5'端的一段 DNA 序列^[4],其核心序列可与 *HIF-1* 特异结合,形成转录起始复合物,从而启动靶基因的转录。本课题前期利用 HRE 的增强子特性上调超抗原中毒性休克综合征毒素-1(toxic shock syndrome toxin-1, *TSST-1*)的表达^[5],*TSST-1* 可诱导免疫细胞增殖,激发强烈的抗肿瘤免疫反应^[6];并通过癌胚抗原启动子 CEAp 的特异性限制作用使仅在 CEA⁺ 肿瘤

细胞(如 LoVo 细胞)中表达。5HRE 和 CEAp 联合调控的逆转录病毒载体 pLEGFP-N1-5HRE-CEAp-TSST-1-linker-CD80TM(简称 pLEGFP-N1-5HCTC)已由本课题组在前期研究中构建^[7]。本研究利用 pLEGFP-N1-5HCTC 病毒感染 CEA⁺ 结肠癌 LoVo 细胞和 CEA⁻ 宫颈癌 HeLa 细胞,在缺氧和常氧环境下检验 TSST-1 的表达,研究缺氧环境对 TSST-1 表达以及 TSST-1 激活淋巴细胞抗肿瘤活性的调控作用,为利用缺氧微环境强化肿瘤的基因治疗提供实验依据,同时为 CEA⁺ 肿瘤的免疫基因治疗探索新的途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料

CEA⁺ 的人结肠癌细胞 LoVo 株为实验组细胞,CEA⁻ 的人宫颈癌细胞 HeLa 株为对照组细胞,PT67 细胞及 NIH3T3 细胞为病毒包装及滴度测定细胞,以上细胞均购自中国科学院细胞库。逆转录病毒表达载体 pLEGFP-N1-5HCTC 以及对照载体 pLEGFP-N1 由本课题组前期构建并保存^[7]。去内毒素质粒提取试剂盒购自 Omega 公司,胎牛血清和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司,G418、脂质体 LipofectamineTM2000 及 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,二氯化钴(CoCl₂,相对分子质量为 237 930)、琼脂糖和四唑氮蓝(MTT)购自 Sigma 公司,人淋巴细胞分离液购自上海索莱宝公司,TSST-1 多克隆抗体购自 Abcam 公司。化学发光试剂盒购自 Amresco 公司,RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 MTT 法检测缺氧模拟剂 CoCl₂ 对 CEA⁺ LoVo 和 CEA⁻ HeLa 细胞增殖的影响

将处于对数生长期 CEA⁺ LoVo 和 CEA⁻ HeLa 细胞(5×10^4 /ml)接种于 96 孔板,培养过夜。加入不同浓度的 CoCl₂ 溶液(100、150、200 μ mol/L)分别作用 24、36、48 h。反应终止后每孔加入 20 μ l MTT 溶液(浓度为 5 g/L),继续培养 4 h,250 \times g 离心 10 min,弃上清;加入 150 μ l/孔 二甲基亚砷,室温振荡 30 min 使结晶溶解,用全自动酶标仪检测各孔 D_{490} 值,绘制细胞在不同浓度 CoCl₂ 作用下的生长曲线。不加 CoCl₂ 的肿瘤细胞作为空白对照。

1.3 重组逆转录病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 的包装

按照逆转录病毒包装说明书包装重组逆转录病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 及对照 pLEGFP-N1 病毒。将处于对数生长期的 PT67 细胞(1×10^6 /ml)接种于 100 mm 培养皿,培养至细胞融合度达 50%。去内毒素质粒提取试剂盒提取质粒 pLEGFP-N1-5HCTC

和对照质粒 pLEGFP-N1。将 pLEGFP-N1-5HCTC 或 pLEGFP-N1(24 μ g)通过 LipofectamineTM2000(72 μ l)转染法共转染入 PT67 细胞。转染 6 h 后换含有 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM,24 h 后换用含 G418(600 μ g/ml)的 DMEM 选择性培养液。转染 48 h 后收集含病毒的上清液,乙酸钠纤维素滤膜(0.45 μ m)过滤,-70 $^{\circ}$ C 贮存。

1.4 LaSRT 法测定 pLEGFP-N1-5HCTC 病毒及对照病毒的滴度

将处于对数生长期 NIH3T3 细胞(2×10^4 /ml)接种于 96 孔板,分为 12 组,每组 8 孔。培养 12 h 后更换完全 DMEM(含 8 μ g/ml 聚凝胺),90 μ l/孔,第 1 组每孔加入待测病毒原液 10 μ l 并充分混合,其后每组依次加入前组孔中 10 μ l 液体,第 11 组中弃去 10 μ l,第 12 组为对照组。培养板 32 $^{\circ}$ C、1 000 \times g 离心 60 min。继续培养 48 h 后,按病毒液自高到低浓度顺序确立计量孔,计阳性细胞数。病毒滴度(virus titer, TU/ml) = $m \times 10^{n+1}$ (n 为阳性计量孔数, m 为最后一阳性计量孔阳性细胞数)。

1.5 pLEGFP-N1-5HCTC 病毒感染效率的测定

通过绿色荧光蛋白表达水平评估 pLEGFP-N1-5HCTC 病毒感染效率。将处于对数生长期的 CEA⁺ LoVo 细胞(3×10^5 /ml)接种于 6 孔板中,用之前收获的 pLEGFP-N1-5HCTC 病毒液感染 CEA⁺ LoVo 细胞,含聚凝胺(8 μ g/ml)的完全 DMEM 培养基培养,设 4 个复孔,32 $^{\circ}$ C、1 000 \times g 离心 60 min。继续培养 48 h 后于荧光显微镜下观察,随机选取 20 个视野,分别在荧光和可见光下计数带有绿色荧光的细胞数和总细胞数。感染效率(%) = 绿色荧光细胞数/总细胞数 \times 100%。

1.6 荧光显微镜下观察稳定表达 pLEGFP-N1-5HCTC 的 CEA⁺ LoVo 细胞

将处于对数生长期的 CEA⁺ LoVo 和 CEA⁻ HeLa 细胞(3×10^5 /ml)分别接种于 6 孔板,根据之前计算的感染效率用相应逆转录病毒(pLEGFP-N1-5HCTC、pLEGFP-N1)感染 CEA⁺ LoVo 和 CEA⁻ HeLa 细胞,32 $^{\circ}$ C、1 000 \times g 离心 60 min。继续培养 24 h 后更换为含 G418(600 mg/L)的选择性培养基继续培养 3 周,筛选出稳定表达目的载体的细胞株,荧光显微镜下观察表达绿色荧光蛋白的 CEA⁺ LoVo 细胞比例。

1.7 RT-PCR 检测缺氧环境调控下 CEA⁺ LoVo 细胞内 TSST-1-linker-CD80TM(TC 融合基因)mRNA 的表达

重组逆转录病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 与 pLEGFP-N1 感染的 CEA⁺ LoVo 和 CEA⁻ HeLa 细

胞随机分为缺氧组和常氧组。用 CoCl_2 模拟缺氧环境^[8], 加入之前确定的 CoCl_2 浓度培养 24 h; 常氧组在普通培养基中培养 24 h。各组取等量细胞, TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 以细胞总 RNA 行 RT-PCR。TC 融合基因上游引物为 5'-GCGCTGCAGGCCACCATGAATAAAAAATTACTAATGA-3', 下游引物为 5'-CGCGGGCCCTACAGGGCGTACACTTTCC-3'。25 μl 反应体系, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 通过紫外凝胶扫描仪观察 TC 融合基因 mRNA 的表达。

1.8 Western blotting 检测缺氧环境调控下细胞内 TSST-1 蛋白的表达水平

重组逆转录病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 与 pLEGFP-N1 感染的 CEA^+ LoVo 和 CEA^- HeLa 细胞随机分为缺氧组和常氧组, 缺氧组用 CoCl_2 模拟缺氧环境培养 24 h, 常氧组在普通培养基中培养 24 h。去污剂法提取两组细胞总蛋白, 行 10% SDS-PAGE, 按每孔 100 μg 蛋白上样, 电泳结束后用含 5% 脱脂奶粉的 $1 \times \text{TBST}$ 溶液室温封闭 2 h。加入兔抗人的 TSST-1 多克隆抗体 (1:1 000), 室温孵育 2 h, 用 TBST 洗 2 次, 每次 10 min; 再用 TBS 洗 1 次, 10 min。加入羊抗兔多克隆二抗 (1:2 500) 室温孵育 2 h 后, 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 2 次, 每次 10 min; 再用 TBS 洗 1 次, 10 min。使用 Western blotting 化学发光试剂盒, 于暗室内在 X 线胶片上显影, 观察 TSST-1 蛋白及内参 β -actin 的条带。

1.9 人外周血淋巴细胞 (peripheral blood lymphocytes, PBL) 的分离培养

采集健康人外周静脉血 5 ml, 加入 5 ml Hanks 液稀释于肝素抗凝管中。在另一支离心管中加入 5 ml 人淋巴细胞分离液, 2 000 $\times g$ 离心 10 min, 吸取白膜层细胞入新离心管, Hanks 液洗 3 次, 每次洗涤后 1 500 $\times g$ 离心 10 min 并弃去上清。按 $2.0 \times 10^9/\text{L}$ 细胞密度于含 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱培养 24 h, 弃去贴壁的巨噬细胞和 B 细胞, 收集悬浮细胞, 即为人 PBL。

1.10 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法测定缺氧调节下 TSST-1 刺激 PBL 增殖的能力

重组逆转录病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 与 pLEGFP-N1 感染的 CEA^+ LoVo 和 CEA^- HeLa 细胞随机分为缺氧组和常氧组。缺氧组用 CoCl_2 模拟缺氧环境培养 24 h; 常氧组在普通培养基中培养 24 h。将 PBL 细胞 ($2.0 \times 10^9/\text{L}$) 接种于 96 孔板, 每孔 100

μl , 转基因肿瘤细胞按 1:1 比例与 PBL 细胞混合培养; 植物血凝素 (PHA) 作为阳性对照; 空白对照孔不加诱导物; 每组 6 个复孔。培养 24 h 后, 每孔加入 20 μl $^3\text{H-TdR}$ (比活性为 0.37 kBq/L), 继续培养 48 h。用细胞收集仪收集细胞于玻璃纤维滤纸上, 干燥后加入闪烁液, 于 Hidex triathler LSC 微量液体闪烁计数仪上测定 cpm 值, 结果以每样本各孔平均值表示。

1.11 MTT 法检测 PBL 对 pLEGFP-N1-5HCTC 感染的 CEA^+ LoVo 细胞的杀伤

重组逆转录病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 与 pLEGFP-N1 感染的 CEA^+ LoVo 和 CEA^- HeLa 细胞随机分为缺氧组和常氧组, 缺氧组用 CoCl_2 模拟缺氧环境培养 24 h, 常氧组在普通培养基中培养 24 h。消化并重悬细胞, 以 $5 \times 10^7/\text{L}$ 密度接种于 96 孔板, 培养过夜。每孔按细胞密度梯度加入 PBL 悬液 [$(0.25, 0.5, 1.0$ 和 $2.0) \times 10^9/\text{L}$] 各 0.1 ml, 各密度设 6 个复孔, 培养 48 h 后弃培养上清, PBS 液洗涤后更换培养基, 每孔加入 20 μl MTT 溶液 (质量浓度为 5 g/L), 继续培养 4 h 后弃去上清, 每孔加入二甲基亚砜 200 μl , 室温震荡 30 min 使结晶溶解。用全自动酶标仪检测各孔 D_{490} 值, 绘制细胞在 PBL 作用下的生长曲线。以野生型 CEA 阳性和阴性肿瘤细胞作为阴性对照, 以不加 PBL 的肿瘤细胞作为空白对照。

1.12 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS17.0 统计软件, 两样本均数间比较采用 t 检验, 多个样本均数间的比较采用方差分析, 多个样本均数间的两两比较采用 Dunnett- t 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CoCl_2 剂量依赖性抑制 CEA^+ LoVo 和 CEA^- HeLa 细胞的增殖

MTT 法检测不同浓度 CoCl_2 对 CEA^+ LoVo 和 CEA^- HeLa 细胞的增殖能力的影响, 实验结果 (图 1) 显示, CoCl_2 浓度在 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, CEA^+ LoVo 和 CEA^- HeLa 细胞增殖无明显抑制; 当 CoCl_2 浓度在 150 ~ 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 范围内时, CEA^+ LoVo 和 CEA^- HeLa 细胞的增殖均受到明显抑制, 并且随着时间的延长细胞存活率降低 ($P < 0.05$)。根据此结果, 后续实验选择 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CoCl_2 用于模拟肿瘤细胞缺氧微环境。

2.2 重组逆转录病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 滴度及其感染效率

通过 PT67 细胞包装获得重组逆转录病毒,将 pLEGFP-N1-5HCTC 和 pLEGFP-N1 病毒液倍比稀释后感染 LoVo 细胞。LaSRT 法检测结果显示,pLEGFP-N1-5HCTC 病毒滴度为 2×10^6 CFU/ml,pLEGFP-N1 病毒滴度为 4×10^6 CFU/ml。荧光观察计算病毒感染效率,pLEGFP-N1-5HCTC 病毒为 82%,pLEGFP-N1 对照病毒为 86%。

2.3 重组逆转录病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 感染 CEA⁺ LoVo 和 CEA⁻ HeLa 细胞

pLEGFP-N1-5HCTC 和 pLEGFP-N1 病毒感染 CEA⁺ LoVo 和 CEA⁻ HeLa 细胞 48 h 后,分别于光镜和荧光显微镜下观察,可见感染 pLEGFP-N1-5HCTC 和 pLEGFP-N1 病毒的 CEA⁺ LoVo 细胞内绿色荧光蛋白表达率均较高,肉眼观测两组表达差异不大;pLEGFP-N1-5HCTC 和 pLEGFP-N1 病毒感染 CEA⁻ HeLa 细胞内无绿色荧光蛋白表达(图 2)。由此说明,pLEGFP-N1-5HCTC 和 pLEGFP-N1 感染效率能够满足后续实验要求,CEAp 启动子能调控 TSST-1 基因在 CEA⁺ LoVo 细胞中表达。

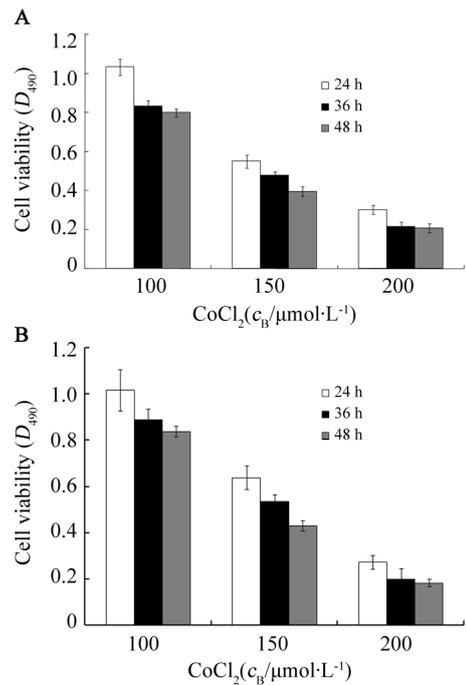


图 1 MTT 法检测 CoCl₂ 抑制 CEA⁺ LoVo (A) 和 CEA⁻ HeLa 细胞(B)的增殖

Fig. 1 CoCl₂ inhibited proliferation of CEA⁺ LoVo (A) and CEA⁻ HeLa cells (B) as detected by MTT assay

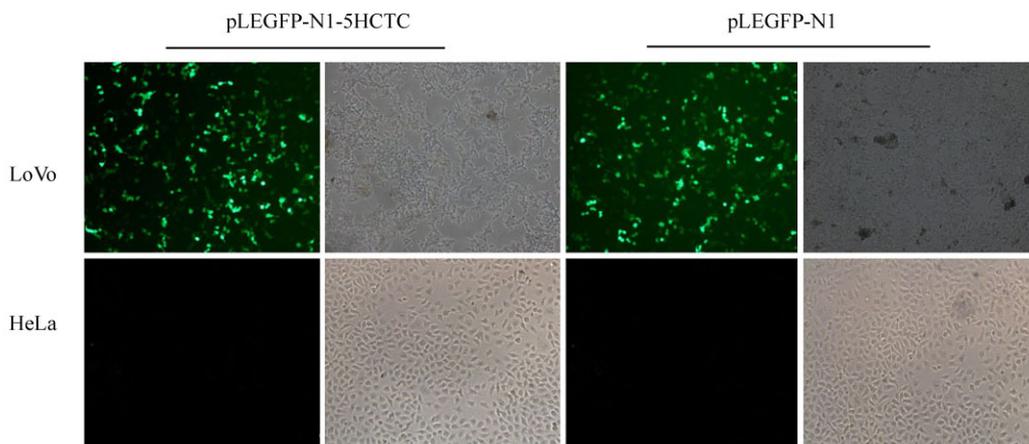


图 2 pLEGFP-N1-5HCTC 和 pLEGFP-N1 病毒感染后 CEA⁺ LoVo 和 CEA⁻ HeLa 细胞中 GFP 的表达(×100)

Fig. 2 Expression of GFP in CEA⁺ LoVo and CEA⁻ HeLa cells infected with pLEGFP-N1-5HCTC and pLEGFP-N1 virus (×100)

2.4 缺氧上调 TC 融合基因 mRNA 的表达

RT-PCR 结果(图 3)显示,感染重组病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 的 CEA⁺ LoVo 细胞可以稳定表达 TC 融合基因,琼脂糖电泳显示为大约 920 bp 大小特异性条带,其在缺氧环境中的表达水平高于常氧环境;而感染病毒 pLEGFP-N1 的 CEA⁺ LoVo 细胞以及感染两种病毒的 CEA⁻ HeLa 细胞均未检测到 TC 融合基因的表达。以上提示,在 CEA 启动子的调控下

TSST-1 基因可以特异性在 CEA⁺ LoVo 细胞内表达,而缺氧微环境通过对 5HRE 增强子的作用可以明显上调 TSST-1 基因的表达水平。

2.5 缺氧上调 pLEGFP-N1-5HCTC 感染后 CEA⁺ LoVo 细胞内 TSST-1 蛋白的表达

Western blotting 结果(图 4)显示,感染重组病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 的 CEA⁺ LoVo 细胞可以稳定表达 TSST-1,显示为大约 22 000 大小特异性条带,

其在缺氧环境中的表达水平高于常氧环境;而感染病毒 pLEGFP-N1 的 LoVo 细胞未检测到 TSST-1 的表达。因此,缺氧微环境可以明显上调 pLEGFP-N1-5HCTC 感染后 LoVo 细胞内 TSST-1 的表达。

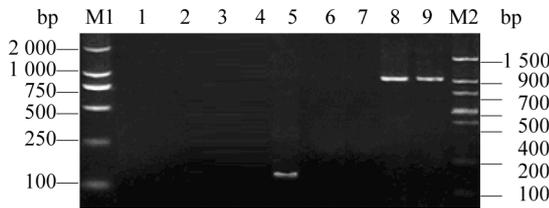


图3 RT-PCR 检测缺氧调控下 CEA⁺ LoVo 细胞内 TC mRNA 的表达

Fig. 3 Expression of TC mRNA in CEA⁺ LoVo cells regulated by hypoxia as detected by RT-PCR

M1: DL2000 marker; M2: DNA marker II; 1: pLEGFP-N1/HeLa cells (hypoxia); 2: pLEGFP-N1/HeLa cells (normoxia); 3: pLEGFP-N1-5HCTC/HeLa cells (hypoxia); 4:β-actin; 5: pLEGFP-N1-5HCTC/HeLa cells (normoxia); 6: pLEGFP-N1/LoVo cells (hypoxia); 7: pLEGFP-N1/LoVo cells (normoxia); 8: pLEGFP-N1-5HCTC/LoVo cells (hypoxia); 9: pLEGFP-N1-5HCTC/LoVo cells (normoxia)

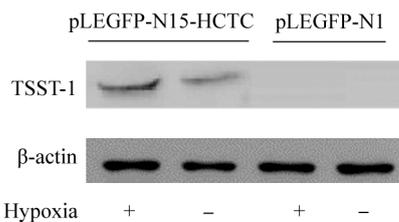


图4 Western blotting 检测缺氧调控下 TSST-1 蛋白在 CEA⁺ LoVo 细胞中的表达

Fig. 4 Expression of TSST-1 protein in CEA⁺ LoVo cells regulated by hypoxia as detected by Western blotting

2.6 缺氧增强 pLEGFP-N1-5HCTC 感染 CEA⁺ LoVo 细胞后诱导 PBL 的增殖

³H-TdR 掺入实验测定结果(图 5)显示,感染重组病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 的 CEA⁺ LoVo 细胞可以显著激活 PBL 细胞的增殖。缺氧环境下测定值约为 7.3 × 10³ cpm,常氧环境下的测定值为 3.1 × 10³ cpm,缺氧环境下 PBL 的增殖能力明显增强(P < 0.01),缺氧环境下此激活能力与作为阳性对照的 PHA 相比无明显差异;而 pLEGFP-N1 病毒感染的 CEA⁺ LoVo 细胞以及两种病毒感染的 CEA 阴性 HeLa 细胞均无明显的 PBL 细胞激活效应,测定值均小

于 1 × 10³ cpm(P > 0.05)。提示重组病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 感染的 CEA⁺ LoVo 细胞所表达的 TSST-1 基因可有效激活 PBL 的增殖。

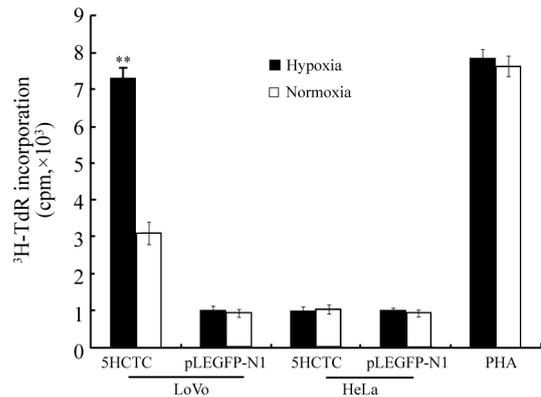


图5 缺氧促进 pLEGFP-N1-5HCTC 感染后 CEA⁺ LoVo 细胞诱导的 PBL 增殖

Fig. 5 Hypoxia prompted the proliferation of PBL induced by CEA⁺ LoVo cells infected with pLEGFP-N1-5HCTC

** P < 0.01 vs 5HCTC/LoVo cells in normoxia or pLEGFP-N1/LoVo cells or HeLa cells

2.7 缺氧环境增强 PBL 对 pLEGFP-N1-5HCTC 感染后 CEA⁺ LoVo 细胞的杀伤作用

PBL 细胞与 pLEGFP-N1-5HCTC 感染后 LoVo 或 HeLa 细胞混合培养,通过 MTT 法测定各组 D₄₉₀ 值,并计算细胞增殖抑制率。结果(图 6)显示, pLEGFP-N1-5HCTC 感染的 CEA⁺ LoVo 细胞可以被激活的 PBL 细胞有效杀伤,细胞随效靶比的升高而逐渐减少,缺氧环境可以明显强化 PBL 的杀伤作用。当 PBL 与 LoVo 细胞效靶比为 5:1 时,PBL 对缺氧诱导和常氧诱导的 LoVo 细胞的增殖抑制率分别为 17.91% 和 17.37%,两者无明显差别。当 PBL 与 LoVo 细胞效靶比逐步提高至 40:1 时,PBL 对缺氧诱导的 LoVo 细胞的增殖抑制率达到 82.69%,而对常氧诱导的 LoVo 细胞的增殖抑制率为 53.50%(P < 0.01)。PBL 对 pLEGFP-N1 感染的 CEA⁺ LoVo 细胞以及两种病毒感染的 CEA⁻ HeLa 细胞均未见明显杀伤作用,对肿瘤细胞的增殖抑制率保持在 5% ~ 10%。结果提示,缺氧环境激活的 PBL 可有效杀伤 pLEGFP-N1-5HCTC 感染后的 CEA⁺ LoVo 细胞。

3 讨论

近年来研究^[9-11]证明,缺氧是大部分实体瘤的特异性微环境。缺氧对肿瘤细胞具有两面性,一方面,肿瘤细胞暴露于缺氧微环境下,使蛋白质合成减

少,导致细胞增殖受限甚至死亡,从而客观上抑制肿瘤增殖;另一方面,缺氧诱导肿瘤蛋白质组或者基因组突变,以加速肿瘤细胞浸润及转移,克服营养匮乏环境,逃离有害环境,最终获得加速增殖的能力。持续性缺氧导致肿瘤细胞改变,出现临床上恶性表征,缺氧时多种基因被诱导表达以维持肿瘤细胞的存活,对抗缺氧引发的凋亡;更为重要的是,缺氧能导致肿瘤细胞的遗传不稳定性和恶性选择。有学者^[12]认为,表达 DNA 错配修复(mismatch repair, MMR)和同源重组(homologous recombination, HR)途径的关键基因被抑制,降低了缺氧状态下 MMR 和 HR 的相应功能;有些 DNA 损伤因子被激活,包括 *ATM/ATR*、*CHK1/CHK2* 与 *BRCA1* 基因,造成对肿瘤 DNA 损伤和修复的障碍。

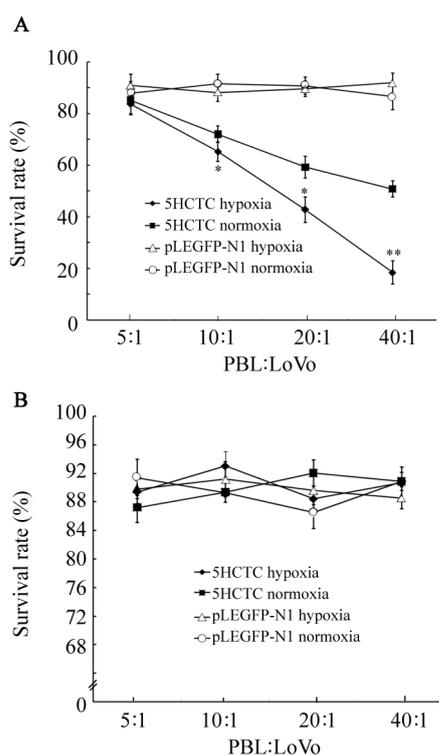


图6 缺氧增强 PBL 对 pLEGFP-N1-5HCTC 感染后 CEA⁺ LoVo 细胞的杀伤

Fig.6 Hypoxia enhanced cytotoxicity of PBL on CEA⁺ LoVo cells infected with pLEGFP-N1-5HCTC

A:CEA⁺ LoVo cells; B:CEA⁻ HeLa cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 5HCTC normoxia;

5HCTC: pLEGFP-N1-5HCTC

缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor, HIF-1)作为缺氧诱导下最重要的转录因子,参与调控一系列缺氧诱导的靶基因表达。它过度表达于肿瘤组织,并参与肿瘤的发生、发展及恶性演进,是一个新

的抗肿瘤靶点。人类 *VEGF* 基因 5'-端的 *HRE* 是对缺氧敏感的增强子序列,与 *HIF-1* 结合后可上调 *VEGF* 等基因的表达^[13-14]。本课题组在之前研究中曾将 *HRE* 与甲胎蛋白启动子 *AFPp* 通过基因重组构建成缺氧可诱导的调控元件,调控自杀基因 *NTR* 在肝癌 HepG2 细胞中表达,证实了其可靠的增强子活性^[15]。利用 *HRE* 的增强子作用,与癌胚抗原启动子 *CEAp* 相结合,可以特异性地调控目的基因在 CEA⁺ 肿瘤细胞中的表达,可以作为 CEA⁺ 肿瘤基因治疗的一个新途径。本研究使用 $CoCl_2$ 作为化学缺氧诱导剂,在体外模拟缺氧微环境。超抗原无需 APC 的加工就可以使带有 TCR $\nu\beta$ 特异性的 T 细胞大量活化增殖,其活化 T 细胞数目是普通抗原激活的数千倍乃至数万倍^[16-17]。*TSST-1* 作为一种超抗原能直接强力激活免疫反应,并大量激活对肿瘤具有杀伤作用的淋巴细胞,可诱发强烈的抗肿瘤免疫,但直接应用 *TSST-1* 有严重的不良反应,所以限制其在肿瘤局部发挥作用非常重要^[18]。为使 *TSST-1* 在真核细胞中正常表达,并保持其空间构象和功能活性,本课题组将 *TSST-1* 基因与 *CD80TM* 相连成 *TC* 融合基因,该基因表达后,TSST-1 在信号肽引导下由细胞内转移到细胞膜表面^[19-20],并被 *CD80TM* 的疏水性跨膜区锚定于细胞膜,使 TSST-1 仅在肿瘤局部发挥作用,避免了全身毒性反应。

为了使 *TC* 融合基因高效稳定地在细胞内表达,本实验选用了逆转录病毒载体间接提高靶向性。逆转录病毒表达载体具有很高的导入效率,且无靶细胞毒性,通过将病毒基因整合入宿主基因组,以实现病毒载体携带的目的基因在靶细胞内长期稳定地表达。经过研究者的长期改造,目前逆转录病毒载体在安全性方面达到了较高标准。据统计,已注册的相关临床试验中有 80% 应用其作为治疗载体,并鲜有短期或长期毒性的相关报告,近年来随着研究的深入以及技术的进步,逆转录病毒载体经过大量改造已能达到严格的安全标准^[21]。

本研究使用 PT67 细胞作为包装细胞,成功包装出了较高滴度的重组逆转录病毒 pLEGFP-N1-5HCTC,通过感染 CEA⁺ LoVo 细胞,证实了其高效的感染能力。RT-PCR 技术证实了重组病毒 pLEGFP-N1-5HCTC 感染的 CEA⁺ LoVo 细胞中 *TC* 融合基因 mRNA 的表达。结果显示,感染 pLEGFP-N1-5HCTC 的 CEA⁺ LoVo 细胞中 *TC* 融合基因明显表达,且通过 $CoCl_2$ 诱导的缺氧环境可更明显上调其表达水平,而 CEA⁻ HeLa 细胞中没有 *TC* 融合基因的表达。Western blotting 技术证明了蛋白水平上

TSST-1 在转基因细胞中的表达, 结果显示, 感染 pLEGFP-N1-5HCTC 病毒的 CEA⁺ LoVo 细胞中有 *TSST-1* 表达, 缺氧可进一步上调其表达水平, 而 CEA⁻ HeLa 细胞中没有 *TSST-1* 的表达。由此可证明, 5HRE 作为增强子与 CEA_p 联合调控可显著上调 *TSST-1* 基因在 CEA⁺ 细胞中的表达。

³H-TdR 掺入法验证了缺氧调节下 pLEGFP-N1-5HCTC 感染后 CEA⁺ LoVo 细胞诱导 PBL 增殖的能力, 结果显示, 感染 pLEGFP-N1-5HCTC 病毒的 CEA⁺ LoVo 细胞能有效激活 PBL 的增殖, 而缺氧环境能明显强化这种激活效应, 其水平与植物血凝素类似; 感染 pLEGFP-N1 的 CEA⁺ LoVo 细胞以及 CEA⁻ HeLa 细胞均无此能力。MTT 检测结果证明, *TSST-1* 激活的 PBL 对感染 pLEGFP-N1-5HCTC 病毒的 CEA⁺ LoVo 细胞有明显杀伤作用, 随效应细胞与靶细胞比值的增高, 杀伤作用逐渐增强, 缺氧环境可显著增强此效应; 其他细胞未见这种情况。结果证明 5HRE-CEA_p 调控的 *TSST-1* 可激活 PBL, 激活的 PBL 进而对 LoVo 细胞产生较强的杀伤效应, 缺氧环境可进一步增强这种效应。

本课题利用 5HRE 与 CEA_p 联合调控元件在转录水平调控免疫激活剂 *TSST-1* 的表达, 证实了缺氧环境可在体外显著上调靶基因 *TSST-1* 的表达水平, 并增强其激活的 PBL 对 CEA⁺ LoVo 细胞的杀伤能力, 为利用缺氧微环境设计和应用肿瘤的基因与免疫治疗探索了新思路, 也为进一步的动物体内实验奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: Significance and impact on clinical outcome [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(2): 225-239.
- [2] Dang DT, Chen F, Gardner LB, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha promotes nonhypoxia-mediated proliferation in colon cancer cells and xenografts [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3): 1684-1693.
- [3] Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(6): 437-447.
- [4] Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ. Tumor hypoxia at the micro-regional level: Clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers [J]. *Radiother Oncol*, 2003, 67(1): 3-15.
- [5] McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: An update [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 77-104.
- [6] Hao HJ, Jiang YQ, Zheng YL, et al. Improved stability and yield of Fv targeted superantigen by introducing both linker and disulfide bond into the targeting moiety [J]. *Biochimie*, 2005, 87(8): 661-667.
- [7] 孙学军, 卢乐, 禄韶英, 等. 5HRE 联合 PCEA 调节 *TSST-1*/*CD80TM* 重组基因表达的逆转录病毒载体的构建 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(10): 863-865.
- [8] Ciafre SA, Niola F, Giorda E, et al. CoCl₂-simulated hypoxia in skeletal muscle cell lines: Role of free radicals in gene up-regulation and induction of apoptosis [J]. *Free Radical Res*, 2007, 41(4): 391-401.
- [9] Askoxylakis V, Millonig G, Wirkner U, et al. Investigation of tumor hypoxia using a two-enzyme system for *in vitro* generation of oxygen deficiency [J]. *Radiat Oncol*, 2011, 10(6): 35-46.
- [10] Welford SM, Giaccia AJ. Hypoxia and senescence: The impact of oxygenation on tumor suppression [J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(5): 538-544.
- [11] Koi M, Boland CR. Tumor hypoxia and genetic alterations in sporadic cancers [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2011, 37(2): 85-98.
- [12] Bindra RS, Crosby ME, Glazer PM. Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(2): 249-260.
- [13] Law AYS, Ching LY, Lai KP, et al. Identification and characterization of the hypoxia-responsive element in human stanniocalcin-1 gene [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 314(1): 118-127.
- [14] 吴元明, 张晓楠, 韩者艺, 等. shRNA 表达载体 pWH1 的构建及用于 *HIF1* 基因的沉默 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(2): 115-118.
- [15] 王伟, 孙学军, 郑见宝, 等. 缺氧促进 5HRE 和 AFP_p 调控的 NTR/CB1954 自杀基因系统特异杀伤 HepG2 细胞 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(2): 125-129.
- [16] Maynard J, Petersson K, Wilson DH, et al. Structure of an auto-immune T cell receptor complexed with class II peptide-MHC: Insights into MHC bias and antigen specificity [J]. *Immunity*, 2005, 22(1): 81-92.
- [17] Dohlsten M, Sundstedt A, Bjorklund M, et al. Superantigen-induced cytokines suppress growth of human colon-carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 1993, 54(3): 482-488.
- [18] Si SY, Hu PZ, Huang YY, et al. Tumor cells with B7. 1 and transmembrane anchored staphylococcal enterotoxin A generate effective antitumor immunity [J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2006, 347(1): 208-214.
- [19] Hao HJ, Jiang YQ, Zheng YL, et al. Improved stability and yield of Fv targeted superantigen by introducing both linker and disulfide bond into the targeting moiety [J]. *Biochimie*, 2005, 87(8): 661-667.
- [20] Futatsumori-Sugai M, Tsumoto K. Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system [J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2010, 391(1): 931-935.
- [21] Cao S, Cripps A, Wei MQ. New strategies for cancer gene therapy: Progress and opportunities [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(1): 108-114.

[收稿日期] 2011 - 09 - 15

[修回日期] 2011 - 10 - 10

[本文编辑] 王莹