

文章编号:1673-9469(2008)02-0095-03

负载食管癌抗原肽的脐血树突状细胞诱导杀瘤活性研究

王 健,史 玉,苏安英,柴锡庆,门金城,郑海萍,张向阳,田 珂
(河北工程大学 教务处,河北 邯郸 056038)

摘要:为探讨负载酸洗脱食管癌抗原肽的脐血树突状细胞(DCs)对细胞毒T细胞(CTL)杀伤活性的影响,本研究采用密度梯度离心法分离脐血中的单个核细胞(CBMNC),在重组人粒巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组白介素(rhIL-4)及重组肿瘤坏死因子(rhTNF- α)的配伍作用下,以酸洗脱食管癌抗原肽负载获得分化成熟DCs,利用CytoTox 96试剂盒检测其对特异性CTL的诱导和体外杀伤效应的影响。结果:负载食管癌抗原肽的脐血DCs诱导的CTL对酸洗前食管癌细胞株T.Tn的杀伤率达(78.5 \pm 9.5)%,显著高于酸洗后组和各对照组($P < 0.05$),而对无关肿瘤细胞株Hep2无显著杀伤作用($P < 0.05$)。结论:负载食管癌抗原肽的脐血DCs体外可诱导CTL产生特异性杀伤效应。本研究为食管癌的免疫治疗提供了新的有效途径。

关键词:树突状细胞;食管癌;细胞毒性T淋巴细胞;脐血

中图分类号:R392

文献标识码:A

Research of human cord blood dendritic cells loaded with peptides of esophageal carcinoma cells on cytotoxicity activity

WANG Jian, SHI Yu, SU An-ying, CHAI Xi-qing, MEN Jin-e,
ZHENG Hai-ping, ZHANG Xiang-yang, TIAN Ke

(Department of Educational Administration, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China)

Abstract: The cord blood mononuclear cells (CBMNCs) were separated by density gradient centrifugation and cultured in presence of relevant cytokines (rhGM-CSF, rhIL-4 and rhTNF- α) to generate DCs in order to explore the killing effect of CTL induced by human cord blood dendritic cells (DCs) loaded with mild acid-eluted peptides of esophageal carcinoma cells on cytotoxicity of T lymphocyte. The specific CTLs were induced by DCs loaded with mild acid-eluted peptides of esophageal carcinoma cell line T. Tn. The killing effect of CTLs on T. Tn. target cells was identified by CytoTox96 assay in vitro. The CTLs induced by DCs loaded with antigen peptides exhibit significant killing activity to T. Tn cells before mild acid-eluted (78.5 \pm 9.5)% compared to the cells after mild acid-eluted ($P < 0.05$). It is higher than Hep2 cell line and the controls ($P < 0.05$). The specific killing activity of CTLs stimulated by cord blood DCs loaded with antigen peptides can be induced. It provides a potent method to the immunotherapy of esophageal carcinoma.

Key words: dendritic cells; esophageal carcinoma; cytotoxic T lymphocyte; cord blood

肿瘤生物治疗是近年来出现的肿瘤治疗新方法,代表当今肿瘤治疗的发展趋势。树突状细胞(dendritic cells, DCs)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,在激活T淋巴细胞产生抗肿瘤免疫过程中发挥关键作用,以DCs为中心的过继免疫是肿瘤生物治疗的研究热点之一^[1]。目前,食管癌的生物治疗

收稿日期:2008-03-24

基金项目:河北省科技研究与发展计划资助项目(06276102D)

作者简介:王健(1972-),男,河北定州人,硕士,副教授,从事肿瘤免疫学及分子生物学研究。

也进行了积极的探索,但仍无法解决特异性抗原和足量免疫细胞来源的问题^[2]。脐血中富含可诱导为 DCs 的前体细胞,且获取方便。我们用脐血来源 DCs 负载酸洗脱食管癌细胞表面的抗原肽,体外诱导患者自身 T 淋巴细胞成为抗原特异性 CTL,并研究其对食管癌细胞株的杀伤效应。

1 材料与方法

1.1 材料

人食管癌 T. Tn 和人肝癌细胞株 HepG2 细胞株购自上海市肿瘤研究所,脐血来自我校附属医院产科,重组人粒巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组白介素-4(rhIL-4)、重组肿瘤坏死因子(rhTNF)为美国 PeproTech 公司产品,Cytotox96 试剂盒购自北京 Promega 生物技术有限公司。

1.2 方法

1)食管癌抗原肽的制备:收集培养中对数生长长期的 T. Tn 细胞,用 pH 3.3 的柠檬酸洗脱液作用 50s,然后 1000 r/min,5min 离心后小心收集上清液,置-80℃冻存储备用。酸洗后的细胞立即以 RPMI 1640 培养基洗涤 3 遍,并继续培养,每 24h 重复洗脱 1 次,每次保证所收集的细胞在 $1 \times 10^9/L$ 以上。以上所得酸洗液先经 SepPak18 去盐柱去盐,再经 Centricon-3 超离获得食管癌抗原肽。

2)负载食管癌抗原肽脐血 DCs 的制备:选择健康、足月的孕妇,在胎儿娩出后立即采集脐血 50~100 ml/份。用淋巴细胞分离液分离出脐血单个核细胞(CBMNC)后,以 2×10^6 个细胞/孔接种于培养板。用含 150 ml/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养 2 h 后,在贴壁细胞中加入 rhGM-CSF 2000 U/mL 和 rhIL-4 500 U/mL,置于 37℃体积分

数为 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。每 3d 半量换液,同时补充上述细胞因子(剂量如上),诱导 DCs 生成。在培养 7d 后,每天加入 rhTNF-α 100 U/mL 诱导 DCs 成熟。在培养 10d 的 DCs 中,每孔加入弱酸洗脱食管癌抗原肽 0.1 mL,至第 12~14d 收集已负载食管癌抗原肽的脐血 DCs。

3)负载食管癌抗原肽的脐血 DCs 诱导细胞毒性 T 细胞:采集食管癌患者外周血,常规分离外周血单个核细胞(PBMNC),尼龙棉柱法获得混合 T 淋巴细胞。96 孔培养板每孔加入致敏 DCs 5×10^3 个,按效靶比为 1:10、1:50 和 1:100 的比例加入 T 细胞,每种条件设 3 个复孔,并设单纯效应细胞为对照。分别以负载食管癌抗原肽脐血 DCs 诱导的抗原特异性 CTL、食管癌抗原肽直接诱导的 T 淋巴细胞及未经抗原诱导的 T 细胞作为效应细胞,以酸洗前后 T. Tn、Hep2 为靶细胞,效靶比分别在 12.5:1、25:1、50:1 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)×100%,统计学处理数据以 mean±SD 表示,采用 SPSS 软件进行 t 检验分析。

2 结果

各个效靶比均显示,负载食管癌酸洗抗原肽的脐血 DCs 可诱导食管癌特异性 CTL,对酸洗前 T. Tn 有强大的杀伤作用,而对酸洗后 T. Tn 和无关肿瘤细胞 HepG2 的杀伤活性则显著降低(P<0.05);与单纯负载食管癌抗原肽 T 细胞相比有非常显著差异(P<0.05)。未经 DCs 诱导的 T 细胞对 T. Tn 无显著杀伤作用,与无关肿瘤 HepG2 类似(P>0.05)。

表 1 致敏脐血 DCs 诱导的特异性 CTL 对 T. Tn 的杀伤作用(%)
Tab.1 Killing effect of specific cytotoxicity T lymphocyte induced by actived DCs on T. Tn cell

分组情况	效靶比		
	12.5:1	25:1	50:1
CTL+T. Tn(酸洗前)	53.5±8.8	67.52±8.6	78.5±9.5
CTL+T. Tn(酸洗后)	6.1±1.8	7.3±1.9	8.6±2.1
CTL+HepG2	5.2±1.7	7.8±2.4	8.8±3.0
抗原+T 细胞+T. Tn	1.2±1.0	1.6±1.4	2.1±1.6
T 细胞+T. Tn	1.1±0.8	1.7±1.0	1.6±1.5
T 细胞+HepG2	1.0±0.6	1.1±1.0	1.3±0.9

3 讨论

肿瘤生物治疗的关键是激活机体的免疫系统来清除肿瘤细胞,而如何诱导产生足量的肿瘤特异性 CTL 是其核心问题。目前食管癌特异性抗原尚难获取,但有研究表明,T 淋巴细胞的激活是通过识别肿瘤细胞或 APC 表面结合于 MHC-I 类分子的抗原肽^[3]。因此,提取这种抗原肽诱导产生肿瘤特异性 CTL,可以实现对肿瘤的特异性免疫^[4]。微酸洗涤法可以单纯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^[5]。因此,以微酸洗涤 T.Tn 细胞方法获取食管癌抗原能够保留其特异性。我们实验中 CTL 对酸洗前后的 T.Tn 杀伤作用的对比也符合此观点。

DCs 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,因此 DCs 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 DCs 提呈就不能有效地诱导出抗癌免疫;肿瘤组织中的 DCs 分布量与肿瘤的疗效和预后密切相关。然而,在肿瘤患者体内,由于自体 DCs 数量有限、局部调节 DCs 的活性物质不足以及肿瘤细胞分泌抑制性细胞因子等原因,致使 DCs 抗原提呈能力十分有限^[7]。因此,如何获得足量 DCs 在体外进行诱导、扩增,并负载相应的肿瘤抗原,然后再回输体内,是肿瘤过继免疫治疗的关键步骤,这也是当前研究的热点。脐血中造血干细胞含量丰富,加入相应细胞因子诱导分化后,DCs 获得率较其他来源高;且脐血来源广泛、采集容易、费用低廉、供需双方无痛苦、移植宿主发生率低,因此在自体 DCs 数量不足以进行有效治疗时,可考虑采用脐血 DCs^[8]。我们用食管癌抗原肽负载脐血 DCs 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 78.5%,提示脐血 DCs 可有效地捕获、提呈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 HepG2 无显著杀伤作用,提示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肽未经 DCs 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 DCs 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 DCs 在抗癌免疫反应中的重要地位和广阔的应用前景。

4 结论

1)本研究采用弱酸洗脱法获得了特异性的食管癌抗原肽,解决了食管癌抗原获取难的实际问题,使食管癌生物治疗得以有效启动。

2)肿瘤患者体内 DCs 数量有限,且功能受到抑制。本研究采用脐血来源 DCs,具有得率高、费用低、痛苦小等特点。为食管癌的生物治疗提供了稳定的细胞来源。

3)由负载食管癌抗原肽的脐血 DCs 诱导的特异性 CTL 对食管癌细胞株 T.Tn 显示出高效的杀伤作用,充分证明了本研究方法的科学性和有效性,有望为食管癌的免疫治疗开辟一条新的途径。

4)本研究由于样本量较少,尚需进一步研究论证并逐步降低费用,为早日应用于临床作必要的准备。

参考文献:

- [1] NESTLE F O, FARKAS A, CONRAD C. Dendritic cell based therapeutic vaccination against cancer[J]. *Curt Opin Immunol*, 2005, 17(2): 163-169.
- [2] YOSHIURA K, NAKAOKA T, NISHISHITA T, *et al.* Carbonic anhydrase II is a tumor vessel endothelium-associated antigen targeted by dendritic cell therapy[J]. *Clin Cancer Res.*, 2005, 11(22): 8201-8207.
- [3] O NEILL D W, ADAMS S. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer[J]. *Blood*, 2004, 104(8): 2235-2246.
- [4] NENCIONI A, BROSSART P. Cellular immunotherapy with dendritic cells in cancer: current status[J]. *Stem Cells*, 2004, 22: 501-513.
- [5] KISLIN K L, MARRON M T, LI G, *et al.* Chaperone-rich cell lysate embedded with BCR-ABL peptide demonstrates enhanced anti-tumor activity against a murine BCR-ABL positive leukemia[J]. *The FASEB Journal*, 2007, 21: 2173-2184.
- [6] ZHANG J G, EGUCHI J, KRUSE C A, *et al.* Antigenic profiling of glioma cells to generate allogeneic vaccines or dendritic cell-based therapeutics[J]. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13: 566-575.
- [7] LIAU L M, PRINS R M, KIERTSCHER S M, *et al.* Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment[J]. *Clinical Cancer Research*, 2005, 11: 5515-5525.
- [8] SLUKVIN I I, VODYANIK M A, THOMSON J A, *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional dendritic cells through the myeloid pathway[J]. *J. Immunol*, 2006, 176(5): 2924-2932.

(责任编辑 闫纯有)

作者: [王健](#), [史玉](#), [苏安英](#), [柴锡庆](#), [门金娥](#), [郑海萍](#), [张向阳](#), [田珂](#), [WANG Jian](#),
[SHI Yu](#), [SU An-ying](#), [CHAI Xi-qing](#), [MEN Jin-e](#), [ZHENG Hai-ping](#), [ZHANG Xiang-](#)
[yang](#), [TIAN Ke](#)

作者单位: [河北工程大学, 教务处, 河北, 邯郸, 056038](#)

刊名: [河北工程大学学报\(自然科学版\)](#) 

英文刊名: [JOURNAL OF HEBEI UNIVERSITY OF ENGINEERING \(NATURAL SCIENCE EDITION\)](#)

年, 卷(期): 2008, 25 (2)

参考文献(8条)

1. [NESTLE F O;FARKAS A;CONRAD C](#) [Dendritic cell based therapeutic vaccination against cancer](#)[外文期刊] 2005 (02)
2. [YOSHIURA K;NAKAOKA T;NISHISHITA T;at al](#) [Carbonic anhydrase II is a tumor vessel endothelium-associated antigen targeted by dendritic cell therapy](#)[外文期刊] 2005 (22)
3. [NEILL D W;ADAMS S](#) [Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer](#)[外文期刊] 2004 (08)
4. [NENCIONI A;BROSSART P](#) [Cellular immunothempy with dendritic ceils in cancer:current status](#)[外文期刊] 2004
5. [KISLIN K L;MARRON M T;LI G](#) [Chaperone-rich cell lysate embedded with BCR-ABL peptide demonstrates enhanced anti-tumor activity against a murine BCR-ABL positive leukemia](#)[外文期刊] 2007 (9)
6. [ZHANG J G;EGUCHI J;KRUSE C A](#) [Antigenic profiling of glioma cells to generate allogeneic vaccines or dendritic cell-based therapeutics](#)[外文期刊] 2007
7. [LIAU L M;PRINS R M;KIERTSCHER S M](#) [Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment](#)[外文期刊] 2005
8. [SLUKVIN I I;VODYANIK M A;THOMSON J A](#) [Directed diferentiafion of human embryonic stem cells into functional dendritic ceils through the myeloid pathway](#) 2006 (05)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_hbjzkjxyxb200802026.aspx