

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )03-0170-05

## 肿瘤抗原负载的树突状细胞对肝癌肿瘤浸润淋巴细胞体外抗瘤作用的影响

汪晓莺<sup>1</sup>, 梁志强<sup>1</sup>, 张一心<sup>2</sup>, 孙伟红<sup>1</sup>, 石佑琴<sup>1</sup>( 1. 南通医学院免疫学教研室, 江苏南通 226001; 2. 南通医学院附属医院外科, 江苏南通 226001 )

[ 摘要 ] **目的:** 研究肿瘤抗原负载的树突状细胞( DCs )对原发性肝癌肿瘤浸润淋巴细胞( TILs )体外增殖和抗瘤作用的影响。**方法:** 将自体肿瘤细胞匀浆粗提物( Tuly )与原发性肝癌患者外周血来源的 DCs 共培养以制备肿瘤抗原负载的 DC( DC-Tuly ),将 DC-Tuly 与自体 TILs 在低浓度 IL-2( 100 U/ml )中共培养,用 FCM 测定 DC-Tuly 的表型以及与 DC-Tuly 混合培养前后的 TILs 表型,并计数 TILs。用 LDH 法测定 TILs 的细胞毒作用。ELISA 法检测 TILs 培养上清中 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的含量。**结果:** DC-Tuly 表面 CD1a, CD83, CD80, CD86, CD40 和 HLA - DR 分子表达水平增高(  $P < 0.05$  );DC-Tuly 明显诱导 TILs 的增殖(  $P < 0.01$  )及对自体肝癌细胞的细胞毒作用(  $P < 0.01$  ), CD3<sup>+</sup> TILs 增多(  $P < 0.05$  ), CD4<sup>+</sup> TILs 比例较混合前升高(  $P < 0.01$  ),但仍以 CD8<sup>+</sup> TILs 为主。与 DC-Tuly 混合培养后第 1,2 天, TILs 分泌 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的量明显提高(  $P < 0.01$  )。**结论:** 负载肿瘤抗原的 DCs 可促进 TILs 的增殖,增强 TILs 的特异性抗肿瘤活性。

[ 关键词 ] 树突状细胞; 肿瘤浸润淋巴细胞; 细胞毒作用; 原发性肝癌

[ 中图分类号 ] R392.1; R735.7 [ 文献标识码 ] A

## Effect of Dendritic Cells Loaded with Tumor Antigens on Antitumor Activity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes from Hepatocellular Carcinoma *in vitro*

WANG Xiao-ying<sup>1</sup>, LIANG Zhi-qiang<sup>1</sup>, ZHANG Yi-xin<sup>2</sup>, SUN Wei-hong<sup>1</sup>, SHI You-qin<sup>1</sup>( 1. Department of Immunology of Nantong Medical College, Nantong 226001; 2. Department of Surgery of Affiliated Hospital of Nantong Medical College, Nantong 226001 )

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the effects of dendritic cells( DCs ) loaded with tumor antigens on the proliferation and antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes( TILs ) from hepatocellular carcinoma ( HCC ) *in vitro*. **Methods:** DCs derived from the peripheral blood of patients with HCC were loaded with autologous tumor lysate( Tuly ) to generate DC-Tuly and then the DC-Tuly was co-cultured with autologous TILs in low concentration of IL-2. TILs were counted, and the phenotypes of DCs and TILs were assayed by FCM and the cytotoxicity of TILs was determined with LDH method. The concentration of cytokines in TILs culture supernatant such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  was detected by ELISA . **Results:** The expression levels of CD1a, CD80, CD83, CD86, CD40, HLA-DR molecules on the DC-Tuly are notably increased(  $P < 0.05$  ). The proliferation of TILs which were induced by DC-Tuly was markedly enhanced (  $P < 0.01$  ) and the cytotoxicity of the TILs against autologous tumor cells was remarkably increased (  $P < 0.01$  ). After co-cultured with DC-Tuly, CD3<sup>+</sup> TILs were increased(  $P < 0.05$  )and the percentage of CD4<sup>+</sup> TILs was enhanced(  $P < 0.01$  ), however, the percentage of CD8<sup>+</sup> TILs was still higher than that of CD4<sup>+</sup> TILs. Both concentrations of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the culture supernatant of the TILs distinctly increased on the 1st and 2nd days of co-culturing (  $P < 0.01$  ). **Conclusion:** DCs loaded with tumor antigens can obviously promote the proliferation and the specific antitumor activity of TILs.

[ **Key words** ] dendritic cell; tumor-infiltrating lymphocyte; cytotoxicity; hepatocellular carcinoma

\* 肿瘤浸润淋巴细胞( TILs )作为过继免疫治疗的效应细胞具有很高的抗瘤活性,以往人们用高浓度 IL-2 ( 1 000 ~ 2 000 U/ml )体外诱导可使 TIL 明显扩增,但

[ 基金项目 ] 江苏省卫生厅资助课题( H9923 )

[ 作者简介 ] 汪晓莺( 1960- ), 女,南通人,副教授,硕士,主要从事抗肿瘤、抗感染免疫研究

TIL 对自体肿瘤的杀伤的特异性下降, 而用低浓度 IL-2 (100 U/ml) 诱导, TIL 却生长迟缓或停滞<sup>[1]</sup>。近年来发现, 经肿瘤抗原致敏的树突状细胞( DCs )能够有效的激发特异性抗肿瘤免疫。本文拟通过研究负载肿瘤抗原的 DC 对肝癌患者 TILs 的影响, 初步探讨一条在低浓度 IL-2( 100 U/ml ) 培养条件下增强 TILs 特异性杀伤活性和促 TILs 增殖的新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及材料

细胞因子: GM-CSF( 北京医科大学免疫室 ), IL-2 和 IL-4( PROMEGA )。单克隆抗体: 抗人 CD1a, CD83, CD80, CD86, CD40 和 HLA - DR 单抗( 法国 Immunotech 公司 ), 抗人 CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 单抗( SABC )。肿瘤细胞株: SK-Hep-1, K562( 本室保存 )。IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  检测 ELISA 试剂盒( 上海森雄科技有限公司进口分装 )。

### 1.2 病例选择

8 例肝癌患者均为附属医院肿瘤外科手术病人。年龄 33 ~ 46 岁, 术前未接受放疗、化疗等, 术后经病理证实为肝细胞性肝癌。

### 1.3 TILs 的分离培养

将手术切除的肿瘤组织块剪碎, 经透明质酸酶、DNA 酶、II 型胶原酶消化后制成细胞悬液。用 100% 和 75% 的淋巴细胞分离液分离细胞, 分别收取上层界面的肿瘤细胞和下层界面的 TILs, 将 TILs 悬浮于含有 IL-2( 100 U/ml ) 的完全培养基中,  $1 \times 10^6$ /ml, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养。

### 1.4 肿瘤细胞的冻存和肿瘤抗原的制备

将部分新鲜分离的肝癌细胞悬于细胞冻存液中, 置于液氮罐中冻存备用。另将  $5 \times 10^6$  自体肝癌细胞在 -70 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 条件下, 反复冻融、物理碾磨和离心, 制备成自体肿瘤抗原( Tuly ), 冻存备用。

### 1.5 外周血 DCs 的诱导与抗原负载

取肝癌病人外周血常规分离获得单个核细胞, 重悬后, 加入 24 孔板(  $2 \times 10^6$  细胞/孔 ), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 2 h 后弃培养上清并去除非贴壁细胞, 即获得贴壁的细胞<sup>[2]</sup>。每孔加入含 IL-4( 500 U/ml ), rhGM-CSF( 800 U/ml ) 的 10% AB 血清完全培养基 1 ml 培养至第 6 天将培养的 DC 分成 2 组, 一组的按上述方法继续培养作为对照组, 另一组加入 Tuly, 培养至第 8 天收获悬浮和轻度贴壁的细胞即为负载肿瘤抗原的 DC( DC-Tuly )。

### 1.6 DC-Tuly 或 Tuly 与 TILs 混合培养

用含有 IL-2( 100 U/ml ) 的完全培养基悬浮 DC-

Tuly 与 TIL 按 1: 10 比例混合, 加入 24 孔培养板, 即每孔加入 DC  $5 \times 10^4$ /ml 和 TIL  $5 \times 10^5$ /ml, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下共培养 7 d, 收集 TILs 检测。另设 2 组作为对照, 即 TIL + IL-2 + Tuly 组和 TIL + IL-2 组。

### 1.7 DCs 和 TILs 细胞的表型的测定

采用间接荧光法标记收集的 DC( 有或无抗原负载 ), 用流式细胞仪检测, 测定细胞表面 CD1a, CD80, CD83, CD86, CD40 和 HLA-DR 分子的表达。分别取与 DC-Tuly 混合培养前和混合培养 7 d 后的 TIL, 同法检测 TIL 表面 CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 分子的表达及计数。

### 1.8 细胞因子检测

留取 TIL + IL-2 + DC-Tuly, TIL + IL-2 + Tuly, TIL + IL-2 各组培养 24, 48, 72 h 的上清液, 按 ELISA 试剂盒操作说明进行 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量测定。

### 1.9 LDH 法测定细胞毒性<sup>[5]</sup>

取连续传代后 24 h 的 SK-Hep-1, K562 及 24 h 前复苏的自体肝癌细胞( 活细胞 > 95% ) 作为靶细胞, 按常规操作方法检测 TILs 的杀伤活性, 效靶比为 25: 1, 按下式计算杀伤活性:

杀伤活性( % ) =

$$\frac{\text{效靶细胞混合释放 OD 值} - \text{自然释放组 OD 值}}{\text{最大释放组 OD 值} - \text{自然释放组 OD 值}} \times 100\%$$

### 1.10 统计学方法

结果采用(  $\bar{x} \pm s$  ) 表示, 两组比较用 *t* 检验, 多组比较用单因素方差分析。所有统计学处理均用 Stata7.0 软件完成。

## 2 结果

### 2.1 Tuly 负载对 DC 表面分子表达的影响

HCC 病人外周血单核细胞用 GM-CSF 和 IL-4 诱导培养 5 d, 第 6 天实验组加入自体 Tuly 继续刺激培养 2 d 后( 对照组不加 Tuly ), 分别检测 2 组 DC 的表面分子的表达, 可见肿瘤抗原负载后的 DC 上调表达 CD1a, CD83, CD80, CD86, CD40 和 HLA - DR( 表 1 )。

### 2.2 DC-Tuly 对 TILs 的增殖的影响

TILs 在含 IL-2( 100 U/ml ) 完全培养基中与 DC-Tuly 混合培养 7 d, 与 Tuly 或单纯在含 IL-2( 100 U/ml ) 的完全培养基中培养的 TILs 相比, 增殖效果明显(  $P < 0.01$  ), 3 组 TILs 增殖数分别为(  $11.16 \pm 2.95$  )  $\times 10^5$ /孔, (  $7.8 \pm 2.63$  )  $\times 10^5$ /孔, (  $7.3 \pm 2.99$  )  $\times 10^5$ /孔( 见图 1 )。

表1 Tuly 负载对 DC 表面分子表达的影响

Tab.1 Effect on the expression of molecules on DC by loading Tuly

Groups	CD1a	CD83	CD80	CD86	CD40	HLA - DR
DC	39.6 ± 9.7	54.5 ± 8.7	52.9 ± 12.0	41.0 ± 11.1	47.1 ± 12.8	53.6 ± 8.6
DC-Tuly	55.6 ± 11.7*	76.4 ± 13.7*	68.9 ± 11.5*	65.3 ± 13.0*	73.1 ± 12.5*	82.3 ± 14.1*

\* Compared with the control group  $P < 0.01$ 

图1 DC-Tuly 对 TIL 的增殖的影响

Fig.1 Effect of DC-Tuly on the proliferation of TIL

## 2.3 DC-Tuly 对 TILs 抗瘤作用的影响

3 组 TILs 对 3 种靶细胞的杀伤率结果见表 2。TIL + IL-2 + DC-Tuly 组对自体肝癌细胞的细胞毒作用较 TIL + IL-2 + Tuly 组和 TIL + IL-2 组显著性增强 ( $P < 0.01$ ), 3 组 TILs 对自体肝癌细胞的细胞毒作用均明显高于对 SK-hep-1, K562 肿瘤细胞的细胞毒作用 ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 DC-Tuly 对 TILs 分泌细胞因子的影响

TILs 经 DC-Tuly 刺激的第 1, 2 天, 分泌 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的水平较 Tuly 组或 IL-2 组的 TILs 显著增高 ( $P < 0.01$ ), 且以第 1 天分泌水平最高 ( $P < 0.01$ ) (见图 2, 3)。

## 2.5 DC-Tuly 对 TIL 的细胞表型的影响

TIL 与 DC-Tuly 混合培养后, CD3<sup>+</sup>T 细胞增多 ( $P < 0.05$ ), CD4<sup>+</sup>T 细胞比例较混合前升高 ( $P < 0.01$ ),

表2 DC-Tuly 对 TILs 杀伤靶细胞活性(%)的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab.2 Effect of DC-Tuly on the cytotoxicity of TIL against target cells

Groups	Autologous tumor cells	K562	SK-Hep-1
TIL + IL-2 + DC-Tuly	75.62 ± 9.16 <sup>■▲</sup>	27.80 ± 9.24	15.02 ± 3.79
TIL + IL-2 + Tuly	41.52 ± 7.28 <sup>▲</sup>	30.10 ± 8.19	13.01 ± 4.25
TIL + IL-2	38.68 ± 8.60 <sup>▲</sup>	26.74 ± 6.50	13.78 ± 3.51

■ Compared with two control groups  $P < 0.01$ ; ▲ Compared with K562 and SK-Hep-1 groups  $P < 0.05$

图2 3组 TIL 不同培养时间分泌 IFN- $\gamma$  的含量( pg/ml )( $\bar{x} \pm s, n=8$ )Fig.2 The concentrations of IFN- $\gamma$  secreted by three groups of TIL in different culturing periods( pg/ml )图3 3组 TIL 不同培养时间分泌 TNF- $\alpha$  的含量( pg/ml )( $\bar{x} \pm s, n=8$ )Fig.3 The concentrations of TNF- $\alpha$  secreted by three groups of TIL in different culturing periods( pg/ml )

表3 TIL与DC-Tuly混合培养前后的细胞表型( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab. 3 The phenotypes of TIL before or after co-culturing with DC-Tuly

Groups	CD3	CD4	CD8	CD56
Before co-culturing	73.26 ± 5.16	17.35 ± 3.44	50.08 ± 4.75	14.68 ± 3.31
After co-culturing	88.40 ± 3.91*	36.72 ± 6.17*	47.53 ± 3.68	7.45 ± 2.46*

\* Compared with before co-culturing group  $P < 0.05$

但仍以 CD8<sup>+</sup>T 细胞为主, CD56<sup>+</sup> 细胞比例下降 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

### 3 讨论

TILs 是原发或继发肿瘤组织周围的淋巴细胞, 大多是 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CTL, 而 CTL 的激活和成熟依赖于抗原肽刺激及第二信号的传导。由于肿瘤细胞表面缺乏或不能正常表达 CD80, CD86 等协同刺激分子, 而不能有效的激活 CTL<sup>[4]</sup>, 同时肿瘤组织内微环境条件下存在免疫抑制物质, 抑制 TILs 的活化、增殖, 使 TILs 活性较低。尽管 TILs 联合应用 IL-2 可产生较强的抗肿瘤效果, 但需 IL-2 的剂量较大, 且 IL-2 具有严重的副作用, 其程度和范围与 IL-2 的用量呈正比<sup>[1]</sup>, 因此, 急需寻找一条在低浓度 IL-2 条件下诱导具有高效特异性抗肿瘤活性的 TILs 的新途径。DC 是体内功能最强的抗原提呈细胞, 其细胞表面丰富表达与抗原递呈有关的 MHC-I 类和 MHC-II 类分子, 高水平表达多种共刺激分子(如 CD80, CD86, CD40 等), 目前发现 DC 既可将外源性抗原与 MHC II 类分子结合, 提呈给 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞, 又可将外源性抗原多肽与 MHC I 类分子结合, 提呈给 CD8<sup>+</sup>T 细胞<sup>[5]</sup>。我们的实验结果显示, 负载肿瘤抗原的 DCs 上调表达 CD1a, CD83, CD80, CD86, CD40 和 HLA-DR 分子, 提示该 DC 成熟度增高, 抗原提呈功能增强。我们将负载肿瘤抗原的 DCs 与肝癌患者 TILs 共同培养, 旨在探讨在低浓度 IL-2 的培养条件下, 增强 TILs 特异性杀伤作用的可行性。

在建立的荷瘤鼠模型中, 负载肿瘤抗原的 DC 体内应用能产生明显的抗肿瘤效果<sup>[6]</sup>。我们将肝癌患者 TILs 与 DC-Tuly 在含低浓度 IL-2(100 U/ml)的培养基中混合培养, 并与加 Tuly 或单纯在低浓度 IL-2(100 U/ml)条件下培养的 TILs 进行比较。实验结果表明, TIL + IL-2 + DC-Tuly 组的 TILs 较 TIL + IL-2 + Tuly 组和 TIL + IL-2 组的 TILs 增殖效果明显; 虽然 3 组 TILs 对自体肝癌细胞的细胞毒作用均明显高于对 SK-Hep-1, K562 肿瘤细胞的细胞毒作用, 显示 TILs 抗肿瘤免疫的特异性, 但负载肿瘤抗原的 DC 诱导的 TILs 对自体肝癌细胞的细胞毒作用显著性增强, 提示 DC-Tuly 促进

了特异性的 CTL 反应。Mulders<sup>[7]</sup>等研究发现, 负载肿瘤抗原的 DCs 与低浓度 IL-2 对人肾细胞癌 TILs 体外增殖及细胞毒作用具有较强的正向调节作用, 本实验结果与该文献报道相一致。

TIL 被激活后能够产生许多细胞因子, 其中 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  具有较高的抗肿瘤活性。它们一方面可直接作用瘤细胞发挥杀伤作用, 另一方面还可调节其它免疫细胞协同对肿瘤细胞的攻击。Rossel<sup>[8]</sup>等分别从细胞因子 mRNA 表达和细胞因子分泌情况观察到缺乏细胞因子的配合是 TILs 细胞毒活性低下的一个重要原因。为证实负载肿瘤抗原的 DCs 对 TILs 细胞因子分泌的影响, 我们对 TILs 在不同培养条件下分泌 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  含量进行测定, 结果显示, TIL + IL-2 + DC-Tuly 组第 1, 2 天分泌 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  的量较 TIL + IL-2 + Tuly 组和 TIL + IL-2 组显著增高。Chang<sup>[9]</sup>等用黑色素瘤病人外周血 DCs 负载肿瘤抗原, 在含 IL-2(60 U/ml)的培养基中可诱导 Th1 细胞分泌高水平的 IFN- $\gamma$ 。IFN- $\alpha$ , TNF- $\gamma$  可增强 DCs 表面 MHC 分子和黏附分子的表达, 从而增强 DCs 将肿瘤抗原呈递给 T 细胞的能力, 促进 T 细胞向 CTL 分化<sup>[10]</sup>。

CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>细胞群体数量的增加程度, 可作为 DCs 激发抗肿瘤特异性 T 细胞的指标之一<sup>[7]</sup>。de Vearmas<sup>[11]</sup>等发现, DCs 只有通过外源抗原负载激活 CD4<sup>+</sup>T 细胞后, 才能诱导产生抗原特异性的 CTL; 负载抗原的 DCs 不能刺激纯化 CD8<sup>+</sup>T 细胞产生 CTL 应答, 加入 CD4<sup>+</sup>T 细胞则可产生应答<sup>[12]</sup>。本结果显示, 被 DC-Tuly 活化后的 TILs 中 CD3<sup>+</sup>T 细胞增多, CD56<sup>+</sup>细胞比例下降, CD4<sup>+</sup>T 细胞所占比例较混合培养前升高, 但仍以 CD8<sup>+</sup>T 细胞为主。提示被 DC-Tuly 活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞对 CD8<sup>+</sup>T 细胞最终分化为肿瘤抗原特异性 CTL 有着极其重要的作用。

本实验结果表明, 负载肿瘤抗原 DCs 能促进 TILs 的增殖和有效地活化 TIL, 使其对自体肿瘤细胞产生较强的细胞毒作用, 分泌高产量的抗肿瘤细胞因子。为临床肝癌患者应用这种高效、特异性的 TILs 进行过继治疗提供了实验依据。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 王建华, 董善庆, 蒋玖, 等. 卵巢癌肿瘤浸润淋巴细胞某些细胞因子基因表达的研究[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6( 1 ): 39-44.

[ 2 ] 朱学军, 曹雪涛, 于益芝, 等. 人外周血树突状细胞的体外扩增与鉴定[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志[ J ], 1997, 4( 4 ): 302-306.

[ 3 ] 何金生, 宗庭益. LDH 法检测 NK 细胞活性的方法学研究[ J ]. 中国实验临床免疫学杂志, 1996, 8( 2 ): 10-13.

[ 4 ] Denfeld RW, Dietrich A, wuttig C, *et al.* *in situ* expression B7 and CD28 receptor families in human malignant melanoma: Relevance for T-cell-mediated anti-tumor immunity[ J ]. *Int J Cancer*, 1995, 62( 3 ): 259-265.

[ 5 ] Moron G, Rueda P, Casal I, *et al.* CD8alpha- CD11b<sup>+</sup> dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8<sup>+</sup> T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules[ J ]. *J Exp Med*, 2002, 195( 10 ): 1233-1245.

[ 6 ] Mule JJ. Tumor vaccine strategies that employ dendritic cells and tumor lysates: Experimental and clinical studies[ J ]. *Immunol Invest*, 2000, 29( 2 ): 127-129.

[ 7 ] Mulders P, Tso CL, Gitlitz B, *et al.* Presentation of renal tumor antigens by human dendritic cells activates tumor-infiltrating lym-

phocytes against autologous tumor: Implications for live kidney cancer vaccines[ J ]. *Cancer Res*, 1999, 445( 5 ): 445-453.

[ 8 ] Roussel E, Gingras MC, Grimm EA, *et al.* High expression of adhesion molecules/activation markers with little interleukin-2, interferon gamma, and tumor necrosis factor beta gene activation in fresh tumor-infiltrating lymphocytes from lung adenocarcinoma[ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 1995, 41( 1 ): 1-9.

[ 9 ] Chang JW, Peng M, Vaquerano JE. Induction of Th1 response by dendritic cells pulsed with autologous melanoma apoptotic bodies[ J ]. *Anticancer Res*, 2000, 20( 3A ): 1329-1336.

[ 10 ] Lutz MB, Assmann CU, Girolomoni G, *et al.* Different cytokines regulate antigen uptake and presentation of a precursor dendritic cell line[ J ]. *Eur J Immunol*, 1996, 26: 586-594.

[ 11 ] de Veerman M, Heiman C, van Meirvenne S, *et al.* Retrovirally transduced bone marrow-derived dendritic cells require CD4<sup>+</sup> T help to elicit protective and therapeutic antitumor immunity[ J ]. *J Immunol*, 1999, 162: 144-151.

[ 12 ] Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P, *et al.* A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4<sup>+</sup> T-helper and a T-killer cell [ J ]. *Nature*, 1998, 393( 6684 ): 474-478

[ 收稿日期 ] 2003 -03 -07 [ 修回日期 ] 2003 -05 -25

· 研究简报 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )03-0174-01

TNP-470 对肺癌细胞诱导的血管内皮细胞增殖的抑制作用

吴晓娟, 杨向红 ( 中国医科大学实验病理学研究室, 沈阳 110001 )

应用体外培养的人脐带静脉内皮细胞( HUVEC )和人肺腺癌细胞株 AZGY82A, 探讨了 TNP-470 对肿瘤细胞诱导的血管内皮细胞增殖的抑制作用及其机制。

人脐静脉内皮细胞的培养采用本实验室改进的 Jaffe 氏培养法, 并且将人肺癌细胞株进行传代培养。制备肺癌细胞条件培养液和肺癌细胞粉碎液。待血管内皮细胞生长至亚融合状态后, 与肺癌细胞条件培养液或细胞粉碎液同时加入 TNP-470 作用液( TNP-470 浓度分别为: 10<sup>-12</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-6</sup> g/ml )。用免疫细胞化学方法检测内皮细胞 PCNA, Flk-1, FGFR 的表达。

肿瘤细胞可合成和释放多种活性因子, 促进其血管新生。其中血管内皮细胞生长因子( VEGF )、成纤维细胞生长因子( FGFs )是主要的促血管新生调节因子。许多恶性肿瘤细胞均有 VEGF 及 FGFs 表达的增多。VEGF 是一种分泌型糖蛋白细胞因子, 体外培养时, 其主要存在于培养细胞的培养液中。而 FGFs 是一种非分泌型生长因子, 合成后贮存于细胞的胞浆, 可存

在于体外培养细胞的粉碎液中。VEGFR-2/Flk-1, FGFR 均为血管内皮细胞表面存在的受体酪氨酸激酶家族成员。本研究应用肺癌细胞条件培养液和细胞粉碎液刺激可见 HUVEC PCNA 表达增加, 表明两者均可刺激血管内皮细胞的增殖。TNP-470( O-氯乙酰-氨基甲酰烟曲霉素 )是一类人工合成的烟曲霉素类衍生物, 其在体内、外抑制肿瘤生长和转移的作用被认为与其抑制血管生成的作用密切相关。研究表明, TNP-470 作用后, 由肺癌细胞诱导的内皮细胞 PCNA, Flk-1, FGFR 的表达均减弱, 并呈剂量依赖关系。因此推测, TNP-470 抑制血管内皮细胞增殖的作用可能与其降低了血管内皮细胞表面的 Flk-1, FGFR 的表达, 进而削弱了酪氨酸激酶受体介导的细胞增殖途径有关。

[ 关键词 ] TNP-470; 血管新生; 血管内皮细胞; 肺癌细胞 [ 中图分类号 ] R730.5 [ 文献标识码 ] D

[ 收稿日期 ] 2003 -03 -10 [ 修回日期 ] 2003 -05 -20