

# SEA 基因修饰抑制小鼠恶性黑素瘤 B16 细胞肺转移

## Suppressive effects of SEA gene transduction on lung metastasis of murine melanoma B16 cells

田 蓉<sup>1,2</sup>, 于继云<sup>3\*</sup>, 刘玉峰<sup>1</sup>

(1. 第四军医大学西京医院皮肤科, 西安 710033; 2. 空军总医院皮肤科, 北京 100036; 3. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100085)

[关键词] 金黄色葡萄球菌肠毒素 A; 生物, 基因修饰; 黑色素瘤, 实验性; 肿瘤, 继发性; 肺

[中图分类号] R 739.5 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2006)02-0226-02

超抗原 (superantigen) 是一组细菌或病毒编码的新型蛋白质分子, 它以完整的蛋白质分子形式分别直接与抗原提呈细胞 (APC) 膜上 MHC II 类分子抗原结合槽外侧及 T 细胞表面抗原识别受体 TCRV $\beta$  区直接结合, 不需要 APC 处理, 即可激活比普通抗原多达数千乃至数万倍的 T 淋巴细胞, 并促使活化的 T 细胞分泌多种足量的细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、TNF- $\gamma$ 、IL-2、IL-6 等, 产生强烈的抗肿瘤免疫效应, 直接或间接地杀伤肿瘤细胞<sup>[1~3]</sup>。作为超抗原的一种, 金黄色葡萄球菌肠毒素 A (staphylococcal-enterotoxin A, SEA) 近年来受到国内外学者广泛关注, 大量研究表明<sup>[2,4]</sup>, SEA 在肿瘤的导向免疫治疗中具有巨大的潜力和良好的应用前景。本研究通过用 SEA 对小鼠黑素瘤细胞 B16 进行修饰, 实现了抗肿瘤效果作用, 现将结果报告如下。

### 1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂 6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心。小鼠恶性黑素瘤细胞系 B16、含有 SEA 基因的重组载体 Teasy-SEA、真核表达载体 pcDNA3.1 以及 *E. coli* JM109 为本室保存。质粒提取试剂盒购自博大泰克生物技术有限公司, RNA 提取试剂盒、RNA 逆转录试剂盒为美国 Promega 公司产品, 限制性内切酶、AMV 逆转录酶、随机引物均为宝生物公司产品。透析胎牛血清、DMEM 培养基、G418、脂质体转染试剂盒均为 Gibco 公司产品。

1.2 pcDNA3.1-SEA 重组真核表达质粒的构建 根据 SEA 序列及 pcDNA3.1 多克隆酶切位点设计引物, 上游引物: 5'-CTC AGC TAG CCA CCA TGA AAA AAA CAG CAT TTA CAT TA-3', 下游引物: 5'-CCG GAA TTC ACT TGT ATA TAA ATA T-3', 引物由上海博亚生物工程有限公司合成。常规 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。回收 SEA 基因及 pcDNA3.1, 分别用 *Nhe*I 和 *Eco*R I 双酶切, 并用 T4 DNA 连接酶连接后, 转化 *E. coli* JM109, 获得重组质粒 pcDNA3.1-SEA。将限制性内切酶酶切鉴定正确的菌种送上海生工生物技术公司测序。

1.3 质粒转染及 RT-PCR 检测 将重组质粒 pcDNA3.1-SEA 用 Lipofectin 转染 B16 细胞后通过 G418 加压筛选, 最后得到能稳定传代的细胞系 B16SEA。同时转染 pcDNA3.1 空载体作为对照。用 Promega 公司总 RNA 提取试剂盒提取、纯化细胞总 RNA, 参照试剂盒说明进行 RT-PCR, 扩增

条件如下: 95 $^{\circ}$ C, 预变性 2 min; 继之 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 32 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.5 抑瘤实验 细胞用 PBS 洗 3 次后, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6/0.2$  ml。将小鼠随机分为 2 组, 每组 5 只, 分别尾静脉注射 B16 (肿瘤对照组) 或 B16SEA (SEA 治疗组) 0.2 ml。2 周后处死小鼠计数肺转移灶个数。

1.6 统计学处理 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 统计软件进行 *t* 检验。

### 2 结果

2.1 pcDNA3.1-SEA 表达质粒的构建 将重组质粒 pcDNA3.1-SEA 双酶切鉴定, 可见有 770 bp 左右的 SEA 片段出现, 与预期结果相符 (图 1)。证实插入的 SEA 片段完全正确。

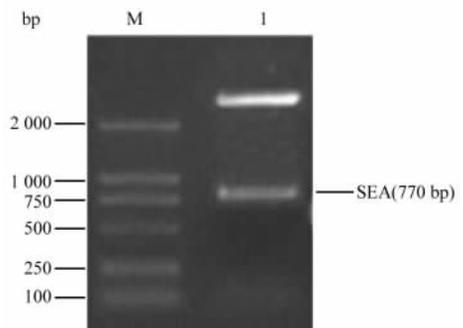


图 1 重组真核表达载体 pcDNA3.1-SEA 的酶切鉴定  
M: 标记物; 1: *Nhe*I 和 *Eco*R I 酶切 pcDNA3.1-SEA

2.2 SEA 在 B16 中的表达 提取 B16 细胞总 RNA 进行 RT-PCR 检测, 结果显示, 可从细胞总 RNA 中扩增出 770 bp 左右的片段 (图 2), 与 SEA 的大小一致, 提示 SEA 基因得到表达。

2.3 抑瘤效果观察 2 周后处死小鼠并计数肺部转移灶的数目, 肿瘤对照组肺部转移灶很多, 平均 (125.8  $\pm$  34.3) 个,

[基金项目] 国家高新技术发展规划/863 计划 (2001AA217131). Supported by National High-tech R&D Program/863 Program (2001AA217131).

[作者简介] 田 蓉, 博士, 主治医师。

\* Corresponding author. E-mail: yujiyun@sina.com

大小不一,但经SEA基因转染后的B16SEA细胞的成瘤性则明显下降,表现为肿瘤转移灶的数目明显减少,仅(33.4±6.65)个,两者转移灶的数目差异极显著( $P<0.01$ )。

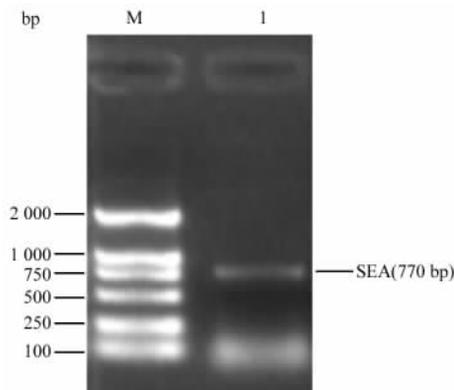


图2 B16SEA细胞中SEA的RT-PCR检测结果

M:标记物;1:B16SEA细胞中SEA

### 3 讨论

现有研究<sup>[5]</sup>表明,肿瘤细胞逃避机体免疫攻击是其发生发展的一个重要原因。超抗原的导入使得肿瘤细胞的免疫识别可以不受APC状态的影响,也不受MHC的限制,从而有助于打破机体对肿瘤的免疫耐受状态。但这种免疫增强没有特异性,所以如何导入SEA以获得针对肿瘤细胞的免疫反应,是SEA介导的肿瘤免疫治疗所要解决的一个关键问题。目前,采用基因重组技术制备超抗原—肿瘤特异抗原的融合蛋白,用于靶向抗肿瘤治疗是SEA的主要研究方向<sup>[4,6]</sup>。这种方法虽然有效,但受到大多数肿瘤无特异性抗原和人源性单抗来源存在困难的限制。最新研究显示,用转基因手段可扩大单抗导向超抗原融合蛋白治疗肿瘤的范围<sup>[7]</sup>。本研究应用脂质体转染方法将SEA直接转入小鼠黑

素瘤B16细胞中,既提高了肿瘤细胞的免疫原性,同时也增强了SEA抗肿瘤特异性,从而对黑色素瘤显示出了较好的抑瘤效果,为进一步研究SEA的抗肿瘤作用提供了实验基础。

### [参考文献]

- [1] Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives [J]. *Science*, 1990, 248: 705-771.
- [2] Dranoff G. Cancer gene therapy: connecting basic research with clinical inquiry [J]. *Clin Oncol*, 1998, 16: 2548-2556.
- [3] Renno T, Hahne M, Tschopp J, et al. Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis *in vivo* express B220 and upregulate Fas and Fas ligand [J]. *Exp Med*, 1996, 183: 431-437.
- [4] Nielsen SE, Zeuthen J, Lund B, et al. Phase I study of single, escalating doses of a superantigen-antibody fusion protein in patients with advanced colorectal or pancreatic carcinoma [J]. *Immunotherapy*, 2000, 23: 146-153.
- [5] Raez LE, Cassileth PA, Schlesselman JJ, et al. Induction of CD8 T-cell-IFN-gamma response and positive clinical outcome after immunization with gene-modified allogeneic tumor cells in advanced non-small-cell lung carcinoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10: 850-858.
- [6] Trudel S, Trachtenberg J, Toi A, et al. Pilot trial of intravenous infusion of a replication-selective adenovirus in combination with chemotherapy or IL-2 treatment in refractory cancer patients [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10: 341-352.
- [7] LeClaire RD, Bavari S. Human antibodies to bacterial superantigens and their ability to inhibit T-cell activation and lethality [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 460-463.

[收稿日期] 2005-05-29

[修回日期] 2005-08-03

[本文编辑] 孙岩