

负载肺癌抗原 DC 疫苗抗肿瘤免疫实验

张洁¹, 林苹¹, 陆燕蓉², 王琪¹, 宁其志¹

Antitumor Immune Experiment of Dendritic Cell Vaccine Loaded with Lung Cancer Antigen

ZHANG Jie¹, LIN Ping¹, LU Yan-rong², WANG Qi¹, NING Qi-zhi¹

1. Laboratory of Geriatrics, National Key Laboratory of Biotherapy and Cancer Center, West China Hospital, West China Medical School, Sichuan University, Chengdu 610041, China, 2. Laboratory of Transplant Immunology, Key Laboratory of Ministry of Education

Corresponding Author: LU Yan-rong, E-mail: zhangjie909@sina.com

Abstract :Objective To investigate the antitumor effect of dendritic cell vaccine loaded with the human lung cancer associated antigens. **Methods** The monocytes were separated from human umbilicus cord blood cells and cultured for dendritic cells (UbDC) with rhGM-CSF, rhIL-4 and rhTNF- α in RPMI 1640 medium. The human lung cancer cells A549 cytolysis antigen and LPS were added into the medium. Successively for loading the A549 antigen on UbDC and promoting DCs mature. The mature DC vaccine loaded with A549 cytolysis antigen (UbDC/AgL) was sorted by magnetic beads. MTT assay was employed to test the auto mix lymphocyte reaction (AMLR). LDH release assay was carried out to assess the killing ability of CTL cells against A549 lung cancer cells. The level of human IL-1, IL-12, IL-6 and TNF- α in the culture supernatant was determined by ELISA. **Results** The level of human IL-1, IL-12, IL-6 and TNF- α in the culture supernatant of UbDC/AgL were higher than that of UbDC/Ag and UbDC separately ($P < 0.01$). The special CTL cells had significant cytotoxicity against A549 cells ($P < 0.01$) and inducement lymphopoiesis availability. **Conclusion** The dendritic cell vaccine loaded with tumor cytolysis antigen can activate naive T lymphocyte and induce specific antitumor immune response efficiently.

Key words :Dendritic cells; Tumor antigen; Vaccine; Antitumor immunity

摘要:目的 探讨负载人肺癌细胞株 A549 冻融抗原 DC 疫苗体外抗肿瘤免疫效应。方法 自脐血分离单核细胞,经 rhGM-CSF、rhIL-4 和 rhTNF- α 诱导树突状细胞(DC),负载人肺癌细胞株 A549 冻融抗原、LPS 诱导成熟,利用免疫磁珠分选获得功能性肺癌 DC 疫苗(UbDC/AgL),ELISA 测定 UbDC/AgL 培养上清中细胞因子浓度,LDH 法测定特异性细胞杀伤(CTL)活性及 MTT 法检测自身混合淋巴细胞反应(AMLR)。结果 UbDC/AgL 细胞组 IL-1、IL-12、IL-6 和 IFN- γ 含量明显高于 UbDC/Ag 和 UbDC 组($P < 0.01$);UbDC/AgL 疫苗细胞能有效诱导肿瘤特异性 CTL 活性,对 A549 细胞有特异性杀伤作用($P < 0.01$),并能有效促进淋巴细胞增殖。结论 负载肿瘤冻融抗原 DC 疫苗,能有效激活 T 淋巴细胞进而诱导肿瘤特异性杀伤效应。

关键词:树突状细胞;肿瘤抗原;疫苗;抗肿瘤免疫

中图分类号:R73-35 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)03-0153-04

0 引言

树突状细胞(Dendritic cell, DC)作为机体最重要的专职性抗原提呈细胞,分化成熟与否直接影响

T 细胞介导的免疫反应^[1]。目前对 DC 疫苗的研究主要通过前体 DC 分选后诱导分化,获得的 DC 处于未成熟或半成熟状态^[2],而诱导分化后获得的 DC 再进行成熟性分选的研究未见报道。本研究采用细胞因子诱导后,利用免疫磁珠分选获得更纯的负载抗原的功能性(成熟)DC 疫苗,探讨其抗肿瘤免疫效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 脐血 足月正常分娩产妇脐血,每份 100 ~

收稿日期:2007-04-03;修回日期:2007-06-12
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270588)
作者单位:1. 610041 成都,四川大学华西医院国家重点实验室老年医学研究室,2. 教育部重点实验室移植免疫研究室

通讯作者:陆燕蓉, E-mail: zhangjie909@sina.com
作者简介:张洁(1964-),女,学士,助研,主要从事肿瘤免疫学研究

150 ml,共约 400 ml。

1.1.2 细胞株 人肺癌细胞株 A549、人肝癌细胞株 SMMC7721 由本室传代培养。

1.1.3 培养基及主要试剂 RPMI1640 培养基 (Gibco),重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF)、重组人肿瘤坏死因子 (rhTNF⁻) 及重组人白细胞介素 4 (rhIL-4) (R&D Systems), 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 及丝裂霉素 C (Mytomicin C) (Sigma), 细胞因子培养基: 10% 胎牛血清 (FBS) RPMI1640 培养液中加入 rhGM-CSF 100 ng/ml、rhTNF⁻ 50 ng/ml 和 rhIL-4 50 ng/ml。

1.1.4 检测试剂盒 人 IL-6、IL-12、TNF⁻ 及 IL-1 ELISA Kit (R&D Systems); Anti-FITC MicroBeads Kit 磁珠分选试剂盒 (Miltenyi biotec)。

1.1.5 荧光标记单克隆抗体 抗人 CD1a-PE、抗人 CD1a-FITC、抗人 CD40-FITC、抗人 CD86-FITC、抗人 HLA-DR-FITC 单克隆抗体 (BD Biosciences Pharmingen); 抗人 CD83-FITC 单克隆抗体 (Immunotech)。

1.2 方法

1.2.1 负载肿瘤抗原 DC 疫苗的制备、诱导及分选

取脐血经淋巴细胞分离液梯度离心、贴壁法制备 UbDC, 培养于细胞因子培养液中, 同时收集悬浮细胞培养于含 rhIL-2 50 ng/ml、10% FBS RPMI 1640 培养液作为脐血淋巴细胞; 收集对数生长期 A549 细胞株, 冻融法制备抗原; 按细胞数 10¹ 将 UbDC 细胞与 A549 细胞冻融抗原混合培养 24 h, 分为两组: (1) LPS 刺激组: 加入 LPS (终浓度 100 ng/ml) 诱导培养 48 h 后, 运用 FITC 荧光标记的抗人 CD83 单克隆抗体, 利用 Anti-FITC MicroBeads Kit 免疫磁珠分选试剂盒, 获得的 DC 疫苗即 UbDC/AgL; (2) LPS 未刺激组: 未加 LPS 诱导的 DC 疫苗 UbDC/Ag。

1.2.2 细胞表面分子表达 分别收集 UbDC/AgL、UbDC/Ag 及 UbDC 细胞, 加入 FITC 标记单克隆抗体, 流式细胞仪检测细胞表面分子表达。

1.2.3 自身混合淋巴细胞反应 (AMLR) 经淋巴细胞分离液、采用贴壁法制备同份脐血淋巴细胞作为反应细胞; 收集 UbDC/AgL、UbDC/Ag、UbDC 及 A549 细胞株, 经丝裂霉素 C 处理作为刺激细胞。按刺激细胞、反应细胞分别为 1:25、1:50、1:100, 均为三复孔, 采用 MTT 法测定 AMLR, Bio-rad 680 型酶标仪测定 570 nm 吸光度 (A) 值, 计算刺激指数 SI。

刺激指数 (SI) = 实验组 A₅₇₀ / 对照组 A₅₇₀

1.2.4 体外诱导 CTL 活性测定 收集 UbDC/

AgL、UbDC/Ag、UbDC 及 A549 冻融抗原, 分别与同份脐血淋巴细胞按 1:20 比例加入 6 孔板, 置 37^oC、5% CO₂ 培养箱共孵育 24 h, 制备 CTL (效应细胞); 收集对数生长期 A549 和 SMMC7721 细胞株作为靶细胞; 按不同效靶比 25:1、50:1 和 100:1, 分别加入效应细胞, 均为三复孔, 采用 LDH 法测定 CTL 活性, Bio-rad 680 型酶标仪测定 570 nm 波长吸光度 (A) 值。CTL 杀伤率 (%) = [(实验组 A₅₇₀ - 效自然释放组 A₅₇₀) / (靶自然释放组 A₅₇₀ - 靶最大释放组 A₅₇₀)] × 100%

1.2.5 ELISA 法测定细胞因子分泌 收集 UbDC/AgL、UbDC/Ag、UbDC 细胞, 按 5 × 10⁵ / 孔接种在 6 孔板内, 置 CO₂ 培养箱中培养 4 天, 收集培养上清液, 测定细胞因子 IL-1 及 IL-12 含量; 分别收集各组 AMLR 培养 96 h 后的上清, 测定细胞因子 IL-6 及 TNF⁻ 浓度。

1.3 统计学方法

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 统计软件作 t 检验和方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌 DC 疫苗鉴定

自脐血分离得单个核细胞于细胞因子培养液中, 第 3 天开始细胞表面出现长短不一的树棘状突起, 细胞呈簇状生长, 出现典型树突状细胞形态学改变; FCM 测定结果显示 UbDC/AgL 细胞表面高表达 CD40 (70.25 ± 5.8) %、CD83 (53.53 ± 5.8) %、CD86 (67.56 ± 6.5) % 及 HLA-DR (82.36 ± 6.5) % 分子; 通过 CD83 免疫磁珠阳性分选后获得的细胞经 FCM 检测, 结果显示 90% 以上表达 CD1a, 见图 1。

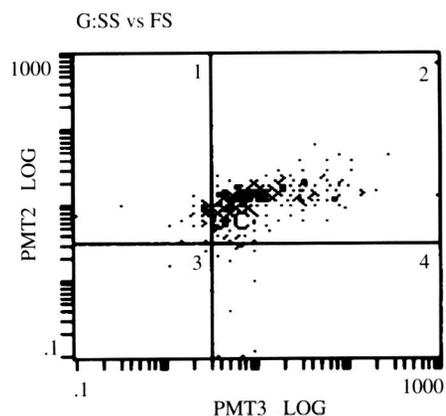


图 1 UbDC/AgL 经 CD83 磁珠分选后 FCM 测定 CD1a 表达

2.2 刺激淋巴细胞增殖反应

MTT 法测定不同刺激组 UbDC/AgL、UbDC/Ag、UbDC 及生理盐水 (NS) 组 AMLR, SI 分别为

3.91 ± 0.18^{*}、1.41 ± 0.17、1.83 ± 0.21 和 1.21 ± 0.15 (* 与其他组比较 $P < 0.01$)。

2.3 激发 T 淋巴细胞特异性杀伤作用

不同类型 DC 诱导 CTL 对靶细胞 A549 杀伤活性比较,见图 2。

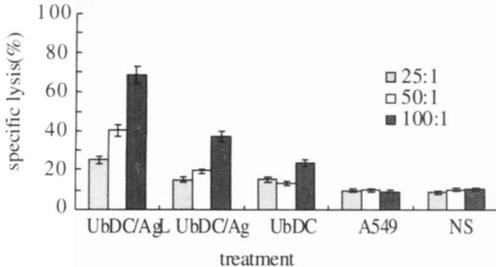


图 2 负载 A549 冻融抗原 DC 诱导 CTL 对 A549 细胞的特异杀伤活性(%)

不同类型 DC 诱导 CTL 对不同靶细胞 A549、SMMC7721 杀伤活性比较,见图 3。

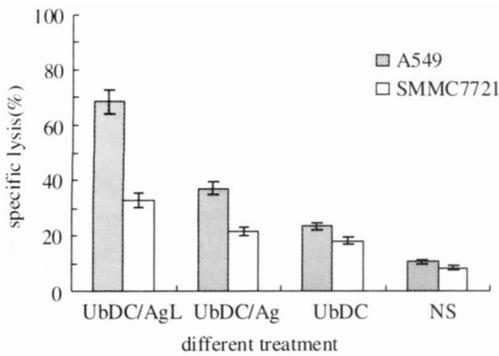


图 3 负载 A549 冻融抗原 DC 诱导 CTL 对不同靶细胞的杀伤活性(%)

2.4 培养上清中细胞因子浓度测定结果

不同类型 DC 细胞培养上清中,细胞因子浓度检测结果,见表 1。

表 1 负载 A549 冻融抗原及 LPS 诱导对 DC 自分泌细胞因子的影响

细胞因子含量	UbDC/ AgL	UbDC/ Ag	UbDC
IL-1 (pg/ml)	1 187 ± 72 ^a	388 ± 85	53 ± 69
IL-12 (pg/ml)	1 607 ± 95 ^b	312 ± 82	52 ± 65

注:分别与 UbDC/ Ag 和 UbDC 组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.01$

AMLR 培养 96 h 后,不同刺激组细胞上清中 IL-6、TNF- α 含量测定结果,见表 2。

3 讨论

树突状细胞作为机体内免疫反应的始动子和调节子,在机体抗肿瘤免疫反应中极其重要,是近年来免疫学研究中最活跃的领域。

表 2 各组 AMLR 培养 96 h 后上清中细胞因子含量

MLR 上清 细胞因子含量	刺激组			
	UbDC/ AgL	UbDC/ Ag	UbDC	A549
IL-6 (pg/ml)	2 178 ± 75 [#]	912 ± 92	82 ± 78	51 ± 36
TNF- α (pg/ml)	1 052 ± 66 [*]	416 ± 87	15 ± 10	15 ± 8

注:分别与 UbDC/ Ag、UbDC 及 A549 刺激组比较,[#] $P < 0.01$,^{*} $P < 0.01$

体外诱导树突状细胞方法有多种,脐血来源丰富,已有利用脐血成功诱导 DC 的报道^[3]。目前 CD1a 和 CD83 被广泛作为人 DC 的相对特异性标志,LPS 作为免疫调节因子可以促进 DC 成熟从而增强抗原提呈功能。本研究制备的 UbDC/ AgL 细胞,经 FCM 检测显示细胞表面高表达 CD40、CD83、CD86 及 HLA-DR 等 DC 成熟表面标志,CD1a 表达率 90% 是 UbDC/ AgL 培养上清 IL-1、IL-12 细胞因子含量明显高于其他实验组 ($P < 0.01$),表明 DC 在本细胞因子联合诱导体系中能增殖生长,分选获得的 UbDC/ AgL 疫苗细胞纯度更高、成熟度更高,能更好满足实验研究的需要。

在肿瘤发生发展过程中,肿瘤抗原不能有效呈递给 T 细胞是导致免疫逃逸的重要原因。同时在荷瘤机体中,由于存在抗原递呈细胞的功能低下甚至缺陷,特别是 DC 在数量和功能的改变,可造成肿瘤细胞逃避机体的免疫监视,导致肿瘤的形成和发展^[4]。利用成熟 DC 负载肿瘤抗原制备出高效 DC 疫苗,是目前研究的热点,也是能否诱导肿瘤特异性 CTL 产生的关键所在^[5,6]。目前已研究出多种 DC 负载抗原的方法^[7],其中冻融裂解法获得肿瘤全抗原,无需明确肿瘤抗原具体的抗原成份,而有多种不同肿瘤抗原成分同时刺激 DC,诱导出针对不同抗原决定簇的特异性 CTL,该法具有潜在的优势。

本研究中 DC 经抗原致敏诱导的 CTL 杀伤作用随着效靶比的增加而相应提高,显示了杀伤活性的量效关系,与国内外研究结果一致^[8,9]。本实验采用冻融法制备负载肺癌抗原 UbDC/ AgL 疫苗细胞,经 AMLR 刺激指数以及培养上清中 IL-6 和 TNF- α 含量测定显示,UbDC/ AgL 疫苗能显著促进淋巴细胞增殖及多种细胞因子分泌 ($P < 0.01$);同时 UbDC/ AgL 对 A549 杀伤活性显著高于无关靶细胞 SMMC7721 ($P < 0.01$),并且 UbDC/ AgL 疫苗细胞诱导 CTL 杀伤活性分别与 UbDC/ Ag、UbDC 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),随着效/靶增加其杀伤活性增高,表明 UbDC/ AgL 疫苗细胞能有效捕获、提呈肺癌抗原并诱导出具有肿瘤特异性的 CTLs,产生特异、高效抗肿瘤效应,具有良好的临床应用前景。

(致谢:四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室毛咏秋老师、雷松老师。)

参考文献:

[1] Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, et al. Antigen specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cell[J]. *Exp Med*, 2001, 193: 233-241.

[2] Bergant M, Meden L, Repink U, et al. Preparation of native and amplified tumour RNA for dendritic cell transfection and generation of in vitro anti-tumour CTL responses[J]. *Immunobiology*, 2006, 211(3): 179-189.

[3] Rossowska J, Pajtasz-Piasecka E. Dendritic cells and their applications in cancer immunotherapy-achievements and future prospects[J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2003, 57(5): 501-518.

[4] Schakel K, Mayer E, Federle C, et al. A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb(M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes[J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(12): 4084-4093.

[5] Imura k, Ueda Y, Hayashi T, Induction of cytotoxic T lymphocytes against human cancer cell lines using dendritic cell-tumor cell hybrids generated by a newly developed electrofusion technique[J]. *Int Oncol*, 2006, 29(3): 531-539.

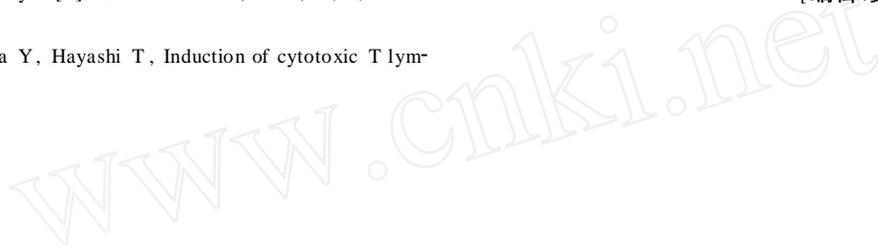
[6] 张希国, 师建国, 刘彦仿, 等. 比较两类树突状细胞激活的肿瘤特异性 CTL 对肝癌荷瘤裸鼠的治疗作用[J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(7): 22-24.

[7] Galea LJ, Wells JW, Darling D, et al. Strategies for antigen choice and priming of dendritic cells influence the polarization and efficacy of antitumor T cell responses in dendritic cell based cancer vaccination[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53: 9639-9648.

[8] Angel P, Eli G. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocyte[J]. *Exp Med*, 1995, 182(1): 255-260.

[9] Goddard RV, Prentice AG, Copplestone JA, et al. In vitro dendritic cell-induced T cell responses to B cell chronic lymphocytic leukaemia enhanced by IL-15 and dendritic cell-B-CLL electrofusion hybrids[J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 131(1): 82-89.

[编辑:贺文;校对:安凤]



· 简讯 ·

欢迎订阅《肿瘤防治研究》杂志

《肿瘤防治研究》杂志是我国创办的第一本独立的全国性肿瘤学术期刊,由中华人民共和国卫生部主管,历史悠久,有着深厚的学术底蕴。

该刊为中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊、湖北省优秀医学期刊,是中国期刊全文数据库、万方数据库、中文科技期刊数据库、中文生物医学期刊文献数据库收录期刊,并被美国《化学文摘》、波兰《哥白尼索引》等多家国外大型数据库列为收录来源刊。

主要栏目有:基础研究、临床研究、临床诊断、临床应用、流行病学、研究简报、技术交流、论著摘要、综述、短篇个案、简讯等。读者对象为肿瘤防治研究工作者及相关专业的高中级医务人员。以报道国内外肿瘤学领域最新进展及临床实践新成果为主。是了解我国肿瘤防治研究领域主要成果的一个重要窗口。

该刊为月刊,每月 25 日出版,A4 开本,80 页码。每期定价 8.00 元,全年 96 元。邮发代号:38-70,国际标准刊号:ISSN1000-8578,国内统一刊号:CN42-1241/R。欢迎订阅,欢迎投稿。如错过邮局征订,可直接向本刊编辑部邮订。

地址:武汉市武昌卓刀泉南路 116 号《肿瘤防治研究》编辑部
 邮政编码:430079
 电话/传真:027-87670126
 网址: <http://www.zlfzyj.com> E-mail: zlfzyj@263.net.cn