[文章编号] 1007-385X(2005)04-0295-03

榄香烯复合瘤苗冲激的树突状细胞的功能研究

杜桂清, 孙 光, 郭连英, 沈 洁, 施广霞, 钱振超(大连医科大学肿瘤生物治疗研究所, 大连 116027)

大多数树突状细胞(Dendritic cell, DC)来源于骨髓。在小鼠、大鼠及人的骨髓中均含有许多DC前体细胞,经体外培养能生成具有典型形态、表型及功能的非成熟的DC,抗原能使非成熟的DC转变为成熟的DC,成熟DC能表达高水平多肽-MHC复合物及共刺激分子CD86(B7-2)及CD40等,能分泌TH1型细胞因子(IL-12),能有效地将抗原提呈给初始型T细胞并使之激活。我们研究所工作表明榄香烯于丝裂霉素联合处理肿瘤细胞制备榄香烯复合瘤苗(EC-TCV),肿瘤细胞膜热休克蛋白表达增加,在体外能够刺激小鼠脾细胞增殖[1]。本实验观察EC-TCV体外冲激小鼠骨髓DC的表型和功能的变化,评价其抗瘤作用的免疫学机制。

1 材料与方法

1.1 动物与瘤株

Balb/c系小鼠($H-2^D$)引自中国医学科学院北京药物研究所,于本室饲养繁殖。实验用小鼠8~12周龄,体重18~22克,雌雄各半。Hca-F为小鼠腹水型肝癌Hca-F(H-22)的高淋巴道转移亚型,属异基因型瘤株,由本校病理学教研室凌茂英教授惠赠,本室常规腹腔传代保种。

1.2 主要试剂和仪器

榄香烯注射液(大连市医药科学研究所)MMC(日本协和);胎牛血清、GM-CSF、IL- 4(Sigma, 美国)、FITC-抗小鼠CD40单克隆抗体、PE-抗小鼠CD86单克隆抗体(Biolegend);小鼠IL-2 ELISA试剂盒(北京晶美公司);小鼠IL-12 ELISA试剂盒(大连泛邦公司)。

1.3 肿瘤细胞的处理

无菌取Hca-F腹水,制成瘤细胞悬液,破红细胞后调细胞浓度至1×10^7/ml。按本室常规加榄香烯和丝裂霉素C复合处理制备榄香烯复合瘤苗;用100 μg/ml MMC作用24 h,(ANNEXINV/PI双标记测定凋亡率为40.2%)定为MMC组;把Hca-F细胞在-70℃和37℃反复冻溶4次,(姬姆萨染色光镜观察,其坏死率为100%)定为冻溶组。

1.4 树突状细胞的分离和培养

颈椎脱臼处死Balb/c小鼠,无菌取股骨,用PBS冲洗髓腔,经200目尼龙网过滤,低渗破红细胞,用PBS洗3次,即获得骨髓细胞。用含10 ng/ml IL-4, 10 ng/ml GM-CSF的RPMI-1640培养液诱导,第3天换液,第6天收集不黏附细胞为骨髓树突状细胞。

1.5 树突状细胞的体外冲激

分别用EC-TCV、MMC组和冻溶组的冲激DC 24 h,同时设RPMI-1640 DC,收集不同处理的DC细胞,用流式细胞仪检测CD40、CD86表达率。并收集其上清供IL-12浓度测定。

1.6 小鼠不黏附细胞的制备及脾T淋巴细胞的分离

在无菌条件下常规制备小鼠出脾细胞悬液,离心,低渗破红细胞,用PBS洗3次,移入塑料培养瓶中,2~3 h,收集未贴壁的悬浮细胞即为脾不黏附细胞。采用尼龙毛柱法,参照文献[1]进行脾T淋巴细胞的分离。

1.7 小鼠脾脏T淋巴细胞的体外冲激

用RPMI-1640调脾T淋巴细胞浓度(1×10^6/ml)分别加入EC-TCV、MMC组冻、溶组的冲激DC和对照组DC于37℃, 5% CO_2培养5 d,并收集培养3 d和5 d不同处理的T淋巴细胞上清供IL-2浓度测定。

1.8 DC活化的T淋巴细胞对Hca-F肝癌细胞的细胞的抑制作用

按效靶比10:1、15:1、20:1以MTT法测杀伤率,按照下式计算杀伤率:

$$杀伤率(\%)=\left[1-\frac{效靶细胞孔A值-效应细胞A值}{靶细胞A值}\right]\times100\%$$

1.9 ELISA法对各组DC培养上清的IL-12浓度测定以及3 d和5 d不同处理的脾T淋巴细胞上清的IL-2浓度测定

按试剂盒说明书操作

1.10 统计学处理

用SPSS11.5软件进行,采用单因素和多因素方差分析进行组间差异显著性分析,组间两两比较用LSD法。数据用$\bar{x}\pm s$。

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目、国家自然科学基金重点项目(39730440-Ⅱ)

[通讯作者] 施广霞, E-mail: shiguangxia@hotmail.com

2　结果与讨论

2.1　不同处理的肿瘤细胞冲激的 DC 表型变化及其上清 IL-12 的含量

诱导 7 d、经各处理组冲激 24 h 的 DC 其 CD40 和 CD86 表达和 IL-12 的分泌均较 DC 对照组显著增高($P<0.01$)，且以 EC-TCV 组为最明显(表 1)。

表 1　不同抗原冲激的 DC 表型变化及上清中 IL-12 的含量(%)

分组	CD40(%)	CD86(%)	IL-12 (pg/ml)浓度
DC 对照组	69.27 ±1.07	76.4 ±0.85	114.72 ±23.41
EC-TCV + DC	91.55 ±1.65 *	97.89 ±0.34 *	517.32 ±22.59 *
MMC-TCV + DC	85.93 ±0.13 *	96.9 ±0.18 *	494.37 ±26.83 *
肿瘤裂解物 + DC	72.37 ±1.32 *	95.01 ±0.01 *	413.74 ±43.49 *

* $P<0.01$ 与 DC 对照组比

2.2　不同处理组冲激的 DC 脾 T 淋巴细胞其培养上清中 IL-2 的含量及活化的脾 T 淋巴细胞对 Hca-F 的抑制率(%)

如表(2)所示，各冲激组 DC 活化的脾 T 淋巴细胞培养上清中 IL-2 浓度明显高于 DC 对照组，而以 EC-TCV 组的 IL-2 浓度最高($P<0.05$)，统计分析显示各组之间差异显著($P<0.05$)。而活化的脾 T 淋巴细胞对 Hca-F 的抑制率也以 EC-TCV 组的最明显($P<0.01$)、MMC-TCV 组次之($P<0.05$)。

表 2　与各处理组 DC 共培养的脾 T 淋巴细胞上清中的 IL-2 的含量(pg/ml)及其对 Hca-F 的杀伤率(%)

分组	IL-2 (pg/ml) 上清浓度		杀伤率(%) E∶T		
	3 d	5 d	10∶1	15∶1	20∶1
对照组 + DC + T	279.5 ±17.67	249 ±74.24	16.52 ± 1.62	24.43 ± 2.63	32.70 ± 3.48
EC-TCV + DC + T	462 ±35.35 *	554 ±187 *	59.76 ± 4.97 * *	67.98 ± 4.56 * *	79.9 ± 3.23 * *
MMC + TCV + DC + T	422 ±63.63	404.5 ±45.96	46.97 ± 3.42 *	56.75 ± 2.90 *	60.57 ±3.56 *
肿瘤裂解物 + DC + T	402 ±7.07	394.5 ±45.96	16.78 ± 1.62	25.57 ± 2.84	35.65 ± 1.63 *

* $P<0.05$ 与 DC 对照组比；* * $P<0.01$ 与冻溶组比

利用 DC 肿瘤疫苗治疗恶性肿瘤，已成为当前研究的一个热点，Ⅰ/Ⅱ期临床试验表明，在肝癌 、肾癌等实体瘤中，细胞类 DC 瘤苗显示了一定免疫治疗作用[2-3]。细胞类 DC 瘤苗主要分为凋亡肿瘤细胞致敏的 DC 和坏死肿瘤细胞即细胞溶解物致敏的 DC。研究表明[5]：有效的抗肿瘤效应严格依赖于 $CD4^+$ T 细胞，$CD4^+$ T 细胞和 DC 之间通过 CD40L 和 CD40 相互作用，在 DC 后续的抗原提呈以及激活 $CD8^+$ T 细胞以溶解自身 MHC-I 类分子和 MHC-Ⅱ类分子结合的抗原多肽[4]。DC 表达丰富的 MHC 类分子，DC 摄取的外源性抗原多通过 MHC-Ⅱ类途径提呈给 $CD4^+$ T 细胞。随着对 DC 活化 T 细胞研究的深入，近年还发现一种交叉呈递(Cross-presentation)的现象，即 DC 也能通过 MHC-Ⅰ类途径呈递内化的外源性抗原，从而诱导机体产生特异性 $CD8^+$ CTL，这就是 T 细胞的交叉活化[4]。交叉呈递的研究表明：源于骨髓和脾脏的 DC 可以交叉呈递细胞性抗原，特别是凋亡的细胞成分。目前对交叉呈递倾向于危险模型学说：APC 接受受损细胞释放的物质，包括 HSP 或线粒体产物等危险信号时，交叉呈递 APC 转变成激活 APC，以诱导 CTL 反应[5]。

本研究室以往的研究表明用榄香烯联合丝裂霉素处理肿瘤细胞，使肿瘤细胞发生不同程度的凋亡和坏死，同时热休克蛋白表达增加。本实验用 EC-TCV、MMC 处理的肿瘤细胞和反复冻融的肿瘤细胞体外冲激 DC，冲激后 DC 的 CD40 和 CD86 表达增加，IL-2 分泌增加，与脾脏 T 淋巴细胞共培养使其 IL-2 分泌增加，但冻融组对 Hca-F 的抑制活性不增加，而经 EC-TCV 对Hca-F则有较强的抑制活性，提示其在诱导对肿瘤

的免疫应答方面更为有效。

[参考文献]

[1] 高志红,黄琳,施广霞,等. 榄香烯增强瘤妙免疫原性的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2002，22：375-378.
[2] Iwashita Y，Tahara K，Goto S，*et al*. A phase I study of autologous dendritic cell-based immunotherapy for patients with unresectable primary liver cancer[J]. Cancer Immunol Immunother，2003，52(3)：155-161.
[3] Marten A，Renoth S，Heinicke T，*et al*. Allogeneic dendritic cells fused with tumor cells：Preclinical results and outcome of a clinical phase Ⅰ/Ⅱ trial in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. Hum Gene Ther，2003，14(5)：483-494.
[4] Matzinger P. The danger model：A renewed sense of self[J]. Science，2002，296(5566)：301-305.
[5] Kelleher M，Beverley PCl. Lipopolysaccharide modulation of dendritic cells is insufficient to mature dendritic cells to generate CTLs from naive polyclonal CD8＋ T cells *in vitro*，whereas CD40 ligation is essential[J]. J Immunol，2001，167(11)：6247-6255.

[收稿日期] 2005－05－09 [修回日期] 2005－09－10
[本文编辑] 韩 丹