

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2005 )04-0292-03

## 荷 CEA-rV 的 DC 增强 CD3AK 对 CEA 阳性肿瘤的特异杀伤作用

祁岩超, 王新帅, 扬波, 卢敏莹, 潘东晓 ( 广州医学院临床肿瘤研究中心暨广州市肿瘤医院, 广州 510095 )

癌胚抗原( carcino embryonic antigen, CEA )是一种常见的肿瘤相关抗原,是目前国际上公认的肿瘤标记物。在人体上皮细胞恶性肿瘤中,包括 90% 的胃肠道肿瘤、胰腺癌、80% 以上的非小细胞肺癌和 50% 左右的乳腺癌,都呈 CEA 阳性。人们称这类肿瘤为 CEA 阳性肿瘤<sup>[1]</sup>。罗超权等<sup>[2]</sup>用牛痘病毒构建的 CEA-重组基因痘苗病毒( CEA-rV )既有 CEA 抗原的高表达,又可刺激机体产生 CEA 抗体。动物实验表明,对 CEA 阳性肿瘤有明显的预防和治疗作用。树突状细胞( DC )是目前已知的功能最强的抗原提呈细胞,在肿瘤的生物治疗中起着重要作用<sup>[3]</sup>。CD3AK 细胞是用于肿瘤过继免疫较好的效应细胞,已成为一个较为成熟的肿瘤生物治疗方法<sup>[4]</sup>。本研究将目前肿瘤生物治疗中的 3 种新技术 CEA-rV, DC 和 CD3AK 有机结合起来,探讨其对 CEA 阳性肿瘤杀伤的增强作用,以期对 CEA-rV 的临床应用提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要仪器和材料

流式细胞仪 FACSCalibur 及 T 细胞亚群检测抗体,美国 BD 公司产品;扫描电镜 JEM-1000CXI,日本电子产品公司;Wellscan MK3 型酶标仪,芬兰 Labsystem 公司产品;CD3 单克隆抗体( CD3Ab ), IL-2, IL-1, IL-4, IFN- $\gamma$ , THN- $\alpha$ , GM-CSF 购自 Cytolab 公司;PGE<sub>2</sub> 购自 Cayman 公司;鼠抗人荧光抗体 CD40-FITC, CD80-PE, CD83-PITC, CD86-PE 购自 eBioscience 公司;CEA 免疫人单克隆抗体及 S-P 试剂盒 DABKit, 购自福州迈新生物技术开发公司;结肠癌细胞株 Lovo、肺癌细胞株 A549 由中山大学提供;肝癌细胞株 BEL-7402 及红白血病细胞株 K562 由本室培养;CEA-rV 由中山大学罗超权教授提供,本室制备,检定;脐血标本由广州市荔湾医院提供。

#### 1.2 CEA-rV 的制备及滴度测定

CEA-rV 的制备和滴度测定按参考文献[ 5 ]中进行。

#### 1.3 CEA 阳性细胞株的鉴定

采用免疫组织化学 S-P 染色法,按 CEA 免疫人单

克隆抗体及 S-P DABKit 说明书,对 Lovo, A549, BEL-7402 和 K562 4 种细胞株的 CEA 表达进行确定。判定标准为 CEA 阳性细胞的胞膜或/和胞浆中呈现棕黄色颗粒。

#### 1.4 脐血单个核细胞( umbilical blood mononuclear cell, UBMC )制备

脐血标本共 10 份,均足月顺产,母体健康,胎儿无畸形,母体血及脐血 HBV、HCV、HIV 和梅毒检测阴性,按文献[ 4 ]的方法分离采集单个核细胞。计算细胞数及其活度。

#### 1.5 脐血 DC 的制备和鉴定

无菌条件下收集 UBMC,调细胞浓度为  $1 \times 10^6$  /ml,加入 24 孔板,每孔 2 ml,37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养 3 h,收集悬浮细胞制备 CD3AK 细胞。重悬贴壁细胞制备 DC: 用含 GM-CSF( 50 ng/ml ), IL-4( 10 ng/ml ), TNF- $\alpha$ ( 50 ng/ml ) 的 RPMI-1640 完全培养基,调细胞浓度为  $2 \times 10^5$  /ml,每孔 1 ml 接种于 24 孔板,常规培养 3 d,以后隔天半量换液。在光镜下连续观察 DC 发育过程中的形态变化,透射电镜观察 DC 细胞形态,流式细胞仪检测 DC 细胞表型。

#### 1.6 脐血 CD3AK 细胞的制备

常规方法培养上法收集的悬浮 UBMC,制备 CD3AK 细胞性<sup>[4]</sup>。用流式细胞仪分别测定 UBMC 和 CD3AK 细胞的 CD3、CD4 等分子表型。

#### 1.7 CEA-rV + DC + CD3AK 细胞制备

1.5 中制备的 DC 培养 3 d 时,加入 CEA-rV  $10^4$  PFU/ml,常规培养制备 CEA-rV + DC。在 1.6 中制备的 CD3AK 细胞培养 8 d 时,把 CEA-rV + DC 和 CD3AK 细胞按 1: 10 的比例混合培养得 CEA-rV + DC + CD3AK 细胞。同时制备无负载 CEA-rV 的 DC + CD3AK 细胞作为对照效应细胞。

#### 1.8 实验分组和杀伤活测定

效应细胞共分 4 组: 单纯 UBMC 组, CD3AK 细胞组, DC + CD3AK 细胞组和 CEA-rV + DC + CD3AK 细胞组。靶细胞共 4 株: CEA 阳性 2 株: Lovo 和 A549; CEA 阴性 2 株 BEL-7402 和 K562。

用 MTT 法<sup>[4]</sup>测定各组效应细胞对 4 种靶细胞的

杀伤活性。

### 1.9 统计学处理方法

用 SPSS11.0 统计学软件。各效应细胞间杀伤率用单因素方差分析法。计量资料以表示,其组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果与讨论

CEA-rV 共繁殖 5 批,计蚀斑结果如下:  $1 \times 10^{-6}$  稀释度分别为 21, 14, 16 个,平均 17 个;  $1 \times 10^{-7}$  稀释度分别为 4, 6, 4 个,平均 4.6 个。按公式<sup>[6]</sup>计算 CEA-rV 滴度为  $6.3 \times 10^8$  PFU/ml。按 CEA 阳性的评定标准:细胞膜和/或细胞质呈现棕褐色颗粒为阳性,确定 Lovo 和 A549 的细胞膜及细胞质呈现棕褐色,为 CEA 阳性细胞株。而 BEL-7402 和 K562 的细胞膜和细胞质无棕褐色颗粒,为 CEA 阴性细胞株。

普通光镜下见培养 10 d 的 DC 有大量突起和明显的伪足。扫描电镜示:成熟 DC,直径 15 ~ 20  $\mu$ m,胞体呈多角形、椭圆形、圆形;表面有丰富片突起,突起又有细小分枝,分枝末端又可分成细小的丝状伪足;胞质内可见线粒体丰富,粗面内质网增生活跃,大量溶酶体和吞噬小体。

流式细胞仪检测培养 10 d 的 DC 显示,高表达 MHC I, II 类分子: CD86( 82.7% ), CD80( 51.1% ), CD83( 57.5% ), CD40( 69.4% )和 CD11c( 21.6% );不表达 CD123( 21.6% )等。

流式细胞仪 Cellquest 软件对单纯的 UBMC 和 CD3AK 细胞的免疫分子表型分析结果显示,无论是 CD3、CD4、CD8 和 CD28; CD3AK 细胞组中的比率都高于 UBMC 中的相应比率的 2 倍以上(表 1)。

从各组效应细胞对靶细胞的杀伤结果(表 2)中可以看出 3 种效应细胞 CD3AK、DC + DC<sub>3</sub>AK 和 CEA-rV + DC + CD3AK 对 4 种靶细胞的杀伤率均比单纯 UBMC 的杀伤率明显提高。这说明无论细胞因子,DC 细胞或 CEA-rV 都有提高 UBMC 杀伤肿瘤细胞的活性的作用( $P < 0.01$ )。DC + CD3AK 和 CD3AK 组比较。虽然 DC + CD3AK 对各靶细胞的杀伤率较 CD3AK 组有所提高,但无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明单纯 DC 无明显提高 CD3AK 杀伤活性的作用。但是 CEA-rV + DC + CD3AK 组对 4 种靶细胞的杀伤率与其它 3 组效应细胞(UBMC, CD3AK, DC + CD3AK)相比,都有提高(表 3)。

表 1 UBMC 和 CD3AK 的免疫分子表型 ( $\bar{x} \pm s$ )  $n = 10$

分组	CD3	CD4	CD8	CD28	CD4/8
UBMC	22.1 ± 3.9	12.1 ± 3.7	11.3 ± 4.6	6.52 ± 2.3	1.084 ± 0.128
CD3AK	46.7 ± 7.7	28.1 ± 5.9	25.8 ± 6.8	16.4 ± 4.1	1.134 ± 0.212

表 2 各组效应细胞对不同靶细胞组的杀伤百分比 ( $\bar{x} \pm s$ )

不同靶细胞组	CEA 阴性靶细胞		CEA 阳性靶细胞	
	K562 组	Bel-7402 组	A549 组	Lovo 组
UBMC 组	61.9 ± 6.9	58.1 ± 4.7	29.3 ± 5.6	34.3 ± 5.6
CD3AK 组	72.6 ± 8.2	66.3 ± 4.8	42.1 ± 3.9	45.9 ± 6.2
DC + CD3AK 组	77.7 ± 7.7	67.8 ± 5.1	44.8 ± 4.2	50.9 ± 6.3
CEA-rV + DC + CD3AK 组	80.4 ± 5.2	71.1 ± 3.8	58.9 ± 7.3	62.1 ± 6.7

其中,CEA-rV + DC + CD3AK 组和 UBMC 组相比,对各靶细胞的杀伤活性均明显提高( $P < 0.001$ )。

CEA-rV + DC + CD3AK 组和 CD3AK 组相比,对各种靶细胞的杀伤活性也有明显提高。且对 CEA 阳性肿瘤细胞 Lovo 和 A549 显著性( $P < 0.01$ )明显优于对 CEA 阴性细胞 K562 和 BEL-7402( $P < 0.05$ )的显著性。这说明 CEA-rV + DC + CD3AK 细胞对 CEA 阳性肿瘤

的杀伤活性更为显著。证实了荷 CEA-rV 的 DC 能明显提高 CD3AK 细胞对 CEA 阳性肿瘤细胞的特异杀伤活性。

CEA-rV + DC + CD3AK 组和 DC + CD3AK 组相比,对 CEA 阴性细胞株 K562( $P = 0.414$ ), BEL-7402( $P = 0.113$ )无显著差异( $P > 0.05$ )。而对 CEA 阳性细胞株 Lovo 和 A549( $P < 0.01$ )却有明显差异。结果进一步

证明 CEA-rV + DC 能明显提高 CD3AK 阳性肿瘤细胞的特异杀伤活性,但对 CEA 阴性的肿瘤细胞杀伤作用

提高不明显。同时也证明了 CEA-rV 在提高 CD3AK 特异杀伤中是重要作用。

表 3 CEA-rV + DC + CD3AK 组其它 3 组效应细胞对不同靶细胞的杀伤提高情况(  $\bar{x} \pm s$  )

靶细胞组	CEA 阴性靶细胞		CEA 阳性靶细胞	
	K562 组	Bel-7402 组	A549 组	Lovo 组
4-1 组	18.4 ± 7.9	12.9 ± 6.1	29.6 ± 3.9	27.7 ± 4.9
4-2 组	7.75 ± 8.2	5.35 ± 5.6	16.8 ± 4.7	16.2 ± 7.7
4-3 组	2.62 ± 7.6	3.37 ± 6.9	14.3 ± 4.3	11.2 ± 6.7

4-1 组: 为效应细胞 CEA-rV + DC + CD3AK 组和 UBMC 组对 4 种靶细胞的杀伤率的差. 以次类推

肿瘤的生物治疗已是肿瘤治疗中的主要方法之一,目前肿瘤的细胞免疫治疗已成为肿瘤生物治疗的一个重要组成部分,并且取得了长足进展<sup>[3]</sup>。但由于所采用的效用细胞如 LAK,CIK 和 CD3AK 等为非特异性的广谱抗肿瘤细胞,所以寻求特异性抗肿瘤细胞免疫治疗的研究亦是目前被关注的研究课题<sup>[6]</sup>。CEA-rV 是以痘苗病毒天坛株 761 为载体所构建的,既有 CEA 抗原的高表达,又可刺激机体产生抗体<sup>[7]</sup>。动物实验表明单用 CEA-rV 皮下注射对 CEA 阳性的肿瘤有明显的预防和治疗作用<sup>[2]</sup>。我们用脐血 DC 负荷 CEA-rV,再诱导的脐血 CD3AK 细胞,即 CEA-rV + DC + CD3AK 对 CEA 阳性和阴性细胞株的杀伤作用的结果表明:①CD3AK 细胞和单纯 UBMC 细胞相比,对 CEA 阳性的靶细胞 Lovo、A549 和 CEA 阴性的靶细胞 BEL-7402、K562 的杀伤作用都有明显提高(  $P < 0.01$  )。② CEA-rV + DC + CD3AK 细胞和 CD3AK 细胞相比,对 4 种靶细胞和杀伤活性又有进一步的提高,但对 CEA 阴性细胞 BEL-7402、K562 的杀伤活性提高无统计学意义(  $P > 0.05$  )。而对 CEA 阳性细胞 Lovo 和 A549 的杀伤活性提高确有明显差异(  $P < 0.01$  )。说明 CEA-rV 可明显增强 CD3AK 对 CEA 阳性肿瘤的杀伤活性。③DC + CD3AK 细胞和 CD3AK 细胞相比,对所有靶细胞的杀伤活性均有不同程度的提高,但无明显统计学意义(  $P > 0.05$  )。说明单纯 DC 细胞不能明显增强 CD3AK 的杀伤活性。国外 CEA-rV 的 I 期临床研究资料表明<sup>[8]</sup>,单用 CEA-rV 接种治疗 58 位进展性 CEA 阳性肿瘤患者,4 月内病情稳定者 23 位( 40% ),并且无明显毒副作用。如果单纯的 CEA-rV 接种再加上本法制备的特异性 CD3AK 细胞的治疗,可望会进一步提高此类肿瘤患者的治疗有效率和生存期。

[ 关键词 ] CEA 重组痘苗病毒; 树突状细胞; CD3AK 细胞; CEA 阳性肿瘤细胞

[ 中图分类号 ] R735.34

[ 文献标示码 ] A

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] 郭俊明, 罗超权. 癌胚抗原阳性肿瘤基因治疗的研究进展 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6( 2 ): 152-154.
- [ 2 ] 罗超权, 杨洁, 卢方安, 等. CEA 重组痘苗病毒对 CEA 阳性肿瘤的防治研究 [ J ]. 中山医科大学学报, 2000, 21( 2 ): 81-83.
- [ 3 ] Timmerman JM, Cgerwiski DK, Davis TA, *et al.* Idiotype-pulsed dendritic cell Vaccination for B-cell lymphoma: Clinical and immune responses in 35 patients [ J ]. Blood, 2002, 95( 2 ): 1517
- [ 4 ] 祁岩超, 王得周, 杨波, 等. 脐血 CD3AK 细胞的制备. 生物活性测定及临床应用初探 [ J ]. 肿瘤防治研究, 2004, 31( 7 ): 381-383.
- [ 5 ] 杨洁, 罗超权, 卢方安. 人癌胚抗原重组痘苗病毒的构建和制备 [ J ]. 中国生物化学与分子生物学, 1999, 15( 1 ): 54-58
- [ 6 ] Mosmann T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay [ J ]. J Immunol Methods, 1983, 65( 1-2 ): 55-63.
- [ 7 ] 谢裕安, 罗小玲, 梁安民, 等. 肿瘤抗原致敏树突状细胞协同 CD3AK 细胞的抗肿瘤作用 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11( 1 ): 54-55
- [ 8 ] John LM, James LG, Philip MA, *et al.* Phase I study of sequential vaccination with fowlpox-CEA( 6D )-TRICOM alone and sequentially with vaccina-CEA( 6D )-TRICOM, with and without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in patients with carcinoembryonic antigen-expressing carcinomas [ J ]. J Clin Oncol, 2005, 23( 4 ): 720-731.

[ 收稿日期 ] 2005 - 07 - 07

[ 修回日期 ] 2005 - 09 - 20

[ 本文编辑 ] 王莹