

[文章编号] 1007-385X(2006)04-0286-04

腺病毒介导的 *HBsAg* 基因修饰树突状细胞的体外生物学特性

杨静悦¹, 曹大勇², 刘文超¹, 范黎¹, 斯小明¹, 腾增辉³, 杨文涛³(1. 第四军医大学西京医院肿瘤科, 西安 710032; 2. 第四军医大学西京医院肝胆外科, 西安 710032; 3. 第四军医大学基础部药理学教研室, 西安 710032)

[摘要] **目的:** 探讨腺病毒介导乙型肝炎病毒表面抗原(AdVHBsAg)基因修饰树突状细胞(dendritic cell, DC)瘤苗体外生物学活性。**方法:** 将腺病毒表达载体 AdVHBsAg 转染人单个核细胞来源的 DC, 构建 AdVHBsAg-DC 肝癌瘤苗, 采用 Western blotting 法鉴定转染基因表达, FACS 检测表面分子和吞噬功能, ³H-TdR 法检测 T 细胞增殖反应的能力, MTT 法检测 CTL 活性。**结果:** HBsAg 基因转染后, Western blotting 法检测结果示 HBsAg 基因表达于转染的 DC, 表明腺病毒介导的 HBsAg 基因转染的有效性。AdVHBsAg-DC 可高表达 CD1a、CD11c、CD83、CD86 和 HLA-DR, 但吞噬功能较 DC 组降低 ($P < 0.05$)。AdVHBsAg-DC 刺激自体 T 细胞增殖功能均明显高于 DC 对照组和 AdVLacZ-DC 组 ($P < 0.05$)。AdVHBsAg-DC 体外诱导 CTL 对 HepG2. 2. 15 肿瘤细胞的杀伤作用具有特异性。**结论:** 肝癌相关基因 HBsAg 可作为乙型肝炎病毒相关性肝癌的切入点, 该研究为 HBV 相关肝癌 DC 体内免疫治疗提供了实验依据。

[关键词] 树突状细胞; 细胞毒 T 淋巴细胞; 免疫治疗; 肝肿瘤; HBsAg

[中图分类号] R730.51 **[文献标识码]** A

Biological characteristics of adenovirus-mediated *HBsAg* gene-modified dendritic cells *in vitro*

YANG Jing-yue¹, CAO Da-yong², LIU Wen-chao¹, FAN Li¹, SI Xiao-ming¹, TENG Zeng-hui³, YANG Wen-tao (1. Department of Oncology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University; 3. Department of Pharmacology, Faculty of Preclinical Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective:** To study the biological characteristics of *HBsAg* gene-modified DC tumor vaccine *in vitro*. **Methods:** Recombinant adenovirus expression plasmid AdVHBsAg was transfected into human monocyte-derived dendritic cells to construct AdVHBsAg hepatocarcinoma tumor vaccine. The expression of transfected gene was detected by Western blotting. Surface molecules and phagocytosis of AdVHBsAg-DCs were detected by FACS. Autologous T cell proliferation stimulated by AdVHBsAg-DCs was detected by ³H-TdR assay. Cytotoxic CTL activity induced by AdVHBsAg-DCs *in vitro* was detected by MTT assay. **Results:** Western blotting analysis showed that HBV surface antigen gene was expressed in transfected DCs, suggesting that the transfection was effective. AdVHBsAg-DCs up-regulated the expression of CD1a, CD11c, CD83, CD86 and HLA-DR, but lowered the phagocytosis compared with DC group ($P < 0.05$). Autologous T cells proliferation induced by AdVHBsAg-DCs was obviously higher than DC that in control group and LacZ-DC group ($P < 0.05$). The *in vitro* cytotoxicity of CTL induced by AdVHBsAg-DCs against HepG2. 2. 15 cells was specific. **Conclusion:** Hepatocarcinoma associated antigen *HBsAg* can be used as a key point in gene therapy of HBV related hepatoma, which provides an experimental base for immunotherapy of HBV related hepatocarcinoma mediated by DCs.

[Key words] dendritic cells; cytotoxic T lymphocytes; immunotherapy; liver neoplasas; HBsAg

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(4): 286-289]

肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 早期诊断率不高, 大多数患者一旦发现已属晚期。手术是目前肝癌治疗最有效手段之一, 但能够接受此种治疗的患者不足

[作者简介] 杨静悦(1978-), 女, 陕西西安人, 博士研究生, 主要从事肿瘤免疫治疗研究。

[通讯作者] 刘文超, E-mail: yangjy@fmmu.edu.cn

20%。我国人群乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的携带率在10%左右,而90%的肝癌患者发现HBsAg阳性^[1]。因此,开发和研究树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗对免疫治疗乙型肝炎病毒相关性肝癌具有重要意义。

DC在初始免疫应答中起到非常重要的作用。DC摄取抗原后,加工提呈至细胞内主要组织相容性I类分子,形成肽-主要组织相容性分子复合物,表达于细胞表面。当初始T淋巴细胞通过特异性受体与此抗原肽复合物结合时,可刺激T淋巴细胞增殖分化^[2-5]。本研究根据乙型肝炎病毒相关性肝癌表达病毒抗原的特点,在没有发现肝癌细胞特异性抗原的情况下,以病毒抗原为靶抗原进行针对性杀伤。本实验制备HBsAg-DC疫苗,通过它来诱导特异性细胞毒性T淋巴细胞反应,评价AdVHBsAg-DC疫苗体外对人肝癌细胞株的杀伤活性,为肝癌的治疗寻求新的思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

GM-CSF、IL-4 购自 PeproTech 公司;新型重组人肿瘤坏死因子(TNF)为第四军医大学生物技术中心产品;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠抗人 McAb HLA-DR、CD80,藻红蛋白(PE)标记的鼠抗人 McAb CD34、CD80、CD1a、CD11c 购自 BD Pharmingen 公司。胎牛血清、RPMI 1640 购自 Gibco 公司;DMSO 购自 Sigma 公司。鼠抗人 HBsAg 抗体以及含辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自 TBD 公司。

1.2 肝 癌 细 胞 株

肝癌细胞株 HepG2.2.15,整合了 HBV 全基因组,由美国 Mount Sinai 医学中心建株,这种细胞可分泌 HBsAg 和 HBeAg。培养条件为含胎牛血清、G418 的 RPMI 1640(Gibco)的培养基。

1.3 DC 的 培 养

外周血单个核细胞来自于健康供者,经 Ficoll 密度梯度离心法分离出单个核细胞层,无血清 RPMI 1640 洗涤细胞后,接种于 6 孔板,5% CO₂、37℃ 孵育 2 h 后,吸去非贴壁细胞,贴壁细胞以含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养 6 d,并且从第 1 天起每隔 2~3 d 加入 GM-CSF(100 ng/ml)和 IL-4(1 000 U/ml)。从单个核细胞来源的 DC 培养的第 6 天起加入 2.5 ng/ml TNF- α ,24 h 后即可诱导出成熟的 DC^[6]。

1.4 重 组 腺 病 毒 的 转 染

携带 HBsAg 的重组腺病毒表达载体 AdVHBsAg(滴度为 1.1×10^9 PFU/ml)、对照病毒 AdVLacZ(含对照基因 LacZ,滴度为 2.1×10^9 PFU/ml)扩增、纯化并

稀释为 1.2×10^8 PFU/ml 备用;转染时,取培养第 6 天的 DC,弃去培养基后加入少量无血清培养基覆盖细胞层,再加入 200 MOI 重组腺病毒 AdVLacZ 或 AdVHBsAg,置 37℃、5% CO₂ 孵箱中,培养 120 min 后洗去上清,加入完全培养基继续培养。

1.5 Western blot 检测 HBsAg 表 达

细胞裂解 AdVHBsAg 转染的 DC。蛋白电泳后,用电转移仪将蛋白条带从 SDS-PAGE 凝胶转移至硝酸纤维素膜上,用鼠抗人 HBsAg 抗体作一抗,以含辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG(1:500)为二抗,用 DAB 和 H₂O₂ 显色溶液进行底物显色。

1.6 FACS 检测 HBsAg 基因修饰 DC 的 表 面 分 子

收集 HBsAg 基因修饰的 DC,调整细胞至 5×10^9 /L,各取 50 μ l,加入 1:20 灭活正常兔血清 10 μ l,4℃ 封闭 10 min,再分别加入荧光标记抗体:包括 CD1a-PE,CD11c-PE,HLA-DR-FITC,CD86-PE,CD80-FITC。4℃ 避光 30 min 后,PBS 洗 2 次,流式细胞仪(FACS caliber)检测。

1.7 AdVHBsAg-DC 吞 噬 功 能 分 析

培养 6 d 的 DC,经重组腺病毒转染后,置 24 孔板,每孔 2.5×10^3 /500 μ l,37℃、5% CO₂ 孵育 24 h,收集 DC。冰上预冷 10 min,加入预冷的 OVA-FITC,终浓度为 10 μ g/ml,37℃、5% CO₂ 孵育 30 min;对照组加入 OVA-FITC 后仍置于冰上 30 min。用预冷 PBS 洗涤 2 次,FACS 检测荧光强度,以荧光强度代表 DC 吞入胞内 OVA-FITC 的含量,反映 DC 对外来抗原的吞噬能力。

1.8 DC 刺 激 T 细 胞 增 殖 能 力 的 检 测

收集各组 DC,分别以 2×10^3 /孔、 5×10^3 /孔接种于 96 孔培养板,每组设 3 复孔,作为刺激细胞。取同一供者外周静脉抗凝血,以常规分离 PBMC,RPMI 1640 重悬,37℃、5% CO₂、100% 湿度条件下贴壁 2 h,收集悬浮细胞作为反应细胞;每孔再加入 1×10^5 反应细胞,终体积为 200 μ l;37℃、5% CO₂ 培养 5 d。结束培养前 18 h 加入 ³H-TdR(3.7×10^4 Bq/孔)。收集细胞,液闪计数仪测 cpm 值,结果以 3 孔平均值表示。

1.9 细 胞 毒 性 测 定

收集各组 DC 作为刺激细胞。自体 T 淋巴细胞来源于非贴壁单个核细胞,以含 IL-2 10% FCS 的 RPMI 1640 培养,每 4 d 换液 1 次。将淋巴细胞与刺激细胞按 20:1 接种于 24 孔板作为效应细胞。收集 HepG2.2.15 细胞作为靶细胞,之后将效应细胞与靶细胞按 20:1 混合接种于 96 孔板,终体积为 200 μ l。37℃、5% CO₂ 培养 24 h 后,加入 MTT(终浓度 0.5 mg/L),再培养 4 h,补入 150 μ l DMSO,用酶联免疫检测仪在 490 nm 处检测 D_{490} 值。以下述公式计算杀伤效率:

CTL 杀伤效率 = [1 - (靶细胞 D_{490} 值 - 效应细胞 D_{490} 值) / 靶细胞 D_{490} 值] × 100%

2 结果

2.1 DC 的体外培养

在细胞因子 GM-CSF 和 IL-4 共同作用下,分离的外周血单个核细胞培养 2 d 后,即出现许多细胞集落;第 4 天时,集落大量增加,但具有毛刺状突起的典型 DC 较少;至第 7 天,集落已逐渐消散,DC 大量释放,悬浮于培养液,镜下呈现典型的 DC 形态。

2.2 AdVHBsAg-DC 中 HBsAg 的表达

各组 DC 经 Western blot 检测如图 1 所示:AdVHBsAg-DC 组在相对分子质量 24 000 处得到与 HBsAg 蛋白分子量相符的蛋白条带,提示 AdVHBsAg 感染 DC 可以表达 HBsAg;而 AdVLacZ-DC 组和空白对照组均未能检测到 HBsAg 存在。

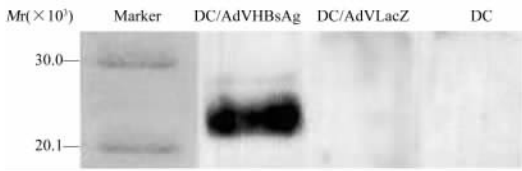


图 1 Western blot 检验转染细胞的 HBsAg 表达
Fig. 1 Western blot analysis of HBsAg expression in transfected DCs

2.3 流式细胞仪检测 AdVHBsAg-DC 表面分子

结果可见 AdVHBsAg-DC 可高表达 CD1a、CD11c、CD86、CD80 和 HLA-DR, 并且 CD1a、CD11c、CD86、CD80 和 HLA-DR 表达量明显高于未转染的不成熟 DC 组,与未转染的成熟 DC 组差异不明显,说明腺病毒转染未影响 DC 功能,并可以诱导 DC 成熟(图 2)。

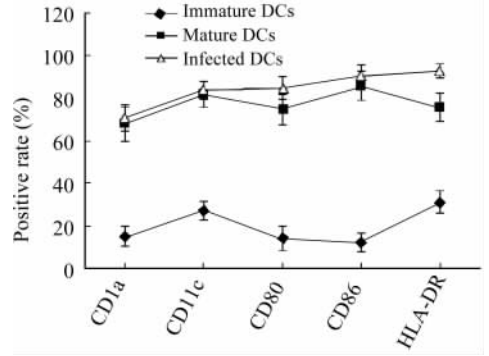


图 2 FACS 检验 AdVHBsAg-DC 表面分子
Fig. 2 Surface molecules of AdVHBsAg-DC were detected by FACS

2.4 AdVHBsAg-DC 吞噬功能分析

通过 FACS 分析转基因 DC 的吞噬功能,以平均荧光强度代表 DC 吞入胞内 OVA-FITC 的含量,反映 DC 对外来抗原的吞噬能力。结果显示(图 3)AdVHBsAg-DC 和 AdVLacZ-DC 组内吞功能均低于 DC 对照组,表明基因转染后 DC 抗原摄取能力降低。

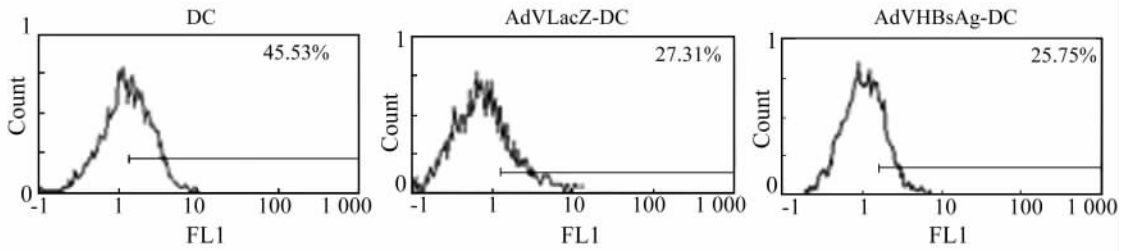


图 3 AdVHBsAg-DC 内吞 OVA-FITC 的 FACS 分析
Fig. 3 FACS analysis of AdVHBsAg-DC endocytosis OVA-FITC

2.5 AdVHBsAg-DC 刺激 T 细胞增殖能力

AdVHBsAg-DC 瘤苗刺激 T 细胞增殖能力的检测结果显示,AdVHBsAg-DC 刺激后 T 细胞增殖水平明显高于 AdVLacZ-DC 组和空白对照组 ($P < 0.05$),这些结果证明腺病毒介导 HBsAg 转染后的 DC 能更有效地刺激自体 T 细胞增殖(图 4)。

2.6 AdVHBsAg-DC 的 CTL 杀伤活性

为了评价 AdVHBsAg-DC 转染的 DC 是否能诱导出抗原特异性 CTL 杀伤活性,CTL 实验结果显示,AdVHBsAg-DC 转染 DC 能诱导出高特异性 CTL 杀伤活

性。AdVHBsAg-DC 对 HepG2.2.15 肿瘤细胞有明显的杀伤活性 [(64.4 ± 3.01) %], 杀伤效率明显高于 AdVLacZ-DC 组 [(31.5 ± 2.84) %] 和空白对照组 [(21.2 ± 2.24) %] ($P < 0.05$); 当靶细胞为 HepG2 时,AdVHBsAg-DC 的杀伤活性为 (27.8 ± 2.55) % , 与靶细胞为 HepG2.2.15 细胞时相比,差异显著 ($P < 0.05$)。当靶细胞为 SMMC7721 时,AdVHBsAg-DC 杀伤活性较低 [(23.4 ± 2.89) %], 与靶细胞为 HepG2.2.15 细胞时相比,差异亦显著 ($P < 0.05$), 此结果说明其杀伤活性具有抗原特异性(图 5)。

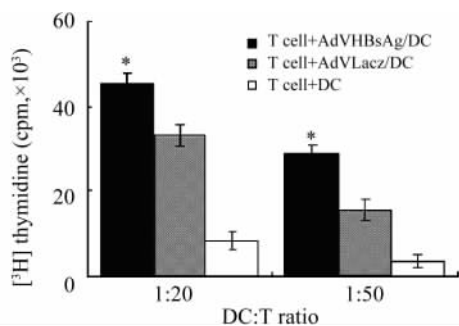


图 4 AdVHBsAg-DC 刺激自体 T 细胞增殖功能

Fig. 4 AdVHBsAg-DC stimulated proliferation of autologous T cells

* $P < 0.05$ vs T cell + AdVLacZ/DC or T cell + DC

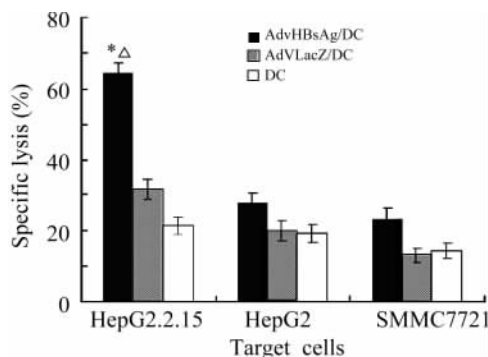


图 5 AdVHBsAg-DC 诱导特异性 CTL 杀伤能力检测

Fig. 5 Specific CTL cytotoxicity induced by AdVHBsAg-DC

* $P < 0.05$ vs AdVLacZ/DC or DC in HepG2. 2. 15

△ $P < 0.05$ vs AdVHBsAg/DC in HepG2 or in SMMC7721

3 讨论

DC 是一种有效的抗原提呈细胞,能够诱导初始免疫应答,提高对外来抗原的二次免疫应答。由于肿瘤患者体内 DC 的功能减弱,MHC 分子和共刺激分子 CD80、CD86 的表达量下降,体外诱导功能正常的 DC。经肿瘤相关性抗原或特异性抗原修饰的 DC 疫苗来免疫治疗肿瘤患者,是肿瘤治疗的一个发展方向。目前国内外已大量开展这方面的研究,如国外有学者将 HBV 转基因鼠 DCs 经 HBsAg 冲击后回输,在体内诱生了 HBsAg 特异性 CTL 反应^[7-10]。国内也有研究报道,将 HBsAg DC 疫苗用于治疗慢性乙型肝炎中。而本研究根据乙型肝炎病毒相关性肝癌表达病毒抗原 HBsAg,将 HBsAg 作为治疗肝癌的靶目标,探讨其能否成为针对表达 HBsAg 肝癌的一种免疫治疗手段。

本次试验中 Western blot 结果均表明:HBsAg 转染的细胞表达 HBsAg,表明由腺病毒介导、转染的未成熟单个核细胞来源的 DC,能够表达 HBsAg;经流式细胞仪检测发现,DC 表面的 B7 和 MHC 分子都升高。这些

结果表明本实验使用的病毒载体成功地转移外源性基因并获得有效表达。同时,转基因可刺激 DC 成熟,上调 DC 表面分子水平。MTT 结果表明,AdVHBsAg 转染的 DC 刺激自体 T 细胞增殖水平明显高 AdVLacZ-DC 组和空白对照组;CTL 结果显示 AdVHBsAg-DC 对表达 HBsAg 的肝癌细胞 HepG2. 2. 15 有较强的杀伤作用。本研究证实,AdVHBsAg-DC 能够诱导特异性抗肿瘤免疫反应,并刺激产生有效的 T 淋巴细胞。对于乙型肝炎病毒相关性肝癌的免疫治疗,DC 疫苗有望成为表达 HBsAg 肝癌的一种免疫治疗手段,为将来 DC 疫苗的临床应用创造了条件。

此研究评价了基因修饰的 DC 诱导抗人肝癌细胞的细胞毒性 T 淋巴细胞的能力,探讨了 HBsAg 作为乙型肝炎病毒相关性肝癌靶向治疗的可行性,为今后进一步研究 DC 疫苗的作用机制以及临床应用提供了一定的实验依据。

[参考文献]

- [1] Sherman M. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors, and screening[J]. Semin Liver Dis, 2005, 25(2): 143-154.
- [2] Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, *et al.* Dendritic cells as vectors for therapy[J]. Cell, 2001, 106(3): 271-274.
- [3] Zhang JK, Li J, Chen HB, *et al.* Antitumor activities of human dendritic cells derived from peripheral and cord blood[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(1): 87-90.
- [4] Guidotti LG. The role of cytotoxic T cells and cytokines in the control of hepatitis B virus infection[J]. Vaccine, 2002, 20(suppl 4): 80-82.
- [5] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, *et al.* Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20: 621-667.
- [6] Bubenik J. Genetically engineered dendritic cell-based cancer vaccines[J]. Int J Oncol, 2001, 18(3): 475-478.
- [7] Nakamura Y, Suda T, Nagata T, *et al.* Induction of protective immunity to listeria monocytogenes with dendritic cells retrovirally transduced with a cytotoxic T lymphocyte epitope minigene[J]. Infect Immun, 2003, 71(4): 1748-1754.
- [8] Qui SJ, Lu L, Qiao C, *et al.* Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transduced by adenoviral vector encoding HBsAg: Comparison to protein immunization[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131(7): 429-438.
- [9] Buchler T, Hajek R. Dendritic cell vaccines in the treatment of multiple myeloma: Advances and limitations[J]. Med Oncol, 2002, 19(4): 213-218.
- [10] Mosca PJ, Clay TM, Kim Lyerly H, *et al.* Current status of dendritic cell immunotherapy of malignancies[J]. Int Rev Immunol, 2003, 22(3-4): 255-281.

[收稿日期] 2006-05-22

[修回日期] 2006-07-30

[本文编辑] 郁晓路