

携带鼠源基因的沙门氏菌对肿瘤的预防作用

李玉华^{1)*} 陈 慧²⁾ 郭坤元^{1)*} 解咏梅²⁾ 杜 江¹⁾ 张明徽³⁾ 黄建生²⁾ 任大明²⁾

(¹⁾第一军医大学附属珠江医院血液科, 广州 510282;

²⁾复旦大学生命科学院遗传学研究所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433;

³⁾第二军医大学免疫教研室, 上海 200433)

摘要 探讨减毒鼠伤寒沙门氏菌作为口服基因治疗载体的可行性. 通过电转化法将真核表达载体 pCMVmIL-12、pCMVmGM-CSF、EGFPN1 导入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 中, 经由胃管饲于 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠. 6 周后分别用 4T₁ 乳腺癌细胞和 Lewis 肺癌细胞进行攻击. 通过流式细胞仪、共聚焦显微镜检测绿色荧光蛋白在小鼠各组织中的表达, 通过 PCR 和 ELISA 的方法检测 mIL-12、mGM-CSF 基因的整合和表达情况. 并考察肿瘤的受抑情况和小鼠的生存期. 结果表明: 在小鼠的肝、脾、小肠、肾脏和肿瘤中可检测到绿色荧光蛋白的表达和相应细胞因子基因的整合. 血清中相应的细胞因子水平较对照组明显升高 ($P < 0.05$), 生存期远远超过对照组小鼠 ($P < 0.05$). 减毒沙门氏菌可作为口服基因治疗载体, 为肿瘤的预防和治疗提供一条简便、安全、有效的途径.

关键词 基因治疗, 减毒沙门氏菌, 鼠白细胞介素-12, 鼠粒巨系集落刺激因子

学科分类号 R730.51

肿瘤是造成人类死亡的第二大原因, 而且在现代人群中的发病率日益提高. 如何预防和治疗肿瘤是现代医学研究的热点和难点. 以口服方式预防和治疗肿瘤是目前为止最简便、安全的理想途径. 自 70 年代以来, 减毒沙门氏菌的口服活菌苗已被广泛应用于预防人、兽、家禽的感染性疾病, 取得了令人瞩目的成就^[1]. 目前以减毒沙门氏菌为载体的 DNA 疫苗已在小鼠体内进行了初步研究并取得了良好的效果^[2]. 本研究将绿色荧光蛋白基因 (green fluorescence protein, GFP)、小鼠的 IL-12、GM-CSF 基因分别导入减毒沙门氏菌中, 考察外源基因在体内的整合、表达情况及产生的效应, 借以推测减毒沙门氏菌作为口服基因治疗载体的可行性, 为肿瘤的预防和治疗探索一条简便、安全、有效的途径.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株: C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌细胞、BALB/c 小鼠 4T₁ 乳腺癌细胞均由上海市第一人民医院惠赠.

1.1.2 质粒与菌株: EGFPN1 质粒由上海市第一人民医院惠赠, pCMVmIL-12、pCMVmGM-CSF 由台湾中央研究院杨宁荪教授惠赠, 减毒鼠伤寒沙门氏菌 LB5000、SL3261 由美国 Stocker 教授及何

笑松博士惠赠.

1.1.3 试剂: 细胞培养基 RPMI1640 购自 GIBCO 公司, 小牛血清购自华美公司, Taq 酶、dNTP 均购自基因公司, mGM-CSF、mIFN- γ 、mIL-12 ELISA 试剂盒均为 Endogen 公司产品.

1.1.4 实验动物: BALB/c、C57BL/6 小鼠购自中国科学院上海实验动物中心, 4~6 周, 雌性.

1.2 实验方法

1.2.1 携带目的基因的减毒沙门氏菌的制备: 应用电转化法将 EGFPN1、pCMVmGM-CSF 和 pCMVmIL-12 的质粒分别导入感受态沙门氏菌 LB5000 中, 提取在 LB5000 中经修饰过的质粒再经电转化导入 SL3261 感受态细菌中. 电转化条件: 2000V 电压、25 μ F 电容、200 Ω 电阻、放电时间为 4 ms.

1.2.2 小鼠的口服治疗: 小鼠共分 10 组, 每组 10~15 只. 其中 BALB/c 和 C57BL/6 各 5 组, 分别是空白对照组 (Blank)、GFP、mGM-CSF、mIL-12、mGM-CSF+mIL-12. 用 10% NaHCO₃ 溶液将 EGFPN1/SL3261、pCMVmGM-CSF/SL3261、pCMVmIL-12/SL3261 细菌数调整为 1×10^9 /ml, 各实验组小鼠用胃管饲服相应细菌 0.1 ml, Blank

* 通讯联系人.

Tel: 020-85143457, E-mail: xyk00@163.net

收稿日期: 2000-09-05, 接受日期: 2000-09-28

组饲服等量 10% NaHCO_3 溶液. 2 周 1 次, 共服 3 次^[3].

1.2.3 肿瘤接种: 口服治疗 6 周后, BALB/c 小鼠每只接种 4×10^5 个 4T₁ 细胞, C57BL/6 小鼠每只接种 1×10^6 个 Lewis 细胞.

1.2.4 绿色荧光蛋白表达的检测: 口服治疗 4 周后, GFP 组与 Blank 组各取 5 只小鼠解剖获取脾脏, 常规制成单细胞悬液, 溶解红细胞后经流式细胞仪检测. 口服治疗 4 周及接种肿瘤 2 周后, 每组小鼠各取 1 只. 解剖获取肝脏、脾脏、肾脏和小肠, 制成冰冻切片, 置于共聚焦显微镜下观察.

1.2.5 真核表达载体的 PCR 检测: 小鼠接种肿瘤 2 周后, 每组各取 1 只, 解剖获取肝脏、脾脏、肾脏、小肠和肿瘤, 常规方法提取基因组 DNA^[4] 进行 PCR 反应, 上游引物为: 5'-CCCAGTACATGACCTTATGGG-3', 下游引物为 5'-GGAGACTTGGAAATCCCC GT-3'^[5], 反应条件: 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延长 45 s, 共进行 30 个循环, 72℃ 延长 10 min, 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测.

1.2.6 淋巴细胞亚群分析: 口服治疗 6 周后, 每组小鼠各取 5 只眼球采血, 用肝素抗凝. 取 20 μl 抗凝血, 在流式细胞仪上进行 $\text{CD}_3^+ \text{CD}_4^+$ T 和 $\text{CD}_3^+ \text{CD}_8^+$ T 细胞计数.

1.2.7 细胞因子的 ELISA 检测: 每只小鼠口服治疗前眼球采血 1 次, 此后每 2 周眼球采血 1 次. 血清行 ELISA 检测, 参照说明书操作, 每份做 3 个复孔.

1.2.8 统计学分析: 各组资料先经正态分布检验和方差齐性检验后再做方差分析, $\alpha = 0.05$, $P < \alpha$ 则用 q 检验做两两之间的比较.

2 结 果

2.1 绿色荧光蛋白在小鼠组织中的表达

在 BALB/GFP 组、C57BL/GFP 组小鼠的肝脏、脾脏、肾脏、小肠和肿瘤中均可检测到绿色荧光蛋白的表达, 其中以脾脏 (图 1) 和肿瘤 (图 2) 的表达较强. C57BL/GFP 组和 BALB/GFP 组表达绿色荧光蛋白的脾细胞百分率分别为 $3.01\% \pm 0.29\%$ 、 $3.03\% \pm 0.36\%$. 在其余各组小鼠的组织中未能检测到绿色荧光蛋白的表达. 说明沙门氏菌可将外源基因导入小鼠体内并进行广泛有效的表达.

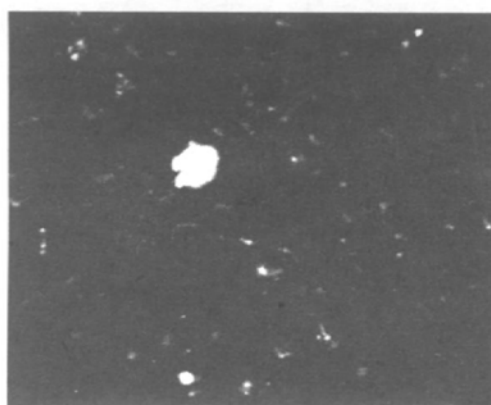


Fig. 1 GFP expression in BALB/c mice's spleen (10×20).

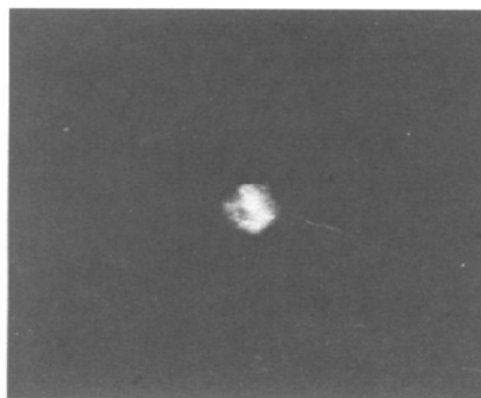


Fig. 2 GFP expression in 4T₁ tumor (10×20).

2.2 基因组中真核表达载体的检测

鉴于真核表达载体 EGFPN1、pCMVmIL-12、pCMVmGM-CSF 均以 CMV 为启动子, 故以 PCR 检测染色体中是否有 CMV 片段, 作为目的基因有无整合入基因组的证据. 结果 (图 3) 显示除 Blank 组, 各实验组小鼠的肝、脾、小肠、肾脏、肿瘤组

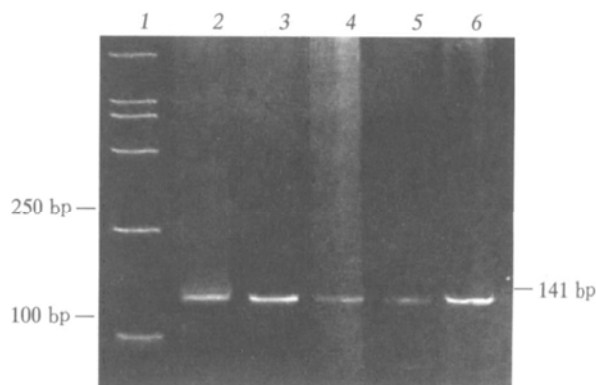


Fig. 3 PCR products of genomic DNA

1: DL2000 molecular marker; 2: spleen genomic DNA; 3: tumor genomic DNA; 4: liver genomic DNA; 5: intestinal genomic DNA; 6: kidney genomic DNA.

织中均可扩增出一个 141 bp 大小的片段, 与引物设计时所预计的扩增片段大小相符. 表示沙门氏菌可将外源基因整合入小鼠各组织器官中.

2.3 淋巴细胞亚群分析

口服治疗 6 周后作 $CD_3^+ CD_4^+$ 、 $CD_3^+ CD_8^+$ 淋巴细胞亚群分析. C57BL/6 小鼠的实验结果显示: 细胞因子治疗组 CD_8/CD_4 明显高于 Blank 组和 GFP 组 ($F = 45.080$, $P = 0.000$), 且以 mGM-CSF 处理组升高最明显 (表 1). BALB/c 小鼠各组的实验结果与之相似 ($F = 8.507$, $P = 0.000$). 结果说明: 沙门氏菌所携带的细胞因子基因提高了实验组小鼠的细胞免疫功能, 将有助于对入侵肿瘤细胞的杀伤作用.

Table 1 Analysis of lymphocytes subclone
 CD_8^+ / CD_4^+ of C57BL/6

Group	Number of mice	$CD_8^+ / CD_4^+ / \%$
C57BL/ Blank	5	79.86 ± 3.24
C57BL/ GFP	5	73.57 ± 6.43
C57BL/ mIL-12	5	$109.71 \pm 12.60^{1)}$
C57BL/ mGM-CSF	5	$201.65 \pm 31.25^{1)}$
C57BL/ mIL-12 + mGM-CSF	5	93.41 ± 17.97

¹⁾ compared with blank control $P < 0.05$, $\bar{x} \pm s$.

2.4 存活率的比较

C57BL/mGM-CSF 处理组中有 5 只小鼠接种 Lewis 肺癌细胞后, 3 d 后长出肿瘤, 大小刚可触及, 以后未见明显增大, 于第 10 天左右发现肿瘤消退. C57BL/mGM-CSF + mIL-12 处理组有 2 只小鼠呈现上述情况, 于 4 周后上述 7 只小鼠再次接种 2×10^6 个 Lewis 细胞仍未长出肿瘤, 7 只小鼠存活至今. 说明: 沙门氏菌所携带的细胞因子基因在 C57BL/6 小鼠体内起到了阻碍肿瘤生长和延长生存期的作用 (图 4).

BALB/c 小鼠各处理组未见肿瘤完全消退者, 但细胞因子处理组的生存期较 GFP 与 Blank 组均有显著延长 ($F = 14.447$, $P = 0.000$).

2.5 血清中 mGM-CSF 的检测

mGM-CSF 的含量在 C57BL/mGM-CSF 组、C57BL/mGM-CSF + mIL-12 组小鼠血清中呈现相似的升高、降低、再升高趋势, 原因可能是机体对

超乎正常水平的 mGM-CSF 产生了中和性抗体, 故而使 mGM-CSF 有骤降的情况发生, 当 mGM-CSF 降低到一定水平时, 机体的负反馈机制作用减弱, 从而其含量又重新上升 (图 5).

BALB/mGM-CSF、BALB/mGM-CSF + mIL-12 组小鼠血清中 mGM-CSF 呈现类似结果.

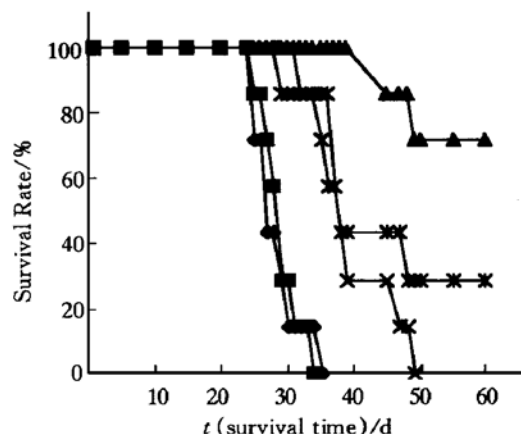


Fig. 4 Survival rate of C57BL/6 mice

◆ — ◆: C57BL/Blank; ■ — ■: C57BL/GFP; ▲ — ▲: C57BL/mGM-CSF; × — ×: C57BL/mIL-12; * — *: C57BL/mGM-CSF + mIL-12.

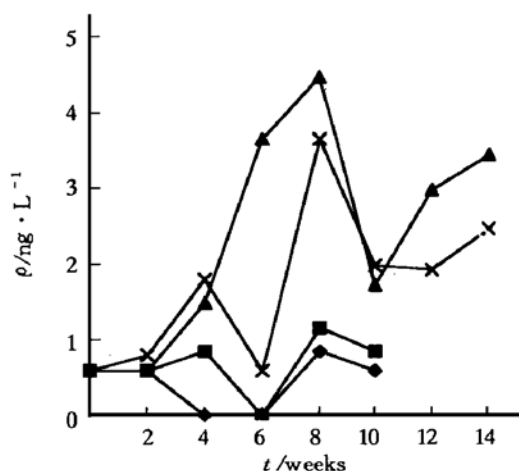


Fig. 5 mGM-CSF concentration in serum of different groups of C57BL/6 mice

◆ — ◆: C57BL/Blank; ■ — ■: C57BL/GFP; ▲ — ▲: C57BL/mGM-CSF; × — ×: C57BL/mGM-CSF + mIL-12.

2.6 血清中 mIL-12、mIFN- γ 含量的检测

C57BL/6 小鼠的 mIL-12 + mGM-CSF 和 mIL-12 组, 与 BALB/c 小鼠相应两组的血清中 mIL-12 的升降变化趋势基本相同. 由于 IFN- γ 是介导 IL-12 发挥抗肿瘤作用的重要效应分子, 故血清中 mIFN- γ 的变化趋势与 mIL-12 相呼应 (图 6 和图 7).

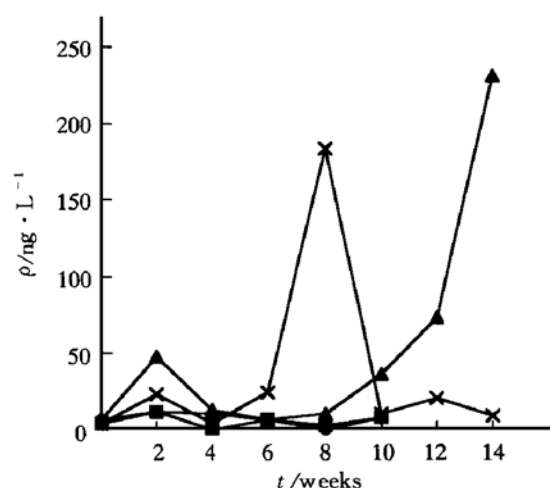


Fig. 6 mIL-12 concentration in serum of different groups of C57BL/6 mice

◆ — ◆: C57BL/Blank; ■ — ■: C57BL/GFP; ▲ — ▲: C57BL/mIL-12; × — ×: C57BL/mIL-12 + mGM-CSF.

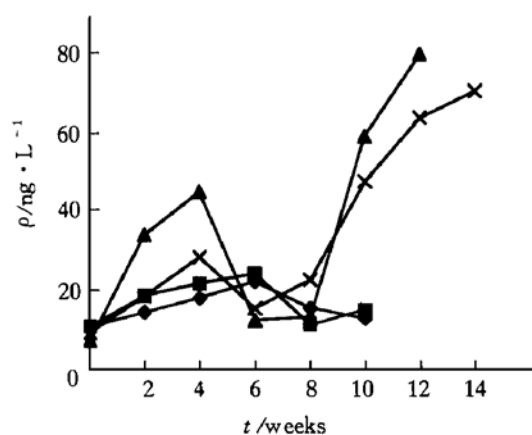


Fig. 7 mIFN-γ concentration in serum of different groups of C57BL/6 mice

◆ — ◆: C57BL/Blank; ■ — ■: C57BL/GFP; ▲ — ▲: C57BL/mIL-12; × — ×: C57BL/mIL-12 + mGM-CSF.

以上所检测到的3种细胞因子在相应的处理组中均较正常水平有显著升高,进一步验证沙门氏菌可将外源基因导入小鼠体内并进行有效表达,从而介导了小鼠细胞免疫功能的增强和对肿瘤的抵抗能力。

3 讨 论

IL-12是异源双链糖蛋白,在调节机体免疫功能方面起着十分重要的作用,是连接先天性免疫与适应性免疫的桥梁。IL-12可诱导活化的T细胞和NK细胞增殖,促进T细胞、NK细胞和肥大细胞分泌IFN-γ,诱导Th1细胞免疫应答,抑制Th2细胞分化。IL-12还调节多种细胞因子的生成,并

刺激造血干细胞增殖^[6]。GM-CSF是一种酸性糖蛋白,在体外具有促进髓样祖细胞增殖和中性粒细胞趋化、吞噬的作用,同时还可增强单核巨噬细胞抗体依赖的杀伤活性^[7]。

在以往的研究中发现:IL-12和GM-CSF均具有良好的抗肿瘤作用^[6,7],且有文献报道两者合用可以明显增强抗肿瘤效果^[8],但最近有报道指出GM-CSF具有抑制IL-12分泌的作用^[9]。本研究中发现:IL-12和GM-CSF联合使用与单独使用其中一种细胞因子相比,CD8⁺/CD4⁺升高幅度较低,但小鼠的生存期无明显缩短,说明联合使用及不表现协同抗肿瘤作用,也无明显的相互拮抗作用;同时说明CD8⁺/CD4⁺升高幅度与生存期的长短并非呈线性相关关系。

从PCR、流式细胞仪检测以及共聚焦显微镜的观察结果来看,减毒沙门氏菌确实可以将外源基因整合入组织细胞的基因组并进行表达。国外有文献报道沙门氏菌存在明显的肿瘤靶向性,它在肿瘤组织与正常组织中浓集的比率约为1000:1^[10,11]。而本实验在小鼠的肝脏、脾脏、肿瘤、小肠、肾脏中均可检测到外源基因的整合和表达,从共聚焦显微镜直观的结果来看,脾脏与肿瘤中表达较强,没有明显的肿瘤靶向性。分析原因可能是所使用的减毒沙门氏菌菌株不同所致。

小鼠血清中mGM-CSF、mIL-12和mIFN-γ的含量在相应的处理组中均有显著升高,进一步验证减毒沙门氏菌可将外源基因携带入小鼠组织细胞内,并进行有效表达。以减毒沙门氏菌为载体的口服基因治疗,通过口服途径使外源基因得以在体细胞中整合和表达,使外源基因(细胞因子)的分泌受机体自身免疫机制的调控;避免了全身用药的毒副作用,同时也省去了体外长期培养细胞和基因转染的繁杂程序,具有以往的治疗手段难以媲美的安全性和简便性。

本实验研究结果证明:减毒沙门氏菌可作为口服基因治疗的载体发挥良好作用。但其转染效率较低,肿瘤靶向性不强,这两方面的缺憾有待进一步完善。

参 考 文 献

- 1 Medina E, Paglia P, Nikolaus T, et al. Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella typhimurium* are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. *Infect Immunity*, 1999, 67 (3): 1093~1099
- 2 Urashima M, Suzuki H, Yuza Y, et al. An oral CD40 ligand gene

- therapy against lymphoma using attenuated *Salmonella typhimurium*. Blood, 2000, **95** (4): 1258~1263
- 3 Darji A, Guzman C A, Gerstel B, *et al.* Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. Cell, 1997, **91** (6): 765~75
 - 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 9. 16~9. 22
 - 5 During M J, Symes C W, Lawlor P A, *et al.* An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. Science, 2000, **287** (5457): 1453~1464
 - 6 Gambotto A, Tuting T, Mcvey D L, *et al.* Induction of antitumor immunity by direct intratumoral injection of a recombinant adenovirus vector expressing interleukin 12. Cancer Gene Therapy, 1999, **6** (1): 45~53
 - 7 Armitage J O. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. Blood, 1998, **92** (12): 4491~4506
 - 8 Aruga A, Tanigawa K, Aruga E, *et al.* Enhanced adjuvant effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor plus interleukin 12 compared with either alone in vaccine-induced tumor immunity. Cancer Gene Therapy, 1999, **6** (1): 89~95
 - 9 Tada Y, Asuhina A, Nakamura K, *et al.* Granulocyte-macrophage colony stimulating factor inhibits IL-12 production of mouse langerhans cells. J Immunol, 2000, **164** (10): 5113~5119
 - 10 Pawelek M, Low K B, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. Cancer Res, 1997, **57** (5): 4537~4544
 - 11 Low K B, Ittensohn M, Trung L, *et al.* Lipid a mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF α induction retain tumor-targeting *in vivo*. Nature biotech, 1999, **17** (1): 37~41

Oral Administration of a Live Attenuated *Salmonella* Containing Murine IL-12、GM-CSF Gene Leads to Tumor Regression and Prolongation of Survival in Mice

LI Yu-Hua^{1)*}, CHEN Hui²⁾, GUO Kun-Yuan^{1)*}, XIE Yong-Mei²⁾, DU Jiang¹⁾,
ZHANG Ming-Hui³⁾, HUANG Jian-Sheng²⁾, REN Da-Ming²⁾

(¹⁾Department of Hematology, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China;

²⁾State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China;

³⁾Department of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract To study the possibility of oral gene therapy using live attenuated *Salmonella*. A live attenuated Ara⁻ autotrophic mutant of *Salmonella typhimurium* (SL3261) was used as carrier for eukaryotic expression vectors EGFPN1, pCMVmIL-12, pCMVmGM-CSF and was administered orally to BALB/c and C57BL/6 mice. After 6 weeks, these mice were challenged with 4T₁ or Lewis tumor cells respectively. Flow cytometer and laser scanning confocal microscopy were used to detect the expression of GFP in murine tissues. PCR and ELISA were used to detect the integration and expression of mIL-12, mGM-CSF gene. The survival time of mice was also investigated. GFP expression and mIL-12, mGM-CSF gene integration could be detected in murine liver, spleen, intestine, kidney and tumor. The serum level of mIFN- γ , mIL-12 increased significantly in the mIL-12 orally treated mice ($P < 0.05$); The serum level of mGM-CSF increased also in mGM-CSF orally treated mice ($P < 0.05$); which resulted in the prolongation of the survival time of those mice, compared with the control ($P < 0.05$). Oral gene therapy using live attenuated *Salmonella* has the potential to be a simple, effective and above all, safe way against tumor.

Key words gene therapy attenuated *Salmonella* mouse IL-12, mouse GM-CSF

* Corresponding author. Tel: 86-20-85143457, E-mail: xyk00@163.net

Received: September 5, 2000 Accepted: September 28, 2000