

微波制备 γ -干扰素处理的小鼠 H22 肝癌细胞瘤苗的抗瘤作用

杨晓峰, 杨新宏[△], 朱艳菊, 丁晓旭, 杨 宁, 连相尧(承德医学院附属医院, 河北承德 067000)

【摘要】 目的 探讨用微波方法制备 γ -干扰素(IFN- γ)处理的小鼠 H22 肝癌细胞瘤苗(MITTV-H22)的抗肿瘤效应。方法 利用 MITTV-H22 免疫小鼠 3 次, 末次免疫后第 7 天接种 H22 肿瘤细胞, 观察肿瘤生长情况及检测小鼠淋巴细胞刺激指数。结果 实验组小鼠于 H22 肿瘤细胞攻击后的 7 d 接种部位没有发现肉眼可见的包块, 经解剖肿瘤接种部位未发现肿瘤组织, 120 d 后也未发现肿瘤组织。对照组于 H22 肿瘤细胞接种后第 5 或第 6 天接种部位出现直径小于 0.5 cm 的包块, 成瘤率为 100%。观察 120 d, 实验组小鼠平均生存期高于对照组($t=25.55, P<0.01$)。脾淋巴细胞增殖实验检测结果显示, 实验组淋巴细胞刺激指数高于对照组($t=3.526, P=0.01$)。结论 MITTV-H22 可以有效抑制肿瘤生长, 具有明显的抗肿瘤效应。

【关键词】 癌症疫苗; 肝肿瘤/免疫学; 微波; γ -干扰素

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.01.025 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)01-0054-02

Antitumor Effects of Microwave Prepared Vaccine of Mice H22 Hepatoma Cells Treated with IFN- γ YANG Xiaofeng, YANG Xin-hong, ZHU Yan-ju, DING Xiao-xu, YANG-ning, LIAN Xiang-yao (Department of Pediatric Surgery, Chengde Medical College Affiliated Hospital, Chengde 067000)

【Abstract】 **Objective** we made H22 tumor vaccine using IFN- γ and microwave treated H22 tumor cells (MITTV-H22) and explored the antitumor effects in the bodies immunized by tumor vaccine. **Methods** Mice were immunized with MITTV-H22 3 times and inoculated with H22 tumor cells at day 7 after last immunization. Tumor growth was observed and spleen cell proliferation was determined by MTT assay. **Results** In the experiment group, 7 days after H22 tumor cells challenger, no visible tumors were found around the injection site, even if examined with anatomy. After 120 days, no tumors were found. In the control group, at day 5 or 6 after H22 tumor cells challenger, visible tumor (less than 0.5 cm in diameter) at the inoculation site was found with the tumor incidence of 100%. Observed 120 days, the average life span of experiment group was higher than that of control group ($t=25.55, P<0.01$). MTT assay showed that the stimulation index in experiment group was higher than that of control group ($t=3.526, P=0.01$). **Conclusion** MITTV-H22 could effectively inhibit tumor growth and has antitumor immune response significantly.

【Key words】 cancer vaccines; liver neoplasms/immunology; microwave; IFN- γ

由于肿瘤的抗原性较弱, 表达的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex class I, MHC-I)较少或缺失, 因此肿瘤细胞可以逃避机体的免疫攻击。 γ -干扰素(IFN- γ)是由 T 细胞分泌的一种多功能调节因子, 可通过诱导 MHC-I 类抗原的表达, 增加肽转运相关蛋白的稳定性、诱导某些细胞表面黏附分子的表达(如 ICAM-1、LFA-1)增强肿瘤细胞的抗原递呈能力^[1-2]。微波作为抗原修复的方法已广泛应用于免疫组织化学染色的抗原暴露, 是最敏感的抗原修复方法, 它可使病理切片的抗原充分暴露, 提高免疫组化染色的敏感性^[3]。全细胞瘤苗可表达多种肿瘤抗原^[4], 因此用 IFN- γ 处理 H22 肿瘤细胞, 再用微波制备全细胞瘤苗, 既消除了它的致病性, 又增强了其抗原性, 且操作简单。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 8 周龄健康 BALB/C 小鼠, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 小鼠体重 14~16 g, 常规饲养。
1.1.2 肿瘤细胞 H22 瘤株由白求恩医科大学提供, 液氮冻存。使用时 37℃ 水浴融解后, RPMI-1640 培养液洗 3 遍, 接种于含 10% 胎牛血清(FBS)的 1640 培养基, 培养至对数生长期, 收集细胞接种于 BALB/C 小鼠腹腔传代。

1.2 微波制备 IFN- γ 处理的 H22 肝癌细胞瘤苗(MITTV-H22)的制备 收集 BALB/C 小鼠腹腔积液 H22 肿瘤细胞, 1640 培养液洗 2 遍, 用 H22 肿瘤细胞培养液培养, 加入 IFN- γ (200 U/mL) 37℃ 5% CO₂ 培养 48 h。收集 H22 肿瘤细胞, 用生理盐水洗 2 遍, 制成 2.5×10^6 /mL 的 H22 细胞悬液, 微波照射 20 s (750 w, 2 450 MHz), 台盼蓝染色后光镜下观察证实 H22 肿瘤细胞被全部灭活, 制成 MITTV-H22, 4℃ 储存备用。

1.3 实验分组与动物模型的制备 60 只小鼠检疫 10 d 后随机分成 A、B、C、D、E、F 6 组, 每组各 10 只。实验组(A、C、E)小鼠右后肢外侧皮下接种 MITTV-H22 (2.5×10^6 /mL) 0.2 mL 进行免疫, 每周免疫 1 次, 共 3 次。对照组(B、D、F)小鼠用生理盐水代替 MITTV-H22 进行免疫。实验组(A、C)与对照组(B、D)均于末次免疫后第 7 天, 接种 H22 肿瘤细胞 (1×10^6 个)于右腋皮下。A、B 两组用于观察小鼠生存情况, 观察 120 d。C、D 两组于 H22 肿瘤细胞接种后的第 7 天取瘤块测量体积。瘤块体积的计算公式为: $V=0.4 \times a \times b^2$ (a 为长轴, b 为短轴)^[5]。E、F 两组于末次免疫后第 10 天, 做脾淋巴细胞增殖实验(MTT)。无菌取小鼠脾脏, 用淋巴细胞分离液按常规分离脾淋巴细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液调成浓度为 1×10^7 /mL 的脾细胞悬液, 加入 96 孔细胞培养

[△] 通讯作者, E-mail: caccine.tumor@yahoo.com.cn.

板,每孔 1×10^5 个淋巴细胞,于刺激细胞 H22 孔加入多聚甲醛处理的 H22 肿瘤细胞 1×10^4 个, 37°C $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中共培养 8 h。8 h 后每孔加入 $20 \mu\text{L}$ (5 mg/mL) MTT 溶液再孵育 4 h。2 000 r/min 室温离心 10 min,弃上清液,加入二甲基亚砷(DMSO) $150 \mu\text{L}$,震荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶标仪上测 OD 值(测定波长 570 nm)。

刺激指数(SI) = (自发转化孔 OD 值 - 刺激细胞 H22 孔 OD 值) / 自发转化孔 OD 值。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 15.0 软件对肿瘤体积进行重复测量设计的方差分析,其他资料均用 2 个独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠生存期 对照组小鼠平均生存期为 (31.87 ± 5.87) d,实验组小鼠 120 d 时的生存率为 80%,生存期明显延长,明显长于对照组 ($t = 25.55, P < 0.01$)。见表 1。

2.2 肿瘤生长情况 实验组小鼠于接种 H22 肿瘤细胞的第 7 天接种部位没有发现肉眼可见的包块,解剖观察肿瘤接种部位亦未发现瘤块;120 d 后经解剖也没有发现肿瘤组织。对照组于接种 H22 肿瘤细胞后的 5~6 d 接种部位出现直径小于 0.5 cm 的包块,成瘤率为 100%;接种后 7 d,肿瘤的平均体积为 $(4.8 \pm 1.0) \text{ mm}^3$ 。

2.3 脾淋巴细胞 SI MTT 法检测结果显示,实验组小鼠的 SI 显著高于对照组,差异具有统计学意义 ($t = 3.526, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 小鼠生存期、肿瘤体积和淋巴细胞刺激指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	生存期(d)	肿瘤体积(mm^3)	淋巴细胞刺激指数(SI)
实验组	30	115.40 ± 11.22	0.0	1.51 ± 0.23
对照组	30	31.87 ± 5.87	4.8 ± 1.0	1.26 ± 0.18
P		<0.01	—	<0.01

注:—表示无数据。

3 讨 论

多数肿瘤主要组织相容性复合体 I(MHC-I)类分子表达明显减少或缺失,使 CTL 不能识别肿瘤细胞的抗原,肿瘤细胞从而得以逃避宿主的免疫攻击。MHC-I 类抗原表达减少或消失与肿瘤细胞去分化有关,使 T 细胞识别肿瘤抗原受阻,不能起到有效的杀肿瘤效应^[6]。IFN 是调节 MHC-I 类分子高表达的重要生物因子^[7-9]。I 型和 II 型 IFN 均可引起 MHC-I 类抗原表达增高,而 IFN- γ 的作用更强,IFN- γ 由 T 细胞产生,能直接抑制肿瘤细胞增殖、增加表面 MHC 抗原和肿瘤坏死因子的表达、抗肿瘤血管生成等^[10]。

肿瘤细胞逃避机体免疫攻击的另一原因是肿瘤细胞表面“抗原覆盖”或被封闭。“抗原覆盖”是指肿瘤细胞表面抗原可能被某些物质所覆盖,如肿瘤细胞可表达高水平的唾液黏多糖或表达肿瘤激活的凝聚系统,这两种成分均可覆盖肿瘤抗原。肿瘤抗原可经糖基化等方式隐藏,这一过程称为抗原遮蔽。微波作为抗原修复的方法已广泛应用于免疫组织化学染色的抗原暴露,是最敏感的抗原修复方法^[11-13]。微波可使病理切片的抗原更充分地暴露,提高免疫组化染色的敏感性。

本研究使用的小鼠肝癌细胞株 H22 的 MHC-I 表达缺失,且肿瘤抗原性弱。IFN- γ 和微波共同处理 H22 肿瘤细胞

制备瘤苗 MITTV-H22,既消灭了致癌性又增加了表面 MHC-I 类抗原的表达,提高其抗原递呈能力和抗原性。初步研究发现:(1)实验组小鼠的 SI 明显高于对照组;(2)实验组小鼠于 H22 肿瘤细胞攻击 7 d 时没有发现肉眼可见的肿瘤组织,120 d 后经解剖也没有发现肿瘤组织,对照组于 H22 肿瘤细胞攻击后第 5 天即发现肉眼可见的瘤块。说明 MITTV-H22 的抗原性有了很大的提高,能有效地激活机体的免疫系统,对 H22 细胞型肿瘤具有很强的预防作用。

参考文献

- [1] Robertson M. Antigen processing: proteasomes in the pathway[J]. Nature (Lond), 1991, 353(6342): 300-311.
- [2] Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, et al. Induction by IL-1 and Interferon- γ : tissue distribution, biochemistry and function of a natural Adherence molecule (ICAM-1) [J]. J Immunol, 1986, 137(1): 245-254.
- [3] Jiao Y, Sun Z, Lee T. A simple and sensitive antigen retrieval method for free-floating and slide-mounted tissue sections [J]. J Neurosci Methods, 1999, 93(2): 149-162.
- [4] Greten TF, Jaffee EM. Biology in neoplasia: Cancer vaccine [J]. J Clin Oncol, 1999, 17(3): 1047-1060.
- [5] 李煜, 钱书兵, 陈诗书, 等. MHC II 类基因修饰小鼠肝癌细胞的抗肿瘤作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(1): 59-60.
- [6] 杨镇. 肿瘤免疫学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 39-42.
- [7] DUrso CM, Wang ZG, Cao Y, et al. Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression [J]. J Clin Invest, 1991, 87(1): 284-292.
- [8] 范义湘, 罗荣成, 方永鑫, 等. 干扰素- γ 对乳腺癌细胞 Her2/neu 表达及 131I-Herceptin 抑制肿瘤细胞增殖的影响[J]. 癌症, 2006, 25(4): 443-446.
- [9] 孙黎飞, 张明徽, 曹雪涛. 细胞因子对小鼠肺癌细胞 MHC I 类分子和共刺激分子的调节作用[J]. 实用医药杂志, 2006, 23(7): 834-835.
- [10] 卢琳, 王占聚, 崔为发. IFN- γ 与肿瘤免疫逃避的研究进展[J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2004, 24(5): 419-422.
- [11] Frost AR, Sparks D, Grizzle WE. Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008, 8(3): 236-243.
- [12] 阚奇伟, 刘伦旭. 干扰素抗肿瘤作用研究[J]. 海南医学院学报, 2010, 16(9): 1241-1244.
- [13] 沈历宗, 王建华, 王海权, 等. 人 γ -干扰素基因修饰的结肠癌细胞瘤菌的抗肿瘤作用[J]. 中华普通外科杂志, 2006, 21(11): 819-821.

(收稿日期: 2012-06-19 修回日期: 2012-11-16)