

[文章编号] 1007-385X(2006)03-0221-03

半抗原修饰的黑素瘤细胞激活树突状细胞诱导特异性 T 细胞反应

Dendritic cells (DC) activated with 2,4-dinitrophenyl (DNP)-modified melanoma cells induced the specific T cell immune response

杜楠¹, 李留树¹, 肖文华¹, 唐卓斌¹, 孙同柱²(解放军总医院 1. 第一附属医院肿瘤科; 2. 全军创伤修复研究室, 北京 100037)

[摘要] 目的: 探索半抗原[二硝基氟苯(DNP)]修饰的恶性黑素瘤细胞(恶黑)激活树突状细胞(DC)体外诱导特异性 T 细胞反应的抗肿瘤效应。方法: 采用 DNP 修饰恶黑细胞 B16(H-2^b), 然后在体外激活 C57BL/6 小鼠(H-2^b)外周血来源的 DC, 观察其诱导 T 细胞的增殖和特异性 T 细胞杀伤功能; 在小鼠皮肤迟发性超敏反应实验和荷瘤实验中观察 DNP 修饰瘤苗 + DC 的特异性。结果: 经 DNP 修饰的 B16 细胞激活的 DC, 诱发 T 细胞增殖能力和对 B16 细胞的特异性杀伤效应均明显高于未修饰的 B16 细胞和 DC。动物实验显示 DNP 修饰瘤苗联合 DC 具有明显的诱发皮肤迟发性超敏反应作用和抑瘤作用。结论: DNP 修饰 B16 所激活的 DC 可以诱导更强的恶黑特异性 T 细胞效应。

[关键词] 半抗原; 二硝基氟苯; 树突状细胞; T 淋巴细胞; 黑素瘤细胞

[中图分类号] R730 **[文献标识码]** A

恶性黑素瘤(恶黑)是恶性程度极高、预后很差的肿瘤, 近年来发病率有明显上升趋势。该病对放化疗不敏感。由于恶黑为免疫原性较高的肿瘤, 肿瘤疫苗及免疫因子治疗得到广泛应用, 但其特异性及免疫反应强度较弱, 不能有效地诱导或激活机体免疫反应。

半抗原——二硝基氟苯(DNP)修饰的肿瘤疫苗通过改变树突状细胞(DC)表面 MHC 抗原决定簇, 从而增加肿瘤抗原与 T 细胞反应的结合位点, 使 T 细胞受体发生改变, 产生更强的特异性 T 细胞免疫反应^[1]。本实验观察半抗原 DNP 修饰的黑素瘤细胞激活 DC 对恶黑的特异性抗肿瘤免疫反应的增强作用。

1 材料与方 法

1.1 DNP 修饰黑素瘤细胞

取 B16 黑素瘤系细胞(H-2^b, B16 是 C57BL/6 小鼠尾部皮肤原发性恶黑) 1×10^7 /ml, 1 ml/孔加入 6 孔板, 再加 DNP 100 μ l 至终浓度为 0.2% (5 mmol/L, pH 7.2), 37 $^{\circ}$ C 10 min^[2], 经⁶⁰Co 照射, 剂量为 30 Gy。

1.2 DC 的制备及激活

取 C57BL/6 小鼠(H-2^b)骨髓细胞, 用 Ficoll 分离获得单个核细胞, 在含 GM-CSF (800 μ g/ml)、IL-4 (500 μ g/ml) 培养液中培养。第 6 天将细胞分为 3 组: 第 1 组为 DNP 修饰恶黑细胞 B16 + DC 组(DNP-B16 + DC); 第 2 组为恶黑细胞 B16 + DC 组(B16 + DC); 第 3 组为单纯 DC 组(DC), 均持续至第 7 天收集各组细胞备用。

1.3 各组 DC 对 T 细胞的激发^[3]

利用 MACS 磁珠分选仪和 CD3 单抗阳性分选 C57BL/6 小鼠外周血的 CD3⁺ 细胞(总 T 细胞), 将上一步获得的 CD3⁺ 细胞按 T 细胞的 1/10 分别加入 DNP-B16 + DC 组、B16 + DC 组及单纯 DC 组。加入³H-TdR (37 kBq/孔) 培养 12 h, 测定放射性核素每分钟闪烁记数(CPM) 值, 计算刺激指数(SI), $SI = \frac{\text{实验组 CPM}}{\text{阴性组 CPM}}$ 。

1.4 T 细胞对黑素瘤细胞的特异性杀伤

分别以 DNP-B16 + DC 组激活的 T 细胞、B16 + DC 组激活的 T 细胞及单纯 DC 组激活的 T 细胞为效应细胞, 以³H-TdR 标记的对数生长期的 B16 细胞为靶细胞, 恶黑细胞 M3(H-2^d) 为对照组, 按效靶比为 50:11 的比例, 效靶共孵育时间 24 h, 进行细胞毒实验, 同时设最大释放组及自发释放组, 测定每组上清 CPM 值。

T 细胞特异性杀伤活性 = $\frac{(\text{实验组上清 CPM 值} - \text{自发释放组上清 CPM 值})}{(\text{最大释放组上清 CPM 值} - \text{自发释放组上清 CPM 值})} \times 100\%$ 。

1.5 DNP-B16 + DC 在荷瘤小鼠体内的免疫治疗

取 C57BL/6 小鼠(H-2^b), 将 1×10^5 个 B16 细胞种植小鼠背部, 将荷瘤小鼠随机分为 5 组, 每组 5 只: 实验组(DNP-B16 + DC)、B16 + DC 组、DC 组、空白对照组、阳性对照(单纯 DNP)组。注射 2.0% DNP 20 μ l 到 C57BL/6 小鼠左背部, 3 周后再接种 B16 细胞, 定期

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30572144)

[作者简介] 杜楠(1962-), 男, 河北省人, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事肿瘤临床生物治疗方面的研究, E-mail: dunan05@yahoo.com.cn

检测各组小鼠肿瘤大小。

1.6 DNP 修饰瘤苗小鼠诱发迟发性超敏反应

所有 C57BL/6 小鼠于实验前 1 d 在背部去毛,面积约 3 cm²,去毛当日及次日于去毛部位分别注射 100 μl DNP-B16 + DC、未修饰的 B16 + DC、DC,阳性对照为 50 μl 的 2.0% DNP,生理盐水作阴性对照,每组 5 只;5 d 后,于小鼠左耳背面涂抹 20 μl 的 0.5% DNP 溶液诱发皮炎,右耳涂等量 4:1 丙酮,橄榄油基质作对照。比较给药前后动物变化及左右耳重量,末次给药 24 h 后以直径 8 mm 金属打孔器将小鼠左右耳取下,以万分之一电子分析天平称其质量,计算诱发后左右耳质量差。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 软件包,先用 *F* 检验,验证方差齐性,再进行 *t* 检验, *P* < 0.05 有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 T 细胞增殖的结果

用³H-TdR 法测定 T 细胞对各种刺激的增殖作用,结果显示 DNP-B16 + DC 组对 T 细胞的刺激增殖作用较 B16 + DC 组及单纯 DC 组强 (*P* < 0.05),刺激指数 (SI) 分别为 30.15 ± 7.08 比 12.43 ± 3.12、10.52 ± 1.84。

2.2 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性

核素法测定 T 细胞对 B16 细胞的杀伤作用。结果表明, DNP-B16 + DC 组激活的 T 细胞在效靶比为 50:1 时,可以明显杀伤 B16 细胞,但对 M3 细胞 (H-2^d 恶黑细胞株) 杀伤作用微弱; B16 + DC 组激活的 T 细胞与单纯 DC 激活的 T 细胞对两种肿瘤细胞的杀伤作用均非常低 (表 1)。

2.3 DNP 修饰瘤苗小鼠诱发迟发性超敏反应

结果表明 DNP 修饰组以及其他各组体重均未受到影响,而对 DNP 诱发的接触型皮炎耳结果不同, DNP 涂擦组和 DNP-B16 + DC 组耳肿胀明显增加, B16 + DC 和单纯 DC 耳肿胀较轻,与上两组相比有显著性差异 (*P* < 0.01),空白对照组无变化。

表 1 DNP 修饰 B16 + DC 的 T 细胞杀伤活性和对小鼠耳重的影响 (*n* = 5, $\bar{x} \pm s$)

组别	T 细胞杀伤率 (%)		体重 (g)		耳重差 (mg)
	B16 细胞	M3 细胞	给药前	给药后	
DNP-B16 + DC	94.3 ± 14.1**	17.5 ± 5.2	20.1 ± 2.3	19.8 ± 1.9	10.1 ± 2.6**
B16 + DC	12.2 ± 6.4	9.2 ± 1.6	19.5 ± 1.8	19.3 ± 2.3	4.6 ± 1.2
DC	6.7 ± 1.8	7.6 ± 2.3	19.7 ± 2.0	20.0 ± 1.5	4.0 ± 1.1
阴性对照	0	0	19.9 ± 2.1	19.7 ± 2.2	0.3 ± 0.1
阳性对照			20.2 ± 1.7	19.8 ± 2.0	9.3 ± 2.3**

** *P* < 0.01 vs B16 + DC or DC or 阴性对照组

2.4 DNP-B16 + DC 在荷瘤小鼠体内的免疫治疗

阴性对照组、阳性对照组 (单纯 DNP) 和 DC 组瘤体体积逐渐长大; B16 + DC 组自第 14 ~ 17 天瘤体体积开始缩小, 3 周后瘤体抑制率为 (72.5 ± 12)% ; DNP-B16 + DC 组自第 10 ~ 12 天瘤体即有明显缩小, 明显早于 B16 + DC 组, 且 3 周后瘤体抑制率达 (96.4 ± 35)% , 明显高于 B16 + DC 组 (*P* < 0.01)。3 周后组织学证实: DNP-B16 + DC 组瘤体组织瘤巢小, 松散, 可见广泛空洞状坏死灶, 部分瘤体组织出现机化。

最早人们发现二硝基氟苯 (DNP) 等半抗原化学物质是研究接触性迟发性超敏反应 (DTH) 的很好模型。接触性超敏反应是一种过敏原诱发的 T 细胞介导的免疫反应。这些过敏原实际上起到半抗原的作用, Berd 等^[4]发现这种半抗原与 MHC 附着的多肽 (抗原) 相结合对于形成免疫原性是非常重要的步骤。许多研究表

明 DNP 特异性 CD8⁺ T 细胞是迟发性超敏反应的主要效应群体, 这种半抗原诱发肿瘤抗原呈现在 MHC 分子的沟槽内, 空间构像类似原始肿瘤抗原决定簇, 也交叉发生于原始的肿瘤抗原, 其免疫原性和反应原性明显强于肿瘤抗原诱发的免疫反应, 这种半抗原修饰的细胞起着确定半抗原-抗原肽决定簇的作用, 诱发免疫决定优势, 具有很高重复性的半抗原-肽表位。

半抗原接触肿瘤细胞通过宿主抗原提呈细胞 APC 提呈的 DNP 修饰的肿瘤抗原具有交叉提呈作用。由于肿瘤抗原分子表达许多分子, DNP 修饰的细胞将产生大量半抗原诱发的蛋白, 经过 APC 加工, 与 MHC I 和 II 类分子形成复合物, 在细胞表面产生巨大的沟槽, 大大增加了与 T 细胞反应的结合位点。因此, 半抗原系统能够有效地诱发肿瘤特异性免疫反应^[3]。DC 作为目前已知最强的抗原提呈细胞, 将肿瘤抗原特异性

地放大传递给T淋巴细胞,发挥特异性抗肿瘤作用。本实验采用DNP修饰的肿瘤疫苗通过改变树突状细胞表面MHC抗原决定簇,打开更多的MHC结合位点,并交叉作用于恶黑多个抗原表位,使T细胞受体发生改变,产生较强的特异性T细胞免疫反应,DNP修饰的黑素瘤细胞联合树突状细胞可进一步增强特异性抗肿瘤免疫反应。

本实验结果表明,以DNP修饰恶黑+DC组激活的T淋巴细胞比未修饰的恶黑+DC组和单纯DC激活的T淋巴细胞具有更好的增殖力及对恶性黑素瘤细胞具有更强的杀伤力。动物实验中DNP修饰瘤苗对皮肤超敏反应(耳肿胀实验)实验显示,DNP-B16+DC组和DNP涂擦组诱发迟发性超敏反应;在载瘤负荷实验中显示DNP修饰的瘤苗+DC组具有明显的抑制肿瘤生长作用,提示皮肤迟发性超敏反应可以作为该免疫疗法的观察指标。以上结果显示DNP修饰的恶黑瘤苗能够明显诱发DC表面更好地表达MHC分子恶黑抗原肽复合物,充分使T细胞受体识别,进而激活恶

黑抗原特异性T细胞,可产生更强的特异性CTL反应,为进一步临床实验奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Berd D. Contribution of dead cells to the immunogenicity of an autologous, hapten-modified melanoma vaccine[J]. *Vaccine*, 2003, 21(7-8): 795-797.
- [2] Berd D, Sato T, Maguire HC Jr, et al. Immunopharmacologic analysis of an autologous, hapten-modified human melanoma vaccine[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(3): 403-415.
- [3] Manne J, Mastrangelo MJ, Sato T, et al. TCR rearrangement in lymphocytes infiltrating melanoma metastases after administration of autologous dinitrophenyl-modified vaccine[J]. *J Immunol*, 2002, 169(6): 3407-3412.
- [4] Berd D. M-Vax: An autologous, hapten-modified vaccine for human cancer[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2004, 3(5): 521-527.

[收稿日期] 2005-12-05

[修回日期] 2006-02-10

[本文编辑] 韩丹

· 科技动态 ·

PGE₂诱导产生的CXCL1促进结直肠癌的血管形成

已知慢性炎症可以通过刺激血管形成而促进肿瘤生长,约15%的恶性肿瘤的发生与慢性炎症有关。慢性炎症导致炎性细胞上调表达IL-1 α/β 、IFN- γ 及TNF- α 等细胞因子,而这些炎性细胞因子又会诱导另一些炎性介质如环加氧酶-2(COX-2)及炎性趋化因子的表达。以前的研究表明COX-2具有促进肿瘤血管形成的作用。作为COX-2的主要代谢产物之一的PGE₂,在人结直肠癌及家族性息肉患者腺瘤中的含量明显上升,在结直肠癌的发展中起重要作用。用PGE₂处理可以逆转COX-2选择性抑制剂的抗血管形成的作用,因此认为COX-2促血管形成的作用是通过PGE₂介导的。但是PGE₂促进肿瘤血管形成的具体机制目前并不清楚。作者研究发现PGE₂诱导人结直肠癌细胞上调表达趋化因子CXCL1,而CXCL1在体外可以诱导微血管内皮细胞的迁移和血管形成;在体内PGE₂通过诱导CXCL1的表达促进了肿瘤生长。

该研究发现在人结直肠癌临床标本中,PGE₂、CXCL1及其受体CXCR2的含量显著高于癌旁正常组织,免疫组化显示CXCL1主要表达于肿瘤中的上皮细胞和基底细胞,而CXCR2却主要表达于基底内皮细胞。进一步研究发现PGE₂是通过EP4-EGFR-MAPK途径来诱导CXCL1的表达上调。

用PGE₂处理人结直肠癌细胞系后的培养上清,在体外可以诱导小鼠内皮细胞(Py-4-1)以及牛肺微血管内皮细胞(BLM-VECs)的迁移及血管形成,重组的人CXCL1也具有同样的作用,但作用强度要弱一些,而在培养上清中加入CXCL1的中和抗体后上述效应就显著降低了。这些实验证明PGE₂诱导产生的CXCL1在体外可以促进血管形成。用荷瘤小鼠进行的体内实验表明PGE₂通过诱导CXCL1的表达促进肿瘤内的血管形成,从而促进了肿瘤的生长。

该研究主要的发现是阐明了PGE₂通过活化EP4-EGFR-MAPK途径刺激内皮细胞分泌具有促血管形成作用的趋化因子CXCL1,因此部分解释了COX-2在肿瘤中促血管形成作用的机制。但是该研究只是证实了CXCL1在上述效应中发挥了重要作用,而不能说是唯一起作用的因素,别的某些促血管形成因子也可能发挥了作用,原因如前述人重组CXCL1的效应强度要低于PGE₂处理的细胞培养上清。