

[文章编号] 1007-385X(2006)03-0167-04

PLA表位肽免疫微球诱导CTL对肝癌细胞的杀伤作用

陈 玮¹, 潘克俭², 蔡美英³, 魏大鹏³(1. 成都医学院免疫学教研室; 2. 成都医学院生物化学教研室, 成都 610083; 3. 四川大学华西基础医学与法医学院, 成都 610041)

[摘要] **目的:**考察两种载肽聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)免疫微球 M1(hAFP₁₅₈₋₁₆₆)和 M2(hAFP₂₁₈₋₂₂₆)在体外诱导特异性 CTL 的能力及其对肝癌细胞的杀伤作用。**方法:**制备分别荷载表位肽 hAFP₁₅₈₋₁₆₆、hAFP₂₁₈₋₂₂₆ 的 PLA 免疫微球 M1 和 M2, 体外刺激 HLA-A2⁺ 健康志愿者的外周血单个核细胞(PBMC)作为效应细胞, 实验分为 3 组: 对照组、hAFP 表达组和 hAFP 阴性组。采用标准⁵¹Cr 释放法检测 CTL 杀伤活性。**结果:**两种免疫微球在体外均能刺激人 PBMC 增殖, 形成大量可见克隆; 两者诱导的效应细胞对 hAFP⁺ 的荷肽 T2 细胞、HepG-2 和 Alexander 的杀伤率均达 75% 以上, 均显著高于不表达 hAFP 的膀胱癌细胞 BT2 和未荷肽的 T2 细胞, 差异非常显著($P < 0.01$), 而两者杀伤活性之间没有明显差异($P > 0.05$)。**结论:**两种载肽聚乳酸免疫微球均能在体外诱导产生特异性 CTL, 并对表达靶抗原的肝癌细胞有较强杀伤作用。

[关键词] 肝癌细胞; 聚乳酸微球; AFP; CTL 表位肽

[中图分类号] R730 **[文献标识码]** A

Poly-lactic acid microspheres-induced CTL cytotoxicity against hepatocellular carcinoma cell lines

CHEN Wei¹, PAN Ke-jian², CAI Mei-ying³, WEI Da-peng³(1. Department of Immunology, Chengdu Medical College; 2. Department of Biochemistry, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China; 3. College of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the *in vitro* efficiency of two kinds of poly-lactic acid (PLA) immunomicrospheres: M1(hAFP₁₅₈₋₁₆₆) and M2(hAFP₂₁₈₋₂₂₆) in specific inducement of CTL and the cytotoxicity of CTL against hepatocellular carcinoma cells. **Methods:** Peripheral blood monocytes (PBMC) of HLA-A2⁺ healthy volunteers stimulated *in vitro* by peptide-loading microspheres were taken as effectors. The experiments were divided into three groups: control group, hAFP⁺ tumor cells group, and hAFP⁻ tumor cells group. The specific cytolysis of target cells was assessed by ⁵¹Cr-release assay. **Results:** Both M1 and M2 induced proliferation of HLA-A2⁺ PBMC, forming visible clones. The effector cells induced by M1 and M2 both had an cytolysis rate over 75% for hAFP⁺ tumor cells, which was significantly higher than that for hAFP⁻ tumor cells ($P < 0.01$). But there was no significant difference in cytolysis rate concerning the two kinds of microspheres ($P > 0.05$). **Conclusion:** The two kinds of microspheres can both induce specific CTL *in vitro*, which can effectively kill hAFP⁺ tumor cells.

[Key words] Hepatocellular carcinoma cell; PLA microspheres; AFP; CTL epitope peptide

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(3): 167-170]

肝细胞癌(HCC)严重威胁人类生命和健康, 临床治疗效果不理想^[1], 人们一直致力于肝癌免疫治疗的探索。目前, 肿瘤 CTL 表位疫苗设计已成为肿瘤免疫治疗研究的重要内容^[2]。大多数 HCC 患者的肝癌细胞都有较高水平的甲胎蛋白(human alpha-fetoprotein, hAFP)表达。本研究以 hAFP 为靶抗原, 采用可生物降解的有机高分子材料聚乳酸(poly-lactic acid, PLA), 制备 PLA 包封的 CTL 表位肽免疫微球^[3], 检测其体外诱

导的特异性 CTL 对肝癌细胞的杀伤活性, 为进一步研究其体内免疫效应和机制提供实验基础。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(NO. 30070855)

[作者简介] 陈 玮(1971-), 男, 四川兴文县人, 讲师, 博士, 主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究

[通讯作者] 蔡美英, Tel: 028-85556991

1 材料与方 法

1.1 细胞的来源及培养

外周血单个核细胞(PBMC)来自 18~25 岁 HLA-A2⁺ 健康志愿者;HCC 细胞 Alexander、HepG-2 及膀胱癌细胞 BTT 为本室冻存;T2 细胞^[4]由美国耶鲁大学医学院哈佛休斯医学研究所 Peter Cresswell 教授惠赠,本教研室冻存保种。上述细胞株均用含 10% 小牛血清的完全 RPMI 1640 培养液、37℃、5% CO₂ 孵箱培养。

1.2 主要试剂与仪器

HLA-A2 限制的 CTL 表位肽由西安美联公司合成、纯化、鉴定;Na₂⁵¹CrO₄, PerkinElmer(美国);RPMI 1640, Gibco;新生小牛血清,兰州民海生物工程有限公司;淋巴分离液,上海试剂二厂;高速离心机,Beckman;真空干燥机,浙江黄岩机械厂;γ 计数器,国营二六二厂;DG-3022 酶标仪,国营华光电子管厂。

1.3 CTL 表位肽的合成与纯化鉴定

CTL 表位肽委托西安美联公司合成,粗产品经反相高效液相色谱纯化,冷冻干燥即得多肽纯品,取样进行纯度分析和质谱鉴定。

1.4 载肽 PLA 免疫微球灭菌及检测

载肽微球由本研究小组前期制备^[5]。表位肽 hAFP₁₅₈₋₁₆₆ 和 hAFP₂₁₈₋₂₂₆ 包封方法相同(载 hAFP₁₅₈₋₁₆₆ 微球和载 hAFP₂₁₈₋₂₂₆ 微球分别简称 M1、M2)。微球冷冻干燥后,辐照灭菌(四川省农科院生物核技术研究所进行)。取样,在含 10% 小牛血清的完全 RPMI 1640 培养液、37℃、5% CO₂ 孵箱培养 24 h,观察灭菌效果。

1.5 免疫微球体外特异性 CTL 的诱导及对肿瘤细胞的杀伤活性检测

1.5.1 体外特异性 CTL 的诱导 抽取 HLA-A2⁺ 健康志愿者外周静脉血 20 ml,肝素抗凝,无菌分离 PBMC,不完全 RPMI 1640 溶液洗涤 3 次(2 000 r/min, 10 min/次),然后完全 RPMI 1640 培养液、37℃、5% CO₂ 孵箱分瓶培养。两种免疫微球用不完全 RPMI 1640 溶液分别配制为 1 mg/ml 的溶液,加入分瓶培养的 PBMC 中诱导培养,7 d 后,密度梯度离心收集细胞。另取空白微球以相同方法诱导培养 HLA-A2⁺ PBMC,收集细胞作为对照组效应细胞。

1.5.2 CTL 杀伤活性检测 采用标准的⁵¹Cr 释放法,将诱导的细胞调整密度为 4 × 10⁵/ml,按 100 μl/孔加入 96 孔细胞培养板作为效应细胞。收集对数生长期的 T2 细胞、Alexander 细胞、HepG2 细胞、BTT 膀胱癌细胞,调整细胞密度为 4 × 10⁶/ml;加入 100 μCi (1 Ci = 3.7 × 10¹⁰ Bq)⁵¹Cr,置 37℃、5% CO₂ 孵育 2 h,轻摇数次,离心,完全 RPMI 1640 培养液洗涤以去除游离的⁵¹Cr,

然后调整细胞密度为 2 × 10⁴/ml(其中对 T2 细胞荷肽)作为靶细胞。实验分组:(1)自发释放组:各孔均加入 100 μl 完全 RPMI 1640 培养液,再加入 100 μl 上述对应的靶细胞(2 × 10⁴/ml);(2)最大释放组:各孔均加入 100 μl 1% Triton,再加入 100 μl 上述对应的靶细胞;(3)实验组:hAFP 表达组和 hAFP 阴性组分别加入效应细胞悬液 100 μl(对照组则加空白微球诱导的效应细胞),再加入 100 μl 上述对应的靶细胞;每一实验孔均为 3 复孔。上好样的 96 孔细胞培养板置 37℃、5% CO₂ 孵箱培育 4 h,吸取上清 0.1 ml,上 γ 计数器测 cpm 值。计算⁵¹Cr 释放率,计算公式为:

$$^{51}\text{Cr 释放率}(\%) = \frac{\text{实验组平均 cpm} - \text{自然释放组平均 cpm}}{\text{最大释放组平均 cpm} - \text{自然释放组平均 cpm}} \times 100\%$$

1.6 统计学处理

所有实验数据采用 SPSS11.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结 果

2.1 合成表位肽的纯度和鉴定结果

经反相高效液相色谱分析,表位肽纯度均达 99% 以上。其相对分子质量测定值, hAFP₁₅₈₋₁₆₆ 为 1 214.96, hAFP₂₁₈₋₂₂₆ 为 968.53,与理论值(hAFP₁₅₈₋₁₆₆ M_r 为 1 214, hAFP₂₁₈₋₂₂₆ M_r 为 968)相符。

2.2 PLA 免疫微球的灭菌效果

辐照处理的荷肽微球在完全 RPMI 1640 培养液、37℃、5% CO₂ 孵箱培养 24 h,未观察到污染,灭菌效果良好,且其特性无明显改变。

2.3 PLA 免疫微球特异性 CTL 的诱导及其杀伤活性

免疫微球 M1、M2 在体外均能刺激人 PBMC 增殖,形成大量可见克隆;而空白微球未能诱导明显淋巴细胞增殖(可见单核细胞变形,胞内含吞噬颗粒)。在诱导 7 d 后,收获细胞进行 CTL 杀伤分析,结果显示,对照组效应细胞对靶细胞的杀伤率极低(都在 2% 以下);免疫微球 M1 和 M2 诱导的效应细胞对荷肽 T2 细胞(T2 + P)、HepG-2 和 Alexander 的杀伤率均在 75% 以上,而两者对 hAFP⁻ 的空载 T2 和 BTT 的杀伤率均在 40% 以下($P < 0.01$)。

经统计分析,免疫微球 M1、M2 诱导产生的效应细胞对荷肽 T2 细胞、表达 hAFP 的肝癌细胞 HepG-2 和 Alexander 的杀伤率(约 75%~90%)均显著高于不表达 hAFP 的膀胱癌细胞 BTT(约 31%~35%)和未荷肽的 T2 细胞(约 35%~39%)($P < 0.01$),而两种效应细胞的杀伤活性之间没有明显差异($P > 0.05$),表明免

疫微球 MI、M2 均能在体外诱导产生特异性 CTL, 并对 表达靶抗原的肿瘤细胞有较强杀伤作用(表 1)。

表 1 PLA 免疫微球诱导的效应细胞对靶细胞的杀伤效应(%)

Tab. 1 Cytotoxicity of PLA immunomicrosphere-induced effector cells against target cells(%)

Microsphere	Target cells				
	T2	T2 + P	HepG-2	Alexander	BTT
M1	35.6 ± 0.6	90.1 ± 1.0**	82.6 ± 0.9**	78.3 ± 0.6**	31.7 ± 1.2
M2	38.8 ± 0.9	91.4 ± 0.8**	83.7 ± 0.7**	76.5 ± 1.1**	34.0 ± 0.7

** $P < 0.01$ vs T2 or BTT

3 讨 论

研究表明,以特异性 CTL 杀伤为代表的细胞免疫在抗肿瘤免疫中起着重要作用。近年来基于 CTL 表位肽的肿瘤疫苗研究得到迅速发展,并成为肿瘤免疫治疗研究的重要内容^[2]。其中,人工合成的表位肽疫苗不仅能直接激活 CTL,诱导特异性 CTL 应答,而且生物安全性高、操作简便、机制也清楚^[2]。并在黑素瘤、乳腺癌和卵巢癌等的免疫治疗中取得了一定的成效^[6-8]。

表位肽免疫原性弱,直接注射效果较差,合适的载体和佐剂对 CTL 表位肽疫苗的构建非常重要。PLA 是一种可生物降解的有机高分子材料,具有良好的生物相容性和适当的稳定性,对人体无毒,且 PLA 微球兼备载体和佐剂作用,可延缓被包裹或吸附的多肽在体内的降解,提高其免疫原性,增强免疫效应,常用于单剂量疫苗和口服疫苗的制备^[3,9-12]。Men^[13]和 Nikou 等^[14]以 PLA 微球荷载 CTL 表位肽,在小鼠体内诱导产生了特异性的细胞免疫应答。因此,PLA 微球可以作为 CTL 表位肽疫苗的载体和佐剂。

前期的研究发现,部分 HCC 细胞株(如 HepG-2、Alexander 等)和多数 HCC 患者的癌组织都表达 HLA-I 类抗原,CTL 表位肽疫苗可能适合于 HCC 的免疫治疗研究^[15-16]。在后续的工作中,本课题组制备得到了荷载 hAFP 优势 CTL 表位肽(hAFP₁₅₈₋₁₆₆和 hAFP₂₁₈₋₂₂₆),体外特性良好、体积平均粒径 3~5 μm 之间的免疫微球^[5]。本研究进一步考察免疫微球体外诱导特异性 CTL 的能力。结果显示,两种免疫微球均能在体外刺激人外周血 PBMC 增殖,形成大量明显的增殖克隆;两者诱导的效应细胞对表达 hAFP 的 HCC 细胞 HepG-2 和 Alexander 的杀伤率均达 70% 以上,显著高于 hAFP 阴性的膀胱癌细胞 BTT 和未荷肽 T2 细胞($P < 0.01$),但两种效应细胞的杀伤活性没有明显差异($P > 0.05$),说明这两种免疫微球均能在体外诱导产生特异性 CTL,并对表达靶抗原的肿瘤细胞有较强

杀伤作用,可以用于抗肝癌疫苗的进一步研究。

综上所述,本研究制备的两种 PLA 免疫微球,在体外均具有较强的特异性 CTL 诱导能力,为疫苗的进一步研究提供了实验基础。而免疫微球的有效性尚需体内实验进一步确证,有关免疫微球与抗原递呈细胞的相互作用及其机制也待深入探讨。

[参 考 文 献]

- [1] 叶维法,杨炳辉,万德森,等. 肝胆肿瘤学[M]. 天津:天津科学技术出版社,2000:6-142.
- [2] Bona CA, Casares S, Brumeanu TD. Towards development of T-cell vaccines[J]. Immunol Today, 1998,19(3):126-133.
- [3] Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1997, 28(1):5-24.
- [4] Salter RD, Cresswell P. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant T B cell hybrid[J]. EMBO J, 1986, 5(5):943-949.
- [5] 陈 玮,蔡美英,王 霞,等. 抗肝癌 CTL 表位肽免疫微球的制备和体外特性研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2005, 42(增刊):228-230.
- [6] Ghosh MK, Li CL, Fayolle C, et al. Induction of HLA-A2-restricted CTL responses by a tubular structure carrying human melanoma epitopes[J]. Vaccine, 2002, 20(19-20):2463-2473.
- [7] Marchand M, van Baren N, Weynants P, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1[J]. Int J Cancer, 1999, 80(2):219-230.
- [8] Disis ML, Grabstein KH, Sleath PR, et al. Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(6):1289-1297.
- [9] Freitas S, Merkle HP, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology[J]. J Control Release, 2005, 10(2):313-332.
- [10] Johansen P, Estevez F, Zurbriggen R, et al. Towards clinical testing of a single-administration tetanus vaccine based on PLA/PLGA

- microspheres[J]. *Vaccine*, 2000, 19(9-10): 1047-1054.
- [11] Kende M, Yan C, Hewetson J, *et al.* Oral immunization of mice with ricin toxoid vaccine encapsulated in polymeric microspheres against aerosol challenge[J]. *Vaccine*, 2002, 20(11-12): 1681-1691.
- [12] Katz DE, DeLorimier AJ, Wolf MK, *et al.* Oral immunization of adult volunteers with microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CS6 antigen[J]. *Vaccine*, 2003, 21(5-6): 341-346.
- [13] Men Y, Tamber H, Audran R, *et al.* Induction of a cytotoxic T lymphocyte response by immunization with a malaria specific CTL peptide entrapped in biodegradable polymer microspheres [J]. *Vaccine*, 1997, 15 (12-13): 1405-1412.
- [14] Nikou K N, Stivaktakis N, Avgoustakis K, *et al.* A HER-2/neu peptide admixed with PLA microspheres induces a Th1-biased immune response in mice[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1725 (2): 182-189.
- [15] Huang J, Cai MY, Wei DP. HLA class I expression in primary hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8 (4): 654-657.
- [16] 陈 玮,蔡美英,魏大鹏. TAP 和 HLA-I 类抗原在人肝细胞癌中的表达[J]. *临床肝胆病杂志*, 2003, 19(3): 152-154
- [收稿日期] 2006 -04 -25 [修回日期] 2006 -06 -12
- [本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

活性氧自由基通过活化 p38MAPK 通路限制造血干细胞的寿命

早在上世纪 50 年代就有学者提出了“自由基能导致衰老”的假说,该假说认为随着年龄的增长,体内聚积的活性氧自由基(ROS)会作用于人体内的 DNA、蛋白质和细胞膜等,导致人体衰老,最终缩短寿命。对于该假说仍存在着大量的争议。如果 ROS 确实能够导致衰老,那么最有可能受影响的应该具有自我更新和分化能力的各种前体细胞,尤其是人体内最活跃的干细胞——造血干细胞(HSCs)。作者通过实验证实了积聚的 ROS 通过激活 p38MAPK 通路导致 HSCs 过度增殖分化,最终衰竭。

在体外实验中,作者首先证明丁硫氨酸亚砷胺(BSO)能够有效地引起未成熟造血干细胞(KSL)中 ROS 的增加并呈剂量依赖性。然后,检测了不同浓度的 BSO 对 KSL 增殖分化能力的影响。克隆形成实验结果表明,不同浓度的 BSO 对 KSL 的增殖能力无明显影响,但移植实验结果却表明低剂量的 BSO 即可减弱 KSL 的重建能力。为进一步明确 ROS 的增加对 HSCs 作用的机制,作者检测了 KSL 不同表面标志分子的表达情况。RT-PCR 结果表明,低剂量的 BSO 在不引起凋亡的前提下即可上调肿瘤抑制基因 $p16^{Ink4a}$ 和 $p19^{Arf}$ 的表达。Real-time RT-PCR 结果表明 BSO 作用下,相对于不同的分化细胞系, HSCs 中 $p16^{Ink4a}$ 和 $p19^{Arf}$ 表达明显增加。研究提示, $p16^{Ink4a}$ 的表达上调受到 MAPK 信号通路的调控。因此,作者在 BSO 作用 KSL 后分别加入抗氧化剂(NAC)和 p38、ERK、JNK 的抑制剂, RT-PCR 结果显示,只有抗氧化剂和 p38 抑制剂阻断了 ROS 引起的 $p16^{Ink4a}$ 和 $p19^{Arf}$ 的表达上调;同时 Ink4 家族的其他成员 $p15^{Ink4b}$ 和 $p18^{Ink4c}$ 在 ROS 作用下表达上调也依赖于 p38MAPK 通路的活化。通过荧光标记法,作者进一步证实了低剂量的 BSO 作用下,相对于其他分化细胞系,只有造血干细胞系中能检测到磷酸化的 p38。

在体内实验中,作者利用 $Atm^{-/-}$ 的小鼠模型,检测其 HSCs 中 p38MAPK 通路活化及 Ink4 家族成员的表达情况,得到了与体外实验相似的结果。移植实验结果表明只有在移植前后都使用 p38 抑制剂才能恢复 $Atm^{-/-}$ 小鼠 KSL 和不同分化细胞的重建能力。荧光标记实验结果表明 $Atm^{-/-}$ 小鼠 KSL 中静止的造血干细胞和 G_0 期细胞都大幅减少,抗氧化剂和 p38 抑制剂能够恢复其静止的造血干细胞和 G_0 期细胞数量。同时实验表明, p38 抑制剂长期作用可恢复 $Atm^{-/-}$ 小鼠 KSL 的增殖分化能力。基于上述结果,作者假设 ROS-p38MAPK 通路也参与了正常 HSCs 的衰老过程。作者首先证实正常小鼠 KSL 中 ROS 水平随着年龄的增长而增加。接着,通过 HSCs 连续移植实验模拟其长期自我更新衰老的过程。实验结果表明第 3、4 次移植后小鼠 KSL 的增殖能力明显减弱,抗氧化剂可以有效恢复其增殖能力。第 3 次移植后 KSL 中可以检测到大量磷酸化的 p38 和 $p16^{Ink4a}$ 、 $p19^{Arf}$ 的表达上调,同时静止造血干细胞数量大幅减少,抗氧化剂能够有效阻断该现象。另外, p38 抑制剂也可以恢复第 3、4 次移植后 KSL 的增殖能力。研究表明, MAP3k5 编码的 ASK1 位于 p38 通路上游,且 $MAP3k5^{-/-}$ 细胞中 ROS 引起的 p38 活化被抑制。因此,作者利用 MAP3k5 失活的逆转录病毒感染小鼠 KSL 后移植实验检测其增殖能力,发现 MAP3k5 失活可显著恢复 KSL 的增殖能力,提示 ROS 通过活化 ASK1 激活 p38MAPK 通路。

据临床报道, p38MAPK 抑制剂可用于某些再生障碍性贫血患者,恢复其造血干细胞的功能。因此该研究不仅为延缓衰老、更为人类造血系统疾病的治疗提供了实验基础。

[郑媛媛 摘译,李 楠 审阅. Ito K, Hirao A, Arai F, *et al.* *Nat Med*, 2006, 12(4): 446-451.]