

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0022-05

不同途径免疫的 AFP 基因修饰 DC 瘤苗体内抗肿瘤效应的研究

宋文刚¹, 曲 迅², 李雅林¹, 李 松¹, 吴 聪¹, 陈宪锐¹(1. 泰山医学院免疫学教研室, 山东泰安 271000; 2. 山东大学齐鲁医院基础医学研究所, 济南 250012)

[摘 要] 目的: 探讨腺病毒介导 AFP 基因修饰的 DC(AFP-DC)瘤苗经不同途径免疫后机体抗肿瘤免疫应答反应。方法: 采用皮下注射、静脉注射和瘤体注射三种途径回输 AFP-DC 瘤苗, 比较观察 AFP-DC 瘤苗对荷瘤小鼠免疫治疗作用, 应用 4 h ⁵¹Cr 释放杀伤实验、T 细胞与 NK 体内剔除实验等方法, 观察 AFP-DC 瘤苗对荷瘤小鼠免疫治疗作用及保护性免疫反应。结果: 皮下注射 AFP-DC 瘤苗治疗效应在抑制肿瘤生长、延长小鼠存活期方面都明显优于瘤体内注射或尾静脉注射($P < 0.05$), AFP-DC 瘤苗体内能更有效地诱导特异 CTL 细胞毒活性, 能使免疫动物产生一定的免疫保护作用, 抵抗肿瘤细胞的再攻击。在 AFP-DC 瘤苗诱导抗肿瘤免疫排斥反应过程中, 必需有 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞的参与; 而在其效应阶段, 则依赖于 CD8⁺T 细胞的参与, CD4⁺T 细胞为非必需; 在免疫诱导及效应阶段剔除 NK 细胞对抗肿瘤免疫应答无明显影响。结论: 皮下注射 AFP-DC 瘤苗能有效诱导机体产生抗肿瘤免疫反应, 为 DC 介导的肝癌免疫治疗开辟了新的途径。

[关键词] 树突状细胞; 甲胎蛋白; Hepal-6 肝癌细胞; 瘤苗; 基因疗法

[中图分类号] R730.59 **[文献标识码]** A

The Therapeutic Effects of AFP Gene-Modified Dendritic Cell-Based Tumor Vaccine by Different Re-Infused Pathways

SONG Wen-gang¹, Qu Xun², LI Ya-lin¹, LI Song¹, WU Cong¹, CHEN Xian-rui¹(1. Department of Immunology, Taishan Medical College, Taian 271000, China; 2. Institute of Basic Medicine, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-tumor effects of adenovirus carrying AFP gene transfected DC using different inculabe administrations. **Methods:** The immunotherapy effects of AFP-DC vaccine were compared among administration of intra-vein, hypo-dermal and intra-tumor. The protective and therapeutic effects of AFP-DC tumor vaccine were detected by 4 h ⁵¹Cr releasing assay and depleting T cells and NK cells. **Results:** The therapentic effect of Hypo-dermal was significantly better than assays of the other two ways in inhibiting tumor growth and prolonging the survival period of the mice($P < 0.05$). AFP-DC tumor vaccine could more effectively induced specific CTL cytotoxicity, protective response, and resistance to the rechallenge of tumor cells. Both CD4⁺ and CD8⁺T cells were required for AFP-DC tumor vaccine to induce antitumor immunological rejection. In the effective phase, antitumor immunological rejections were mainly depended on CD8⁺T cells, and CD4⁺T cells were not necessary. Blocking NK cells in the induction and effect phase didn't have obvious influence on the antitumor immunity, suggesting that NK cells were not required for antitumor immunity induced by AFP-DC tumor vaccine. **Conclusion:** AFP-DC tumor vaccine by hypo-dermal administration could induce vaccine more efficient antitumor immune responses than intravein or intra-tumor ways *in vivo*, which provided new ways to the immunotherapy of tumor mediated by DC.

[Key words] dendritic cell; alpha-fetoprotein; hepatoma Hepal-6 cells; tumor vaccine; gene therapy

* 树突状细胞(dendritic cells, DC)是机体功能最强的专职抗原提呈细胞, 它能高效的摄取、加工处理和提呈抗原, 具有较强的迁移能力, 并能显著地激活初始型 T 细胞, 处于启动、调控、并维持免疫应答的中心环节,

[基金项目] 山东省教育厅科技计划项目(J00K61)和山东省卫生厅科技发展计划项目(2001CA1CDB1)

[作者简介] 宋文刚(1964 -), 男, 山东威海市人, 副教授, 主要从事肿瘤免疫学的研究

[通讯作者] 曲 迅(1958-), 女, 教授, 硕士生导师

应用 DC 为基础的主动特异性免疫疗法治疗肿瘤是近几年最受关注的热点^[1-3]。越来越多的人类肿瘤特异性抗原被确认和发现,为肿瘤抗原致敏的 DC 回输机体激发特异性抗肿瘤免疫应答奠定了基础。近来研究发现,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、肿瘤浸润 DC 不能激发有效 CTL、肿瘤细胞在患者体内通过抗原变异和产生免疫抑制因子等机制干扰 DC 对肿瘤抗原的识别、处理和提呈,影响 DC 的活化和成熟,使 DC 不能有效地提呈肿瘤抗原,启动机体的特异性抗肿瘤免疫应答,导致肿瘤细胞逃逸机体的免疫监视^[4-6]。

我们曾观察到重组腺病毒介导 AFP 基因修饰 DC 瘤苗体外能明显刺激 T 细胞增殖和增强 CTL 特异性杀伤作用^[7]。于是,我们采用皮下注射、静脉注射和瘤体注射 3 种途径回输免疫治疗,比较观察了 AFP-DC 瘤苗对荷瘤小鼠的治疗作用及免疫保护反应,并初步探讨其免疫机制。

1 材料与方 法

1.1 动物和细胞株

C57BL/6(H-2K^b)小鼠,雌性,6~8 周龄,购自山东省医学院实验动物中心;Hepa1-6 细胞为 C57BL/6 小鼠来源的肝癌细胞株购自 ATCC;EL-4,293,Yac-1 细胞由本室常规传代培养。

1.2 主要试剂

小鼠重组 GM-CSF,IL-4 购自 Promega 公司;分装(10 ng/μl),-80℃ 保存备用。人 IL-2 购自 Genzyme 公司,RPMI-1640 完全培养基由 RPMI-1640(Hyclone 公司)、10% 胎牛血清(Hyclone 公司)组成,4℃ 保存备用。大鼠抗小鼠 CD4(GK1.5, ATCC TIB207),CD8(2.43, ATCC TIB210)、NK 细胞(PK136, ATCC HB191)单抗腹水按常规方法制备。同位素⁵¹Cr 购自 Amersham 公司。

1.3 AFP-DC 瘤苗的制备

按文献方法^[7]进行。

1.4 荷瘤小鼠模型的建立及治疗

将对数生长期的 Hepa1-6 肝癌细胞接种于小鼠腿部皮下(5×10^5 细胞/只),随着分组,每组 10 只。7 d 后肿瘤长至 20~40 mm² 大小,分别通过瘤体内(intra-tumor)注射,皮下(hypo-dermal)注射或尾静脉(intra-vein)注射 AFP-DC 瘤苗(1×10^6 细胞/只),7 d 后再加强免疫治疗 1 次,观察肿瘤形成情况,对肿瘤大小进行测量,并观察其存活期。

1.5 小鼠脾细胞 CTL 活性和 NK 活性检测

正常 C57BL/6 小鼠(每组 10 只)经 AFP-DC 瘤苗

和对照和对照瘤苗(1×10^6 细胞/只)皮下注射免疫 2 次,间隔 7 d,于第 2 次免疫后 7 d,取其脾淋巴细胞分别以 YAC-1 及 Hepa1-6 肿瘤细胞(EL-4 肿瘤细胞)测定 NK 和 CTL 活性。

$$\text{杀伤率}(\%) = \frac{\text{实验组 cpm} - \text{自发释放组 cpm}}{\text{最大释放组 cpm} - \text{自发释放组 cpm}} \times 100\%。$$

1.6 瘤苗的免疫接种

正常 C57BL/6 小鼠(每组 10 只),经 AFP-DC 瘤苗和对照瘤苗(1×10^6 细胞/只)皮下注射免疫 2 次,间隔 7 d,于第 2 次免疫后 7 d,皮下接种对数生长期的 Hepa1-6 肝癌细胞或 EL-4 肿瘤细胞(5×10^5 细胞/只),观察瘤体生长情况。

1.7 免疫细胞亚群体内剔除试验

为了分析免疫细胞亚群在 AFP-DC 瘤苗诱导抗肿瘤免疫反应中的作用,从 DC 免疫前 4 d 始(为诱导阶段剔除组),或接种肿瘤细胞前第 4 天始(为效应阶段剔除组),间隔 3 d 1 次给小鼠腹腔注射 0.1 ml 抗 CD4(GK1.5)、CD8(2.43)或 NK(PK136)等相应单抗的杂交瘤腹水(每组 10 只),共持续 5 次,对照组注射大鼠 IgG。这一过程经流式细胞术检测证实,在小鼠外周血和脾脏中特定的淋巴细胞亚群 >95% 被删除。肿瘤细胞接种 20 d 后测量其大小。

1.8 统计学处理

采用未配对计量资料的 *t* 检验分析。

2 结 果

2.1 AFP-DC 瘤苗回输途径比较和对荷瘤小鼠的治疗效果

我们首先比较研究了 AFP-DC 瘤苗不同途径回输后的抗肿瘤效应。从(图 1)和(图 2)可见,无论肿瘤瘤体大小还是小鼠存活期,皮下注射 AFP-DC 组都优于瘤体内注射组尾静脉注射组($P < 0.05$)。因此我们就采用皮下注射回输途径进行下列各项实验研究。

皮下注射 AFP-DC 瘤苗组肿瘤的生长明显缓慢,而 LacZ-DC 及 PBS 处理的 DC 组明显快于该组,AFP-DC 瘤苗治疗组小鼠的平均生存期(49.4 ± 4.3) d 明显长于 PBS-DC 组(41.5 ± 5.2) d 及 LacZ-DC 组(42.8 ± 5.8) d($P < 0.05$)。表明 AFP-DC 瘤苗能有效诱导机体产生抗肿瘤免疫反应。

2.2 AFP-DC 瘤苗抗肿瘤免疫保护反应及免疫机理分析

2.2.1 体内诱导 CTL 活性及 NK 杀伤活性

皮下注射 AFP-DC 瘤苗能有效地诱导特异杀伤 Hepa1-6 细胞的 CTL 细胞毒活性,PBS 处理组和 LacZ-DC 组不能有效诱导杀伤 Hepa1-6 细胞的细胞毒活性;

另外, PBS 处理组、LacZ-DC 组和 AFP-DC 组都不能有效诱导杀伤 EL-4 细胞的细胞毒活性, 这表明 AFP-DC 瘤苗体内能更有效地诱导特异 CTL(图 3)。AFP-DC 瘤苗免疫后小鼠脾脏 NK 细胞活性与 PBS 处理组和 LacZ-DC 组几乎一致($P > 0.05$), 表明 NK 活性不受影响(图 4)。

保护作用, 所有小鼠均长出肿瘤。但是 AFP-DC 瘤苗免疫小鼠不能有效产生抗 EL-4 肿瘤细胞的效应(结果未显示)。

图 1 AFP-DC 瘤苗不同途径回输后肿瘤在体内的生长情况

Fig.1 Tumor growth in mice vaccinated by AFP gene-modified DC re-infused in different pathways

图 2 AFP-DC 瘤苗不同途径回输后荷瘤鼠存活期

Fig.2 Survival period of the tumor-bearing mice racinated by AFP gene-modified DC re-infused in different pathways

2.2.2 免疫小鼠对 Hepa1-6 肝癌细胞再次攻击的抵抗作用

如图 5 所示, 与上述 CTL 效应结果相符, AFP-DC 瘤苗免疫小鼠能有效抵抗 Hepa1-6 肿瘤细胞的再次攻击, 肿瘤的生长受到明显抑制, 瘤体出现延迟, 同时生长减慢, 接种后 13 d 时仍未长出肿瘤, 且 16 d 后 60% 的小鼠仍未长出肿瘤, 提示其激发了强有力的抗肿瘤免疫应答。而 LacZ-DC 免疫对 Hepa1-6 细胞的攻击无

图 3 AFP-DC 瘤苗对 Hepa1-6 细胞的特异性 CTL 的体内诱导作用

Fig.3 The cytotoxicity of specific CTL to Hepa1-1 cells induced by AFP-DC vaccination

图 4 AFP-DC 瘤苗免疫后小鼠脾脏细胞 NK 杀伤活性

Fig.4 Cytotoxicity of the mice spleen NK cells in tumor-bearing mice vaccinated with AFP gene-modified DC

我们通过体内剔除试验进一步探讨 AFP-DC 瘤苗

诱导抗肿瘤免疫应答的有关免疫机制。如(图6)所示,在DC免疫过程中(诱导阶段的体内剔除, before immunization)或肿瘤细胞攻击过程中(效应阶段的体内剔除, before inoculation)剔除 $CD8^+$ 细胞都导致免疫动物丧失对 Hepa1-6 肿瘤细胞的抵抗作用;在免疫过程中剔除 $CD4^+$ 细胞导致免疫动物不能排斥肿瘤细胞,但是在效应过程中剔除 $CD4^+$ 细胞对其抗肿瘤免疫应答无明显影响。在免疫诱导阶段和免疫效应阶段剔除NK细胞对抗肿瘤免疫应答无明显影响。

图5 AFP-DC 瘤苗体内诱导的对 Hepa1-6 细胞攻击的免疫保护作用

Fig.5 Protective effects *in vivo* against Hepa1-6 cells of AFP gene-modified DC

Before immunization Before inoculation
Ab treatment

图6 体内剔除细胞亚群对DC诱导抗肿瘤作用的影响

Fig.6 Anti-tumor effects induced by DC after deletion of subsets of lymphocytes *in vivo*

3 讨论

机体内的DC具有独特的迁移功能,这依赖于它们表达多种黏附分子、趋化因子受体、细胞因子受体以及生长因子受体等,DC能够穿越血管壁进入并分布到外周组织、获取抗原后进入输入淋巴系统,最后来到淋

巴结内的T细胞区。实验动物皮下免疫DC瘤苗,能够按照预期的目的进入引流淋巴结。实验动物静脉注射DC瘤苗后^[8],DC首先聚集在肺脏、然后是肝脏、脾脏,表明它们不能有效的进入淋巴结,导致相应T细胞克隆的失能。瘤体注射DC瘤苗后,因肿瘤微环境产生免疫抑制因子影响DC发挥作用。淋巴结内注射是一种高效的免疫途径,而且DC的绝对数只需要 $(1 \sim 2) \times 10^6$ 即可诱导出机体产生特异性的免疫应答^[9],但这种操作方法需要一定的技术。近来研究发现,免疫途径对免疫应答的类型具有明显的影响,皮下免疫DC瘤苗倾向于产生Th1型免疫应答,而静脉注射DC瘤苗倾向于Th2型免疫应答^[10-13]。本实验应用腺病毒介导AFP基因修饰的DC瘤苗,通过瘤体内注射,皮下注射或尾静脉注射回输治疗效果比较,发现皮下注射AFP-DC瘤苗治疗效果在抑制肿瘤生长、延长小鼠存活期方面都明显优于其它两组($P < 0.05$)。

AFP-DC瘤苗体内能有效地诱导特异杀伤Hepa1-6细胞的CTL细胞毒活性,但不能有效诱导杀伤EL-4细胞的细胞毒活性,这表明AFP-DC瘤苗体内能更有效地诱导特异CTL。AFP-DC瘤苗免疫小鼠能有效抵抗Hepa1-6肿瘤再攻击,肿瘤的生长受到明显抑制,瘤体出现延迟,同时生长减慢,但是AFP-DC瘤苗免疫小鼠不能有效产生抗EL-4肿瘤细胞的效应,表明该保护效应具有肿瘤抗原特异性。

逃逸免疫系统的监视是肿瘤细胞的基本特征,增强免疫应答,能够克服这种免疫妥协状态。DC具有显著的活化静息的T细胞的能力,包括 $CD4^+$ Th细胞和 $CD8^+$ CTL细胞,相比之下单核细胞不具备这些特点。通过诱生的DC,增强CTL的杀伤活性,强化免疫监视功能,将为肿瘤免疫治疗提供一条有意义的途径。本研究在DC免疫过程中或肿瘤细胞攻击过程中剔除 $CD8^+$ 细胞都导致免疫动物丧失对Hepa1-6肿瘤细胞的抵抗作用;在免疫过程中剔除 $CD4^+$ 细胞导致免疫动物不能排斥肿瘤细胞,但是在效应过程中剔除 $CD4^+$ 细胞对其抗肿瘤免疫应答无明显影响。在免疫诱导阶段和免疫效应阶段剔除NK细胞对抗肿瘤免疫应答无明显影响,提示AFP-DC瘤苗诱导抗肿瘤免疫应答过程中, $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T细胞的参与是必需的,而NK细胞则非必需。

本研究表明AFP-DC瘤苗皮下免疫的有效体内抗肿瘤效应与DC的抗原提呈功能增强、特异性的CTL诱导和增强等密切相关,为以AFP为“靶的”的肝癌免疫疗法提供实验证据,从而为DC介导的肿瘤免疫治疗开辟了新的途径。

[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(3): 161-168.

[2] Cao XT, Zhang WP, Gu JR. Gene therapy in china[J]. Chin J Cancer Res, 1997, 9(4): 235-239.

[3] 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.

[4] Byrne SN, Halliday GM. Dendritic cells: Making progress with tumor regression? [J]. Immunol Cell Biol, 2002, 80(6): 520-530

[5] Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, *et al.* Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20: 621-667.

[6] 张焯, 曹雪涛. 肿瘤免疫逃逸机制研究新进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(1): 72-74.

[7] 宋文刚, 曲迅, 陈宪锐, 等. 腺病毒介导 AFP 基因修饰树突状细胞体外生物学活性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(4): 269-273.

[8] Lappin MB, Weiss JM, Delattre V, *et al.* Analysis of mouse dendritic cell migration *in vivo* upon subcutaneous and intravenous injection[J]. Immunology, 1999, 98(2): 181-188.

[9] Small EJ, Fratesi P, Reese DM, *et al.* Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells [J]. J Clin Oncol, 2000, 18(23): 3894-3903.

[10] K Tarte, B Klein. Dendritic cell-based vaccine: A promising approach for cancer immunotherapy[J]. Leukemia, 1999, 13: 653-663.

[11] Dillon SM, Griffin JFT, Hart DNJ, *et al.* A long-lasting IFN-alpha response is induced to a single inoculation of antigen-pulsed dendritic cells[J]. Immunology, 1998, 95: 132-140.

[12] Timmerman JM, Levy R. Linkage of foreign carrier protein to a self-tumor antigen enhances the immunogenicity of a pulsed dendritic cell vaccine[J]. J Immunol, 2000, 164: 4797-4803.

[13] Morikawa Y, Tohya K, Ishida H, *et al.* Different migration patterns of antigen-presenting cells correlate with Th1/Th2-type responses in mice[J]. Immunology, 1995, 85: 575-581.

[收稿日期] 2003 - 10 - 20 [修回日期] 2003 - 12 - 10

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0026-01

荷瘤小鼠瘤苗治疗疗效与红细胞天然免疫活性相关性及其意义

郭 峰¹, 钱宝华¹, 花美仙¹, 许育¹, 张乐之²(1. 第二军医大学附属长海医院输血科血液免疫研究室, 上海 200433; 2. 第二军医大学附属长海医院实验诊断科, 上海 200433)

新近利用抗原处理细胞(APC 细胞)处理制备瘤苗疗效较为肯定, 认为天然免疫细胞 DC 细胞瘤苗更有其应用价值。红细胞也是天然免疫细胞。能否用红细胞处理补体调理过的肿瘤细胞制备瘤苗是值得探讨的。有的学者认为红细胞是 T 细胞活性的调节器, 我们的实验有可能为此提供的依据 [Arosa FA, Currpharm Des, 2004, 10(27): 191]。

荷艾氏腹水癌昆明种小白鼠, 模型制备与治疗, 每组小鼠称体重后, 分别腹腔注射死癌瘤苗(放 4℃ 数天苔盼兰染色证明死亡, 细胞数为 1×10^6 /ml)、溶癌瘤苗(低渗裂介制成细胞数为 1×10^6 /ml)、生理盐水各 0.2 ml, 分别为死癌瘤苗治疗组、溶癌瘤苗治疗组和荷瘤未治疗组, 每组 10 只, 在注射后第 6 天 3 组小鼠每只腹腔注射活的艾氏腹水癌(1×10^6 /ml) 0.2 ml, 在攻击后 14 d 每组小鼠都经眼取少许血做 2 种红细胞天然免疫黏附肿瘤细胞功能测定试验(3), 同时测体重, 观察腹胀, 计每日存活数。以及用红细胞肿瘤细胞花环试验测定每组小鼠红细胞 CR1(即 CD35)活性, 用促肿瘤红细胞花环试验测定每组小鼠血清中红细胞免疫调节物质的活性, 方法详见“现代红细胞免疫学”参考书。

2 种瘤苗疗效比较: 2 种瘤苗治疗组小鼠体增减值(-1.65 ± 1.10)g, (-0.93 ± 1.10)g 明显低于未治疗组

(3.31 ± 0.02)g ($P < 0.05$), 死癌瘤苗组小鼠体重明显下降, 毒性反应大于溶癌瘤苗组($P < 0.01$), 2 治疗组小鼠主要死于毒性反应, 腹水量少, 而未治疗组小鼠腹水胀大, 体重明显增加, 死于癌症。但治疗组小鼠明显延长生存期($P < 0.01$)。

2 种瘤苗治疗对红细胞天然免疫黏附肿瘤细胞功能影响比较: 死癌瘤苗治疗组直向红细胞天然免疫黏附率(26.25 ± 9.85)明显高于未治疗组(14.38 ± 4.07 , $P < 0.01$), 促红细胞黏附率无变化; 溶癌瘤苗治疗组促红细胞黏附率(12.14 ± 3.18)明显低于未治疗组(17.25 ± 3.81 , $P < 0.01$), 直向红细胞黏附率略有上升(17.14 ± 3.18)。

研究结果表明瘤苗疗效与红细胞天然免疫活性增强密切相关, 可能与红细胞 CR1 与补体共同作用肿瘤细胞, 并通过红细胞 CD58, CD59 与淋巴细胞 CD2 结合, 促进 T 淋巴细胞免疫功能有关。

[关键词] 瘤苗; 红细胞天然免疫; 补体受体
[中图分类号] R735.7 [文献标识码] D

[收稿日期] 2003 - 9 - 26 [修回日期] 2003 - 12 - 20

[基金项目] 国家自然科学基金资助(39670754)