

树突状细胞致敏的肿瘤疫苗对胰腺癌细胞的杀伤效应

陈鑫, 杨帆, 杨兴无, 张帆

陈鑫, 杨兴无, 张帆, 大连医科大学附属第二医院普外科 辽宁省大连市 116027

杨帆, 大连医科大学生物化学与分子生物学教研室 辽宁省大连市 116027

通讯作者: 陈鑫, 116027, 辽宁省大连市, 大连医科大学附属第二医院普外科. xinchent26@yahoo.com.cn

电话: 0411-84671291-3063

收稿日期: 2006-07-08 接受日期: 2006-08-10

Killing effect of tumor vaccine pulsed with dendritic cells on pancreatic carcinoma cells

Xin Chen, Fan Yang, Xing-Wu Yang, Fan Zhang

Xin Chen, Xing-Wu Yang, Fan Zhang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China

Fan Yang, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xin Chen, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China. xinchent26@yahoo.com.cn

Received: 2006-07-08 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To investigate the anti-tumor effect of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) *in vitro* induced by human dendritic cells (DCs) sensitized with pancreatic carcinoma cell lysate on the primarily cultured autogenous cells.

METHODS: Pancreatic carcinoma cells from 6 patients were lysed as tumor antigens. T cells and DCs were separated from peripheral blood. The anti-tumor effects of CTLs induced by DCs sensitized with tumor antigens on the primarily cultured autogenous cancer cells were observed by Cr^{51} -release assay. CTLs pulsed by normal DCs or DCs sensitized with pancreatic cancer cell Panc1 lysate were used as negative or antigen control, respectively.

RESULTS: The killing rates of CTLs for each case in the experimental group were from $69.05\% \pm 15.79\%$ to $88.05\% \pm 15.34\%$, while in the antigen controls they were from $43.08\% \pm 6.92\%$

to $67.30\% \pm 8.91\%$, both of which were much higher than that in negative control ($P < 0.01$). In addition, the killing rates between the experimental and antigen control group were significant ($P < 0.05$).

CONCLUSION: CTLs induced by DCs pulsed with pancreatic carcinoma cell lysate have specific cytotoxic effects on the autogenous pancreatic carcinoma cells.

Key Words: Dendritic cell; Cytotoxic T lymphocyte; Pancreatic carcinoma; Cytotoxic effect

Chen X, Yang F, Yang XW, Zhang F. Killing effect of tumor vaccine pulsed with dendritic cells on pancreatic carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(28):2815-2818

摘要

目的: 研究胰腺癌细胞冻融物致敏树突状细胞(DC)诱导的细胞毒性T细胞(CTL)对原代培养的自体胰腺癌细胞的杀伤作用。

方法: 从6例手术切除的胰腺癌组织中分离胰腺癌细胞, 反复冻融获得肿瘤抗原; 以该肿瘤抗原致敏外周血DC, 诱导T细胞转变为CTL; 采用 Cr^{51} 释放法观察CTL对原代培养的自身胰腺癌细胞的杀伤活性, 分别以来源于胰腺癌细胞株Panc1的肿瘤抗原致敏DC和未致敏DC刺激的CTL作为抗原对照和阴性对照。

结果: 实验组CTL对自身细胞的杀伤活性为 $69.05\% \pm 15.79\% \rightarrow 88.05\% \pm 15.34\%$, 抗原对照组CTL的杀伤活性为 $43.08\% \pm 6.92\% \rightarrow 67.30\% \pm 8.91\%$, 两组CTL杀伤率均显著高于阴性对照组($P < 0.01$); 而实验组与抗原对照组相比, 前者的杀伤活性显著高于后者($P < 0.05$)。

结论: 胰腺癌细胞冻融物致敏的DC疫苗可以诱导T细胞产生高效的针对自体癌细胞的细胞毒效应; 新鲜肿瘤组织来源的胰腺癌细胞比传代的Panc1细胞具有更好的抗原性。

关键词: 树突状细胞; 细胞毒性T淋巴细胞; 胰腺癌细胞; 细胞毒效应

■背景资料

胰腺癌是恶性程度最高的肿瘤之一, 预后极差, 传统的治疗方法对胰腺癌的疗效及预后无明显改善, 而应用免疫生物学手段治疗胰腺癌则有望成为改善胰腺癌疗效及预后的一条有效途径。

■研发前沿

DC能有效激活CTL发挥细胞毒作用,在肿瘤免疫治疗中日益受到重视.已有多DC疫苗尝试用于乳腺癌、前列腺癌、黑色素瘤等临床治疗与研究.在胰腺癌方面,目前国外已有学者利用胰腺癌细胞冻融物或不同的免疫分子激活DC,进而介导CTL对胰腺癌细胞的杀伤作用.

陈鑫,杨帆,杨兴无,张帆.树突状细胞致敏的肿瘤疫苗对胰腺癌细胞的杀伤效应.世界华人消化杂志 2006;14(28):2815-2818
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2815.asp>

0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DCs)在启动抗肿瘤免疫中起关键作用.研究表明,肿瘤抗原激活的DC诱导的抗肿瘤免疫在体外细胞实验及动物实验中均表现出良好的抗肿瘤作用.我们从胰腺癌患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)培养、扩增DC,观察胰腺癌组织细胞冻融物致敏DC诱导的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)对胰腺癌的抗肿瘤效应.

1 材料和方法

1.1 材料 胰腺癌患者6例分别为我院住院患者,年龄范围56-76(平均65.2)岁.手术切除的肿瘤组织病理学诊断均为胰腺导管细胞癌, RPMI 1640培养液为Gibco公司产品; rhGM-CSF, rhIL-4为Promega公司产品; $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$ 购自Amersham公司;淋巴细胞分离液、胶原酶均购自欣经科公司.胰腺癌细胞株Panc1购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心,常规培养于含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液中.无菌条件下收集肿瘤组织,切成小块置于含抗生素的培养液中,胶原酶消化后分离胰腺癌细胞.将细胞分为两部分:一部分作为肿瘤细胞抗原,另一部分细胞进行原代培养,备作细胞毒实验用.

1.2 方法 将上述从肿瘤组织中分离的胰腺癌细胞及Panc1细胞用液氮快速冷冻-室温慢融方式,反复冻融3-4次,镜下见细胞完整性破坏后终止冻融,16 000 g离心30 min,收集上清,无菌微孔滤膜过滤后,即为肿瘤组织冻融抗原.以Bradford法对冻融抗原进行蛋白定量,冻存备用.以Thomas *et al*^[1]改良的方法分离及纯化胰腺癌患者外周血DC,主要步骤如下:抽取胰腺癌患者外周静脉血10 mL,用淋巴细胞分离液分离PBMC;悬浮于含100 mL/L AB血清的RPMI 1640完全培养基中,加入24孔板(每孔 2×10^6 细胞);在37℃, 5% CO_2 培养箱中温育2 h,分别获得悬浮细胞与贴壁细胞.将悬浮的PBMC在聚丙烯Petri皿中培养,选择性除去巨噬细胞;以尼龙毛过滤除去B细胞;再与L2亮氨酸-L2亮氨酸甲酯共同培养选择性除去其中的NK细胞及细胞毒性T细胞,余下细胞则主要为T淋巴细胞.对于

贴壁细胞,每孔加入含rhGM-CSF (1000 U/mL), rhIL4 (1000 U/mL), 100 mL/L AB血清的RPMI 1640完全培养液1 mL;每2 d半量换液,并加入半量细胞因子,保持细胞因子浓度不变.3-4 d后,贴壁细胞变成悬浮的、具有突起的未成熟DC.培养第5天,将每群DC分为两组,一组加入20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 其自身来源的肿瘤抗原冻融物(自身细胞致敏DC组),另一组加入等量Panc1细胞冻融物(细胞系致敏DC组),然后继续培养;第7天收集悬浮细胞,即为具有递呈抗原能力的致敏DC.细胞毒效应按照自身肿瘤抗原致敏自身DC→诱导自身CTL→杀伤自身肿瘤细胞的方案进行,分别以细胞系致敏DC及未致敏DC诱导的CTL作用组作为抗原对照组(Ag control)和阴性对照组(negative control).具体采用4 h ^{51}Cr 释放法检测CTL的抗肿瘤效应:(1)效应细胞:将分离的外周血T细胞,培养7 d后按照DC:T=1:10的比例分别加入自身细胞致敏DC、细胞系致敏DC及未致敏DC,继续培养3-4 d后收集T细胞,此即为效应细胞CTL.(2)靶细胞:分别收集 1×10^6 Panc1以及从6例肿瘤组织中分离获得的胰腺癌细胞(编号S1-S6),重悬于0.5 mL不含碳酸氢钠的完全培养液.加入3.7 MBq ^{51}Cr 铬酸钠,37℃水浴中标记1 h,洗涤细胞三次,调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$.(3)细胞毒效应:向96孔板加入靶细胞,每孔100 μL .按效应细胞:靶细胞=50:1的比例向各孔加入100 μL 不同效应细胞.每组均设3个复孔,阴性对照孔(自发释放)只加100 μL 完全培养液,阳性对照孔(最大释放)加100 μL 1% NP40 (v/v).将96孔板置37℃培养4 h后,1000 g离心培养板10 min,每孔吸取100 μL 上清在液闪计数器上测定每分钟放射活性(cpm值).细胞杀伤活性按以下公式计算:CTL活性(%)=[(实验组cpm-自发释放cpm)/(最大释放cpm-自发释放cpm)] $\times 100\%$.

统计学处理 采用SPSS统计软件,所有变量均以mean \pm SD表示.变量间差异显著性比较用方差分析(Student-Newman-Keuls法).

2 结果

以胰腺癌细胞抗原刺激的DC活化T细胞,使其转变为CTL,再通过 ^{51}Cr 释放法检测CTL在体外对胰腺癌细胞的杀伤作用,结果显示:利用从胰腺癌组织中分离的细胞冻融物作为抗原依次活化DC和CTL,其CTL对自身细胞的杀伤活性为(69.05% \pm 15.79%)-(88.05% \pm 15.34%);而

■创新盘点

从患者手术切除的胰腺癌组织中分离胰腺癌细胞,利用其自身的胰腺癌细胞冻融物作为抗原激活DC,观察活化DC介导的CTL对患者自身的胰腺癌细胞的杀伤效应,可为DC疫苗在临床上的应用提供更加切实可信的依据,这一方案目前在国内外尚未见报道.

表 1 效应细胞CTL对胰腺癌细胞的杀伤活性 (mean \pm SD, %)

靶细胞	自身细胞致敏DC组	细胞系致敏DC组	未致敏DC组
S1	86.72 \pm 13.83 ^{ab}	51.32 \pm 1.63 ^b	3.67 \pm 0.86
S2	76.36 \pm 9.16 ^{ab}	43.08 \pm 6.92 ^b	6.21 \pm 1.32
S3	70.01 \pm 6.56 ^{ab}	49.24 \pm 4.76 ^b	4.18 \pm 1.05
S4	88.39 \pm 10.75 ^{ab}	67.30 \pm 8.91 ^b	2.98 \pm 1.13
S5	69.05 \pm 15.79 ^{ab}	44.37 \pm 11.28 ^b	4.56 \pm 0.78
S6	88.05 \pm 15.34 ^{ab}	60.12 \pm 8.54 ^b	3.97 \pm 0.69
Panc1	76.05 \pm 7.70 ^{a1}	82.17 \pm 12.75 ^b	2.08 \pm 1.10

^a $P < 0.05$ vs 细胞系DC组; ^b $P < 0.01$ vs 未致敏DC组. ¹: 该组所用CTL与S1组相同.

利用Panc1细胞冻融物作为抗原依次活化DC和CTL, 其CTL对自身细胞的杀伤活性为(43.08% \pm 6.92%)-(67.30% \pm 8.91%); 两组CTL杀伤率均远高于未经抗原刺激的DC活化的CTL作用组[杀伤率为(2.98% \pm 1.13%)-(6.21% \pm 1.32%), $P < 0.01$]. 上述结果说明无论是自身来源的肿瘤抗原, 还是胰腺癌细胞株来源的肿瘤抗原, 均可以有效刺激DC, 使其进一步激活CTL, 发挥杀伤胰腺癌细胞的作用(表1).

此外, 对同一靶细胞来说, 自身抗原活化DC介导的CTL对靶细胞的杀伤活性均显著高于Panc1活化DC介导的CTL的杀伤效力(各组 $P < 0.05$), 显示前者具有更强的细胞毒效应; 反之, 当以Panc1作为靶细胞时, 从癌组织中分离的胰腺癌细胞冻融物活化的DC介导的CTL杀伤效应与Panc1细胞自身冻融物刺激活化的DC介导的CTL作用相比, 二者无显著差别(表1). 上述结果提示, 新鲜肿瘤组织来源的胰腺癌细胞比传代的胰腺癌细胞系Panc1具有更好的抗原性, 因而可以更有效地激活DC.

3 讨论

DC是目前所知的最有效的激活初始化T细胞的抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC), 在肿瘤免疫治疗中日益受到重视^[2-3]. 已有多种DC疫苗尝试用于乳腺癌、脑部肿瘤、前列腺癌、黑色素瘤等临床治疗与研究^[4-5]. 研究表明, 肿瘤细胞无法被T细胞识别、杀伤是由于荷瘤宿主的DC功能有缺陷, 无法有效递呈肿瘤抗原所致. 在胃癌、甲状腺癌、黑色素瘤、肺癌、直肠癌等的研究中, 肿瘤患者存在DC数量减少及功能缺陷^[6-7]. 本实验应用反复冻融法获取胰腺癌细胞裂解产物作为胰腺癌全细胞性抗原, 由这些抗原刺激DC来完成对肿瘤抗原的摄取、加工和递呈.

本研究利用胰腺癌患者手术切除的肿瘤细胞冻融物作为抗原激活患者自体DC, 体外观察活化DC诱导产生的CTL对原代培养的患者自体胰腺癌细胞的杀伤作用, 结果6例患者的CTL在体外均显示出了很强的杀伤活性, 这一结果表明, 患者自体DC经rhGM-CSF, rhIL-4及自体胰腺癌细胞冻融物共同修饰后, 产生了良好的抗原递呈作用, 从而能有效激活CTL发挥杀伤作用. 因此, 如果将自体DC作为疫苗输入患者体内, 则活化的DC有可能使机体对肿瘤细胞免疫监视作用的缺陷得以修复, 在体内主动诱导宿主产生高效特异性的抗胰腺癌免疫应答, 抑制胰腺癌肿瘤细胞的生长. DC疫苗作为一种临床胰腺癌辅助治疗手段应具有良好的应用前景.

在靶细胞相同的情况下, 与以胰腺癌细胞株Panc1冻融物作为抗原相比, 抗原为自体胰腺癌细胞诱导产生的DC所激活的CTL具有更高的杀伤率, 其可能的原因为DC可以从胰腺癌细胞冻融物中获取全细胞抗原(即能充分获得肿瘤抗原或肿瘤相关抗原), 完全激活T淋巴细胞, 从而产生特异性的细胞毒性作用.

胰腺癌是消化道肿瘤中恶性程度最高的肿瘤, 其根治性切除术后较高的复发与转移率以及对传统化疗、放疗不敏感已成为制约胰腺癌有效治疗的主要障碍^[8-9], 必须寻找新的治疗手段才有可能解决这一问题. 我们的研究结果显示, 胰腺癌细胞裂解物致敏DC介导的CTL的细胞毒作用对胰腺癌细胞可以产生特异性的杀伤作用, 提示活化的DC疫苗可作为肿瘤免疫生物学治疗的一种崭新模式, 改善晚期胰腺癌的疗效, 预防胰腺癌根治术后的复发与转移.

4 参考文献

- 1 Thomas R, Davis LS, Lipsky PE. Comparative

■应用要点

自体胰腺癌细胞活化DC所激活的CTL具有很高的杀伤率, 表明DC疫苗可作为胰腺癌免疫生物学治疗的一种崭新模式, 改善晚期胰腺癌的疗效, 预防胰腺癌根治术后的复发与转移.

■同行评价

本研究利用胰腺癌患者手术切除的肿瘤细胞冻融物作为抗原激活患者自体DC, 体外观察活化DC诱导产生的CTL对原代培养的患者自体胰腺癌细胞的杀伤作用, 内容新颖, 实验方法先进, 结论较为明确, 文字尚流畅, 是一篇较好的实验研究, 对胰腺癌临床治疗也有一定价值。

- accessory cell function of human peripheral blood dendritic cells and monocytes. *J Immunol* 1993; 151: 6840-6852
- 2 Nishioka Y, Hirao M, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. *Cancer Res* 1999; 59: 4035-4041
- 3 Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 245-273
- 4 Manjili MH, Park J, Facciponte JG, Subjeck JR. HSP110 induces "danger signals" upon interaction with antigen presenting cells and mouse mammary carcinoma. *Immunobiology* 2005; 210: 295-303
- 5 Mincheff M, Zoubak S, Altankova I, Tchakarov S, Makogonenko Y, Botev C, Ignatova I, Dimitrov R, Madarzhieva K, Hammett M, Pomakov Y, Meryman H, Lissitchkov T. Human dendritic cells genetically engineered to express cytosolically retained fragment of prostate-specific membrane antigen prime cytotoxic T-cell responses to multiple epitopes. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 907-917
- 6 Pinzon-Charry A, Maxwell T, Lopez JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol* 2005; 83: 451-461
- 7 Faries MB, Czerniecki BJ. Dendritic cells in melanoma immunotherapy. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6: 175-184
- 8 Ko AH, Dito E, Schillinger B, Venook AP, Bergsland EK, Tempero MA. Phase II study of fixed dose rate gemcitabine with cisplatin for metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *J Clin Oncol* 2006; 24: 379-385
- 9 Abrams RA, Yeo CJ. Combined modality adjuvant therapy for resected periampullary pancreatic and nonpancreatic adenocarcinoma: a review of studies and experience at The Johns Hopkins Hospital, 1991-2003. *Surg Oncol Clin N Am* 2004; 13: 621-638

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信), 免收出版费, 写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间