

转染融合基因的 DC 抗肿瘤免疫效应

张文彬¹, 张海红², 孔维², 查晓¹, 陈廷清¹, 邓碧芳¹, 任原¹, 黄建鸣¹

Specific Anti-tumor Immunological Effect by Dendritic Cell Transfected with GM-CSF Sur Gene

ZHANG Wen-bin¹, ZHANG Hai-hong², KONG Wei², CHA Xiao¹, CHEN Ting-qing¹, DENG Bi-fang¹, REN Yuan¹, HUANG Jian-ming¹

1. Sichuan Cancer Hospital & Institute, Chengdu 610041, China; 2. Vaccine Research Center, Jilin University

Corresponding Author: HUANG Jian-ming, E-mail: wesleyhuangcn2002@yahoo.com.cn

Abstract: **Objective** To study the specific anti-tumor immunological effects induced by dendritic cells transfected with GM-CSF gene and survivin gene (GM-CSF Sur) *in vitro*. **Methods** pcDNA 3.1 plasmid containing GM-CSF fusion gene was constructed and was transfected into dendritic cells by jetPEITM-Macrophage transfected kit; cellular surface phenotype such as CD1a, CD80, CD86, CD83 were detected by FACS; The specific cytotoxicity of induced human cytotoxic T lymphocyte (CTLs) to tumor cells was detected with LDH assay. **Results** GM-CSF Sur expression was detected in DC cells; High-level expression of HLA-DR, CD1a, CD80, CD86, CD83 were found in transfected DC cells; The ratio of CD8⁺ cells cultured with PHA/rhIL-2 were largely increased. The lyse rate of induced CTL cells to HT-29 cell were much higher than those of blank DC cells. **Conclusion** GM-CSF Sur gene modified DC cells could induce MHC-I specific cytotoxic T lymphocytes and strikingly raised DC cells antigen present function and could induce high effective and specific anti-cancer immunological effect.

Key words: Tumor; Dendritic cell; Fusion Gene; CTL; survivin

摘要: **目的** 研究转染融合基因(GM-CSF-survivin GM-CSF Sur)的树突状细胞(DC)在体外诱导高效而特异的抗肿瘤免疫效应。 **方法** 用 jetPEITM-Macrophage 转染体系,将构建的 GM-CSF Sur 融合基因转染入 DC,用流式细胞仪检测 DC 的表面分子 HLA-DR、CD83、CD80、CD86 表达的高低;用 LDH 法测定转染融合基因的 DC 诱导特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)杀伤肿瘤细胞(HT-29 和 OVCAR-3)的能力。 **结果** 转染融合基因的 DC 细胞中可检测到 GM-CSF Sur 融合蛋白的表达;DC 表面高表达 HLA-DR、CD83、CD80、CD86;PHA/rhIL-2 长期培养(21 d)的 T 细胞 CD8⁺ 比例明显增加;转染融合基因的 DC 对 HT-29 肿瘤细胞的杀伤率显著高于未修饰的 DC 的杀伤率。 **结论** GM-CSF Sur 基因转染修饰的 DC 能选择性诱导 MHC-I 类分子限制的 CTL 的特异性,显著提高 DC 的抗原提呈功能和诱导高效而特异的抗肿瘤免疫效应。

关键词: 肿瘤; 树突状细胞; 融合基因; CTL; survivin;

中图分类号: R73-35⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2007)09-0647-04

0 引言

survivin 基因是一种新的抗凋亡基因,广泛表达于人的胚胎发育组织,在正常成人组织中不表

达,但在大多数肿瘤组织中表达,对肿瘤的发生、发展起着重要作用,是一个较为特异的肿瘤相关抗原(Tumor-associated antigen, TAA)基因^[1]。树突状细胞(Dendritic cell, DC)是体内重要的专职抗原提呈细胞,直接启动和调控机体特异性的抗肿瘤免疫应答^[2]。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)对 DC 的增殖分化、细胞活力以及抗原提呈功能有着重要的调节作用^[3]。我们构建的 GM-CSF-survivin 融合基因表达质粒(pcGM-CSF Sur)并转染人外周血来源诱导扩增的树突状细胞,探讨转染后 DC 的生物学特性及诱导产生的抗肿瘤

收稿日期:2007-01-22;修回日期:2007-06-04

基金项目:四川省科技厅应用基础资助项目(03JY029-103-2)

作者单位:1. 610041 成都,四川省肿瘤医院、四川省肿瘤医院研究所; 2. 吉林大学疫苗中心

通讯作者:黄建鸣, E-mail: wesleyhuangcn2002@yahoo.com.cn

作者简介:张文彬(1963-),男,硕士,副研究员,主要从事肿瘤免疫学研究

免疫效应。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂

pcDNA3.1(-) 购自 invitrogen 公司。HT-29 细胞株、GM-CSF 基因由四川康龙生物医学有限公司惠赠。survivin 基因由本科室从 HT-29 细胞中克隆获得,经 DNA 测序与 GenBank 上收录的 survivin 序列一致。各种限制性内切酶、连接酶购自 TaKaRa 公司。LDH 细胞毒分析盒(Cytotox96) 购于 Promega 公司;jetPEITM-Macrophage 转染体系购自 polyplus-transfection 公司、人白细胞介素-4(IL-4)、GM-CSF 购自晶美生物公司。CD1a、CD80、CD83、CD86、HLA-DR 单抗由华西医院肿瘤生物实验室提供。

1.2 GM-CSF 与 survivin 基因的连接

以 GM-CSF 基因 DNA 为模板,pGM-1、pGM127 为引物进行 PCR 扩增。以 survivin 为模板,Psur01、Psur02 为引物进行 PCR 扩增。扩增 DNA 纯化后,BamHI 内切酶 37 酶切 2 h,37 15 min 热终止反应,反应物纯化后加入 T4DNA ligase,16 连接 18 h。GM-CSF 与缺失八个氨基端氨基酸的 survivin 之间加入一段含三个重复氨基酸残基序列为 GGGGS 的肽段。利用氨基酸密码的同义突变,在连接子碱基序列的中间位置形成一个 BamHI 内切位点。

1.3 pcGM- Sur 质粒构建

以上述连接物为模板,pGM-1、pSur02 为引物,反应条件同。反应物经纯化后,分别经 EcoRI、Hind 酶切。质粒 pcDNA 3.1(-)DNA 经同样处理。酶切后纯化 DNA 并定量。取酶切后纯化的 GM-CSF-survivin DNA 5 μg,pcDNA3.1(-) 质粒 DNA 1 μg,10 U T4 DNA ligase,反应体系为 20 μl。16 保温 20 h。取连接产物 10 μl 转化感受态大肠杆菌 DH52。接种氨苄青霉素平板。挑取克隆扩增培养,提取质粒,经 PCR 扩增初步获得 pcGM- Sur 阳性质粒。质粒经酶切电泳鉴定。

PGM-1 :-5 GCGAATTCTA GACA TGGCACCCGCCG CTCGCC-3 ,

PGM127 :-5 CCGGA TCCACCGCCACCACTCCCTCCG CCACCCCTCTGGACTGGCTC-3 ;

Psur01 :-5 GA GGA TCCGGTGGCGGA GGGAGTGGCG CCTGGCAGCCCTTTCTC-3 ,

Psur02 :-5 GGAA GCTTTCAA TCCATGGCAGCCA GC TG3 。

1.4 DC 的诱导扩增

采集健康自愿者外周血,肝素抗凝,用淋巴细胞

分离液分离,收集单个核细胞层,用含 20% NCS(小牛血清)的 RPMI1640 培养液调细胞浓度为 2×10^6 /ml,制成细胞悬液。取 1 ml 接种于 24 孔板中,于 5% CO₂、37 孵育 2 h 后,吸出未贴壁的细胞备用。补加少许 20% NCS RPMI1640 使 GM-CSF (1 500 ng/ml)和 IL-4 (5 000 U/ml),终浓度分别为 150 ng/ml 和 500 U/ml,置于 5% CO₂、37 培养,每隔一天半量换液,至第 7 d 收集 DC。分别用 CD1a、CD80、CD83、CD86、HLA-DR 单抗标记,流式细胞仪鉴定细胞表型。

1.5 pGM- Sur 转染 DC

收集培养 7 天的 DC,转入 12 孔板培养,细胞浓度为 2×10^5 /ml,分别加入 GM-CSF (1 500 ng/ml)和 IL-4 (5 000 U/ml),至终浓度分别为 75 ng/ml 和 250 U/ml;再分别加入含 pGM- SurDNA 质粒和 pcDNA 质粒(对照)的转染液(jetPEITM-Macrophage)0.1 ml,24 h 后,收集细胞,除去转染液,继续于 GM-CSF 和 IL-4 条件下培养 24 h,收集细胞和培养上清,提取蛋白做 Western blot 检测。

1.6 转染融合基因 DC 转录表达的 Western blot 检测

用甲醇-氯仿法沉淀上清中蛋白。以 2 × SDS 上样缓冲液裂解细胞,提取 pGM- SurDCs 中蛋白和 pcDNA DCs 中蛋白;Western blot 按常规方法进行。

1.7 CD8⁺ T 细胞的诱导扩增

上述未贴壁的单核细胞悬浮于 10 ml 10% NCS RPMI1640 培养基中,加入适量 PHA,于 5% CO₂、37 培养 3 d 后,再用 rhIL-2 诱导扩增,每隔 2 d 换液,至 21 d 收集细胞,分别用 CD3、CD4、CD8 单抗标记,在流式细胞仪上鉴定细胞表型。

1.8 转染 GM- Sur 融合基因 DC 诱导致敏 CTL 及其细胞毒试验

上述诱导 21 d 的 CD8⁺ T 细胞和未诱导的 Naive T 细胞,悬于 10% NCS RPMI1640 培养液中,调细胞浓度为 2×10^6 /ml,接种于 12 孔培养板内,分别加入 1×10^5 pcGM- Sur、pcDNA 转染和未转染的 DC 细胞,再加入 rh-IL-2 至终浓度为 250 IU/ml,于 5% CO₂、37 混合培养 4 ~ 5 d,作为 CTL 效应细胞;另取呈指数生长的 H-29 和 OVCAR-3 细胞,用培养液调细胞浓度至 1×10^4 /ml 作为靶细胞。效靶比按 20:1 ~ 2.5:1 比例混合,置 5% CO₂、37 培养 20 ~ 24 h。然后采用 LDH 法检测特异性杀伤率,并按下列公式计算特异性杀伤率:特异性细胞杀伤率(%) = [效靶 OD - (效应细胞自然释放 OD + 靶细胞自然释放 OD)] / [(靶细胞最大释放

OD - 靶细胞自然释放 OD)] ×100。

2 结果

2.1 诱导扩增 DC 的形态学观察及表型

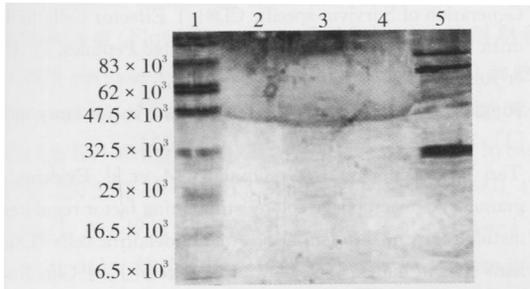
经淋巴细胞分离液梯度离心,从外周血获得单个核细胞,加入 GM-CSF、IL-4 培养 24 h 后,可见有细胞由贴壁变为悬浮,并有少量细胞聚生,至第 4~5 d 大量细胞聚集成团,第 7 d 部分细胞形状不规则,高倍镜下可见有毛刺状突起,为典型的 DC 形态,见图 1。培养第 7 d 的 DC,经 FACS 分析显示 DC 不仅表达其特异性标志 CD1a(25.9%),而且高表达 CD80(98.4%)、CD83(97.0%)、CD86(97.8%)、HLA-DR(16.4%)。经 pcGM-Sur 基因转染的 DC 同样高表达 CD80(99.0%)、CD83(99.0%)、CD86(99.7%)、HLA-DR(20.8%)。

2.2 质粒鉴定

碱基序列测定:样品送北京三博远志生物技术有限责任公司进行 DNA 测序,结果与设计序列完全一致。

2.3 Western blot 检测 GM-Sur 蛋白表达

转染 pcGM-Sur 质粒的 DC 可检测到融合蛋白的表达,而转染的空载体和空白对照的 DC 未检测到融合蛋白存在,表明转染 pcGM-Sur 基因成功,见图 2。



1: protein marker; 2: 未转染的上清; 3: 转染的上清; 4: 转染 pcDNA; 5: 转染的细胞

图 2 GM-Sur 融合蛋白免疫印迹结果

2.4 CTL 和 Naive T 细胞的表型

表 1 显示,PHA 和 rhIL-2 活化诱导的 T 细胞 CD8⁺ T 细胞的比例(80.3%)明显高于未诱导的 T 细胞(45.9%);相反,CD4⁺ T 细胞的比例(15.2%)明显低于未诱导的 T 细胞(38.1%)。

2.5 CTL 对靶细胞的特异性杀伤率

结果见图 3。各实验组对靶细胞的杀伤率明显高于 pcDNA 组、DC 组,且随着效靶比的增加而升高。提示 PHA/rhIL-2 诱导的 CD8⁺ 占优势的 T 细胞对 HT-29 和 OVCAR-3 瘤细胞的杀伤活性均高于 Naive T 细胞,转染 pcGM-Sur 基因的 DC 细

表 1 效应细胞的表型

Gnoup	the long-term culture of CTLs		Naive Ts	
	%		%	
CD3	92.0		85.3	
CD8	80.3		45.9	
CD4	15.2		38.1	

胞可选择性递呈 survivin 抗原肽给 MHC-I 分子限制的 CD8⁺ T 细胞,诱导致敏更多的 survivin 特异性 CTL,增强对高表达 survivin 的肿瘤细胞的杀伤作用。

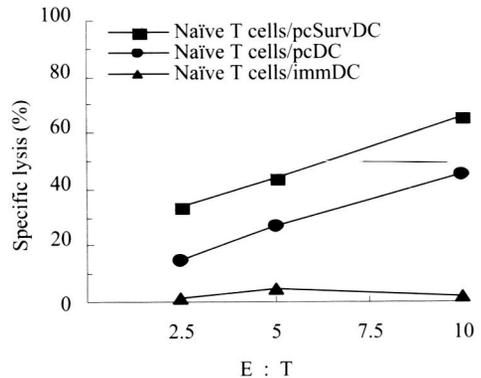


图 3 不同效靶比下 T 细胞对靶细胞的杀伤率

3 讨论

近年来利用 DC 疫苗治疗人类癌症(如前列腺癌、黑色素瘤、肾癌、恶性淋巴瘤已进入 I 期)已取得预期效果^[4]。应用相关基因修饰 DC 来增强机体抗肿瘤免疫成为肿瘤免疫治疗的一种新途径^[5,6]。本实验在前期工作的基础上,用本室构建的 pcGM-Sur 质粒转染 DC 并进行抗肿瘤实验。

由于 survivin 在肿瘤细胞表达的特异性及其抗凋亡功能,survivin 已成为肿瘤免疫治疗和基因治疗的新靶点^[7-10]。用 survivin 肽段、survivin 基因和 survivin mRNA 来活化树突状细胞,诱导能攻击肿瘤细胞的特异 CTL 产生的研究已有报道^[11-14]。DC 在受到外来抗原刺激分化成熟期间,受包括 GM-CSF 等多种细胞因子的调节,GM-CSF 不仅能促进 DC 增殖分化,而且对树突状细胞的体内分布及其抗原提呈功能都有一定的调节作用^[15,16]。

目前,国内外已有实验成功地将 survivin 基因转染至 DC^[17],同时也有实验将 GM-CSF 基因转染至 DC^[18],均取得了较好的抗肿瘤效果。本实验则期望将两种能增强 DC 疫苗免疫活性的基因同时转入 DC 内,从不同的免疫途径提高 DC 疫苗抗肿瘤效果。基于这种思路,我们成功地构建了 pcGM-Sur 质粒,并将该质粒转染至从外周血培养出来的

DC, 试图制备效果更好、持续时间更长的 DC 疫苗。为了最大限度的保留 survivin 抗原决定簇部位, 同时又避免野生型 survivin 基因的导入可能引起的细胞抗凋亡等副作用, 以及避免点突变型 survivin 基因导入细胞后可能发生的与染色体 survivin 基因的交流重组, 我们构建了 N 端缺失 7 个氨基酸残基的 7survivin/ GM-CSF 基因真核表达质粒 (在细胞内, survivin N 端前 7 个氨基酸对形成 survivin 二聚体起了重要作用^[19]), 并将其转染于人外周血分离诱导的树突状细胞, 观察由此诱导产生的抗肿瘤细胞免疫效应。

结果证明, 转染后 DC 保持了原有的形态、表面标志 CD80、CD83、CD86、HLA-DR 表达均有不同程度升高。众所周知, CD80、CD86 是 DC 表面重要的共刺激分子, 有利于 DC 的抗原提呈作用。体外实验表明转染融合基因后的 DC 更具有抗原提呈作用, 转染 pcGM-Sur 质粒的 DC 对 HT-29 细胞的杀伤率明显高于未转染质粒的 DC 和转染空质粒的 DC。

本实验初步证实, 转 pcGM-Sur 基因的 DC 可选择性递呈 MHC-I 类分子限制的 survivin 抗原肽, 诱导产生 survivin 特异性 CTL, 发挥特异性杀伤肿瘤细胞的作用。同时还表明将融合的 GM-Sur 基因转入 DC 后能显著提高 DC 的抗原提呈功能, 体外能诱导高效的抗原免疫效应。其作用原理有待进一步探索。

(本文图 1 见第 736 页)

参考文献:

- [1] Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, et al. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death[J]. *Oncogene*, 2005, 24(12): 1994-2007.
- [2] Dallal R M, Lotze M T. The dendritic cell and human cancer vaccines[J]. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12(5): 583-588.
- [3] Cao X, Zhang W, Wang J, et al. Therapy of established tumor with a hybrid cellular vaccine generated by using granulocyte-macrophage colony-stimulating genetically modified dendritic cell[J]. *Immunology*, 1999, 97(4): 616-625.
- [4] Beatrice S T, Erwin S S, Thomas G B, et al. Rapid induction of tumor-specific type I T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-load monocyte-derived dendritic cells[J]. *J Exp Med*, 2002, 195(10): 1279-1288.
- [5] Zeis M, Siegel S, Wagner A, et al. Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA transfected dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2003, 170(11): 5391-5397.
- [6] Heiser A, Maurice M A, Yancey D R, et al. Human dendritic cells transfected with renal tumour RNA stimulate polyclonal T-Cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumours[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(8): 3388-3393.
- [7] Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8581-8589.
- [8] O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, et al. Altieri DC Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(2): 393-398.
- [9] Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(25): 23130-23140.
- [10] Asanuma K, Moriai R, Yajima T, et al. Survivin as a radio-resistance factor in pancreatic cancer[J]. *Jap J Cancer Res*, 2000, 91(11): 1204-1209.
- [11] Matthias Zeis, Sandra Siegel, Andreas Wagner, et al. Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells[J]. *The Journal of Immunology*, 2003, 170(11): 5391-5397.
- [12] Andersen MH, Podersen LO, Capeller B, et al. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16): 5964-5968.
- [13] Margaret M, Bachinsky, Darlene E, et al. Judith Singleton, Mapping and binding analysis of peptides derived from the tumor-associated Cancer Immunol. antigen survivin for eight HLA alleles[J]. *Cancer Immunity*, 2005, 5: 6-9.
- [14] Marc Schmitz, Petra Diestelkoetter, Bernd Weigle, et al. Generation of Survivin-specific CD81 T Effector Cells by Dendritic Cells Pulsed with Protein or Selected Peptides[J]. *Cancer Research*, 2000, 60(17): 4845-4849.
- [15] Stingl G, Bergstresser P. Dendritic cells: a major story unfolds[J]. *Immunol Today*, 1995, 16(7): 330-333.
- [16] Tazi A, Bouchonnet F, Grandsaigne M, et al. Evidence that granulocyte macrophage colony-stimulating factor regulates the distribution and differentiation state of dendritic cells/Langerhans cells in human lung and lung cancers[J]. *J Clin Invest*, 1993, 91(2): 566-576.
- [17] Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, et al. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(22): 5071-5074.
- [18] Christopher J. Kirk, Review: Gene-Modified Dendritic Cells for Use in Tumor Vaccines[J]. *Human Gene Therapy*, 2000, 11(6): 797-806.
- [19] Chantalat L, Skoufias DA, Kleman JP, et al. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual α -helical extensions[J]. *Mol Cell*, 2000, 6(1): 183-189.

[编辑校对: 刘红武]

转染融合基因的 DC 抗肿瘤免疫效应

(正文见 647 页)

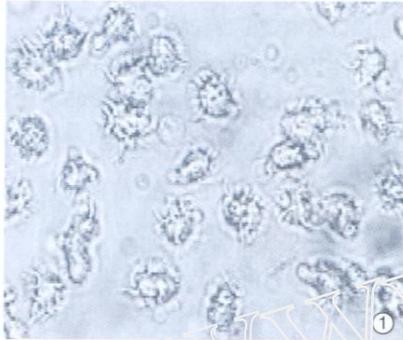
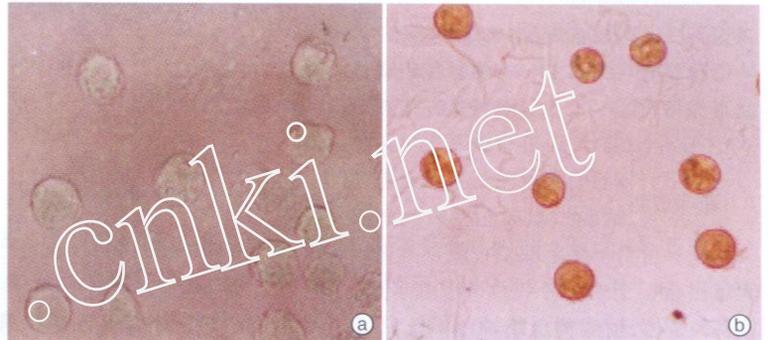


图 1 倒置显微镜下 DC 形态 (×400)

葛根黄酮提取物对 HL-60 细胞 增殖和凋亡的影响

(正文见 671 页)



a. 对照组; b. 葛根黄酮提取物处理 3d 组
图 5 TUNEL 法检测 HL-60 细胞凋亡 (×400)

鼻 NK/T 细胞淋巴瘤的免疫表型、EBV 感染及 TCR γ 基因重排的检测

(正文见 693 页)

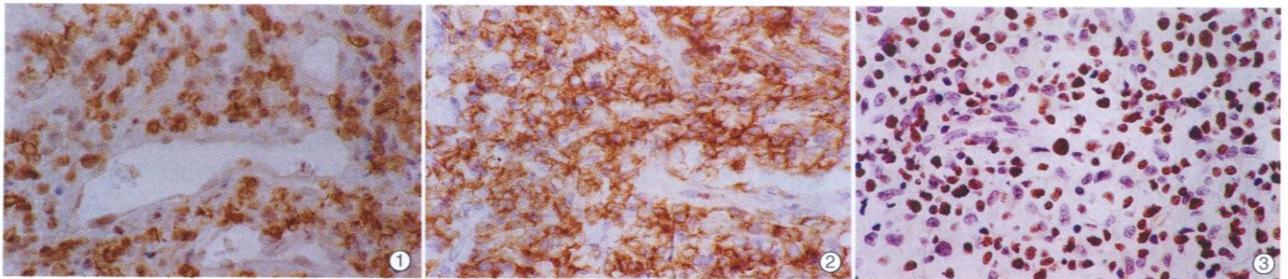


图 1 鼻 NK/TCL 的瘤细胞表达 CD3 阳性定位于细胞质 (SP ×400)
图 2 鼻 NK/TCL 的瘤细胞表达 CD56 阳性定位于细胞膜 (SP ×400)
图 3 鼻 NK/TCL 的瘤细胞 EBV 阳性, 细胞核棕黄色 (ISH ×400)

替尼泊甙对胃癌细胞凋亡及细胞周期的影响

(正文见 654 页)

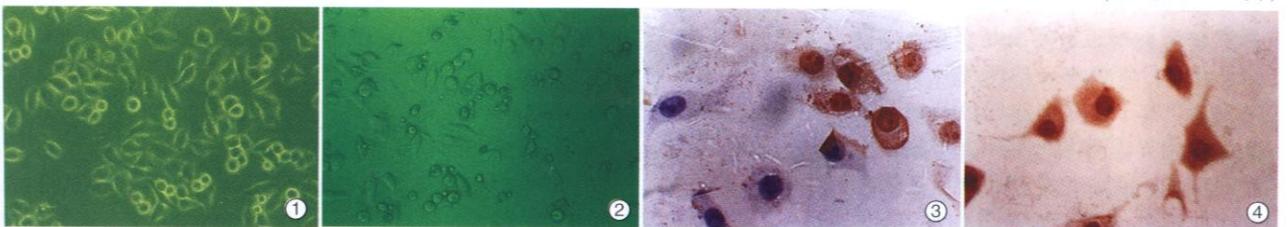


图 1 对照培养 48h 的细胞生长图 (绿色滤光片 ×20) 图 2 VM-26 作用 48h 的细胞生长图 (绿色滤光片 ×20)
图 3 VM-26 作用 48h 对照组 p53 蛋白的表达, 细胞核内可见棕褐色颗粒 (SP ×100)
图 4 VM-26 作用 48h 实验组 p53 蛋白的表达, 细胞核内可见棕褐色颗粒 (SP ×100)