

[文章编号] 1007-385X(2006)04-0249-04

树突状细胞免疫治疗辅助放射治疗抑制小鼠肾癌移植瘤的生长

黄建华¹, 李 峤^{1,2}, 王 瑶¹, 郭 佳¹, 吕海燕¹, 杨 军³, 马 林³(1. 解放军总医院肿瘤免疫治疗研究中心, 北京 100853; 2. Division of Surgical Oncology, University of Michigan, Medical School, Ann Arbor, Michigan 48109-0620, USA; 3. 解放军总医院放射治疗科, 北京 100853)

[摘要] **目的:** 研究树突状细胞免疫治疗联合放射治疗对小鼠肾癌移植瘤的作用。**方法:** BALB/c 小鼠右腋皮下注射 2.5×10^6 Renca 肾癌细胞制作移植瘤模型, 分为无治疗对照组、单纯放疗组、单纯 DC 治疗组和 DC 联合放疗组 4 组进行治疗。皮下荷瘤的 BALB/c 小鼠, 在第 12~16 天连续 5 d 接受肿瘤局部放射治疗, 6 脉伏电子线, 7 Gy/次, 并于第 11、15、19 和 22 天分别 4 次在肿瘤部位直接注射未负载肿瘤抗原的 DC 细胞(1×10^6 /次), 第 28 天处死小鼠。检测各组肿瘤生长速度和瘤体重量, ELISA 检测小鼠脾细胞 IL-2、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 分泌水平。**结果:** 与单纯治疗组比较, DC 联合放疗组小鼠的肿瘤生长明显缓慢, 体积明显减小, 脾细胞分泌的 IL-2、IFN- γ 和 IL-4 的能力显著提高, 与其它各组比较均有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。**结论:** 瘤内 DC 注射免疫治疗联合放疗能够有效地抑制 BALB/c 小鼠肾癌移植瘤生长, 其效果明显好于单一方法治疗。

[关键词] 树突状细胞; 免疫治疗; 放射治疗; 肾癌; 瘤内注射

[中图分类号] R730 [文献标识码] A

Inhibitory effect of intratumoral dendritic cells injection combined with radiotherapy on growth of renal carcinoma

HUANG Jian-hua¹, LI Qiao^{1,2}, WANG Yao¹, GUO Jia¹, Lü Hai-yan¹, YANG Jun³, MA Lin³(1. Tumor Immunotherapy & Research Center, PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 2. Division of Surgical Oncology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA; 3. Department of Radiotherapy, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of radiotherapy (RT) on dendritic cell (DC)-based immunotherapy of renal cancer in mice. **Methods:** Mice s. c. renal carcinoma models were established by transplanting Renca renal carcinoma cells and were divided into control group, single radiotherapy group, single DC injection group, and DC injection plus radiotherapy group. Mice in the last group received radiotherapy (7 Gy/time) on d 12-16 after inoculated with renal carcinoma cells (2.5×10^6); and on d 11, 15, 19 and 22, bone marrow-derived unpulsed DCs (without tumor antigen, 10^6 every time) were injected into the tumors of model mice. Mice were sacrificed on day 28 and the growth rate, weight and size of tumors were measured. IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-10 in the splenocytes were determined by ELISA assay. **Results:** Compared with single DCs and single RT group, DCs plus RT group had an obviously decreased growth rate and tumor size, but the splenocytes had an increased secretion of IL-2, IFN- γ and IL-4 compared with other groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Intra-tumor DCs injection combined with radiotherapy can effectively inhibit the growth of renal carcinoma growth in BALB/c mice; its effect is better than any of the single strategy.

[Key words] dendritic cell; immunotherapy; radiotherapy; renal carcinoma; intratumoral injections

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(4): 249-252]

大量研究表明,树突状细胞(dendritic cell, DC)在启动抗肿瘤免疫的抗原提呈中起关键作用,携带肿瘤抗原的 DC 能够有效激活抗原特异性细胞毒 T 细胞发挥抗肿瘤作用,在多种肿瘤的 DC 免疫治疗临床实验中证实具有一定的治疗效果^[1,3]。本研究建立了 DC 瘤内注射联合放疗治疗小鼠肾癌移植瘤模型,观察放

疗是否具有增强 DC 免疫治疗小鼠肾癌的抗肿瘤作用,评价这种联合治疗方法的抗肿瘤效果。

[基金项目] 北京市自然科学基金资助项目(7042060)

[作者简介] 黄建华(1955-),女,研究员,主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究。E-mail:huangjh123@yahoo.com.cn.

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

8 周龄 BALB/c 小鼠,雌性,购于中国医学科学院动物实验中心。BALB/c 小鼠肾癌细胞株 Renca 由美国密执安大学李峤博士惠赠。GM-CSF、IL-4 购自 Cytolab 公司。荧光标记的大鼠抗小鼠细胞表面抗体:CD3-异硫氰酸荧光素(FITC)、CD4-FITC、CD8-FITC、MHC-I、MHC-II 单抗及 CD86-FITC、CD80-PE 双抗、CD19-FITC、CD25-PE 双抗购自 BD Pharmingen 公司。细胞因子 IL-2、IL-4、TNF- α 、IFN- γ ELESA 试剂盒购自 BD 公司。

1.2 小鼠骨髓 DC 的培养

无菌条件下取同源鼠股骨,洗出骨髓细胞,无菌水溶去红细胞,10% NaCl 中止。洗涤 2 次后以 1×10^7 /瓶加入 25 cm²培养瓶培养,过夜后弃悬浮细胞,加入 GM-CSF 10 ng/ml、IL-4 10 ng/ml,3 d 后半量换液,加新鲜细胞因子,第 7 天收集 DC 细胞。

1.3 DC 表面分子的检测

于 DC 培养的第 7 天收集细胞,常规制样,加入 5 μ l FITC 或 2 μ l PE 标记的相应单抗,流式细胞仪检测其表面分子的表达。用 Biosort 30 软件处理数据,计算阳性细胞率及表达的平均荧光强度。

1.4 荷瘤小鼠的治疗方案

取 BALB/c 小鼠 48 只, Renca 肾癌细胞 2.5×10^6 /ml, 0.3 ml 接种于每只小鼠右腋窝皮下,接种后第 11 天,荷瘤小鼠皮下可触到 0.2 cm³左右肿瘤结节时开始治疗。小鼠随机分为无治疗对照组、单纯 DC 治疗组,单纯放疗组和 DC 联合放疗组等 4 组,每组 12 只。单纯 DC 治疗组的小鼠于第 11、15、19 和 22 天分别 4 次在肿瘤局部直接瘤内注射未负载肿瘤抗原的 DC 细胞,每只小鼠 0.2 ml (1×10^6 /次)。单纯放疗组的小鼠在接种肿瘤的第 12~16 天,连续 5 d 使用 SL-18 型 X 线高能直线加速器(X-ray high-energy linac)进行肿瘤局部放射治疗,每只小鼠每次接受 7Gy、6 脉伏电子线。DC 联合放疗组小鼠接受的全部治疗过程见图 1。

1.5 疗效观察

于放疗前 1 d 和放疗后每 2 d 卡尺测量肿瘤体积。荷瘤 28 d 后处死小鼠,剥离肿瘤称重。

1.6 脾细胞分泌细胞因子水平的检测

将实验组小鼠的脾细胞分离后,以 1×10^6 /ml 的密度接种于经 20 Gy X 射线照射的 Renca 细胞铺底的 24 孔培养板中,效靶比为 4:1,每孔加入 1ml 10% 胎牛血清 1640 培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱内培养 24 h 后,离心收集上清。用 ELISA 法检测各组荷瘤小鼠脾细胞 IL-2、IL-10、IL-4 和 IFN- γ 的分泌水平,以 pg/ml 表示。

1.7 统计学处理

使用 State7.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,t 检验分析数据。

2 结 果

2.1 体外培养骨髓细胞诱导产生成熟 DC

经流式细胞术测定显示,作为对照的未培养骨髓细胞 CD80 为 4.86%、CD86 为 22.39%、MHC-II 为 0.78%,经 GM-CSF、IL-4 细胞因子刺激培养的 DC 细胞其 CD80 为 96.23%、CD86 为 91.75%,MHC-II 为 88.95%。结果显示,所制备的 DC 为成熟的 DC(图 2)。

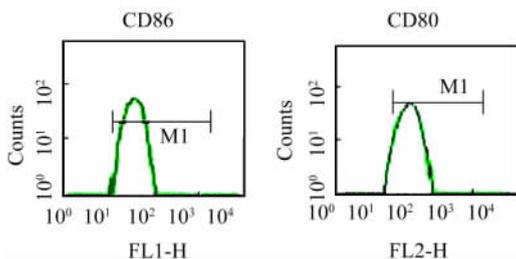


图 2 流式细胞仪分析骨髓来源 DC 表面标志 CD86、CD80 的表达

Fig. 2 Expression of CD 86 and CD80 on bone marrow-derived DCs by FCM

2.2 各种治疗方法对小鼠移植瘤生长的影响

与无治疗对照组相比,各治疗组的小鼠肿瘤增长速度减慢,以 DC 联合放疗组的生长速度最为缓慢。肿瘤体积:未治疗组为(10.6 \pm 1.4) cm³,单纯 DC 组为(8.5 \pm 1.4) cm³,单纯放疗组为(4.1 \pm 0.6) cm³,DC 联合放疗组为(1.9 \pm 0.3) cm³(图 3)。荷瘤 28 d 的不同治疗组的肿瘤重量明显不同:未治疗组为(5.3 \pm 0.8) g,单纯 DC 组为(4.5 \pm 0.7) g,单纯放疗组为(2.8 \pm 0.3) g,DC 联合放疗组为(1.1 \pm 0.7) g。以 DC 联合放疗组肿瘤重量最轻。经统计学检验,除单纯 DC 组/未治疗组的 P 值为 0.45、放疗组/DC 组的 P 值

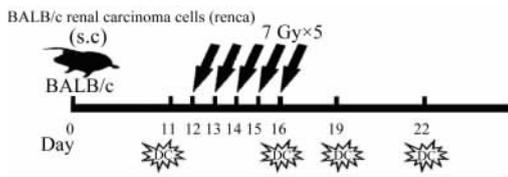


图 1 荷肾癌小鼠 DC 联合放疗的治疗过程示意图
Fig1 Sketch of combining DC and radiotherapy in treatment of renal carcinoma-bearing mice

为 0.02 外, 未治疗组/放疗组、未治疗组/ DC 联合放疗组、放疗组/DC 联合放疗组、DC 组/ DC 联合放疗组等各组间比较均有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。

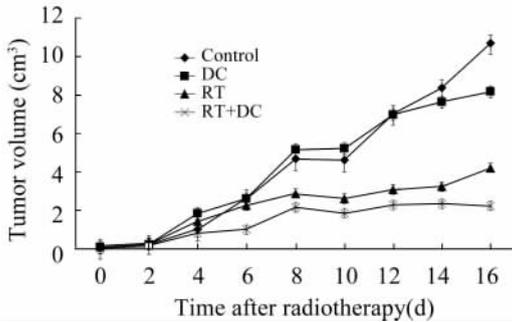


图3 治疗后各组肿瘤的体积

Fig. 3 Tumor volumes of tumor-bearing mice in each growth

2.3 各治疗方法对脾细胞抗肿瘤因子分泌的影响

取不同治疗组的移植瘤小鼠脾细胞, 分别与 Renca

肾癌细胞共培养 24 h 后, 用 ELISA 法测定细胞上清液 IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN- γ 的浓度, 结果见表 1。与单一治疗相比, DC 联合放疗组的小鼠脾细胞分泌 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 的能力显著提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 治疗后 IL-10 在单纯 DC 组明显增高, 其他各组无明显改变。

3 讨论

DC 的研究和应用是肿瘤免疫治疗的一个重要组成部分, 大量研究表明, 肿瘤抗原制备的方法和形式直接影响携带肿瘤抗原的 DC 是否能够诱发机体免疫系统产生抗肿瘤作用。如何提高 DC 的抗原提呈能力, 有效地针对肿瘤细胞产生特异性的抗肿瘤效应, 使 DC 疫苗的疗效实现最优化, 是 DC 疫苗用于肿瘤免疫治疗中尚待解决的关键问题之一^[4-5]。为此, 本实验建立了 Renca 肾癌移植瘤的小鼠模型, 采用瘤内注射 DC 辅助局部放疗照射肿瘤组织的治疗方案, 研究是否能更有效地激活 DC 引发更强的抑制肿瘤效果。

表 1 各种治疗对荷瘤小鼠脾细胞分泌 IL-2、INF- γ 、IL-4、IL-10 的影响 (pg/ml)

Tab. 1 Secretion of IL-2, IFN- γ , IL-10 and IL-4 by splenocytes in each group

Groups	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10
Control	211.02 \pm 35.98	83.69 \pm 1.37	19.35 \pm 0.86	201.71 \pm 13.97
DC	220.73 \pm 15.58	233.25 \pm 15.98**	31.37 \pm 5.14*	2 019.24 \pm 338.77**
RT	1 482.47 \pm 47.91**	167.56 \pm 13.13**	18.11 \pm 2.82	166.99 \pm 3.51*
DC + RT	1 572.93 \pm 20.82 $\Delta\Delta$	404.01 \pm 5.24 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	131.3 \pm 11.28 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	454.42 \pm 30.66 $\Delta\Delta\Delta\Delta$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; $\Delta\Delta$ $P < 0.05$, vs DC; $\Delta\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs RT

通过对各治疗组小鼠肾癌移植瘤生长速度、体积和瘤重的分析表明, DC 瘤内注射辅助放疗的方法有效地抑制了 Renca 肾癌细胞在 BALB/c 小鼠体内的生长, 其效果比单一疗法显著。DC 免疫治疗辅助放疗对 Renca 肾癌的增效作用是与放疗诱导的免疫调节机制密切相关的。近年的研究表明: 放疗能够引发细胞凋亡, 其机制为 DNA 损伤诱导 DNA 依赖型蛋白激酶的合成, 从而促进 p53 肿瘤抑制因子的生成; 同时上调细胞抗原, 如肿瘤抗原、MHC 分子、共刺激分子 CD80、CD86、热休克蛋白、致死受体 CD95、黏附因子 ICAM-1 等; 诱导生成细胞因子, 如 IL-2、IL-12 和 IFN- γ 等^[6]。通过放疗在肿瘤组织内引发炎症反应, 释放“危险”信号, 使 DC 在炎症微环境中能够更好地获取和提呈多种肿瘤相关抗原和共刺激因子至初始 T 细胞, 从而有效地启动机体抗肿瘤免疫功能的产生。本实验进一步证实了经过治疗的荷瘤小鼠脾细胞, 在 Renca 细胞抗

原刺激后, DC 瘤内注射辅助放疗组小鼠的脾细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 的能力显著提高, 这些具有抗肿瘤效应的 Th1 型细胞因子的增加是与小鼠体内肿瘤明显消退的程度相一致的。此外还观察到, 联合治疗组分泌 Th2 型细胞因子 IL-4 的水平明显高于对照组与单一治疗组。在抑瘤效果不明显的单纯 DC 治疗组小鼠, 脾细胞分泌 IL-10 明显增加。这些结果表明, 采用 DC 瘤内注射辅助局部放疗的方案, 在肾癌移植瘤的 BALB/c 小鼠体内产生了系统性抗肿瘤细胞免疫及体液免疫效应, 导致了 Renca 肾癌移植瘤的消退, 其疗效优于单纯放疗或单纯 DC 治疗方法, 这些结果与 D5 黑色素瘤和 MCA205 肉瘤小鼠移植瘤的研究结果相一致^[7]。

本实验选择了体外未负载肿瘤抗原的 DC 直接瘤内注射的途径, 这一方法的优势在于体外培养 DC 时, 不但能够免除负载肿瘤抗原的繁杂程序, 而且可以使足量 DC 到达肿瘤局部, 直接获取和提呈多种肿瘤相

关抗原与共刺激因子,克服皮下或静脉输注途径使 DC 难于到达肿瘤组织内发挥作用的缺陷^[8]。瘤内注射 DC 方法已用于黑色素瘤和乳腺癌病人,观察到肿瘤生长明显受到抑制的结果^[9]。DC 联合放疗的方案是一种以原位肿瘤抗原为模板激活 DC 扩增成熟的新技术,这种方案的创立有可能为已丧失手术机会的肿瘤患者提供获取自身肿瘤相关抗原进行主动性免疫治疗的新途径。

[参 考 文 献]

[1] Nestle FO, Farkas A, Conrad C. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer[J]. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17 (2): 163-169.

[2] Chang AE, Redman BG, Whitfield JR, *et al*. A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(4): 1021-1032.

[3] Stift A, Friedl J, Dubsky P, *et al*. Dendritic cell-based vaccination in solid cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(1): 135-142.

[4] Labarriere N, Bretaudeau L, Gervois N, *et al*. Apoptotic body-loaded dendritic cells efficiently cross-prime cytotoxic T lympho-

cytes specific for NA17-A antigen but not for Melan-A/MART-1 antigen[J]. *Int J Cancer*, 2002, 101(3): 280-286.

[5] Strome SE, Voss S, Wilcox R, *et al*. Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(6): 1884-1889.

[6] Friedman EJ. Immune modulation by ionizing radiation and its implications for cancer immunotherapy[J]. *Curr Pharm*, 2002, 8 (19): 1765-1780.

[7] Teitz-Tennenbaum S, Li Q, Rynkiewicz S, *et al*. Radiotherapy potentiates the therapeutic efficacy of intratumoral dendritic cell administration[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23): 8466-8475.

[8] Candido KA, Shimizu K, McLauqhlin JC, *et al*. Local administration of dendritic cells inhibits established breast tumor growth: Implications for apoptosis-inducing agents[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(1): 228-236.

[9] Triozzi PL, Khurram R, Aldrich WA, *et al*. Intratumoral injection of dendritic cells derived *in vitro* in patients with metastatic cancer [J]. *Cancer*, 2000, 89(12): 2646-2654.

[收稿日期] 2006 - 05 - 10 [修回日期] 2006 - 07 - 06
 [本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

浆细胞样树突状细胞通过 GITRL 活化 NK 细胞

NK 细胞是天然免疫中一类十分重要的淋巴细胞,通过其细胞毒活性和产生淋巴因子,在机体抗感染、抗肿瘤、免疫调节和造血调控等方面发挥重要的免疫功能。该文报告通过基因芯片分析发现,静息和活化的 NK 细胞表面表达糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, GITR),而活化浆细胞样树突状细胞(pDC)表面优先表达糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体配体(GITRL),由受体与配体相互作用的模式推测 pDC 与 NK 细胞之间可能通过 GITRL 和 GITR 发生相互作用而调节固有免疫系统的功能。

实验发现 CpG 诱导活化的 pDC 激活了静息态的 NK 细胞,增强了其对靶细胞系 Daudi 和 K562 的杀伤活性,并明显增加了杀伤性细胞因子 IFN- γ 的分泌水平。通过应用 I 型干扰素及其受体的混和抗体阻断 I 型干扰素途径, NK 细胞的杀伤活性和 IFN- γ 的分泌完全被抑制,而用趋化小室将 pDC 与 NK 细胞分开仅使可溶性因子通过,或者应用 GITRL 的单克隆抗体阻断其作用途径时, NK 细胞的杀伤活性和 IFN- γ 的分泌也受到部分抑制,结果提示活化 pDC 对 NK 的活化以及促进其杀伤功能和 IFN- γ 分泌功能依赖于 I 型干扰素的存在,而活化 pDC 表面所表达的 GITRL 则代表了一类促进 NK 细胞活化的重要的共刺激分子。

利用一个稳定表达人 GITRL 并能直接作为靶细胞被 NK 细胞杀伤的 CD32-L 细胞系,将静息 NK 细胞与转入和未转入 GITRL 的 CD32-L 细胞系共培养,并在培养体系中分别加入亚适量的 NK 细胞的活化因素 IL-2、IFN- α 和 NK 细胞活化性受体 NKG2D 单克隆抗体,发现在亚适量活化因素不能激活 NK 细胞的前提下,与转入 GITRL 的 CD32-L 细胞共培养的 NK 细胞明显活化,杀伤活性显著增强, IFN- γ 分泌也显著增加,进一步证实 GITRL 代表了一类促进 NK 细胞活化的重要的共刺激分子。免疫组织化学染色发现人扁桃体中 pDC 与 NK 细胞共定位于 T 细胞区并且两者相聚很近,表明体内 pDC 与 NK 细胞之间可能存在相互作用。

综上所述, pDC 通过活化过程中分泌的大量 I 型干扰素和活化 pDC 所表达的共刺激分子 GITRL, 以及可能存在的其他不为所知的机制,促进了 NK 细胞的活化,增强了其细胞毒活性和淋巴因子的分泌,在机体抗感染、抗肿瘤,以及免疫调节等功能方面发挥了重要的作用。

[李 莉 摘译, 刘书逊 审阅. Hanaduchi S, Watanabe N, Wang YH, *et al*. *Blood*, 2006, 107(9): 3617-3623]