

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0208-02

脐血树突状细胞介导的卵巢癌免疫治疗的体外研究

马 薇¹, 高云荷¹, 郭钰珍¹, 薛春燕²(1. 兰州医学院第二附属医院妇产科, 兰州 730030; 2. 第二军医大学长海医院肿瘤科, 上海 200433)

树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前所知的最有效的激活初始型 T 细胞的专职抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC),在肿瘤免疫治疗中具独特地位^[1]。有学者^[2]用黑色素瘤片段 Melar/MART 和在乳腺癌、卵巢癌上表达的 Her-2/neu 基因编码肽 E75 和 Gp2 分别负载人外周血 DC, 然后刺激 T 细胞, 结果诱发了抗原特异性的细胞毒反应。本实验旨在探讨脐血树突状细胞诱导卵巢癌细胞株 HO-8910 免疫治疗作用, 为临床生物治疗卵巢肿瘤提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 研究对象及材料

2000 年 4 月 ~ 10 月病理确诊的卵巢癌患者 10 例, 年龄 18 ~ 63 岁, 平均年龄为 35 岁, 均为首次发病。脐血由我院产科提供, 常规肝素抗凝, 标本在 6 h 内处理。人卵巢浆液性囊腺癌细胞株 HO-8910 由第四军医大学西京医院妇产科研究室惠赠。人宫颈癌细胞株 HeLa, 人肝癌细胞株 SMMC7721、人膀胱移行肿瘤细胞株 EJ 由兰州大学生命科学院郑荣梁教授惠赠; rhGM-CSF, rhIL-2 购自厦门特宝生物工程公司; rhTNF- α 购自中国药品生物制品检定所, RPMI-1640, FCS, IMDM, MTT 购自美国 Gibco 公司; CD1a, CD80, CD83, CD86, CD95, HLA-DR 免疫荧光单抗为法国 IMMUNTECH 公司产品。流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 常规培养 HO-8910 细胞, 收集。低温反复冻融, 高速离心后收集上清, 经直径 0.22 μm 微孔滤膜过滤后作为冻融抗原备用。

1.2.2 采用 Mini MACS 免疫磁珠吸附柱分离装置, 用 CD34⁺ 细胞选择试剂盒(Milienyi Biotech 公司产品) 按其说明进行细胞分离与纯化。每 1.0×10^8 细胞悬浮于 0.3 ml MACS 标记液, 加 100 μl 抗人 IgG 和 100 μl 抗 CD34 单抗(QBEND-10)。标记细胞通过置于磁场中分离柱, 洗脱去除 CD34⁻ 细胞, 将分离柱移出磁场, 加压洗脱, 收集 CD34⁺ 细胞, 以 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 6 孔板, 每孔 1 ml。完全培养基中含 100 ng/ml GM-CSF, 50 U/ml TNF- α , 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 培养 2 周, 每周半量换液,

第 14 天检测细胞表型。所用软件为 Cell Quest 软件。

1.2.3 按文献[3]方法制备卵巢癌患者外周 T 淋巴细胞, 将 HO-8910 冻融抗原($1 \times 10^7/\text{ml}$), T($1 \times 10^6/\text{ml}$), rhIL-2(100 U/ml), 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 孵育 3 d, 收集细胞为 CTL。

1.2.4 收集第 8 天的 DC, 密度调整至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 加入冻融抗原。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h 后, 用终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的丝裂霉素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min, 1640 洗 2 次, 作为刺激细胞。

1.2.5 将对数生长期 HO-8910, HeLa, SMMC-7721, EJ 以 $5 \times 10^3/\text{孔}$ 接种于 96 孔板中, 然后将 DC 以 $1 \times 10^3/\text{孔}$ 、 $1 \times 10^4/\text{孔}$, CTL 以 10: 1, 25: 1, 50: 1, 100: 1, 200: 1 的效靶比加入 96 孔板中, 每组设 3 个复孔, 同时设单纯的靶细胞组、单纯的效应细胞组、1640 空白对照组。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 孵育 48 h 后弃悬液, 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml) 150 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 孵育 4 h, 终止培养, 弃去 MTT, 每孔加入二甲基亚砷溶液 150 μl , 水浴振荡 10 min, 静置 20 min。酶联免疫检测仪上测定各组在 570 nm 处吸收值(结果用 3 孔均值表示), 计算杀伤活性。实验重复 3 次。

杀伤活性(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{单纯效应细胞组 OD 值}}{\text{单纯靶细胞 OD 值}} \right) \times 100\%$$

1.2.6 将 DC 作用后的 HO-8910 用胰酶消化后制成细胞涂片, 吡啶橙常规染色。荧光显微镜观察细胞形态变化。

1.2.7 采用 student *t* 检验, 数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计用 EXCEL 软件。

2 结果与讨论

脐血 CD34⁺ 细胞培养 3 d 后, 约有 60% 细胞出现不规则外形, 有小的聚集细胞簇出现。7 ~ 10 d 后聚集细胞团扩大。细胞基本分两种类型: 一种贴壁, 不规则, 伸展着粗大树根样突起; 一种为非贴壁细胞, 胞浆透亮, 细胞膜边缘有毛刺样物质伸出(图 1)。体外以 rhGM-CSF, rhTMF- α , 诱导培养 14 d 后, 流式细胞仪 CD1a, CD80, CD83, CD86, CD95(Fas), HLA-DR 表达分

别为: $(17.66 \pm 2.21)\%$, $(10.40 \pm 0.16)\%$, $(0.89 \pm 0.09)\%$, $(33.93 \pm 6.71)\%$, $(0.41 \pm 0.03)\%$, $(60.68 \pm 1.42)\%$ ($P < 0.5$)。本实验利用 rhGM-CSF, rhTNF α 和诱导脐血 CD34⁺ 细胞生成具有典型的“树突状形态”, 表达 CD1a, CD80, CD83, CD86, CD95(Fas), HLA-DR 细胞表型的 DC。随着时间的延长, 细胞内出现颗粒或细胞裂解等细胞凋亡现象, 这与 DC 表型中检测出 Fas 表达是一致的, 说明 Fas 可能参与 DC 的凋亡^[4]。

图1 培养第8天DC形态 $\times 250$

卵巢肿瘤死亡率居妇科肿瘤之首, 术后系统化疗是不可缺少的重要治疗措施。虽然卵巢癌对化疗比较敏感, 有效率达 50% ~ 80%, 但因为内在性和获得性的化疗耐受性, 有部分病人初次化疗无效或缓解后复发, 再次化疗无效, 从而严重影响病人的生存。为解决这一难题, 我们尝试用 HO-8910 冻融抗原致敏脐血 DC, 激活卵巢癌患者外周血 T 淋巴细胞增强 CTL 对肿瘤细胞特异性的杀伤作用。治疗结果显示: 当效靶比为 50:1 时, 可使肿瘤细胞生长受到抑制; 当效靶比为 100:1 时, 肿瘤细胞生长受到明显抑制 ($P < 0.01$)。当效靶比为 200:1 时, 肿瘤细胞受抑制程度与 100:1 无明显变化 (图 2); 而对照组 (Hela, SMMC-7721, EJ) 细胞生长不受抑制 ($P > 0.5$, 图 3)。经杀伤作用后 HO-8910 细胞吖啶橙染色可见肿瘤细胞出现核固缩 (karyopyknosis)、核碎裂 (karyorrhexis)、膜起泡 (membrane zeiosis)、新月小体 (crescentic body) 凋亡细胞形态学改变。这提示用肿瘤细胞冻融抗原致敏的 DC 联合 IL-2 活化的卵巢癌患者外周血 T 淋巴细胞可以有效的杀伤肿瘤细胞。有报道认为^[5], 无论卵巢癌细胞株还是卵巢癌新鲜组织标本, 绝大部分无 CD80 基因表达, 少部分有 CD80 基因表达时量也很低, 推测这是卵巢癌细胞逃避机体免疫攻击机理之一。而 DC 由于高表达 CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), 从而为 T 淋巴细胞提供“双信号”, 启动免疫杀伤程序。DC 诱导的肿瘤杀伤机制之一为 CTL 特异性的杀伤, 亦可能为诱导肿瘤细胞的凋

图2 CTL对HO-8910在不同效靶比时的杀伤率

图3 效靶比为100:1时不同靶细胞的吸光度值

亡。此研究为卵巢癌的免疫治疗, 特别是过继免疫治疗提供实验依据。

[关键词] 树突状细胞; 卵巢癌; 免疫治疗; 凋亡

[中图分类号] R737.31 [文献标识码] A

[参考文献]

- [1] 曹雪涛. 树突状细胞的基础与临床研究新进展[J]. 中国免疫学杂志, 1998, 14: 161-168.
- [2] Brossart P, Stuhler G, Flud T, et al. Lysis of human renal and colon carcinoma cells by Her-2/neu specific cytotoxic T lymphocytes induced with dendritic cells[J]. Blood, 1997, 90: 450a.
- [3] 辛宏, 陈虎, 满秋红, 等. 人外周血树突状细胞的超微结构及其化学特征[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20: 592-595.
- [4] Santiago-Schwarz F, Borrero M, Tucci J, et al. *in vitro* expansion of CD13⁺ CD33⁺ dendritic cells precursors from multipotent progenitors is regulated by a discrete fas-mediated apoptosis schedule [J]. J leukoc Biol, 1997, 62(4): 493.
- [5] 崔保霞, 孔北华, 姜洁, 等. CD80 基因导入人卵巢癌细胞系及其体外诱导细胞毒 T 淋巴细胞的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2001, 4: 229-232.

[收稿日期] 2001-11-13

[修回日期] 2002-04-05

bp