

# mRNA致敏树突细胞对胃癌的免疫治疗作用研究

罗治彬, 徐采朴, 朱高友, 张朋斌, 郭朝华, 罗元辉, 房殿春, 罗成基

徐采朴, 罗元辉, 房殿春, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化内科中心 重庆市 400038  
罗治彬, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心 重庆市 400042  
朱高友, 重庆市垫江高安中心医院 重庆市 408306  
张朋斌, 中国人民解放军第三军医大学新桥医院消化内科 重庆市 400037  
郭朝华, 罗成基, 中国人民解放军第三军医大学全军复合伤研究所 重庆市 400038  
罗治彬, 男, 1968-06-13 生, 重庆市垫江县人, 汉族. 2000 年第三军医大学博士研究生毕业, 讲师. 主要从事胃肠黏膜免疫和肿瘤免疫防治方面的研究, 已发表论文 26 篇.  
项目负责人: 罗治彬, 400042, 重庆市渝中区大坪长江支路 10 号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心. luozhibin@online.cq.cn  
电话: 023-68757346  
收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-02

## Immunotherapy of dendritic cells transfected with mRNA of gastric cancer cells in carried-tumor mice

Zhi-Bin Luo, Cai-Pu Xu, Gao-You Zhu, Peng-Bin Zhang, Chao-Hua Guo, Yuan-Hui Luo, Dian-Chun Fang, Cheng-Ji Luo

Cai-Pu Xu, Yuan-Hui Luo, Dian-Chun Fang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China  
Zhi-Bin Luo, Department of Oncology, The 3th Affiliated Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China  
Gao-You Zhu, Department of Gastroenterology, Gaoan Center Hospital, Dianjiang County, Chongqing 408306, China  
Peng-Bin Zhang, Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, China  
Chao-Hua Guo, Cheng-Ji Luo, Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Correspondence to: Dr. Zhi-Bin Luo, Department of Oncology, The 3th Affiliated Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. luozhibin@online.cq.cn  
Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

**AIM:** To probe into the possibility of dendritic cells (DC) in preventing solid carcinomas such as gastric cancer (GC).

**METHODS:** Immunotherapy was performed by DC sensitized by mRNA of gastric cancer cells.

**RESULTS:** The indices such as the production rate of ascites of mice (75%), the metastasis rate of tumor (25%), the survival rate of animals (75%) and the average weight of tumor ( $2.04 \pm 0.33$  g) showed that the condition of the mice treated by DC was better than that in the control group ( $P < 0.01$ ). And the level of gene expression of IL-12, IFN $\gamma$  and IL-18 in local tumor tissue was significantly raised ( $P < 0.01$ ) and the amount of local CD $_4^+$  ( $0.71 \pm 0.25/\mu\text{m}^2$ ) and CD $_8^+$  ( $0.67 \pm 0.22/\mu\text{m}^2$ ) cells was increased ( $P < 0.05$ ) and the cytotoxicity of TIL was remarkably enhanced.

**CONCLUSION:** DC transfected with mRNA isolated from mouse tumor cells may effectively control the growth of tumor and ameliorate the symptoms, suggesting that a certain therapeutic efficiency for mice carrying tumor can be realized.

Luo ZB, Xu CP, Zhu GY, Zhang PB, Guo CH, Luo YH, Fang DC, Luo CJ. Immunotherapy of dendritic cells transfected with mRNA of gastric cancer cells in carried-tumor mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):13-15

## 摘要

**目的:** 了解 DC 在胃癌胃黏膜中的功能状态, 探讨 DC 用于胃癌等实体瘤防治的可能性, 旨在为胃癌的治疗探索一条新的途径.

**方法:** 利用致敏 DC 治疗胃癌, 以观察其对荷胃癌小鼠的免疫治疗效果.

**结果:** 荷胃癌小鼠经胃癌细胞 RNA 致敏的 DC 治疗后, 小鼠腹水产生率、肿瘤转移率、动物的存活率、平均瘤体质量等指标分别为 75% (6/8)、25% (2/8)、75% (6/8)、( $2.04 \pm 0.33$  g), 均优于对照组 ( $P < 0.01$ ); 局部组织中 IL-12、IL-18 和 IFN $\gamma$  的基因表达水平都明显升高 ( $P < 0.01$ ); 肿瘤局部 CD $_4^+$ 、CD $_8^+$  细胞数量分别为  $0.71 \pm 0.25/\mu\text{m}^2$  和  $0.67 \pm 0.22/\mu\text{m}^2$ ,  $P < 0.05$ ), TIL 细胞毒活性明显增强.

**结论:** 胃癌 RNA 致敏的 DC, 能促进胃癌抗原的提呈并启动和增强局部的抗癌免疫功能, 改善临床症状和生存质量, 对荷胃癌小鼠具有一定的免疫治疗效果.

罗治彬, 徐采朴, 朱高友, 张朋斌, 郭朝华, 罗元辉, 房殿春, 罗成基. mRNA 致敏树突细胞对胃癌的免疫治疗作用研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):13-15  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/13.asp>

## 0 引言

树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内最有效的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell), 是 T 细胞依赖性免疫应答的重要辅助细胞<sup>[1-3]</sup>. 癌前状态胃黏膜中 DC 数量显著增多, 功能增强; 而胃癌患者胃黏膜中肿瘤浸润性树突状细胞(tumor infiltrating dendritic cell, TIDC)数量随分化程度的降低而减少, TIDC 提呈胃癌抗原引起宿主免疫抵抗的能力较弱, 胃黏膜中 DC 细胞功能的抑制是导致胃黏膜免疫功能低下和癌前状态发生癌变的重要原因之一<sup>[4-8]</sup>. 因此, 我们利用致敏 DC 对荷胃癌小鼠的免疫治疗效果如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料**  $^{60}\text{Co}$  射线放射源, 本院放射科提供; 台式低温冷冻离心机, MR1812, Jouar 公司生产, USA; PCR 循环仪, 2400 型, Perkin-Elmer 生产; 凝胶成像仪, Gel

Doc 2000 型, Bio-Rad 生产, USA; 图像分析仪, Tiger920 型, Germany 生产. 小鼠的前胃癌细胞 MFC (mouse forestomach carcinoma) 细胞系: 从中国科学院上海细胞所引进; IFN $\gamma$ 、IL-18 primer: 上海生工生物工程公司合成; Cytotoxicity Detection Kit (LDH) 和 Lipotectimin: 脂质体(DOTAP), 宝灵曼公司生产, Germany; Purified Rat anti-mouse CD $\alpha$  (Ly-2) mAb: cat#01041D, Phamingen 公司生产; Access RT-PCR System: cat# A1250, Promega 公司生产. 615 小鼠, SPF 级, 购自第三军医大学实验动物中心(川实动管使第 015 号, 川实动管质第 058 号), 6-8 周龄, 雌雄各半, 体重为  $23.2 \pm 1.5$  g, 随机分为 3 组: RNA-DC、PBS、灭活 MFC, 每组 8 只, 各组间质量无统计学差异.

1.2 方法 采用粒细胞巨噬细胞集落刺激因子从小鼠骨髓的 CD $34^+$  细胞中扩增、分离出大量纯化 DC. 选用生长期小鼠的前胃癌细胞系 MFC 细胞, 加入 Tripure<sup>TM</sup> 分离试剂按其说明书进行 RNA 提取分离操作, 取样品适当稀释, 用紫外分光光度计定量后备用. 从小鼠骨髓的 CD $34^+$  细胞中扩增、分离出大量纯化 DC, 在 15 mL 的聚丙烯试管中洗涤 DC 2 次、重悬, 细胞密度调为  $5.0 \times 10^9$ /mL, 移入另一支 15 mL 聚苯乙烯试管中; 将 25  $\mu$ g MFC RNA (250  $\mu$ L) 与 50  $\mu$ g 脂质体 (250  $\mu$ L, 培养基配制) 混匀, 20  $^{\circ}$ C 孵育 10 min; 将上述混合物加入  $5.0 \times 10^9$ /mL DC 中 37  $^{\circ}$ C 培养 40 min (间断晃动). 洗涤后重悬于无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中( $2.0 \times 10^8$ /mL), 3 000 cGy 灭活备用.

1.2.1 MFC RNA 冲击 DC 对小鼠的免疫治疗作用 各组 615 小鼠腋窝皮下注射  $2 \times 10^8$ /mL MFC 500  $\mu$ L/ 鼠; 第 7 d 分别给各组 615 小鼠腹腔注射已制好的 3 000 cGy 灭活 MFC RNA 致敏 DC (RNA-DC 组)、PBS(PBS 组)、3 000 cGy 灭活的  $2 \times 10^8$ /mL MFC (灭活 MFC 组)各 500  $\mu$ L/ 鼠; 第 3 d 后复种 1 次, 以后每天观察小鼠肿瘤的生长情况及其存活率; 第 21 d 处死小鼠, 取肿瘤组织分离肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)以检测其细胞毒活性; 取肿瘤组织分别进行 CD $4^+$ , CD $8^+$  细胞的免疫组化染色、用 RT-PCR(reverse transcriptase polymerase chain reaction)和原位杂交染色检测细胞因子 IL-12, IL-18, IFN $\gamma$ .

1.2.2 细胞毒活性检测 无菌条件下将新鲜肿瘤组织剪碎、匀浆、过滤、离心, 不连续密度梯度离心, 收集界面细胞用 RPMI1640 培养液调浓度为  $1 \times 10^9$ /mL, 加入 rIL-2 100 KU/mL 在 50 mL/L CO $_2$  37  $^{\circ}$ C 培养, 每天观察 1 次, 每 3 d 换液 1 次(当细胞密度大于  $2 \times 10^9$ /mL 时补充 rIL-2 并调整细胞浓度); 用前 500 g 离心 3 min, 生理盐水洗涤 1 次, TIL 计数后备用. 按说明书进行细胞毒活性检测操作, 设孔: 效-靶细胞混合物(effector-target cell mix, E-T)及效应细胞(effector cell, EC)各 12 孔, 另设背景对照、自发(Low)对照、最大释放(High)对

照, 分别设 3 个复孔; ELISA 机测读 A 490 nm 值. 细胞介导的细胞毒活性(%) = [(效-靶细胞混合物-背景对照)-自发对照]  $\div$  (最大释放对照-自发对照)  $\times$  100%. 1.2.3 RT-PCR、SP 法免疫组化染色和原位杂交 根据基因库 GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Entrez/nucleotide.html>) 中小鼠 IL-18, IFN $\gamma$  的完整 cDNA 序列, 利用 PRIMER 软件设计 PCR 成对引物. IL-18: 上游引物 5' -ACTGTA CAACCGCAGTAATAC-3', 下游引物 5' -AGTGAA CATTACAGA TTTATCCC-3' (扩增产物片段长度 434 bp、退火温度 56  $^{\circ}$ C); IFN $\gamma$ : 上游引物 5' -AACGCTACACAC TGCATCTTGG-3', 下游引物 5' -GACTTCAAAGA GTCTGAGG -3' (扩增产物片段长度 237 bp、退火温度 56  $^{\circ}$ C). 在 PCR 管中加入: 5  $\times$  buffer 5.0  $\mu$ L、dNTP 2.0  $\mu$ L、ddH $_2$ O(DEPC) 11  $\mu$ L、specific Primer 1.5  $\mu$ L、GAPDH Primer 1.5  $\mu$ L、MgCl $_2$  1.0  $\mu$ L、Total RNA 2.0  $\mu$ L、AMV 0.5  $\mu$ L、Tf1 DNA 0.5  $\mu$ L (Total 25  $\mu$ L), 48  $^{\circ}$ C 45 min; 94  $^{\circ}$ C 2 min; 94  $^{\circ}$ C 40 s, 退火 40 s, 68  $^{\circ}$ C 120 s, 35 个循环, 68  $^{\circ}$ C 10 min; 20 g/L 琼脂糖电泳后凝胶照像记录. 免疫组化和原位杂交染色按文献[7, 9]介绍方法进行.

统计学处理 采用第三军医大学数学教研室编制的数理统计程序包作单因素方差分析、二维列联表统计, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为相差显著.

## 2 结果

RNA-DC 组小鼠经治疗后肿瘤生长相对减慢, 未见大范围的转移, 腹水量少, 动物精神状况稍有好转. 而 PBS 组小鼠虽经治疗, 但肿瘤生长仍然很快, 精神食欲很差, 嗜睡, 不活动, 动物明显衰竭; 全身皮下可见大小不等的多个转移灶和新旧不一的出血斑, 腹水明显、呈蛙腹状. 灭活 MFC 组介于二者之间.(表 1).

表 1 小鼠肿瘤的生长情况及其存活率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

项目	RNA-DC 组	PBS 组	灭活 MFC 组
瘤体质量(g)	$2.04 \pm 0.33^a$	$4.71 \pm 0.77$	$4.96 \pm 0.58$
转移率	25% (2/8) <sup>b</sup>	100% (8/8)	100% (8/8)
腹水率	75% (6/8)	100% (8/8)	100% (8/8)
生存率	75% (6/8) <sup>b</sup>	37.5% (3/8)	50% (4/8) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs PBS group.

表 2 各组肿瘤 TIL 细胞毒活性的检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

效-靶比	PBS 组	MFC 组	RNA-DC 组
0.39	$2.00 \pm 0.13$	$5.80 \pm 1.60$	$11.59 \pm 2.98$
0.78	$3.60 \pm 1.01$	$8.00 \pm 4.22$	$15.30 \pm 4.28^a$
1.56	$4.70 \pm 2.18$	$11.80 \pm 2.82$	$21.30 \pm 6.55^a$
3.125	$6.00 \pm 3.11$	$15.80 \pm 5.17$	$30.00 \pm 4.17^a$
6.25	$9.00 \pm 6.10$	$20.70 \pm 4.10$	$38.00 \pm 8.42^a$
12.5	$11.50 \pm 2.48$	$27.60 \pm 7.18$	$48.30 \pm 6.75^b$
25	$15.10 \pm 6.10$	$35.10 \pm 6.41^a$	$59.00 \pm 7.44^b$
50	$18.30 \pm 2.07$	$40.90 \pm 5.74^a$	$68.50 \pm 9.83^b$
100	$20.80 \pm 3.55$	$43.00 \pm 5.00^a$	$70.50 \pm 14.29^b$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs PBS group.

2.1 肿瘤TIL细胞毒活性检测 RNA-DC组的细胞毒活性明显高于相同效靶比的PBS组(表2,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ).

2.2 免疫组化、原位杂交染色和RT-PCR PBS组CD<sub>4</sub><sup>+</sup>细胞数为  $0.18 \pm 0.01/\mu\text{m}^2$ 、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞数为  $0.21 \pm 0.06/\mu\text{m}^2$ , MFC组CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞数分别为  $0.37 \pm 0.18/\mu\text{m}^2$  和  $0.34 \pm 0.17/\mu\text{m}^2$ , 与PBS组无显著差异( $P > 0.05$ ). RNA-DC组CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞数量分别为  $0.71 \pm 0.25/\mu\text{m}^2$  和  $0.67 \pm 0.22/\mu\text{m}^2$ , 均明显高于PBS组( $P < 0.05$ );而各组平均吸光度则无显著差异( $P > 0.05$ ). RNA-DC组IL-12 p40 mRNA阳性产物的面积比率显著高于PBS组( $P < 0.01$ );而其阳性产物的平均吸光度与PBS组均无差异( $P > 0.05$ ). RNA-DC组IL-18 mRNA、IFN $\gamma$  mRNA阳性产物的平均吸光度显著高于PBS组( $P < 0.05$ );而灭活MFC组与PBS组相比则无差异( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

胃癌发病率高,其免疫治疗在国内外已经有不少研究<sup>[10-21]</sup>.我们发现,胃癌细胞RNA致敏的DC接种后,局部肿瘤组织中IL-12, IL-18和IFN $\gamma$ 等因子的基因表达水平都有明显的升高,TIL细胞在致敏DC的诱导下其细胞毒活性均有了明显增强(并且其细胞毒活性随着效靶细胞比值的增加而增加);小鼠的精神食欲状况、腹水的产生、肿瘤生长和转移的发生率、动物的存活率和瘤体的重量等指标均优于各自的对照组小鼠.表明RNA致敏DC接种后,由于促进了胃癌抗原的有效提呈,并在自身和周围组织分泌的细胞因子IL-12、IL-18和IFN $\gamma$ 作用下,CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞活化,使局部肿瘤组织中NK、TIL等效应细胞的细胞毒活性和抗体产生细胞功能增强.RNA-DC接种后,肿瘤局部CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞的数量有一定程度的增加,局部肿瘤组织中TIL细胞的细胞毒活性增强.说明DC诱导的免疫应答与CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞密切相关.Boczowski et al<sup>[22-23]</sup>研究也发现RNA抗原比肿瘤洗脱抗原能更高效地致敏DC,用含OVA抗原的肿瘤细胞来源的RNA致敏的DC能更有效地激活OVA特异性CTL的产生,并且完全能够保护宿主不再受表达OVA的肿瘤细胞的攻击.我们的结果与Boczowski et al<sup>[23]</sup>的结果是一致的.

用胃癌细胞RNA致敏的DC接种对小鼠的免疫保护和免疫治疗,这种方法从根本上讲至少可以部分地重建或强化胃癌局部的免疫功能,对改善荷瘤宿主的生存状况有一定的帮助.DC网络是体内能提呈抗原给未致敏或静息T细胞的特异系统,他在诱导T、B淋巴细胞免疫中起着关键性作用,在肿瘤的免疫调控中有着相当重要的地位.

### 4 参考文献

1 Lau AH, Thomson AW. Dendritic cells and immune regula-

- tion in the liver. *Gut* 2003;52:307-314
- 2 Waller EK, Ernstoff MS. Modulation of antitumor immune responses by hematopoietic cytokines. *Cancer* 2003;97:1797-1809
- 3 Buttiglieri S, Galetto A, Forno S, De Andrea M, Matera L. Influence of drug-induced apoptotic death on processing and presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Int J Cancer* 2003;106:516-520
- 4 Galetto A, Contarini M, Sapino A, Cassoni P, Consalvo E, Forno S, Pezzi C, Barnaba V, Mussa A, Matera L. Ex vivo host response to gastrointestinal cancer cells presented by autologous dendritic cells. *J Surg Res* 2001;100:32-38
- 5 Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Kiyoku H, Toi M, Hiroi M. CD34 positive stromal cells in gastric adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2001;54:846-848
- 6 Takahashi A, Kono K, Itakura J, Amemiya H, Feng Tang R, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y. Correlation of vascular endothelial growth factor-C expression with tumor-infiltrating dendritic cells in gastric cancer. *Oncology* 2002;62:121-127
- 7 罗治彬, 鲁荣, 罗元辉, 徐采朴. 树突状细胞对胃黏膜免疫的调节作用研究. 第三军医大学学报 2000;22:769-772
- 8 Luo ZB, Xu CP, Luo YH, Zhang PB. 11th Asian Pacific Congress of Gastroenterology and 8th Asian Pacific Congress of Digestive Endoscopy. Hong Kong, China, March 10-14, 2000. Abstracts. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):B1-132
- 9 罗治彬, 罗元辉, 鲁荣, 晋华源, 张朋彬, 徐采朴. 胃癌和癌前病变中树突状细胞的免疫组化研究. 世界华人消化杂志 2000;8:400-402
- 10 Belldgrun A, Bander NH, Lerner SP, Wood DP, Pantuck AJ. Society of urologic oncology biotechnology forum: new approaches and targets for advanced prostate cancer. *J Urol* 2001;166:1316-1321
- 11 Slovin SF. Vaccines as treatment strategies for relapsed prostate cancer: approaches for induction of immunity. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001;15:477-496
- 12 Lotze MT, Shurin M, Esche C, Tahara H, Storkus W, Kirkwood JM, Whiteside TL, Elder EM, Okada H, Robbins P. Interleukin-2: developing additional cytokine gene therapies using fibroblasts or dendritic cells to enhance tumor immunity. *Cancer J Sci Am* 2000;6(Suppl 1):S61-S66
- 13 Morse MA, Lysterly HK. Clinical applications of dendritic cell vaccines. *Curr Opin Mol Ther* 2000;2:20-28
- 14 Gitlitz BJ, Belldgrun AS, Figlin RA. Vaccine and gene therapy of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* 2001;19:141-147
- 15 Meidenbauer N, Andreesen R, Mackensen A. Dendritic cells for specific cancer immunotherapy. *Biol Chem* 2001;382:507-520
- 16 Ishigami S, Natsugoe S, Hokita S, Xiangming C, Aridome K, Iwashige H, Tokuda K, Nakajo A, Miyazono F, Aikou T. Intranodal antitumor immunocyte infiltration in node-negative gastric cancers. *Clin Cancer Res* 2000;6:2611-2617
- 17 郭建巍, 秦力维, 蔡美英, 吕同德. 树突状细胞体内外对肝癌细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11:408-410
- 18 郭建巍, 秦力维, 蔡美英. 肝癌DC疫苗活化的CTL对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11:419-421
- 19 姜琳, 朱金水. 胃癌的免疫治疗研究新进展. 世界华人消化杂志 2002;10:1190-1193
- 20 杜建军, 龚科峰, 曹云新, 王中华, 王为忠, 高志清. 胃癌下调新基因CA11的功能研究. 世界华人消化杂志 2002;10:525-529
- 21 刘剑勇, 张力图, 李挺, 赵荫农, 张春燕, 陈建思, 张丽生, 覃宇周, 吴飞翔, 唐凯, 唐朝晖. 树突状细胞诱导肿瘤浸润性淋巴细胞抗胃癌免疫的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:467-469
- 22 Kochman S, Bernard J. Antitumour immune response and cancer vaccination: the critical role of dendritic cells. *Curr Med Res Opin* 1999;15:321-326
- 23 Boczowski D, Nair SK, Nam JH, Lysterly HK, Gilboa E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:1028-1034