

- 3 Silvestri L, Sonzogni L, De Silvestri A, Gritti C, Foti L, Zavaglia C, Leverì M, Cividini A, Mondelli M, Silini EM. CYP enzyme polymorphisms and susceptibility to HCV-related chronic liver disease and liver cancer. *Int J Cancer* 2003;104: 310-317
- 4 De Ledinghen V, Liu H, Zhang F, Lo CR, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ, Czaja MJ. Induction of cyclooxygenase-2 by tumor promoters in transformed and cytochrome P450 2E1-expressing hepatocytes. *Carcinogenesis* 2002;23:73-79
- 5 Song Y, Shi Y, Ao LH, Harken AH, Meng XZ. TLR4 mediates LPS-induced HO-1 expression in mouse liver: Role of TNF- α and IL-1 β . *World J Gastroenterol* 2003;9:1799-1803
- 6 You J, Zhuang L, Tang BZ, Yang WB, Ding SY, Li W, Wu RX, Zhang HL, Zhang YM, Yan SM, Zhang L. A randomized controlled clinical trial on the treatment of Thymosin-a 1 versus interferon-a in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:411-414
- 7 Renton KW. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacol Ther* 2001;92:147-163
- 8 Zhang GL, Wang YH, Teng HL, Lin ZB. Effects of aminoguanidine on nitric oxide production induced by inflammatory cytokines and endotoxin in cultured rat hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2001;7:331-334
- 9 Zhang GL, Wang YH, Ni W, Teng HL, Lin ZB. Hepatoprotective role of *ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 2002;8:728-733
- 10 Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:544-550
- 11 Vupputgalla R, Shah RB, Chimalakonda AP, Fisher CW, Mehvar R. Microsomal cytochrome P450 levels and activities of isolated rat livers perfused with albumin. *Pharm Res* 2003;20: 81-88
- 12 Zhang LJ, Yu JP, Li D, Huang YH, Chen ZX, Wang XZ. Effects of cytokines on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:77-81
- 13 Barakat MM, El-Kadi AOS, du Souich P. L-NAME prevents in vivo the inactivation but not the down-regulation of hepatic cytochrome P450 caused by an acute inflammatory reaction. *Life Sciences* 2001;69:1559-1571
- 14 Morgan ET, Ullrich V, Daiber A, Schmidt P, Takaya N, Shoun H, McGiff JC, Oyekan A, Hanke CJ, Campbell WB, Park CS, Kang JS, Yi HG, Cha YN, Mansuy D, Boucher JL. Cytochromes P450 and flavin monooxygenases- targets and sources of nitric oxide. *Drug Metab Dispos* 2001;29:1366-1376
- 15 Vernia S, Beaune P, Coloma J, Lopez-Garcia MP. Differential sensitivity of rat hepatocyte CYP isoforms to self-generated nitric oxide. *FEBS Letters* 2001;488:59-63
- 16 Hakkola J, Hu Y, Ingelman-Sundberg M. Mechanisms of down-regulation of CYP2E1 expression by inflammatory cytokines in rat hepatoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:1048-1054
- 17 Silvestri L, Sonzogni L, Gritti C. CYP enzyme polymorphisms and susceptibility to HCV-related chronic liver disease and liver cancer. *Int J Cancer* 2003;104: 310-317

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 •

食管癌细胞 RNA 致敏树突状细胞诱导特异性抗肿瘤免疫

王 健, 苏安英, 柴锡庆, 门金娥, 张向阳, 郑海萍, 田 珂

王健, 苏安英, 柴锡庆, 门金娥, 张向阳, 郑海萍, 田珂, 河北工程学院教务处 河北省邯郸市 056038
河北省科技研究与发展计划项目资助, No. 00276168D
项目负责人: 王健, 056038, 河北省邯郸市, 河北工程学院教务处.
收稿日期: 2004-04-19 接受日期: 2004-05-13

摘要

目的: 观察人食管癌细胞株 RNA 致敏的树突状细胞(DC)所诱导的特异性抗肿瘤免疫效应, 探讨肿瘤细胞 RNA 直接致敏 DC 进行食管癌生物治疗的可能性.

方法: 食管癌细胞株 T. Tn 体外培养, 提取 RNA; 正常人外周血, 进行体外 DC 的培养扩增; 食管癌 RNA 直接致敏 DC, MTT 法检测食管癌 RNA 活化 DC 所诱生的淋巴细胞对食管癌 T. Tn、视网膜母细胞瘤 SoRb-70 的体外杀伤效应.

结果: 正常人外周血来源的 DC, 经食管癌 T. Tn 细胞株 RNA 直接致敏后, 成功诱导特异性抗肿瘤免疫反应, T. Tn RNA 组 CTL 在靶效比为 20:1 时对 T. Tn, SoRb-70 的杀伤率分别为 85.8%、1.9%, 而对照组对这两种细胞的杀伤率分别为 1.0% 和 0.5%.

结论: 肿瘤 RNA 致敏 DC 可以诱导特异性抗肿瘤免疫, 是一种有前景的食管癌治疗手段, 有进一步研究的价值.

王健, 苏安英, 柴锡庆, 门金娥, 张向阳, 郑海萍, 田珂. 食管癌细胞 RNA 致敏树突状细胞诱导特异性抗肿瘤免疫. 世界华人消化杂志 2004;12(8): 1976-1978

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1976.asp>

0 引言

食管癌的治疗手段包括手术、介入治疗、化疗、生物治疗等, 尽管手术技巧不断提高, 化疗药物不断更新, 生物治疗也进行了积极的探索, 但仍然无法彻底解决肿瘤复发与转移的问题. 大量研究表明, 通过骨髓、脐血、外周血等途径获取树突状细胞(dendritic cell, DC), 经体外培养、扩增、抗原负载及成熟, 可以打破肿瘤免疫耐受, 诱导强烈的特异性抗肿瘤免疫. 由于食管癌具有异质性大、抗原性弱, 缺乏特异性肿瘤抗原的特点, 和多数肿瘤一样不能激发有效的免疫反应^[1], 同时食管癌标本污染重, 难以体外培养及保证无菌等, 使得 DC 难以广泛用于食管癌的免疫治疗. 近年来文献[2-3]

报道肿瘤细胞 RNA 致敏 DC 可以诱导强烈的抗肿瘤免疫,但在人类食管癌方面尚无报道.我们研究了人食管癌细胞 RNA 致敏 DC 的免疫效应如下.

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌细胞株 T.Tn, 购自上海中科院细胞研究所;人视网膜母细胞瘤细胞株 SoRb-70, 购自湖南医科大学肿瘤研究所;二甲亚砷和 MTT 为 Sigma 产品; Trizol 试剂盒为上海生工产品; rhGM-CSF, rhIL-4, rhIL-2, CD1a 单抗为 Immunotech 产品;淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂.

1.2 方法 常规培养细胞,以 Trizol 试剂盒对培养的细胞进行 RNA 抽提, -20°C 保存.部分用于测定 260 nm 和 280 nm 吸光度 A 值,估计纯度并定量.部分进行 RNA 电泳,观察 18 S 和 28 S 条带的完整性.自健康志愿者抽取外周血 100 mL,以淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMNC),在 37°C 和 50 mL/L CO_2 饱和湿度条件下培养 4 h,取贴壁细胞,加入完全培养基和细胞因子 rhGM-CSF 800 kU/L, rhIL-4 500 kU/L 在 37°C 和 50 mL/L CO_2 饱和湿度条件下培养.倒置显微镜下观察细胞形态,第 3, 7, 24 d 流式细胞仪检测 CD1a 阳性细胞比例.第 7 d 收获细胞作为 DC 用于 RNA 致敏.培养 7 d 的贴壁 PBMNC 分成 2 组,重悬于 RPMI 1640 培养基中.实验组直接加入 T.Tn RNA 10 pg/DC,对照组不加 RNA.混匀后在 50 mL/L CO_2 、 37°C 、饱和湿度条件下培养 4 h,制备效应细胞,用于淋巴细胞的活化. RNA 致敏的同时,取同一志愿者外周血 100 mL,同上方法制备 PBMNC,贴壁 4 h 后取非贴壁细胞,作为淋巴细胞来源.将 T.Tn RNA 致敏的 DC 和未经 RNA 致敏的 DC,分别按 1:100 的比例加入自体非贴壁 PBMNC,混匀后在 37°C 、50 mL/L CO_2 、饱和湿度, rhGM-CSF 800 kU/L、rhIL-4 500 kU/L、rhIL-2 100 kU/mL 条件下共同培养 3 d,活化淋巴细胞,制备效应细胞.在 96 孔塑料培养板中每孔加入 T.Tn 细胞 1×10^4 ,按照效应与靶细胞比例 1:1, 1:10, 1:20, 分别加入 T.Tn RNA 致敏 DC 所活化的淋巴细胞和未经 T.Tn RNA 致敏 DC 所活化的淋巴细胞.每种条件设 3 个复孔,并分别设立效应细胞和肿瘤细胞平行对照孔.孵育 4 h 后,各孔分别加入 5 g/L MTT 溶液,再次孵育 4 h,离心沉淀,弃去上清,每孔加入 0.2 mL DMSO(二甲亚砷),震荡溶解 10 min,用酶联免疫检测仪,波长 570 nm,测定各孔吸光度 A 值.计算杀伤率 = (靶细胞 A - 效应细

胞 A - 效靶细胞杀伤反应后 A) / 靶细胞 $A \times 100\%$ 同样方法 96 孔培养板中加入 SoRb-70 细胞,按上法测定不同方法活化的非贴壁 PBMNC 细胞对 SoRb-70 细胞的体外杀伤效应,并计算杀伤率.

2 结果

T.Tn 细胞经 Trizol 试剂盒抽提的 RNA,经电泳可见到完整的 18S 和 28S 条带,分光光度计检测 $A_{260}/A_{280} = 1.84$, >1.8 .正常 PBMNC 贴壁后得到贴壁细胞.培养 3 d 后可见悬浮的细胞群落,有短的突起.7 d 左右大部分悬浮细胞有大量毛刺,具有典型的 DC 形态.流式细胞仪检测 CD1a 阳性细胞随时间增加也相应增加,第 3, 7, 24 d CD1a 阳性细胞率分别为 6.5%、46.9% 和 65.3%. T.Tn RNA 致敏 DC 活化非贴壁 PBMNC 时,可见淋巴细胞在 DC 周围呈花环样聚集,同样活化淋巴细胞对 T.Tn 细胞体外杀伤实验时,可见淋巴细胞在肿瘤细胞周围簇状聚集;而未经 T.Tn RNA 致敏 DC 活化非贴壁 PBMNC 时,以及两组淋巴细胞对 SoRb-70 细胞体外杀伤实验时,均未见到明显的淋巴细胞聚集效应. T.Tn RNA 致敏 DC 诱导的 CTL 对 T.Tn 有强大的杀伤作用,而未经 T.Tn RNA 致敏 DC 诱导的 T 细胞对 T.Tn 无显著杀伤作用,与对无关肿瘤 SoRb-70 类似,二者相比有非常显著差异 ($P < 0.01$, 表 1).

3 讨论

肿瘤 RNA 被 DC 摄取,在 DC 内翻译成相应的蛋白质,经过抗原处理加工,被加工成抗原肽,被运送到 DC 表面,通过 MHC 限制性途径,激活 T 细胞,发挥特异性抗肿瘤效应^[4].至今对肾癌、膀胱癌、胰腺癌、黑色素瘤和中枢神经系统肿瘤进行了这一方法的尝试,取得了良好的效果.在食管癌方面,国内还未见报道.我们采用常规方法培养扩增 DC,将食管癌 T.Tn 细胞 RNA 在无血清培养体系中直接致敏 DC 在体外杀伤实验中,食管癌细胞 T.Tn RNA 致敏 DC 所活化淋巴细胞,对食管癌细胞株 T.Tn 的杀伤率在效靶比为 20:1 时达到 85.8%,而对无关肿瘤视网膜母细胞瘤 SoRb-70 细胞杀伤率很低;未经 RNA 致敏的 DC 所活化淋巴细胞,对 T.Tn 和 SoRb-70 的体外杀伤率都很低.表明这种抗肿瘤免疫具有肿瘤特异性,同时也说明从食管癌 T.Tn 细胞提取的 RNA 具有完整的功能,通过致敏可以实现肿瘤抗原的抗原加工递呈.

肿瘤 RNA 致敏 DC 治疗包括食管癌在内的恶性肿

表 1 T.Tn RNA 致敏 DC 所活化的淋巴细胞对不同肿瘤的杀伤率 (%)

	T.Tn RNA 致敏组 / 效靶比			未经 T.Tn RNA 致敏组 / 效靶比		
	1:1	10:1	20:1	1:1	10:1	20:1
T.Tn	58.8 \pm 8.6	72.4 \pm 8.8	85.8 \pm 9.6	2.4 \pm 1.9	1.8 \pm 1.2	2.0 \pm 1.7
SoRb-70	1.1 \pm 1.0	1.3 \pm 1.1	1.1 \pm 1.0	0.4 \pm 0.2	0.6 \pm 0.3	0.5 \pm 0.2

瘤,具有明显的优势,如RNA可以从少量肿瘤细胞中提取并体外扩增,解决抗原制备时肿瘤细胞来源有限的问题^[5];其次无需知道肿瘤抗原的确切成分^[6];另外也可轻易解决手术标本伴有细菌污染的问题等.对食管癌标本抽提RNA,直接致敏DC,我们也观察到相似的体外杀伤效果,整个培养体系未出现细菌污染(待发表).这一方法目前也存在一定的不足,如RNA致敏的最佳时机、剂量,是否需要载体以及使用何种载体还没有定论,RNA的稳定性问题也没有完全解决等.我们采用肿瘤RNA直接致敏培养7d的DC,剂量为10 pg RNA/DC,取得良好的体外实验效果.

随着对DC的功能和RNA致敏机制的进一步认识,肿瘤RNA致敏DC治疗恶性肿瘤必将受到更多重视.今后发展方向主要是通过消减PCR差异或显示PCR获取并扩增肿瘤组织中差异表达的基因,以RNA的形式致敏DC既达到诱导强烈抗肿瘤免疫的目的,同时又可

有效避免可能出现的严重自身免疫损害.

4 参考文献

- 1 Chen LP. Immunological ignorance of silent antigens as an explanation of tumor evasion. *Immunol Today* 1998;19:27-30
- 2 Mitchell DA, Nair S. RNA - transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2000;106:1065-1069
- 3 Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Coleman DM, Dahm P, Vieweg J. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res* 2001; 61:3388-3393
- 4 Liu M. Transfected human dendritic cells as cancer vaccines. *Nat Biotechnol* 1998;16:335-336
- 5 Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lyster 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
- 6 Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Wu NZ, Dahm P, Pruitt SK, Boczkowski D, Nair SK, Ballo MS, Gilboa E, Vieweg J. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immunol* 2001;166:2953-2960

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 •

负载食管癌酸洗抗原树突状细胞诱导高效特异的抗肿瘤免疫

苏安英,王 健,柴锡庆,门金娥,张向阳,郑海萍,田 珂

苏安英,王健,柴锡庆,门金娥,张向阳,郑海萍,田珂,河北工程学院教务处 河北省邯郸市 056038
本课题受河北省科技研究与发展计划项目资助(No.00276168D)
项目负责人:苏安英,056038,河北省邯郸市,河北工程学院教务处.
收稿日期:2004-04-19 接受日期:2004-05-13

苏安英,王健,柴锡庆,门金娥,张向阳,郑海萍,田珂.负载食管癌酸洗抗原树突状细胞诱导高效特异的抗肿瘤免疫.世界华人消化杂志 2004;12 (8):1978-1980

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1978.asp>

摘要

目的:研究负载食管癌酸洗抗原树突状细胞(DC)诱导的特异性CTL对食管癌细胞的杀伤效应.

方法:酸洗法获得T.Tn细胞膜抗原多肽,GM-CSF,IL-4和TNF- α 体外诱导扩增DC并负载酸洗抗原,制备食管癌抗原特异性CTL;用CytTox 96TM检测其对T.Tn体外杀伤效应.

结果:负载食管癌抗原肽的DC诱导的特异性CTL对T.Tn的杀伤率达89.4%,显著高于LAK细胞的杀伤率43.9% ($P<0.05$).而对MCC803及Hep2肿瘤细胞株无显著杀伤作用($P<0.05$).

结论:负载食管癌抗原的DC体外可诱导出高效而特异的抗肿瘤效应,提示以DC为中心的肿瘤生物治疗可望提高食管癌综合治疗水平.

0 引言

肿瘤生物治疗是近年来出现的肿瘤治疗新方法;也是肿瘤治疗的发展趋势.树突状细胞(dendritic cell, DC)是功能最强大的“专职”抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs),具有独特的抗原提呈和激发功能.作为免疫反应的核心和关键.在肿瘤细胞和T淋巴细胞的相互作用中起桥梁和枢纽作用,以DC为中心的肿瘤生物治疗是发展的主要方向之一^[1].食管癌的治疗手段包括手术、介入治疗、化疗、生物治疗等,尽管手术技巧不断提高,化疗药物不断更新,生物治疗也进行了积极的探索,但仍然无法彻底解决肿瘤复发与转移的问题.我们用DC负载酸洗脱食管癌细胞表面的抗原多肽,体外诱导食管癌T.Tn抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL),研究其对食管癌T.Tn细胞的杀伤效应.

1 材料与方法

1.1 材料 人食管癌T.Tn和胃癌MGC803细胞株(购自上