

[文章编号] 1007-385X(2004)02-089-03

MIP-1 β 基因修饰增强肿瘤相关抗原致敏树突状细胞的抗肿瘤免疫效果

罗小玲¹, 张学荣², 梁安民¹, 谢裕安¹, 匡志鹏¹, 吴继宁¹(1. 广西医科大学肿瘤医院肿瘤实验研究部, 南宁 530021; 2. 广西医科大学医学科学实验中心, 南宁 530021)

[摘要] **目的:** 探讨通过增强树突状细胞(dendritic cells, DC)与T细胞的相互作用来进一步增强DC介导的抗肿瘤免疫效果。**方法:** 体外培养的小鼠骨髓DC体外经携带人MIP-1 β 基因的重组腺病毒(adenovirus expressing human macrophage inflammatory protein-1 beta, AdhMIP-1 β)转染后(MIP-1 β -DC),用小鼠CT26结肠腺癌细胞相关抗原冲击致敏,然后免疫正常同系小鼠,观察其体内诱导的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的保护性免疫反应;通过体内阻断试验探讨免疫细胞亚群及免疫分子在DC诱导抗肿瘤免疫应答中的作用。**结果:** 经抗原致敏的MIP-1 β -DC能更有效地诱导特异CTL活性,能使免疫动物产生更有效的免疫保护作用,抵抗肿瘤细胞的攻击。通过对其抗肿瘤免疫机理的分析发现,CD4⁺、CD8⁺T细胞共同参与了经抗原致敏的MIP-1 β -DC介导的抗肿瘤免疫反应,是主要的抗瘤效应细胞,NK细胞作用不明显。**结论:** 通过基因修饰增强树突状细胞对T细胞的体内趋化活性,能更有效地诱导抗肿瘤免疫反应,为树突状细胞介导的肿瘤免疫基因治疗开辟了新的途径。

[关键词] 树突状细胞; 肿瘤抗原; 基因转染; 抗肿瘤免疫

[中图分类号] R730.59 [文献标识码] A

Enhanced Antitumor Effects Induced by MIP-1 β Gene-Modified Dendritic Cells Pulsed with Tumor Associated Antigen

LUO Xiao-ling¹, ZHANG Xue-rong², LIANG An-min¹, XIE Yu-an¹, KUANG Zhi-peng¹, WU Ji-ning¹(1. Tumor Experiment Apartment, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Medical Science Experiment Center of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To probe the potent effects of dendritic cells (DCs)-based vaccine by enhancing the mutual action between DCs and T lymphocytes. **Methods:** Mouse bone marrow DCs transduced with human Macrophage Inflammatory Protein-1 beta (MIP-1 β) gene by adenovirus vector (MIP-1 β -DC) were pulsed with murine CT26 colorectal adenocarcinoma cell antigen, and used to vaccinate syngeneic mice. **Results:** Immunization with CT26 cell antigen-pulsed MIP-1 β -DC induced specific CTL against CT26 cells and induced protective antitumor immunity, which rendered the immunized mice resistant completely to CT26 tumor challenge. The result of the study on antitumor immunity mechanism showed that the antitumor response depended on both CD8⁺T cells and CD4⁺T cells, which played important roles, while NK cells were not necessary. **Conclusions:** MIP-1 β gene modified DCs are more potent in induction of antitumor immunity through the preferential chemotaxis of DCs on T cells. Vaccination with tumor antigen-pulsed MIP-1 β -DC may be a novel approach to immunotherapy of cancer.

[Key words] dendritic cells; tumor antigens; gene transfer; antitumor immunity

* 树突状细胞(dendritic cells, DC)是抗原提呈功能最强的抗原递呈细胞(antigen presentation cell, APC),也是目前发现的唯一能激活未致敏的幼稚T细胞增殖并建立初级免疫反应的细胞,在启动抗肿瘤免疫反应中起关键作用^[1-2]。体外经肿瘤抗原致敏的DC在体内可诱导抗原特异性CTL,产生有效的抗肿瘤免疫反应^[3-4]。然而DC的抗原提呈有赖于其体内与T细胞的

相互作用,而趋化因子在免疫细胞的体内迁移、分布等过程中发挥重要作用,参与机体炎症反应与免疫应答

[基金项目] 广西科技厅资助课题(编号:桂科回0009008)

[作者简介] 罗小玲(1968-),女,副教授,在读博士研究生,主要从事肿瘤免疫与生物治疗研究

[通讯作者] 罗小玲, E-mail: lxllc001@sina.com

的调节^[5]。本研究以腺病毒为载体将对 T 细胞和 NK 细胞有强烈趋化作用的趋化因子人巨噬细胞炎性蛋白-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β , MIP-1 β) 基因转染体外诱导扩增的 DC, 再用肿瘤抗原体外冲击致敏制成 DC 疫苗免疫机体, 观察其诱导的免疫保护作用, 并探讨其免疫机理。

1 材料与方法

1.1 试剂、细胞等

mGM-CSF 和 mIL-4、丝裂霉素 C 购自 Sigma 公司; 淋巴细胞分离液为上海生化试剂二厂产品; RPMI-1640 购自 GIBICO 公司; 表达人 MIP-1 β 基因的复制缺陷型重组腺病毒(AdhMIP-1 β , 滴度为 5.6×10^9 pfu/ml)、表达 LacZ 的对照腺病毒(AdLacZ, 滴度为 3.4×10^9 pfu/ml); 大鼠抗小鼠 CD4 (GK1.5)、CD8 (2.43)、NK 细胞 (PK136) 由第二军医大学免疫研究所曹雪涛教授惠赠; 乳酸脱氢酶 (LDH) 4 h 释放法杀伤活性测定试剂盒为美国 Promega 公司生产。

1.2 动物与瘤株

BALB/c (H2^d) 小鼠, 雌性, 5~6 周龄, 广西医科大学动物实验中心提供 (SPF 级动物室)。小鼠结肠腺癌 CT26 细胞由本室传代培养。

1.3 肿瘤相关抗原的制备

常规培养 CT26 细胞, 收集对数生长期 CT26 并调整细胞浓度至 1×10^7 /ml, 反复冻融 (-80 $^{\circ}$ C/37 $^{\circ}$ C) 4 次, 作为肿瘤相关抗原。

1.4 小鼠骨髓树突状细胞的诱导

颈椎脱位法处死 BALB/c 小鼠, 无菌取股骨, 骨髓细胞, Tris-NH₄Cl 溶去红细胞, PBS 洗 2 次, 用含 mGM-CSF (10 ng/ml)、mIL-4 (1 ng/ml) 和 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基重悬至 1×10^6 /ml, 铺于 12 孔板, 2 ml/孔, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养, 第 3 天轻轻晃动培养板, 吸弃全部上清, 补入含相同浓度细胞因子的完全培养基; 第 6 天轻轻吹下疏松黏附于的聚集体及悬浮细胞, 置于新的 12 孔培养板中, 并加入等量的上述完全培养基继续培养。

1.5 DC 基因修饰和肿瘤相关抗原的冲击致敏

收集培养第 9~10 天的小鼠骨髓 DC, 调整至 1×10^6 /ml 于 12 孔培养板上, 以 MOI 值 50 加入 AdMIP-1 β 或 AdLacZ, 经腺病毒介导的基因修饰后 2 h, 加 0.2 ml CT26 肿瘤抗原冲击致敏, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵育 3 h, 间隔 30 min 摇晃 1 次。冲击后的细胞用生理盐水洗涤 2 次, X-gal 染色以明确转染效率。

1.6 小鼠脾细胞 CTL 体外诱导和活性检测及肿瘤抗原刺激的树突状细胞诱导的保护性免疫效应

正常 BALB/c 小鼠 40 只, 随机分 5 组, 每组 8 只, ①组: 基因修饰和肿瘤相关抗原冲击致敏的 DC (MIP-1 β -DC + CT26); ②组: 肿瘤相关抗原冲击致敏的 DC (MIP-1 β -DC); ③组: DC; ④组: 经丝裂霉素 C 灭活的 CT26 细胞; ⑤组: 生理盐水。经皮下注射 0.2 ml 进行体内免疫。1 周后, 每组处死 2 只小鼠取脾脏 T 细胞 (5×10^6 /ml) 与灭活的 CT26 细胞按 20:1 的比例, 在含 IL-2 100 U/ml 的 RPMI-1640 完全培养基中培养体外诱导 CTL 活性, 5 d 后收集活细胞作为效应细胞, CT26 细胞为靶细胞, 效靶比为 50:1。采用 LDH 释放法检测 CTL 杀伤活性。置酶标仪上测 490 nm 的 OD 值, 按下列公式计算各效应细胞的杀伤活性。其余小鼠每只皮下接种活野生 CT26 细胞 5×10^5 个, 观察瘤体的生长情况。

杀伤活性 (%) =

$$\frac{(OD_{实} - OD_{空}) - (OD_{效} - OD_{空}) - (OD_{靶} - OD_{空})}{(OD_{靶最大释放} - OD_{靶校对}) - (OD_{靶自然释放} - OD_{空})} \times 100\%$$

1.7 免疫细胞亚群的体内阻断试验

取 40 只 BALB/c 小鼠, 随机分 5 组, 每组 8 只: ①组: 对照抗体 IgG; ②组: anti-CD4 mAb + anti-CD8 mAb; ③组: anti-CD4 mAb; ④组: anti-CD8 mAb; ⑤组: anti-NK mAb; 分别于 MIP-1 β 基因修饰与 CT26 肿瘤相关抗原免疫 DC 的第 4、-1、2、5、8 天腹腔注射含相应单克隆抗体的杂交瘤腹水 0.1 ml/鼠, 共 5 次 (以基因修饰与抗原致敏 DC 免疫的当天为第 0 天)。基因修饰与抗原致敏 1×10^5 DC 免疫后第 9 天, 皮下接种 CT26 直肠癌细胞 (5×10^5 /只)。当有 1 组小鼠全部死亡时, 全部处死其余小鼠。

1.8 统计学处理

数据用平均值表示, 采用未配对计量资料的 *t* 检验分析, *P* < 0.05 时差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 腺病毒介导基因转染效率的测定

X-gal 染色的阳性率可达 95% 以上, 表明腺病毒介导的基因转移效率较高。

2.2 MIP-1 β 基因修饰与 CT26 肿瘤相关抗原致敏的骨髓 DC 能更有效地诱导特异 CTL 细胞毒性

CT26 肿瘤相关抗原致敏 1×10^5 DC 一次性免疫小鼠, 1 周后取脾细胞体外诱导 CTL, 虽然 CT26 肿瘤相关抗原刺激的 DC 与未经基因修饰的 DC 及经丝裂霉素 C 灭活的 CT26 细胞能有效地诱导特异性 CTL 杀伤活性 (分别为 $65.3 \pm 13.8\%$, $36.5 \pm 12.6\%$, $30.5 \pm 10.5\%$), 但是 MIP-1 β -DC + CT26 更有效, 其杀伤活性为 $82.8 \pm 15.7\%$ 。生理盐水处理组不能诱导杀伤

CT26 细胞的细胞毒活性,提示 MIP-1 β -DC + CT26 在体内能更有效地诱导特异 CTL。

2.3 MIP-1 β 基因修饰与 CT26 肿瘤相关抗原致敏的骨髓 DC 体内诱导的保护性免疫反应

如(图1)所示,经 CT26 肿瘤相关抗原刺激的 DC (DC + CT26)与未经基因修饰的 DC (DC)及灭活的 CT26 细胞(CT26)免疫的小鼠均能有效抵抗 CT26 肿瘤的生长,MIP-1 β -DC + CT26 更有效,CT26 肿瘤出现明显延迟,生长明显减慢,有 20% 的小鼠未见肿瘤生长;而经生理盐水处理组小鼠不能产生抗 CT26 肿瘤细胞的效应,提示 MIP-1 β -DC + CT26 免疫可在体内诱导更有效的抗肿瘤免疫应答。

图 1 MIP-1 β 基因修饰与 CT26 肿瘤相关抗原致敏 DC 体内诱导的对 CT26 细胞攻击的抵抗作用

Fig.1 Vaccination with CT26 tumor antigen-pulsed MIP-1 β -DC induced the resistance to the subsequent challenge of CT26 tumor cells

2.4 DC 诱导抗肿瘤免疫反应的免疫机理分析

在免疫过程中,完全阻断 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞,则 MIP-1 β -DC + CT26 免疫不发挥作用,小鼠于接种肿瘤细胞后的第 23 天全部死亡,肿瘤平均直径为 29.5 \pm 5.5 mm,与对照抗体 IgG 阻断组及 anti-CD4 mAb, anti-CD8 mAb, anti-NK mAb 阻断组(肿瘤平均直径分别为 9.5 \pm 1.5 mm, 18.3 \pm 4.5 mm, 20.5 \pm 4.0 mm, 12.5 \pm 3.5 mm)比较有显著意义($P < 0.01$)。而阻断 NK 细胞对抗肿瘤免疫应答无明显影响,提示 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞共同参与了 MIP-1 β -DC + CT26 介导的抗肿瘤免疫反应,是主要的抗瘤效应细胞, NK 细胞作用不明显。

3 讨论

DC 是体内功能最强大的专职抗原提呈细胞,具有独特的抗原提呈和激发功能,作为免疫反应的核心和关键,在肿瘤细胞和 T 淋巴细胞的相互作用中起桥梁和枢纽作用^[6]。通过调节肿瘤抗原的提呈以增强抗肿

瘤免疫应答是目前肿瘤免疫治疗的重要策略之一。DC 的抗原提呈有赖于其体内与 T 细胞的相互作用,而趋化因子在免疫细胞的体内迁移、分布等过程中发挥重要作用,参与机体炎症反应与免疫应答的调节^[5],部分趋化因子在肿瘤治疗中显示了良好的应用前景^[7-8]。而有关 MIP-1 β 在肿瘤治疗中应用的报道较少。本文以腺病毒为载体将对 T 细胞和 NK 细胞强烈趋化作用的趋化因子人 MIP-1 β 基因转染体外诱导扩增的 DC,再用肿瘤抗原体外冲击致敏制成 DC 疫苗免疫机体,使之能更有效地选择性地趋化 T 细胞,增强 DC 与 T 细胞接触机率和相互作用,促进抗原的有效提呈从而更有效地诱导机体的抗肿瘤免疫应答。实验结果表明,腺病毒能有效介导 MIP-1 β 基因转染,肿瘤相关抗原致敏、MIP-1 β 基因修饰的 DC 免疫能更有效地诱导特异 CTL 细胞毒活性,并在体内诱导出强烈的保护性免疫反应,可抵抗肿瘤细胞的 2 次攻击。通过对其抗肿瘤免疫机理的分析发现,阻断 CD8⁺ T 细胞导致免疫动物丧失对 CT26 肿瘤细胞的抵抗作用,阻断 CD4⁺ T 细胞导致免疫动物不能排斥肿瘤细胞,CD4⁺, CD8⁺ T 细胞共同参与了经抗原致敏的 MIP-1 β -DC 介导的抗肿瘤免疫反应,是主要的抗瘤效应细胞,而 NK 细胞作用不明显。本实验为增强树突状细胞疫苗的肿瘤免疫治疗提供了新的思路和方法,同时也为趋化因子在肿瘤免疫治疗中的应用提供了新的模式。

[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] 扬维华, 刘英, 周敬群. 树突状细胞与肿瘤免疫治疗进展[J]. 中国肿瘤, 2003, 12(6): 345-347.
- [3] 李东福, 扬春荣, 申吉子, 等. 肝癌细胞负载肿瘤抗原树突状细胞激活 CTL 的抗肿瘤作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(2): 137-138.
- [4] 童鹰, 詹仁雅, 周永庆, 等. 肿瘤提取物冲击致敏树突状细胞治疗脑胶质瘤的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(7): 647-649.
- [5] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokine: A new classification system and their role in immunity[J]. Immunity, 2000, 12: 121.
- [6] Nair S K, Synder D, Rouse B T, et al. Regression of tumors in mice vaccinated with profession antigen-presenting cells pulsed tumor extracts[J]. Int J Cancer, 1997, 70(6): 706-715.
- [7] Narvaiza I, Mazzolini G, Barajas M, et al. Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one-encoding the chemokine IFN- γ -inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy[J]. J Immunol, 2000, 164: 3112-3122.
- [8] Zhu JG, Li YF, Zhou GH, et al. Transfection of colorectal cancer cells with chemokine MCP-3 (monocyte chemoattractant protein-3) gene retards growth and inhibits tumor metastasis[J]. World J Gastroenterol(世界胃肠学杂志, 英文版), 2002, 8(6): 1067-1073.