

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CytoTox 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

海市肿瘤研究所), 人肝癌细胞株 HepG2(购自中国人民解放军传染病中心), 人外周血来自正常献血员外周静脉血。

1.2 方法 食管癌 T.Tn 抗原的制备按照文献[2]方法。收集培养中对数生长期的 T.Tn 细胞, 用 pH 3.3 的柠檬酸洗脱液作用 50 s, 然后 1 000 r/min, 5min; 小心收集上清液, 置 -80 °C 冻存备用。酸洗后的细胞立即以 RPMI 1640 培养基洗涤 3 遍, 并继续培养, 每 24-28 h 重复洗脱 1 次, 每次保证所收集的细胞在 1×10^6 /L 以上。所获的酸洗液经 SepPak18 去盐柱去盐, 然后收集经 Centricon-3 超离后的滤液。获得 T.Tn 食管癌抗原多肽, 并对酸洗后的细胞进行抗原性检测。用梯度离心法从食管癌患者外周血中分离获得外周血单个核细胞(PBMC)悬于含 200 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 中, 加 rhGM-CSF 500 kU/L, rhIL-4 1 000 kU/L 在 37 °C, 50 mL/L CO₂, 条件培养箱中培养。第 3 d 向 DC 诱导体系中加入上述食管癌 T.Tn 抗原, 与诱导中的 DC 孵育, 以制备负载食管癌 T.Tn 抗原的 DC。第 5 d 加入 TNF- α 100 μ g/L, 第 7 d 收集已负载抗原的 DC 与根据文献[3]分离 T 淋巴细胞混合培养 5 d, 诱导抗原特异性 CTL。以负载抗原 DC 诱导的抗原特异性 CTL, LAK 细胞、未负载抗原的单纯 DC 诱导的 T 淋巴细胞、食管癌 T.Tn 抗原直接诱导的 T 淋巴细胞以及未经诱导的 T 淋巴细胞作为效应细胞、以 T.Tn、MGC803、Hep2 为靶细胞, 效靶比分别在 1:12.5、1:25、1:50 采用 CytoTox 96™ 试剂盒进行细胞毒性实验。杀伤活性(%) = (实验孔 A 值 - 效应细胞孔自发释放 A 值 - 靶细胞自发释放 A 值) / (靶细胞最大释放 A 值 - 靶细胞自发释放 A 值) \times 100% 统计学处理数据以 mean \pm SD 表示, 采用 SPSS 软件进行 *t* 检验分析。

表 1 负载酸洗抗原 DC 诱导的特异性 CTL 对 T.Tn 的杀伤作用 (%)

	效靶比 12.5 : 1	效靶比 25 : 1	效靶比 50 : 1
CTL+T.Tn (酸洗前)	53.5 \pm 8.8	76.52 \pm 8.6	89.4 \pm 9.5
CTL+T.Tn (酸洗后)	6.1 \pm 1.8	7.3 \pm 1.9	8.6 \pm 2.1
CTL+MGC803	5.5 \pm 1.6	8.6 \pm 2.1	9.3 \pm 3.6
CTL+HepG2	5.2 \pm 1.7	7.8 \pm 2.4	8.8 \pm 3.0
LAK+T.Tn	25.9 \pm 5.8	36.9 \pm 6.2	43.9 \pm 4.9
DC+T.Tn	1.6 \pm 1.3	2.0 \pm 1.6	2.3 \pm 1.8
抗原 + T 细胞 + T.Tn	1.2 \pm 1.0	1.6 \pm 1.4	2.1 \pm 1.6
T 细胞 + T.Tn	1.1 \pm 0.8	1.7 \pm 1.0	1.6 \pm 1.5
T 细胞 + HepG2	1.0 \pm 0.6	1.1 \pm 1.0	1.3 \pm 0.9

2 结果

食管癌 T.Tn 特异性 CTL 对酸洗后的 T.Tn 杀伤率在各个效靶比均较酸洗前显著降低($P < 0.01$), 同其对无关肿瘤细胞 MGC803 和 Hep2 的杀伤率相比无显著差异($P > 0.05$, 表 1)。负载食管癌 T.Tn 酸洗抗原 DC 诱导的

CTL 对 T.Tn 有强大的杀伤作用, 与 LAK 细胞相比有非常显著差异($P < 0.01$)。单纯负载食管癌 T.Tn 抗原 DC 及未经 DC 诱导的 T 细胞对 T.Tn 均无显著杀伤作用, 与对无关肿瘤 HepG2 类似(表 1)。

3 讨论

诱导肿瘤特异性 CTL 是抗肿瘤免疫反应的关键, 而 CTL 的特异性取决于肿瘤抗原的特异性。虽然食管癌特异性抗原尚不明确, 然而 T 淋巴细胞识别的是结合于肿瘤细胞或 APC 表面与 MHC-I 类分子多肽结合沟内的抗原多肽。因此, 提取这种抗原多肽来诱导 CTL, 可以实现对肿瘤的特异性免疫。微酸洗涤法可以特异地把该多肽分离出来, 而对与 MHC-II 和其他非 MHC 结合的抗原无影响, 也不会引起多肽结构改变, 使酸洗物成分相对单一^[4]。因此, 以微酸洗涤 T.Tn 细胞方法获取肿瘤抗原能够保留其特异性。我们实验中特异性 CTL 对酸洗前后的 T.Tn 杀伤作用的对比也符合此观点。肿瘤细胞低表达或不表达 MHC 分子和共刺激分子是肿瘤免疫逃逸的主要原因之一, 导致抗原不能被有效提呈给 T 细胞以产生特异性的抗癌效应。因此激发有效的 T 细胞介导的抗癌免疫反应是提高肿瘤免疫治疗效果的关键。单纯的抗原不能活化 T 淋巴细胞, 必须经过 APC 提呈; 因为 T 淋巴细胞活化需要抗原和辅助分子双信号才能有效地诱导 CTL 形成, 发挥抗癌效应^[5]。

DC 是体内功能最强大的 APC, 具有独特的抗原提呈和免疫激发功能, 在肿瘤细胞和 T 淋巴细胞间起作枢纽和桥梁作用, 因此 DC 在肿瘤的发生、发展和免疫治疗中发挥着重要的作用^[6]。肿瘤抗原不被 DC 提呈就不能有效地诱导出抗癌免疫; 肿瘤组织中的 DC 分布量与肿瘤的疗效和预后密切相关^[7]。然而, 在肿瘤微环境中, DC 数量有限、局部调节 DC 的活性物质不足以及肿瘤和细胞分泌抑制 DC 功能的细胞因子等原因, 致使 DC 抗原提呈能力十分有限^[8]。因此, 在体外进行 DC 诱导、扩增, 并负载相应的肿瘤抗原, 然后再回输体内, 对肿瘤过继免疫治疗显得十分重要, 这也是当前研究的热点。我们用食管癌抗原多肽负载 DC 后诱导食管癌特异性 CTL, 结果显示其对食管癌 T.Tn 细胞株的杀伤率可高达 89.4%, 显著高于 LAK 细胞的作用, 提示 DC 可有效地捕获、提呈了食管癌抗原并诱导出食管癌抗原特异性 CTL, 产生高效的抗食管癌效应; 实验同时显示该特异性 CTL 对其他类型的肿瘤细胞株 MGC803 和 HepG2 则无显著杀伤作用, 提示 DC 负载食管癌抗原诱导的 CTL 对食管癌具有高度特异性。这对临床食管癌疫苗的应用提供了一个思路。另外, 实验结果显示, 单纯食管癌特异性抗原多肽未经 DC 提呈而直接刺激 T 淋巴细胞, 其诱导的 T 淋巴细胞对 T.Tn 无显著杀伤作用, 且与未经抗原诱导的 T 淋巴细胞对 T.Tn 以及无关肿瘤细胞 HepG2 的杀伤作用相似, 说明未经 DC 提呈抗原就不能诱导出有效的肿瘤特异性 CTL 而发挥抗癌

效应,充分显示了DC的抗原提呈作用在抗瘤免疫反应中重要地位.

4 参考文献

- 1 Okada H, Tahara H, Shurin MR, Attanucci J, Giezeman-Smiths KM, Fellows WK, Lotze MT, Chambers WH, Bozik ME. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a tumor-specific peptide elicit effective anti-tumor immunity against intracranial neoplasms. *Int J Cancer* 1998;78:196-201
- 2 Storkus WJ, Zeh HJ 3rd, Salter RD, Lotze MT. Identification of T-cell epitope:rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J Immunother* 1993;14:94-103
- 3 巴德年. 当代免疫学技术与应用. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998:158-167
- 4 Runnels HA, Moore JC, Jensen PE. A structural transition in class II major histocompatibility complex proteins at mildly acidic pH. *J Exp Med* 1996;183:127-136
- 5 Sigal LJ, Reiser H, Rock KL. The role of B7-1 and B7-2 costimulation for the generation of CTL responses *in vivo*. *J Immunol* 1998;161:2740-2745
- 6 Angevin E, Andre F, Zitvogel L. Antitumor cellular immunotherapy: the breakthrough of dendritic cells. *Bull Cancer* 2000;87:107-115
- 7 Maehara Y, Tomisaki S, Oda S, Kakeji Y, Tsujitani S, Ichiyoshi Y, Akazawa K, Sugimachi K. Lymph node metastasis and relation to tumor growth potential and local immune response in advanced gastric cancer. *Int J Cancer* 1997;74:224-228
- 8 Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:1269-1276

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 •

食管癌发生发展过程中 RAR- β mRNA 的原位表达

王立峰, 张丽红, 刘明, 张伟, 王吾如

王立峰, 王吾如, 哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科
黑龙江省哈尔滨市 150001

张丽红, 哈尔滨医科大学第一临床医学院放射科
黑龙江省哈尔滨市 150001

刘明, 哈尔滨医科大学第三临床医学院腹外科 黑龙江省哈尔滨市 150040
张伟, 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所, 肿瘤生物检测中心
北京市 100021

项目负责人: 王立峰, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街 23 号, 哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科. Ifwy@public.hr.hl.cn
电话: 0451-53604114

收稿日期: 2004-04-22 接受日期: 2004-06-10

摘要

目的: 研究 RAR- β mRNA 在食管癌发生发展过程中的作用, 探讨维 A 酸(RA, retinoid acid)在食管癌高危人群中化学预防和化学治疗中应用的可行性.

方法: 应用原位杂交方法检测了食管癌 70 例 (原位癌 30 例, 鳞状细胞癌 20 例, 腺癌 20 例) 及增生性病变 97 例 (单纯增生 19 例, 不典型增生 I-III 级分别为 20 例, 39 例, 38 例) 和正常食管黏膜鳞状上皮组织 19 例中 RAR- β mRNA 表达情况.

结果: 在正常食管黏膜上皮、单纯增生、不典型增生上皮总体及其 I-III、原位癌、侵袭性鳞状细胞癌及腺癌中 RAR- β mRNA 表达的阳性率分别为 100%(19/19), 94.7%(18/19), 90%(18/20), 69.2%(27/39), 68.4%(26/38), 63.3%(19/30), 60%(12/20), 60%(12/20). 正常食管黏膜上皮较不典型增生总体、原位癌和侵袭性癌组织均有显著性差异($P < 0.05$).

结论: RAR- β mRNA 表达的丢失与食管癌的发生发展有关,

用 RA 对表达 RAR- β 高危人群进行化学干预可能会得到预期效果.

王立峰, 张丽红, 刘明, 张伟, 王吾如. 食管癌发生发展过程中 RAR- β mRNA 的原位表达. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1980-1982

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1980.asp>

0 引言

RA(retinoid acid, 维 A 酸)对食管癌细胞系的生长抑制和 RAR- β (retinoid acid receptor beta, 维 A 酸 β 受体)的表达和表达上调有关, 不表达 RAR- β 的细胞系对 RA 有抵抗力, 可以在软琼脂糖中形成集落^[1]. 为研究 RAR- β 在食管癌发展过程中表达的改变, 以及应用 RA 在食管高危人群中进行化学预防的可行性, 我们对 205 例一系列食管活检组织, 包括正常食管黏膜、单纯增生、不典型增生食管上皮、原位癌和侵袭性癌组织中 RAR- β mRNA 的表达情况用非放射性原位杂交方法进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 取自河北磁县 1997 年食管癌普查食管活检组织 195 例, 经病理诊断: 侵袭性鳞状细胞癌 20 例, 原位癌 30 例, 腺癌 10 例, 不典型增生 I, II, III 级分别为 20 例, 39 例, 38 例, 单纯增生 19 例和正常食管黏膜鳞状上皮 19 例. 其中哈医大一院标本腺癌 10 例. 地高辛配基核酸标记和检测试剂盒为 Boehringer mannheim 公司产品. 质粒 PSG5(分别含 RAR- β -antisense