

[文章编号] 1007-385X(2005)03-0197-05

体外研究 CpG 基序对人食管癌疫苗的佐剂效应

孙涛¹, 黄幼田², 杨红艳², 杨月景³, 袁亦铭¹, 赵明耀², 董子明²(1. 北京大学第一临床医院男科中心, 北京 100034; 2. 郑州大学基础医学院, 郑州 450052; 3. 郑州大学第二附属医院, 郑州 450053)

[摘要] 目的: 探讨 CpG 基序在人食管癌 Eca-109 细胞疫苗研究中的佐剂效应。方法: 以 Eca-109 细胞膜表面小肽刺激 DC 作为食管癌疫苗, HL-60 细胞膜表面小肽刺激 DC 作为对照疫苗。以 CpG 基序作为佐剂, 以 CBPw 作为对照佐剂, 测定各组的 T 细胞增殖试验和 CTL 活性。结果: 佐剂组的 T 细胞活性明显高于其余各组($P < 0.01$); 人食管癌疫苗组的 T 细胞活性明显高于其余各组($P < 0.01$); 与 Eca-109 细胞匹配的 HLA 也影响了 T 细胞活性的发挥。结论: CpG 基序是人食管癌疫苗的有效佐剂, HLA 对 T 细胞功能有影响。

[关键词] CpG 基序; 树突状细胞; 组织相容性白细胞抗原; 食管癌

[中图分类号] R392.33 [文献标识码] A

Adjuvant Effects of CpG Motif-Containing Oligodeoxynucleotide *in vitro* on Human Esophageal Tumor Vaccine

SUN Tao¹, HUANG You-tian², YANG Hong-yan², YANG Yue-jing³, YUAN Yi-ming¹, ZHAO Ming-yao², DONG Zi-ming²(1. Andrology Center, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; 2. Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 45002, China; 3. The Second Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the adjuvant effects of CpG motif-containing oligodeoxynucleotide (CpG) *in vitro* on human esophageal cancer vaccine. **Methods:** Matured dendritic cells (DC) activated by peptides on Eca-109 cell membranes were used for human esophageal tumor vaccine and matured DC activated by peptides on HL-60 cell membranes were used for control vaccine. With adjuvant of CpG or the cell wall skeleton of coryne bacterium parvum (CBPw), we analyzed each group's T-cell proliferation and cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. **Results:** The adjuvant of CpG or CBPw markedly enhanced T-cell proliferation and CTL response($P < 0.01$); The groups with human esophageal tumor vaccine had markedly greater T-cell proliferation and CTL response than other groups($P < 0.05$); The HLA gene locus alleles to match Eca-109 cell gene affected the activity of T cells. **Conclusion:** CpG may be the optimal adjuvant of human esophageal tumor vaccine and the HLA gene locus may affect T cells' function.

[Key words] CpG motif; dendritic cell; histocompatibility leukocyte antigen; esophageal tumor

食管癌是常见的恶性肿瘤之一, 预后差, 对其发病机制、免疫治疗的研究虽然取得了一定进展, 但其免疫疗效一直处于较低的水平, 这主要是因为未找到食管癌的肿瘤特异性抗原(tumor-specific antigen, TSA) 和敏感的肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA), 而且食管癌抗原的免疫原性弱, 不能诱导充分的免疫反应。

用弱酸洗膜法提取细胞膜表面小肽是一种合理的抗原纯化过程, 但是单纯的细胞膜表面小肽尚不能诱

发充分的抗肿瘤免疫应答。而通过采用合适的佐剂来增强抗原的免疫原性, 可获得相对理想的免疫效应。含 CpG 基序的寡聚脱氧核苷酸(CpG-containing oli-

[基金项目] 2002 教育部科学技术重点项目; 2002 河南省重点科技攻关项目(0223033900); 2003 年河南省科技厅攻关项目(324410035)

[作者简介] 孙涛(1971-), 男, 郑州人, 讲师, 住院医师, 在读博士, 主要从事肿瘤学及男科学的研究
E-mail: suntao@zzu.edu.cn

godeoxynucleotide, CpG)是一种有效的免疫佐剂,但尚未见其应用于食管癌疫苗研究中的报道^[1,5]。本实验以人食管癌 Eca-109 细胞膜表面小肽作为抗原,以被刺激 DC 作为疫苗,研究作为佐剂的 CpG 基序对细胞免疫的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

CpG: 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3',上海申工合成。Eca-109 细胞、HL-60 细胞由本研究室保存。短小棒状杆菌胞壁成分(the cell wall skeleton of coryne bacterium parvum, CBPw)由郑州大学徐发林博士惠赠。hIL-2、hIL-4、hGM-CSF、脂多糖(LPS)购自 Sigma; DNA 提取试剂盒、HLA 引物试剂盒、Taq 酶购自 One Lambda; PE-CD_{11c}, PE-CD₁₄, PE-CD₄₀, PE-CD₈₃, PE-CD₈₆购自 Becton Dickimso; 乙腈(乙级色谱纯)购自天津四友; 三氟乙酸(HPLC 级)为 Fluka 进口分装; Na₂₅₁CrO₄, ³H-TdR 购自美国 Perkin Elmer。

1.2 A 细胞膜表面小肽的收集与纯化

以弱酸洗脱法收集 Eca-109 细胞膜表面小肽,酸洗液(pH 3.3)的成分为 0.131 mol/L 柠檬酸和 0.066 mol/L Na₂HPO₄。收获的酸洗液过 Sep-Pak C18 柱,用质量分数为 60% 的乙腈洗脱,收集洗脱液,用真空冷冻干燥法去除乙腈和水,收获少量淡黄色粉末。以 PBS 溶解后,再用 MicroconYM-3 型超滤管超滤,收集分子量小于 3 000 dal 的多肽混合物, -20℃ 冻存^[6]。同法收集人白血病细胞系 HL-60 细胞膜表面小肽以作对照。以体积比 15% SDS-PAGE(Tris-Glycine)进行蛋白电泳,考马斯亮蓝 R-250 染色观察 Eca-109 细胞膜表面小肽纯化情况(图 1)。

1.3 Eca-109 细胞的配型及对健康志愿者的筛选

采用敏感的 HLA 基因分型技术检测 Eca-109 细胞,采用血清学 HLA 分型技术检测本学院的健康志愿者^[6]。

1.4 人外周血 DC 的培养

取 1 名含有 HLA-A03 的健康志愿者外周血 50 ml,收集外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),用含 hGM-CSF 20 μg/L, hIL-4 10 μg/L 及含 10% 该志愿者血清的 RPMI-1640 培养液,调整细胞密度为 3 × 10⁶/ml,加入 24 孔板,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,于第 6 天根据培养板每孔 DC 数量,以每 1 × 10⁴ 个 DC 加入上述冻存的小肽混合物 50 μg,并同时加入 CpG 50 μg 或 CBPw 50 μg,刺激未成熟 DC,同时设立未加小肽混合物的对照疫苗组。各组再加入 LPS 5 μg/ml 后继续培养 24 h,收获 DC,以流式细胞仪鉴定其成熟。

1.5 CTL 杀伤活性的检测

取上述抗原肽和不同佐剂负载的 DC 5 × 10⁵ 作为刺激细胞,即 DC 疫苗。在刺激细胞培养孔中加入上述 PBMC 5 × 10⁶,以 RPMI-1640 培养液常规培养 24 h 后,以含 80 μg/L rhIL-2 的 RPMI-1640 培养液继续培养。每 7 天应用 DC 疫苗重复刺激淋巴细胞 1 次,共培养 18 d。收集纯化的 T 细胞。

以未加佐剂的 DC 疫苗刺激的 T 细胞为对照组效应细胞,以加佐剂的 DC 疫苗刺激的 T 细胞为实验组效应细胞,以 Eca-109 细胞为靶细胞,取 5 × 10³ 靶细胞按 50:1 效靶比加入 CTL,未经刺激的 T 细胞作阴性对照。以抗原肽加佐剂负载 DC,以此负载的 DC 刺激纯化的 T 细胞。实验分组: CpG 基序加食管癌疫苗组(human esophageal tumor vaccine with the adjuvant of CpG, CpG-Ve); CBPw 加食管癌疫苗组(human esophageal tumor vaccine with the adjuvant of the cell wall skeleton of coryne bacterium parvum, CBPw-Ve); CpG 基序加食管癌对照疫苗组(control vaccine with the adjuvant of CpG, CpG-Vc); CBPw 加食管癌对照疫苗组(control vaccine with the adjuvant of CBPw, CBPw-Vc); 单纯食管癌疫苗组(human esophageal tumor vaccine, Ve); 单纯食管癌对照疫苗组(control vaccine, Vc); 单纯 CpG 基序刺激组; 直接用纯化的 T 细胞加 Eca-109 细胞作效应对照组。

以肿瘤细胞 4 × 10⁶/ml 加 Na₂₅₁CrO₄ 100 μCi,比放射性为 100 ~ 500 μCi/μg,比强度为 0.5 ~ 2.0 mCi/ml。室温下 1 h 后,用 RPMI-1640 培养液悬浮肿瘤细胞,浓度为 5 × 10⁴/ml。每孔加此标记的靶细胞 0.1 ml,加入等量的 2.5 × 10⁶/ml 效应细胞,效靶比为 50:1,同时设

图 1 Eca-109 细胞膜表面小肽的电泳结果
Fig.1 The electrophoresis result of peptides on Eca-109 cell membranes

M: Marker; Me: Peptides on Eca-109 cell membranes

空白对照组。常规培养 4 h 后,分别自各培养孔吸出液体 0.2 ml 移入离心管中,每管补加 0.8 ml Hanks 液,500 rpm 离心 10 min,自各管吸出 0.5 ml 上清分别移入洁净试管中,用 γ 计数器分别计量每分钟脉冲数 (cpm),其结果用三复孔的均值表示。另将标记的靶细胞 0.1 ml 加 1% TritonX-100 0.9 ml 溶解,离心后取上清 0.5 ml,以三复孔的 cpm 均值作为最大释放值。以下列公式计算⁵¹Cr 的特异性释放百分数:

$$^{51}\text{Cr 的特异性释放量}(\%) = \frac{\text{实验组释放量} - \text{自然释放量}}{\text{最大释放量} - \text{自然释放量}} \times 100\%$$

1.6 ³H-TdR 渗入法测定 T 细胞特异性增殖试验

在 96 孔培养板中,每孔加入 2×10^5 /ml 以不同的刺激物刺激纯化的 T 细胞 200 μ l,常规培养这些细胞。在第 4 天,每孔加入 0.5 μ Ci/ml 的³H 胸腺嘧啶(³H-TdR) 20 μ l,18 h 后收获这些细胞,用 β -闪烁仪测定样品结合³H-TdR 的数量。每组至少 3 个复孔,从标准差小于 10% 的样本中计算 cpm 均值。

1.7 HLA 抗原对 T 细胞功能的影响

分 2 个实验组,与 Eca-109 细胞的 HLA 有一个 A03 位点相同的实验组和与 Eca-109 细胞的 HLA 没有一个位点相同的实验组。同法,取 3 名含有 HLA-A03 的健康志愿者外周血和与 Eca-109 细胞的 HLA 没有一个位点相同的 10 名健康志愿者的外周血,分别进行 DC 的培养、T 细胞的纯化、制备加佐剂的 DC 疫苗和未加佐剂的 DC 疫苗,分别测定 CpG-Ve, CpG-Vc, Ve, Vc 4 个实验条件下的 CTL 杀伤活性和 T 细胞特异性增殖情况,并比较 2 组在相同实验条件下的测定值。

1.8 统计处理

采用 SPSS 10.0 进行统计处理。随机选取 1 名含有 HLA-A03 的健康志愿者的外周血所作的 CTL 杀伤活性和 T 细胞特异性增殖试验的结果用($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差进行分析,以 $\alpha = 0.05$ 作为显著性检验水准。与 Eca-109 细胞的 HLA 有一个 A03 位点相同的实验组和与 Eca-109 细胞的 HLA 没有一个位点相同的实验组的 CTL 杀伤活性之间的比较和 T 细胞特异性增殖试验结果之间的比较,用 τ 检验,以 $\alpha = 0.05$ 作为显著性检验水准。

2 结果

2.1 Eca-109 细胞的配型及对健康志愿者的筛选

Eca-109 细胞的 HLA 的基因分型为 A * 03, A * 24; B * 35, B * 37; DRB1 * 01, DRB1 * 12; DRB3。HL-60 细胞的基因分型中无 A * 03。筛选了 3 例表型为

A03 杂合子的健康志愿者。

2.2 DC 的培养结果及鉴定

从外周血单核细胞经 GM-CSF 和 IL-4 诱生 DC, TNF- α 提高 DC 的成熟程度。培养 3 d 后,可见贴壁的单核细胞聚集成散布的细胞集落。培养第 4 天,可见细胞有树突样突起,随着培养时间的延长,细胞体积变大、突起更加明显。培养第 7 天,可见大部分细胞呈悬浮状,形态不规则。本研究室用该法所获得的悬浮细胞进行表型测定发现其高表达 HLA-DR, CD11c, CD83 及 CD86,具有强烈的激活初始 T 细胞的作用。通过对细胞的形态、表型及刺激活性鉴定其为成熟 DC(图 2)。

2.3 CTL 杀伤活性和 T 细胞增殖试验

测定 1 名含有 HLA-A03 的志愿者的外周血所作的 CTL 杀伤活性和 T 细胞特异性增殖活性。用⁵¹Cr 释放试验测定各组 CTL 的活性,用³H 渗入法测定各组 T 细胞增殖活性(表 1)。除 CpG-Ve 与 CBPw-Ve 组之间, CpG-Vc 与 CBPw-Vc 组之间,单纯 Vc 组、单纯 CpG 基序组与单纯 T 细胞对照组之间无显著性差异($P > 0.05$)以外,其余各组之间均有显著性差异($P < 0.05$)。这表明疫苗加佐剂组的 T 细胞杀伤率明和 T 细胞增殖活性明显优于非佐剂组,佐剂 CpG 与 CBPw 之间没有明显差异。人食管癌疫苗组的 T 细胞杀伤率和 T 细胞增殖活性明显优于其余各组。

2.4 HLA 抗原对 T 细胞功能的影响

把 13 名健康志愿者分为两组,与 Eca-109 细胞的 HLA 有一个 A03 位点相同的实验组和与 Eca-109 细胞的 HLA 没有一个位点相同的实验组,使用方法同上,检测这两组之间在 CpG-Ve, CpG-Vc, Ve, Vc 4 个实验条件下的 CTL 杀伤活性和 T 细胞增殖活性。在 Vc 条件下,HLA 匹配组与差异组之间无显著性差异,其余条件下的测定值在两组之间均有显著性差异($P < 0.05$)。此结果提示 T 细胞的功能与 HLA 之间有相关性。

3 讨论

对于人类,胸腺依赖性抗原必须由主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)递呈。T 细胞对抗原的识别受 MHC 分子种类的限制,因此本研究涉及了 HLA 分型问题。MHC 不同座位或同一座位不同等位基因之间结构上的差异,可以改变抗原结合槽的结构。由此造成不同 MHC 等位基因编码分子对各种抗原肽的结合具有一定的差异性。这实际上是 MHC 以其多态性参与和调控免疫应答的一种重要机制。

DC 是迄今为止抗原递呈能力最强的细胞。不成熟的 DC 对抑制因子,如 IL-10 和血管表皮生长因子等特别敏感,而分化成熟的 DC 对这些抑制因子不敏感。肿瘤微环境中富含此类抑制因子以及坏死的肿瘤组织

释放的炎症介质,使 DC 无法递呈强的免疫原,这可能是造成该部位 DC 无法刺激抗肿瘤免疫反应的主要原因,这也是引用体外扩增的携有抗原的成熟 DC 可以避免这一限制的免疫学基础。

图 2 流式细胞术检测的成熟与未成熟 DC 表面标志的表达

Fig. 2 Comparative flow cytometric analysis of immature and mature DC's surface makers

A: CD14; B: CD11c; C: CD83; D: HLA-DR; E: CD40; F: CD86

表 1 CTL 对 Eca-109 细胞的杀伤率和 T 淋巴细胞增殖活性($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Tab. 1 *In vitro* tests of CTL against Eca-109 cells and T lymphocyte proliferation activity

Groups	CpG-Ve	CBPw-Ve	CpG-Vc	CBPw-Vc	Ve	Vc	CpG	Control
Cytotoxicity	55.46 ± 2.39	57.96 ± 2.83	22.55 ± 2.17	23.34 ± 3.24	36.18 ± 2.49	18.49 ± 2.13	4.13 ± 1.22	3.54 ± 0.88
Proliferation	77 377 ± 3 298	74 761 ± 4 424	30 773 ± 2 399	33 487 ± 4152	49 909 ± 3 644	9 542 ± 3 411	6 539 ± 2108	4 314 ± 855

根据 Janeway^[4]等提出的模式识别理论,在新模式中,疫苗和其他“非我”抗原只有通过模仿感染的主要方面或导致一定的组织损伤方可引起较强的免疫应答。高度纯化的新型疫苗因缺少诱发天然免疫的信号物质,而不能被天然免疫细胞的相应受体很好识别,不足以产生引起免疫应答的有效信号。因此,佐剂的非抗原特异性的多克隆激活是天然免疫细胞的可能作用机制。于是,人们期望将新型疫苗与佐剂联用来模仿感染过程以诱导免疫应答。

肿瘤免疫的体外实验往往具有很好的效果,这在很大程度上是由于强大佐剂的应用。但是,绝大部分佐剂,如 LPS,IL-2,是不能大量应用于体内的,它们可引起发热、皮疹、休克等副作用。所以,本研究致力于寻找能应用于临床的免疫佐剂。

细菌 DNA 在 B 细胞、NK 细胞、单核细胞等各类细胞中,具有明显激活免疫反应的效果,它还能诱导各种抗肿瘤细胞因子的产生。而 CpG 基序具有与细菌 DNA 相似的免疫效果。人们推测脊椎动物可以通过识别 CpG 基序来辨别细菌感染,并对细菌产生免疫应答,即 CpG 基序可以作为一种危险信号分子诱导宿主的免疫应答。本研究使用的 CpG 基序是指具有非甲基化 CpG(5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3')的寡聚脱氧核苷酸,对人有最佳刺激活性的是 5'-GTC GTT-3'^[5-7]。

CpG 作为佐剂的确切机制还不十分清楚,它可能与以下因素有关:①CpG 具有直接激活树突状细胞等抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC)、巨噬细胞、T 细胞的功能;②CpG 能刺激 APC、部分 T 细胞分

泌 IL-12, IFN- γ 等细胞因子,为 T 细胞的增殖与活化创造有利条件;③ CpG 可被巨噬细胞、APC 等以吞噬小泡的形式进入细胞,使细胞产生活性氧以激活核转录因子 NF- κ B,从而促进一些细胞因子的基因转录。

迄今未见可以大量应用于临床的 CpG 基序在人食管癌疫苗研究中的相关报道,但是已有 CBPw 作为有效佐剂的报道^[7]。因此,我们选用 CBPw 作为 CpG 基序佐剂效应的金标准^[7,8]。

CpG 基序加对照疫苗的免疫效应弱于肿瘤疫苗的免疫效应,这提示 CpG 基序的佐剂效应与肿瘤抗原的特异性之间有一定的相关性,单独应用 CpG 基序诱导特异性肿瘤免疫应答是不可行的。

[参 考 文 献]

- [1] Tascon R E, Ragno S, Lowrie B, *et al.* Immunostimulatory bacterial DNA sequences activate dendritic cells and promote priming and differentiation of CD8⁺ T cells[J]. *Immunology*, 2000, 99 (1): 1-7.
- [2] Bohle B, Orel L, Kraft D, *et al.* Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce low levels of TNF- α in human B lymphocytes: Possible adjuvants for Th1 responses[J]. *J Immunol*, 2001, 166 (6): 3743-3748.

- [3] Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, *et al.* CpG motifs expressed by bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete IL-6, IL-12 and IFN[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(7): 2879-2883.
- [4] Klinman DM, Gregoriadis G. CpG motifs as immune adjuvants [J]. *Vaccine*, 1999, 17(1): 19-25.
- [5] Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants [J]. *Pharm Res*, 2002, 19(6): 715-728.
- [6] Baral RN, Saha A, Chatterjee SK, *et al.* Immunostimulatory CpG oligonucleotides enhance the immune response of anti-idiotype vaccine that mimics carcinoembryonic antigen[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2003, 52(5): 317-327.
- [7] Sugimachi K, Miyauchi Y, Inutsuka S, *et al.* Effectiveness of multidisciplinary treatment combined with immunotherapy in esophageal cancer-analysis of 287 cases of carcinoma of the thoracic part of the esophagus in Kyushu and Yamaguchi districts[J]. *Gan No Rinsho*, 1987, 33(7): 777-783.
- [8] Akazawa T, Masuda H, Saeki Y, *et al.* Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 757-764.

[收稿日期] 2004 - 12 - 19

[修回日期] 2005 - 06 - 20

[本文编辑] 王莹

《中国肿瘤生物治疗杂志》简介

由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办、第二军医大学免疫学研究所承办的《中国肿瘤生物治疗杂志》于 1994 年创刊,1996 年获得正式刊号,1997 年开始邮局发行。经获准于 2006 年起改为双月刊。

《中国肿瘤生物治疗杂志》坚持科学技术发展的双百方针,在编辑中注意学术导向,将基础研究与临床应用并重,重点报道我国在肿瘤生物的基础研究与临床实践中取得的进展和成果;报道国家在肿瘤生物治疗的政策及发展策略;介绍国内外肿瘤生物治疗的最新研究进展、动态;展望肿瘤生物治疗的发展前景。《中国肿瘤生物治疗杂志》根据普及与提高相结合的原则,既重视科研工作者在生物治疗方面的研究,也面向广大的临床医生,交流他们在肿瘤生物治疗方面的经验体会。

《中国肿瘤生物治疗杂志》于 1999 年被列入国家科技部“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊);同时为《中国科学引文数据库》来源期刊;《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊;同年被《中国医学文摘·肿瘤学》列为医学核心期刊。2003 年被《中国学术期刊文摘》、《中国核心期刊(遴选数据库)》、《中文生物医学期刊文献数据库》收录;同年被《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》执行评优活动中荣获首届《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊奖。

《中国肿瘤生物治疗杂志》第一届编委会于 1994 年成立,主编为张友会教授,副主编为曹雪涛教授(兼常务副主编)、崔正言教授、钱振超教授、何球藻教授、董志伟教授。《中国肿瘤生物治疗杂志》第二届编委会于 2004 年成立,主编为曹雪涛教授,副主编为田志刚教授、董志伟教授、樊代明教授、曾益新教授、魏于全教授。