

[文章编号] 1007-385X(2003)02-0137-02

## 肝癌细胞抗原负载树突状细胞激活 CTL 的抗肿瘤作用

李东复, 杨春荣, 申吉子, 闫峻 (吉林大学第二医院消化内科, 长春 130041)

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,世界范围内每年约有 100~125 万人死于肝癌,我国是肝癌高发国家。导致肝癌发生的主要危险因素有 HBV, HCV 感染及各种肝硬化等。肝癌化疗、放疗疗效差,虽尚有另外多种治疗方法,包括手术切除、化疗栓塞、瘤体内注射药物和肝移植等,但预后均不理想。研究表明肝癌患者机体免疫功能存在严重障碍。本课题对肝癌患者外周血树突状细胞介导的抗肿瘤功能状态进行了研究,现报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 临床资料

6 例肝癌患者分别为我院及省肿瘤医院住院病人。年龄范围 36~56 岁,平均年龄 46.2 岁,均经 B 超、CT 或 MRI 确诊。手术切除的肿瘤组织病理学诊断均为原发性肝细胞癌,以无菌操作收集于含抗生素的培养液中,酶消化后分离肿瘤细胞待用。对照组 7 人为年龄范围相应的健康献血者。

#### 1.2 主要试剂与细胞株

IMDM 培养液, MTT 为 Sigma 公司产品;人 AB 血清由长春市中心血站提供;rhGM-CSF, rhIL-4 为 promega 公司产品;抗人 CD1a, CD83, CD80, HLA-DR 免疫荧光单抗为 IMMUNTECH 公司产品;传代肝癌细胞 BelH7402、胃癌 BGC823 细胞由本室保存。

#### 1.3 外周血 DC 的体外诱导与表型测定

取肝癌患者与对照组健康献血者外周血常规分离获得单个核细胞( $5 \times 10^6/\text{ml}$ )悬浮后,加入 24 孔板(每孔 1 ml),在  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中温育 2 h,分别获得非贴壁细胞与贴壁细胞,贴壁细胞每孔加入含 rhGM-CSF(1 000 U/ml), rhIL-4(500 U/ml), 10% AB 血清完全培养液 1 ml,分别于培养 3, 6, 9, 12 d 收集 DC 细胞,采用间接免疫荧光法标记收集的 DC,用流式细胞仪测定细胞表面 CD1a, CD83, CD80, HLA-DR 分子表达。

#### 1.4 肿瘤抗原的制备

手术切除肝癌组织分离的肝癌细胞与常规培养的肝癌细胞( $1 \times 10^7/\text{ml}$ )低温反复冻融,高速离心后收集上清,经微孔滤膜过滤后即肿瘤冻融抗原备用。

#### 1.5 CTL 细胞的制备

外周血非贴壁单个核细胞( $1 \times 10^7/\text{ml}$ )加入含冻融抗原( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ), rhIL-2(200 U/ml)完全培养液,于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  孵育 3 d,即为肿瘤特异性 CTL 备用。

#### 1.6 肿瘤抗原负载 DC 激活肿瘤特异性 CTL 细胞毒作用

将生长良好的肝癌细胞、BelH7402 传代细胞、胃癌 BGC823 细胞以  $5 \times 10^3/\text{孔}$  接种于 96 孔板中,然后将经冻融抗原孵育 24 h 后 DC 以  $5 \times 10^3/\text{孔}$ , CTL 以 50:1 的效靶比加入 96 孔板中,每组设 3 复孔,同时设未负载抗原 DC、胃癌细胞、单纯效应细胞、单纯肝癌细胞等对照组。 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  孵育 48 h 后弃去培养液,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)150  $\mu\text{l}$  继续培养 4 h,弃去 MTT,每孔加入二甲亚砷溶液 150  $\mu\text{l}$ ,水浴振荡 10 min,静止 20 min,酶标仪检测 570 nm 处吸收值,计算杀伤活性。

杀伤活性(%) =

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

### 2 结果与讨论

#### 2.1 单核细胞诱生的 DC 计数

6 例原发性肝癌患者 10 ml 外周血来源的单个核细胞经体外诱导培养 3, 6, 9, 12 d 后,诱生的细胞数分别为  $0.53 \pm 0.08$ ,  $0.82 \pm 0.11$ ,  $1.56 \pm 0.32$ ,  $2.02 \pm 0.53$  ( $\times 10^6$ ),明显低于正常对照组  $1.13 \pm 0.28$ ,  $1.86 \pm 0.64$ ,  $2.57 \pm 0.42$ ,  $3.25 \pm 0.76$  ( $\times 10^6$ ), ( $P < 0.05$ )。

#### 2.1 DC 表型分析

分别收集培养 3, 6, 9, 12 d 后的细胞,经流式细胞仪分析显示肝癌患者表达 DC 特征性标志 CD1a 分子、成熟标志 CD83 分子、共刺激分子 CD80 及 HLA-DR 分子等随着培养时间的延长而增加,但明显低于对照组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,见表 1)。

表1 不同培养时间原发性肝癌与对照组 DC 表型表达变化(  $\bar{x} \pm s$  )

组别( n )	DC 表型	培养时间( d )			
		3	6	9	12
肝癌组( 6 )	CD1a	15.1 ± 3.2	25.1 ± 4.6	38.2 ± 8.3	41.6 ± 9.2**
	CD83	13.5 ± 4.8	36.3 ± 11.2	46.8 ± 10.2	51.3 ± 9.6**
	CD80	18.6 ± 5.1	33.8 ± 16.1	45.6 ± 9.6	50.6 ± 13.1**
	HLA-DR	38.2 ± 9.1	59.6 ± 11.5	78.2 ± 13.5	83.3 ± 10.1*
对照组( 7 )	CD1a	23.6 ± 6.8	41.9 ± 6.2	62.8 ± 11.6	67.2 ± 16.5
	CD83	38.3 ± 9.2	62.6 ± 10.3	77.2 ± 15.1	83.8 ± 15.1
	CD80	24.6 ± 5.1	46.5 ± 7.1	68.6 ± 9.1	73.3 ± 11.6
	HLA-DR	55.2 ± 6.8	73.4 ± 8.1	92.6 ± 13.1	98.2 ± 14.6

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  与对照组比较

### 2.3 负载肝癌抗原 DC 介导 CTL 杀伤肿瘤细胞效应 ( 见图 1 )。

究结果显示,肝癌患者相同数量的前体细胞经诱导分化形成的 DC 数量、成熟状态、细胞表面的 MHC II 类分子及协同刺激分子表达量较对照组明显减少。本研究经实体肝癌细胞、传代肝癌细胞冻融抗原负载外周血 DC 激活肝癌患者 CTL 对肿瘤细胞的特异性杀伤作用显示,肝癌患者抗原负载 DC 介导的 CTL 对肿瘤细胞的杀伤作用明显低于对照组,这一结果亦表明,肝癌患者存在 DC 功能缺陷。研究结果还显示,应用肝癌传代细胞冻融抗原负载 DC 介导 CTL 对实体瘤肝癌细胞的杀伤作用虽有所降低,但与实体肝癌细胞冻融抗原负载 DC 介导的杀伤作用无明显差异。上述结果为肝癌树突状细胞免疫治疗提供了实验依据。

图1 负载肝癌抗原 DC 介导 CTL 与对照组杀伤肿瘤细胞效应比较

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.05$

DC 细胞是目前所知的最有效的激活初始 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。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<sup>[1-3]</sup>。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、胰腺癌等的研究中,肿瘤患者存在 DC 数量减少及功能缺陷<sup>[4]</sup>。肿瘤组织及其周围浸润 DC 数量、功能与肿瘤的发生发展、预后等密切相关,DC 密集浸润的肿瘤分化程度高,预后好,反之,常伴有肿瘤分化程度低和恶性进展。肿瘤可使 DC 凋亡、共刺激分子表达缺陷及免疫反应中的信号传导分子缺失。本研

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Berard F, Blanco P, Davoust J, *et al.* Cross-priming of naive CD8T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic cells[ J ]. *J Exp Med*, 2000, 192: 1535-1543.
- [ 2 ] Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, *et al.* Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor - specific immune response[ J ]. *J Immunol*, 2000, 165: 3797-3803.
- [ 3 ] Brossart P, Wirths S, Stuhler G, *et al.* Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses *in vivo* after vaccinations with peptide - pulsed dendritic cells[ J ]. *Blood*, 2000, 96: 3102-3108.
- [ 4 ] Dallal RM, Christakos P, Lee K, *et al.* Paucity of dendritic cells in pancreatic cancer[ J ]. *Surgery*, 2002, 131: 135-142.

[ 收修日期 ] 2002 - 12 - 26

[ 修回日期 ] 2003 - 03 - 20