

# 肝癌细胞抗原致敏树突状细胞体外诱导特异性细胞毒T淋巴细胞

谢裕安, 罗小玲, 梁安民, 匡志鹏, 吴继宁

谢裕安, 罗小玲, 梁安民, 匡志鹏, 吴继宁, 广西医科大学肿瘤医院  
广西壮族自治区南宁市 530021  
广西回国基金项目“树突状细胞介导的肿瘤免疫与基因治疗”, No.  
桂科回 0009008  
项目负责人: 梁安民, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学肿瘤  
医院. kgzhou@163.com  
电话: 0771-5310045 传真: 0771-5312000  
收稿日期: 2004-06-27 接受日期: 2004-08-16

## 摘要

目的: 探讨原发性肝癌患者外周血树突状细胞(DC)体外经自体肝癌细胞抗原致敏后, 对特异性细胞毒T淋巴细胞(CTL)的诱导作用。

方法: 肝癌患者外周血经梯度密度离心法分离, 获得DC前体细胞, 用重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和重组人白介素-4(rhIL-4)联合培养, 诱导扩增DC。制备自体肝癌细胞抗原, 体外脉冲DC, 检测DC诱导自体T细胞增生能力及特异性CTL在体外对自体肝癌细胞的杀伤活性。

结果: 经自体肝癌细胞抗原致敏的DC能诱导较强的自体T细胞增生, 且能诱导特异性CTL, 该CTL对自体肝癌细胞具有很强的杀伤活性, 杀伤率明显高于DC、未经肝癌细胞抗原致敏的DC激活的CTL及T淋巴细胞的杀伤率, 而对CT26细胞、BEL-7402细胞无明显的杀伤作用。

结论: 肝癌患者外周血DC体外能诱导高效而特异的抗肝癌免疫, 提示DC可能在肿瘤治疗及预防其复发与转移中发挥重要作用。

谢裕安, 罗小玲, 梁安民, 匡志鹏, 吴继宁. 肝癌细胞抗原致敏树突状细胞体外诱导特异性细胞毒T淋巴细胞. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1479-1481  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1479.asp>

## 0 引言

免疫治疗是现代肿瘤综合治疗的一种重要手段。随着肿瘤免疫理论的突破和分子生物学技术的发展, 提出了肿瘤疫苗的概念, 其基本策略是通过肿瘤抗原特异性细胞毒性T细胞(CTL)的激活而诱导抗肿瘤的免疫反应。现已制备了肿瘤细胞疫苗、肿瘤核酸疫苗、肿瘤基因工程疫苗等, 但这些疫苗的一个共同弱点是不能刺激有效的T细胞介导的免疫反应, 这表明抗肿瘤免疫反应不是由肿瘤细胞直接提呈给未致敏的T细胞, 而是先转移肿瘤抗原给抗原提呈细胞(APC), 再由APC激活免疫系统。树突状细胞(dendritic, DC)是抗原提呈功能最强的APC, 也是目前发现的惟一能激活初始型T细胞增生并建立初级免疫反应的细胞, 在启动抗肿瘤免疫反应

中起关键作用<sup>[1-5]</sup>。我们在原发性肝癌患者外周血DC经自体肝癌细胞抗原激活后, 观察其在体外能否刺激自体T细胞增生和诱导的肿瘤特异性CTL细胞毒活性, 为临床应用DC免疫治疗肝癌提供实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 rhGM-CSF、rhIL-4、丝裂霉素C购自Sigma公司; 抗人CD83McAb购自PharMingen公司; 淋巴细胞分离液为上海生化试剂二厂产品; RPMI-1640细胞培养基、T细胞尼龙毛柱购自美国GIBICO公司; <sup>3</sup>H-TdR购自北京原子能研究所; 乳酸脱氢酶(LDH) 4h释放法杀伤活性测定试剂盒为美国Promega公司生产。CT26人结肠癌细胞、BEL-7402人肝癌细胞由本室传代培养。临床确诊的原发性肝癌患者10例, 男8例, 女2例, 年龄30-65岁, 平均47.5岁, 均未接受过任何抗肿瘤治疗。手术当天术前抽取外周静脉血, 用于分离、纯化外周血单个核细胞(PBMC)和T淋巴细胞。

### 1.2 方法

1.2.1 分离、纯化肝癌患者外周血PBMC和T淋巴细胞 取肝癌患者抗凝外周全血用常规密度梯度离心法分离PBMC, 部分PBMC用于诱导DC; 部分PBMC采用尼龙棉柱分离法分离T细胞, 用台盼蓝染色后在倒置显微镜下计数活细胞数应>95%, 并用培养液配成 $3 \times 10^6$ 细胞/mL备用。

1.2.2 肝癌细胞的分离 将手术切取的肝癌组织, 用淋巴细胞分离液, 采用不连续密度梯度离心法分离获得肝癌细胞, 肝癌细胞分2部分, 一部分用于制备肝癌全细胞抗原, 一部分用RPMI-1640常规培养, 用作细胞毒实验的靶细胞。

1.2.3 肝癌全细胞抗原肽的制备 用RPMI-1640调整肝癌细胞浓度至 $1 \times 10^7$ , 反复冻融(-80℃/37℃)4次, 作为肝癌抗原。

1.2.4 DC的体外诱导及肿瘤抗原冲击致敏DC 以含150 mL/L FCS的RPMI-1640(完全培养基)调整PBMC浓度至 $3 \times 10^6$ /mL加入6孔板中(3 mL/孔), 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱培养2 h, 轻轻吸弃非黏附细胞, 而获得贴壁的单核细胞, 每孔再加入含rhGM-CSF 100 ng/mL和rhIL-4 100 ng/mL的完全培养基, 常规培养, 每3 d换液1次, 换液时加等浓度的rhGM-CSF和rhIL-4。在培养的第4 d将DC和肝癌全细胞抗原共培养, 第6 d收集DC, 即为肝癌抗原肽冲击致敏的DC, 以抗CD83McAb特异显示诱导培养后的DC。冲击后的细胞用培养基洗2遍, 重悬于RPMI-1640细胞培养液中备用。

1.2.5 抗原致敏 DC 刺激自体 T 细胞增生能力的检测 收集培养第 7 d 的抗原致敏及未致敏的 DC 作为刺激细胞, 分别用完全培养基调整细胞浓度为  $2 \times 10^6/\text{mL}$ , 加入丝裂霉素 C  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育 45 min, 生理盐水洗涤 3 次, 完全培养基悬浮, 分别以  $1 \times 10^3/\text{孔}$ ,  $5 \times 10^3/\text{孔}$  及  $1 \times 10^4/\text{孔}$  加入 96 孔圆底培养板, 每组设 3 个复孔. 再每孔加入自体 T 淋巴细胞  $1 \times 10^5$  作为反应细胞, 终体积为  $200 \mu\text{L}$ . 置  $37^\circ\text{C}$ ,  $50\text{mL}/\text{LCO}_2$  孵箱培养 96 h, 于培养结束前 16 h 加  $^3\text{H}$ -TdR,  $0.5 \mu\text{Ci}/\text{孔}$ . 收集细胞, 液闪计数器检测 CPM 值, 结果用 3 孔均值表示.

1.2.6 抗原致敏的 DC 刺激自体 T 细胞增生分化为 CTL 于多孔反应板中加入自体 T 淋巴细胞 ( $1 \times 10^5$ , 作为反应细胞)、抗原致敏的 DC ( $5 \times 10^3$ , 作为诱导细胞), 置  $37^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{mL}/\text{L CO}_2$  孵箱培养, 于培养的第 6 d 收集活细胞即为抗原致敏 DC 激活的 CTL. 同理诱导未经肝癌细胞抗原致敏 DC 激活的 CTL.

1.2.7 细胞毒实验 抗原致敏 DC 激活的 CTL 作为效应细胞, 自体肝癌细胞、CT26 细胞、BEL-7402 细胞为靶细胞, 效靶比为 50:1. 同时设立 DC、未经肝癌细胞抗原致敏的 DC 激活的 CTL 及 T 淋巴细胞作为效应细胞的杀伤对照. 采用乳酸脱氢酶 (LDH) 4 h 释放法检测 CTL 杀伤活性, 严格按照试剂盒说明书操作. 置酶标仪上测 490 nm 的 A 值, 将 A 值代入公式中计算各效应细胞的杀伤活性.

$$\text{杀伤活性}(\%) = \frac{(A_{\text{实}} - A_{\text{空}}) - (A_{\text{效}} - A_{\text{空}}) - (A_{\text{靶}} - A_{\text{空}})}{(A_{\text{靶最大释放}} - A_{\text{靶对照}}) - (A_{\text{靶自然释放}} - A_{\text{空}})} \times 100$$

统计学处理 数据用  $\text{mean} \pm \text{SD}$  来表示, 采用 SPASS 统计软件进行计量资料的 t 检验.

## 2 结果

2.1 肝癌细胞抗原致敏 DC 刺激自体 T 细胞增生的能力 肝癌抗原致敏的 DC 具有较未经致敏的 DC 更强的激发 T 细胞增生的能力, 差异有显著意义 ( $P < 0.01$ , 图 1).

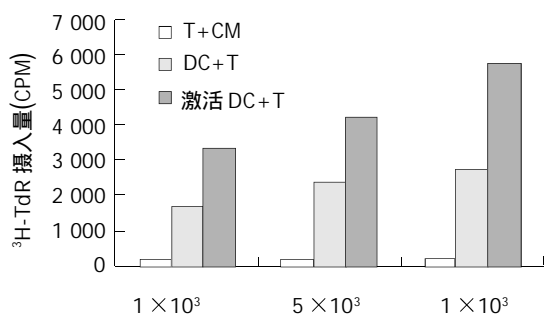


图 1 抗原致敏的 DC 刺激同基因 T 细胞增生.

2.2 肝癌细胞抗原致敏 DC 诱导的 CTL 杀伤活性 肝癌抗原致敏 DC 诱导的 CTL 表现出很强的杀伤自体肝癌细胞的细胞毒活性, 杀伤率显著高于 DC、未经肝癌细胞

抗原致敏的 DC 激活的 CTL 及 T 淋巴细胞的杀伤率, 而对 CT26 细胞、BEL-7402 细胞无明显的杀伤作用; 未经抗原致敏 DC 诱导的 CTL 对自体肝癌细胞也有较强的杀伤作用; DC 本身及未经 DC 激活的 T 细胞对自体肝癌细胞无杀伤作用.

表 1 DC 诱导的 CTL 杀伤活性比较

效应细胞	n	靶细胞	杀伤率(%)
抗原致敏 DC 诱导 CTL	10	自体肝癌细胞	$82.5 \pm 12.3^a$
抗原致敏 DC 诱导 CTL	10	CT26 细胞	$10.6 \pm 4.5$
抗原致敏 DC 诱导 CTL	10	BEL-7402 细胞	$16.5 \pm 7.5$
未致敏 DC 诱导 CTL	10	自体肝癌细胞	$48.8 \pm 11.3$
DC	10	自体肝癌细胞	0
T 细胞	10	自体肝癌细胞	0

<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 其他组.

## 3 讨论

DC 在免疫应答中起着调控地位: (1) 机体的卫士; (2) 免疫应答的始动者; (3) T 细胞的强刺激者; (4) 免疫耐受的诱导者. 应用这种体内功能最强的 APC 即 DC 作为肿瘤疫苗的载体或称佐剂, 以肿瘤抗原体外冲击使其致敏, 或者说让 DC 负载着肿瘤抗原, 这样的疫苗进入体内保证肿瘤抗原被有效摄取、提呈, 且通过 DC 可提供攻击肿瘤细胞所必须的共刺激信号, 因此, DC 疫苗是新一代的肿瘤疫苗, 可提供更有效的特异性主动免疫, 显示了比“常规”疫苗更明显的优越性<sup>[6-14]</sup>. 本实验结果表明, 联合应用 rhGM-CSF 和 rhIL-4 可从原发性肝癌患者外周血诱导扩增出大量 DC, 该 DC 经自体肝癌细胞抗原体外脉冲致敏后, 能诱导自体 T 细胞增生和特异性 CTL, 抗原致敏的 DC 对自体肝癌细胞具有很强的杀伤力, 而对 CT26 细胞、BEL-7402 细胞无明显的杀伤作用, 说明抗原致敏 DC 诱导的 CTL 具有高效而特异的抗肿瘤作用. 未经抗原致敏 DC 诱导的 CTL 对自体肝癌细胞也表现出一定的杀伤力. 有关 DC 诱导的 CTL 抗肿瘤作用的机制目前尚不清楚, 可能与 (1) DC 表面有大量的树突状突起, 使之有利于大量接触抗原并提呈给 CTL 细胞; (2) DC 高表达 MHC I、II 类分子和 CD80/CD86 等共刺激分子, 为 CTL 充分活化提供信号刺激; (3) DC 分泌 IL-12 等多种细胞因子, 可维持和增强 CTL 的活性; (4) DC 可通过分泌或外排一种具有抗原提呈能力的 exosome 小体来诱导免疫反应, 也增强了 CTL 的抗肿瘤能力; (5) CTL 直接杀伤肿瘤细胞或分泌细胞因子诱导肿瘤细胞凋亡及抑制肿瘤细胞增生等机制有关. 最近有报道 DC 可作为一种效应细胞直接杀伤肿瘤细胞<sup>[15-16]</sup>, 但我们在实验中未发现肝癌患者外周血 DC 在体外对自体肝癌细胞有直接的杀伤作用, 可能是 DC 不具备效应细胞功能, 也可能是体内和体外微环境不同造成的. 总之, 本实验结果提示, 肿瘤抗原致敏的 DC 可作为一

种新型抗肿瘤疫苗在肿瘤治疗及预防其复发与转移中发挥重要作用。

#### 4 参考文献

- 1 Austyn JM. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(4 Pt 2):S146-150
- 2 Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int J Cancer* 1997;70:706-715
- 3 Dubois B, Lamy PJ, Chemin K, Lachaux A, Kaiserlian D. Measles virus exploits dendritic cells to suppress CD4+ T-cell proliferation via expression of surface viral glycoproteins independently of T-cell trans-infection. *Cell Immunol* 2001;214: 173-183
- 4 Bedouet L, Bousser MT, Frison N, Boccaccio C, Abastado JP, Marceau P, Mayer R, Monsigny N, Roch AC. Uptake of dimannoside clusters and oligomannosides by human dendritic cells. *Biosci Rep* 2001;21:839-855
- 5 Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, Shalabi A, Shin T, Pardoll DM, Tsuchiya H. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 2001;193:839-846
- 6 Tang ZH, Qiu WH, Wu GS, Yang XP, Zou SQ, Qiu FZ. The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:908-912
- 7 Chen Y, Emtage P, Zhu Q, Foley R, Muller W, Hitt M, Gauldie J, Wan Y. Induction of ErbB-2/neu-specific protective and therapeutic antitumor immunity using genetically modified dendritic cells: enhanced efficacy by cotransduction of gene encoding IL-12. *Gene Ther* 2001;8:316-323
- 8 Insug O, Ku G, Ertl HC, Blaszczyk-Thurin M. A dendritic cell vaccine induces protective immunity to intracranial growth of glioma. *Anticancer Res* 2002;22(2A):613-621
- 9 Kalady MF, Onaitis MW, Padilla KM, Emani S, Tyler DS, Pruitt SK. Enhanced dendritic cell antigen presentation in RNA-based immunotherapy. *J Surg Res* 2002;105:17-24
- 10 Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 2000;6:332-336
- 11 Liu Y, Zhang W, Chan T, Saxena A, Xiang J. Engineered fusion hybrid vaccine of IL-4 gene-modified myeloma and relative mature dendritic cells enhances antitumor immunity. *Leuk Res* 2002;26:757-763
- 12 Kirk CJ, Hartigan-O'Connor D, Nickoloff BJ, Chamberlain JS, Giedlin M, Aukerman L, Mule JJ. T cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Res* 2001;61:2062-2070
- 13 Mackensen A, Drager R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:152-156
- 14 Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk AH. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 2001;93:243-251
- 15 Amigorena S. Exosomes derived from dendritic cells. *J Soc Biol* 2001;195:25-27
- 16 Amigorena S. Cancer immunotherapy using dendritic cell-derived exosomes. *Medicina (B Aires)* 2000;60(Suppl 2):51-54

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 血清、组织 E - 钙黏附素变化与结直肠癌根治手术的关系

蔡诚忠, 许洪卫, 童晓晨

蔡诚忠, 许洪卫, 童晓晨, 上海同济大学附属铁路医院普通外科  
上海市 200072

项目负责人: 许洪卫, 200072, 上海市, 上海同济大学附属铁路医院普通外科。

收稿日期: 2004-02-07 接受日期: 2004-03-24

### 摘要

目的: 通过检测结直肠癌患者血清 E - 钙黏附素(E - Cd)浓度和组织 E - Cd 的 mRNA 水平, 探讨 E - Cd 与结直肠癌浸润和转移的关联性。

方法: 应用酶联免疫黏附方法测定 28 例结直肠癌患者血清可溶性 E - Cd 浓度; 应用点杂交法和计算机灰度扫描分析组织的 mRNA 灰度均值。

结果: 结直肠癌组血清 E - Cd 浓度显著高于对照组( $P < 0.001$ ), Dukes C 组或有淋巴结转移组明显高于 Dukes A、B 组或无淋巴结转移组( $P$  均  $< 0.05$ ), 切除瘤体后上述各组的血清 E - Cd

浓度均明显下降( $P < 0.01 - 0.05$ )。各组的组织 E - Cd mRNA 均值变化与血清 E - Cd 浓度的一致, 且两指标间具有明显的相关性( $P < 0.05$ )。

结论: 血清、组织 E - Cd 可能与人结直肠癌的浸润深度和淋巴结转移密切相关。

蔡诚忠, 许洪卫, 童晓晨. 血清、组织 E - 钙黏附素变化与结直肠癌根治手术的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1481 - 1483  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1481.asp>

### 0 引言

E - 钙黏附素(epithelial cadherin, E - Cd)又称上皮钙黏附素, 属钙黏附素超家族经典亚族成员<sup>[1]</sup>, 他的表达程度与功能活性状态直接影响着肿瘤细胞的脱离和再附着(1)本文通过检测结直肠癌患者血清 E - Cd 浓度和组织