

腺病毒介导的 TEM8 抑制小鼠在体胶质瘤模型的血管生成作用

陈宏颖^{1,2}, 王守森¹, 郑兆聪¹, 王如密¹

1. 南京军区福州总医院神经外科, 福州 350025

2. 福建医科大学福总临床学院, 福州 350025

[摘要] **目的** 探讨基于 TEM8 的腺病毒(Ad-TEM8)对小鼠胶质瘤 G422 细胞系内外模型的生长抑制及其抗血管的生成作用。**方法** 连续皮下注射 Ad-TEM8 使其激活小鼠免疫系统并收集小鼠脾淋巴细胞, 将该细胞与 G422 细胞体外共培养, 检测 G422 细胞的生长抑制率, 并应用 ELISOT 检测该免疫激活淋巴细胞在体外分泌 IFN- γ 的能力。另构建皮下荷 G422 昆明小鼠在体肿瘤模型, 并连续皮下注射 Ad-TEM8 后检测肿瘤生长速度以及瘤内血管抑制效应。**结果** Ad-TEM8 能有效激发小鼠产生具有肿瘤生长抑制作用的毒性效应淋巴细胞, 并分泌 IFN- γ 。Ad-TEM8 皮下注射诱导的细胞毒性作用能有效抑制在体 G422 肿瘤生长, 产生明显的血管生成抑制作用。**结论** Ad-TEM8 可诱导小鼠产生细胞毒性细胞、抑制在体和体外肿瘤细胞生长, 其在体抑制肿瘤生长作用机制之一可能是抑制肿瘤内血管生成。TEM8 可能成为抗胶质瘤血管生成治疗的新靶标。

[关键词] 神经胶质瘤; TEM8; 腺病毒; G422 细胞; 病理性新生血管化

[中图分类号] R 739.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)08-0860-04

Inhibitory effect of recombinant adenovirus expressing TEM8 gene against angiogenesis in mouse model of glioma

CHEN Hong-jie^{1,2}, WANG Shou-sen¹, ZHENG Zhao-cong¹, WANG Ru-min¹

1. Department of Neurosurgery, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, Fujian, China

2. PLA Fuzhou General Hospital, Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the inhibitory effects of recombinant adenovirus carrying TEM8 (Ad-TEM8) against angiogenesis and growth of mouse glioma G422 cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The Ad-TEM8 was constructed and subcutaneously injected to immunize Kunming mice, and then the splenic lymphocytes were collected for co-culture with G422 cells *in vitro*. The growth inhibition of G422 cells was observed and IFN- γ secretion by the activated lymphocytes were examined by ELISOT method. In addition, the anti-tumor and anti-angiogenesis effects of Ad-TEM8 were observed in Kunming mice carrying G422 xenografts. **Results** Ad-TEM8 effectively stimulated the generation of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in Kunming mice and the secretion of IFN- γ . Subcutaneous injection of Ad-TEM8-induced cytotoxicity effectively inhibited *in vivo* tumor growth and angiogenesis. **Conclusion** Ad-TEM8 can induce CTLs in mice, inhibit tumor growth *in vitro* and *in vivo*, and disrupt tumor vasculature. The anti-angiogenesis effect might be a mechanism for its *in vivo* anti-tumor effect; and TEM8 may serve as a novel target for anti-angiogenesis therapy of glioma.

[Key words] glioma; TEM8; adenovirus; G422 cells; pathologic neovascularization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(8): 860-863]

胶质瘤是颅内最常见的恶性实体肿瘤之一, 占颅内肿瘤的 45%~50%, 由于其分化差、增殖快、侵袭性强, 手术治疗不能有效延长患者的生存时间, 疗效不理想^[1-3]。因此, 寻找新的治疗方法显得尤为必要。抗肿瘤血管生成是近年来肿瘤学领域的研究热点, 并已成功应用于临床^[4-5]。TEM8 是新近发现的

位于肿瘤血管内皮上的分子^[6-7]。TEM8 的 mRNA 和蛋白在肿瘤血管内皮上高表达, 但在正常的血管内皮上不表达^[6-7]。另外研究还发现 TEM8 的表达能刺激血管内皮细胞的黏附和增殖^[8-9]。因此, TEM8 有望成为抗血管生成治疗的靶点。基于上述研究, 本实验采用重组 TEM8 腺病毒, 观察其对胶质

瘤小鼠血管生成的影响,以探讨重组 TEM8 腺病毒治疗胶质瘤的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠神经胶质瘤细胞株 G422 由本实验室保存(购自中科院细胞库),以含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37℃、5% CO₂ 的环境下培养。昆明小鼠,体质量 18~22 g,购自福建医科大学实验动物中心,合格证号:SCX(闽)2004-002,SPF 级条件下饲养。重组 TEM8 腺病毒(Ad-TEM8)和重组 LacZ 腺病毒(Ad-LacZ)委托重庆百思特生物技术公司构建。CD31 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,免疫组化检测试剂盒为北京中杉金桥公司产品。

1.2 动物免疫 将雄性昆明小鼠随机分为实验组、对照组和空白对照组,每组 10 只;实验组以 Ad-TEM8 免疫,对照组以 Ad-LacZ 免疫,空白对照组以 PBS 免疫;每次按含有 1×10⁹ PFU 的 100 μl 腺病毒行腹股沟皮下免疫,每隔 1 周免疫 1 次,连续免疫 3 次。

1.3 效应细胞的制备 末次免疫后 1 周,断颈处死小鼠,在无菌条件下取脾脏,用 100 目筛网碾磨,收集细胞悬液,用聚蔗糖-泛影葡胺分层液密度梯度离心法分离脾淋巴细胞,用含有质量百分浓度为 10% 的胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调节细胞密度为 1×10⁶ 个/ml,作为效应细胞。

1.4 ⁵¹Cr 释放实验 实验采用标准 4 h ⁵¹Cr 释放试验测定效应细胞的杀伤力。稳定转染了 TEM8 的 G422 靶细胞与 ⁵¹Cr (100 μCi/10⁶ 个细胞, Amer-sham Bioscience UK Limited, 美国)在 37℃ 水浴箱内共同温育 2 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 3 次,用 RPMI 1640 重悬并按不同效靶比(25:1、50:1、100:1)与效应细胞混合,每组复种 3 孔,以每分钟脉冲数(cpm)表示,结果均以 3 复孔 cpm 的平均值表示。孵育 4 h 后收获上清,用 γ 放射免疫计数器(FJ22021 型,中国)测定各孔的每分钟计数(cpm)值。特异性杀伤率采用公式计算:(实验组的 cpm 平均值-自释放的 cpm 平均值)/(最大释放的 cpm 平均值-自释放的 cpm 平均值)×100%。

1.5 IFN-γ 的 ELISOT 检测 ELISPOT (IFN-γ)试剂盒购于法国 DIACLONE 公司,参照使用说明进行检测。调整细胞密度为 1×10⁶ 个/ml,于 96 孔培养板中每孔加入 100 μl 细胞悬液,各设 3 个复孔,温育时间为 48 h。由 DIACLONE 公司用 ELISPOT

分析仪检测色斑数目作为最终结果。

1.6 重组 TEM8 腺病毒抑制胶质瘤 G422 的生长 将胶质瘤 G422 细胞消化重悬,取 0.1 ml 接种于昆明小鼠的右侧皮下,约 1×10⁶ 细胞。1 周后,随机分组实验,每组 7 只,共分为 3 组:Ad-TEM8 治疗组,Ad-LacZ 对照组和 PBS 对照组,按 1.2 项下方法进行免疫。每 5 d 用游标卡尺测量肿瘤长、短径两次。肿瘤体积:V=L×W²/2 (L 为肿瘤长径;W 为肿瘤短径)。

1.7 肿瘤内血管密度的检测 免疫结束 1 周后,取各组新鲜肿瘤组织浸泡于中性甲醛溶液中固定、石蜡包埋切片。免疫组化用 CD31 一抗,DAB 显色。在 200 倍视野下随机选取 3 个不重复的视野,计数血管内皮细胞,以 3 个视野的平均值作为最终结果。

1.8 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,先进行方差齐性检验,方差齐者组间比较用方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 重组 TEM8 腺病毒诱导脾淋巴细胞的细胞毒活性 由图 1 可见,Ad-TEM8 能有效诱导小鼠脾淋巴细胞的细胞毒效应,在效靶比为 25:1、50:1 和 100:1 时,对靶细胞均能产生杀伤作用。而对照组 Ad-LacZ 和 PBS 均不能有效诱导杀伤靶细胞的细胞毒性 T 淋巴细胞(P<0.05)。研究结果证实 Ad-TEM8 能有效激发脾淋巴细胞产生细胞毒作用,对 G422 有较强的特异性杀伤作用。

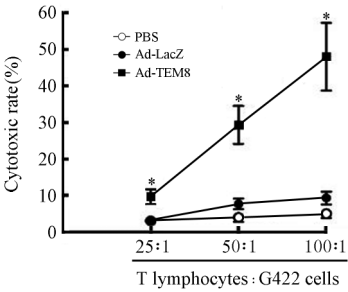


图 1 Ad-TEM8 诱导的脾淋巴细胞对 G422 细胞的细胞毒作用

Fig 1 Cytotoxicity of Ad-TEM8-induced splenic T lymphocytes on G422 cells

* P<0.05 vs PBS and Ad-LacZ group. n=3, $\bar{x} \pm s$

2.2 重组 TEM8 腺病毒激发脾淋巴细胞分泌 IFN-γ 以 ELISPOT 检测各实验组脾淋巴细胞所形成的斑点数目,结果如图 2 所示:Ad-TEM8 激发脾淋巴细胞分泌 IFN-γ 的斑点数目明显高于对照组

($P<0.05$)。结果提示 Ad-TEM8 具有较好的免疫作用,能有效激发脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 。

2.3 重组 TEM8 腺病毒抑制胶质瘤 G422 的生长实验 将胶质瘤 G422 细胞接种于昆明小鼠的右侧皮下,1 周后随机分组注射重组腺病毒。由图 3 可见,在 PBS 和 Ad-LacZ 组中,接种肿瘤后,肿瘤体积迅速增大。与之相比,Ad-TEM8 组的肿瘤体积增长缓慢,在第 10 天开始差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 肿瘤内血管密度的检测 为了证实 Ad-TEM8 抑制肿瘤内的血管生成,实验在治疗结束 1 周后,取各组新鲜肿瘤组织,在 200 倍视野下随机选取 3 个不重复的视野,观察血管内皮细胞的平均数。由图 4 可见,PBS 组中血管内皮细胞数为(58 ± 9)个/ mm^2 , Ad-LacZ 组中血管内皮细胞数为(53 ± 8)个/ mm^2 , Ad-TEM8 组中血管内皮细胞数为(25 ± 4)个/ mm^2 , Ad-TEM8 组与另外两组相比差异有统计学意义($P<0.05$),证明 Ad-TEM8 能有效抑制肿瘤内的血管生成。

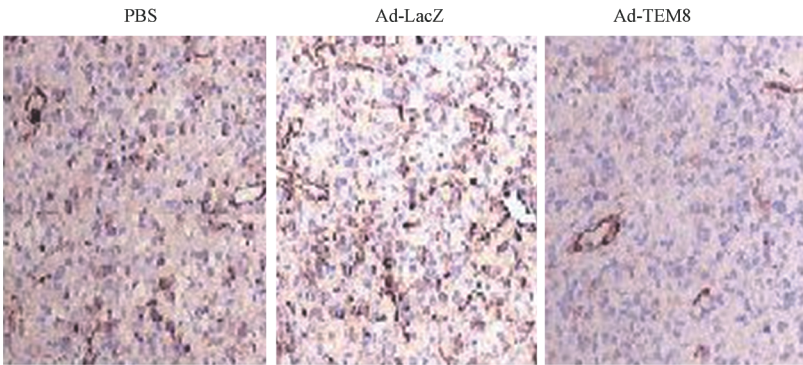


图 4 不同组别肿瘤内血管密度的检测

Fig 4 Microvessel density (MVD) analysis in tumor tissues in different groups

* $P<0.05$ vs PBS and Ad-LacZ groups. $n=7$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

胶质瘤是神经系统最常见的恶性实体肿瘤之一,发展快、预后差,严重危害人类的身体健康。继手术、放疗、化疗后,生物治疗已经成为胶质瘤综合治疗的重要组成部分。近年来,由于血管内皮细胞的基因稳定性,抗血管生成治疗策略受到广泛的关注,以血管内皮细胞为靶点的治疗在多种肿瘤细胞中得到广泛研究。

TEM8 最初被报道为炭疽毒素的受体,随后,越

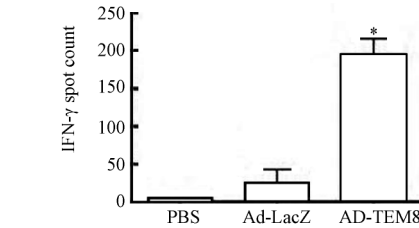


图 2 Ad-TEM8 诱导的脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 水平

Fig 2 IFN- γ secreted by Ad-TEM8-induced splenic T lymphocytes detected by ELISPOT

* $P<0.05$ vs PBS and Ad-LacZ groups. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

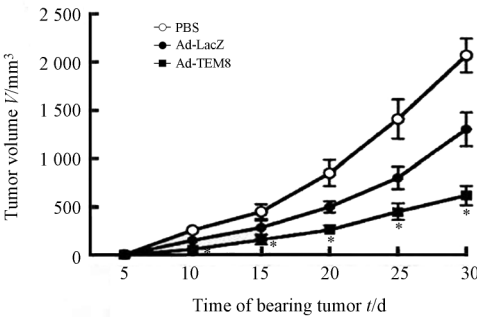
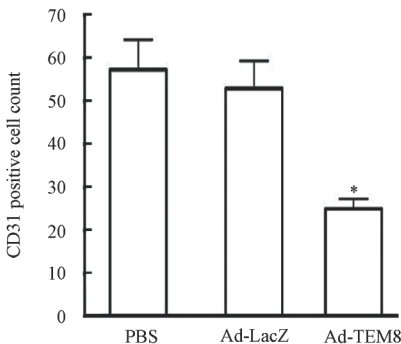


图 3 不同组别的肿瘤生长曲线图

Fig 3 Tumor growth curves in different groups

* $P<0.05$ vs PBS and Ad-LacZ groups. $n=7$, $\bar{x}\pm s$



来越多的实验证明 TEM8 特异表达在肿瘤血管内皮细胞上^[10-11]。以上研究提示 TEM8 能为肿瘤的抗血管治疗提供理想的靶点。有科研人员将 TEM8 的 DNA 疫苗或融合蛋白免疫小鼠,发现能诱发抗肿瘤血管生成的免疫应答^[12-13]。因此,TEM8 可有效打破耐受,可作为一种理想的抗原应用到抗肿瘤免疫中。

腺病毒载体系统具有宿主范围广、感染率高、包装容量大、繁殖滴度高、不发生整合及安全性好、性质稳定、载体制备较容易等特点,目前已成为继反

转录病毒载体后被广泛应用的载体系统。病毒载体可以稳定地将外源基因导入受体细胞并表达,而且效率高,基因转移过程中不易受 DNA 酶的降解,因而是十分具有发展前途的转基因方法。

为了证实腺病毒介导的 TEM8 应用于抗胶质瘤血管生成的可行性,研究制备了 TEM8 的腺病毒,免疫移植了胶质瘤 G422 的昆明小鼠,并观察对胶质瘤 G422 的血管抑制效应。结果显示,TEM8 腺病毒能有效诱导 CTL 分泌 IFN- γ 和产生细胞毒效应,对表达 TEM8 的靶细胞具有杀伤作用,结果证实 TEM8 腺病毒诱发了淋巴细胞的免疫活性。其次,研究观察了 TEM8 腺病毒对胶质瘤 G422 和肿瘤血管的生长抑制作用。研究结果进一步提示 TEM8 腺病毒能有效抑制胶质瘤 G422 的血管生成,并能降低胶质瘤的平均生长速度。

综上所述,TEM8 腺病毒能有效激活抗血管生成的免疫应答,明显抑制胶质瘤 G422 的血管生成,为胶质瘤的抗血管治疗提供了理论可行性,并为胶质瘤的综合治疗提供了理想策略。

[参 考 文 献]

[1] de la Fuente B P, Dalmau J, Rosenfeld M. [Glioma therapy update][J]. Neurologia, 2007, 22: 159-169.
[2] Norden A D, Wen P Y. Glioma therapy in adults[J]. Neurologist, 2006, 12: 279-292.
[3] Massimino M, Biassoni V. Use of high-dose chemotherapy in front-line therapy of childhood malignant glioma[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2006, 6: 709-717.

[4] Stratmann A, Machein M R, Plate K H. Anti-angiogenic gene therapy of malignant glioma[J]. Acta Neurochir Suppl, 1997, 68: 105-110.
[5] Gerstner E R, Sorensen A G, Jain R K, Batchelor T T. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for malignant glioma[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2009, 9: 254-262.
[6] St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans K E, Montgomery E, et al. Genes expressed in human tumor endothelium[J]. Science, 2000, 289: 1197-1202.
[7] Carson-Walter E B, Watkins D N, Nanda A, Vogelstein B, Kinzler K W, St Croix B. Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans[J]. Cancer Res, 2001, 61: 6649-6655.
[8] Nanda A, Carson-Walter E B, Seaman S, Barber T D, Stampfl J, Singh S, et al. TEM8 interacts with the cleaved C5 domain of collagen alpha 3(V)[J]. Cancer Res, 2004, 64: 817-820.
[9] Hotchkiss K A, Basile C M, Spring S C, Bonuccelli G, Lisanti M P, Terman B I. TEM8 expression stimulates endothelial cell adhesion and migration by regulating cell-matrix interactions on collagen[J]. Exp Cell Res, 2005, 305: 133-144.
[10] Bradley K A, Mogridge J, Mourez M, Collier R J, Young J A. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin[J]. Nature, 2001, 414: 225-229.
[11] Nanda A, St Croix B. Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy[J]. Curr Opin Oncol, 2004, 16: 44-49.
[12] Felicetti P, Mennecozzi M, Barucca A, Montgomery S, Orlandi F, Manova K, et al. Tumor endothelial marker 8 enhances tumor immunity in conjunction with immunization against differentiation Ag[J]. Cytotherapy, 2007, 9: 23-34.
[13] Fernando S, Fletcher B S. Targeting tumor endothelial marker 8 in the tumor vasculature of colorectal carcinomas in mice[J]. Cancer Res, 2009, 69: 5126-5132.

[本文编辑] 徐 佳, 孙 岩

• 书 讯 •

《中国腔道泌尿外科手术视频图谱》已出版

《中国腔道泌尿外科手术视频图谱》由孙颖浩主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0057-7,定价 260.00 元。
《中国腔道泌尿外科手术视频图谱》由国内泌尿外科微创领域有较深造诣和丰富经验的学者编写而成,除了对各种腔道泌尿外科手术进行了简洁而实用的文字说明以外,更创新地结合电子出版物的优势,为临床广泛开展的各类微创泌尿外科手术配以规范、清晰的手术视频,从而更加清晰地展示出作者的手术思路和精湛的技艺。

全书简明易懂,生动直观,对腔道泌尿外科手术的初学者和具有一定操作经验的泌尿外科医生均有较高的参考价值。
该书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。
通信地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433
邮购电话:021-65344595,65493093
<http://www.smmup.com>