

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.01.005

NY-ESO-1 致敏树突状细胞诱导的 CTL 对肝癌细胞株的特异性杀伤作用

张文敏^{1*}, 陈裕庆¹, 张萌², 凌航¹, 文剑明²(1. 福建医科大学基础医学院病理学系, 福建医科大学肿瘤研究所, 福州 350004; 2. 中山大学附属第一医院病理科, 广州 510080)

[摘要] 目的: 探讨肿瘤睾丸抗原 NY-ESO-1(New York-esophageal-1)致敏树突状细胞体外诱导特异性 CTL 对肝癌细胞株的杀伤作用。方法: 重组质粒 pGEX-ESO1 经原核诱导表达并纯化 GST-ESO1 融合蛋白肽。重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和白细胞介素 4(IL-4)诱导培养人外周血来源的树突状细胞(dendritic cells, DCs), 经 GST-ESO1 融合蛋白肽致敏后诱导特异性 CTL 增殖。以此 CTL 为效应细胞, 分别以 NY-ESO-1 阳性表达的肝癌细胞株 HepG2 和不表达 NY-ESO-1 的肝癌细胞株 H2P 为靶细胞, MTT 法检测 CTL 对肝癌细胞株的杀伤作用。结果: 重组质粒 pGEX-ESO1 经 IPTG 诱导, 在大肠杆菌中表达相对分子质量约 36 000 的 GST-ESO1 融合蛋白肽, 纯化后的质量浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$; 经 rhGM-CSF 和 IL-4 联合诱导成功培养人外周血 DCs, 其表型分子 HLA-DR 为 91.4%、CD86 为 70.5%、CD83 为 71.2%、CD80 为 55.3%。NY-ESO-1 致敏的 DCs 能明显诱导 CTL 增殖, 此 CTL 对肝癌细胞株 HepG2 的杀伤率显著高于 GST 刺激组、未致敏 DC 组和无 DC 刺激组(均 $P < 0.05$), 效靶比为 50:1 时杀伤效应达到最高峰(53.23 \pm 3.78%, $P < 0.01$); 相同条件下 CTL 对 H2P 细胞无特异性杀伤作用。结论: NY-ESO-1 抗原致敏的 DCs 在体外可诱导同种 CTL 产生和增殖, 后者对 NY-ESO-1 阳性肝癌细胞株具有特异性杀伤效应, 该方法为肝癌免疫治疗提供了一条新思路。

[关键词] 肝细胞癌; NY-ESO-1; 树突状细胞; 细胞毒性 T 淋巴细胞

[中图分类号] R735.7; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)01-0018-06

CTL induced by NY-ESO-1-impulsed dendritic cells specifically kills NY-ESO-1 positive human hepatocellular cancer cells

ZHANG Wen-min^{1*}, CHEN Yu-qing¹, ZHANG Meng², LING Hang¹, WEN Jian-ming²(1. Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Tumor Research Institute, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antigen specific anti-tumor effect of cytotoxic T lymphocyte (CTL), which was induced by cancer testis antigen NY-ESO-1-impulsed dendritic cells (DCs), against human hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** GST-ESO1 fusion protein was induced in recombinant pGEX-ESO1 vector transformed bacteria by IPTG, and the GST-ESO1 fusion protein was purified. DCs were induced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) from human peripheral blood mononuclear cells. DCs impulsed with GST-ESO protein peptide were co-cultured with T lymphocytes, and the resultant CTLs were used as effector cells. NY-ESO-1 positive hepatocellular carcinoma HepG2 cells and NY-ESO-1 negative H2P cells were used as target cells to test the specific anti-tumor effect of CTL using MTT. **Results:** *Escherichia coli* BL21 expressed fusion protein peptide GST-ESO1 (M_r 36 000) after transfection with recombinant pGEX-ESO1 vector. The concentration of GST-ESO1 peptide was 50 $\mu\text{g/ml}$ after purification. DCs were successfully induced with GM-CSF and IL-4 from human peripheral blood mononuclear cells. DCs-impulsed with NY-ESO1 had high expression of surface molecule such as HLA-DR (91.4%), CD86 (70.5%), CD83 (71.2%) and CD80 (55.3%). DCs-impulsed with NY-ESO-1 induced production and proliferation of CTL, and this CTL specifically killed NY-ESO-1 positive HepG2 cells. CTL induced by NY-ESO-1 had stronger cytotoxic effect against HepG2 cells compared with GST-impulsed DCs, un-impulsed DCs ($P < 0.05$). Highest anti-tumor activity was found when the ratio of effector: target was 50:1 (53.23 \pm 3.78, $P < 0.01$). **Conclusion:** DCs-impulsed with NY-ESO-1 can induce production and proliferation of allogenic CTLs, which show antigen specific anti-tumor effect against

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(No. C0610023);广州市科技计划资助项目(No. 2003J1-C0221)。Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province(C0610023);Science and Technology Planning Program of Guangzhou(No. 2003J1-C0221)

[作者简介] 张文敏(1968-),女,汉族,福建省屏南县人,博士,教授,硕士生导师,主要从事肿瘤病理方面的研究

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: wminz@163.com

NY-ESO-1 positive HCC cells. This result casts new lights on immunotherapy of HCC.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; New York-esophageal-1(NY-ESO-1); dendritic cells; CTL

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(1): 18-23]

肝细胞癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,术后复发率和转移率极高,预后极差,目前虽有手术治疗、化疗、射频、动脉内栓塞等多种治疗方法,但肝癌患者总体生存率并无明显改善。因此人们正在研究用细胞免疫方法治疗肝癌。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是体内功能最强的专职抗原提呈细胞,不仅可以有效摄取和提呈肿瘤抗原,而且通过提供活化 T 细胞所必需的共刺激信号,使 T 细胞被充分激活和有效增殖。因此,利用 DCs 提呈肿瘤抗原进而诱导特异性 CTL 是肿瘤免疫治疗的一个研究热点。

肿瘤-睾丸(cancer-testis, CT)抗原是 20 世纪 90 年代发现的肿瘤特异性抗原,在除睾丸外的其他正常组织中不表达,而在多种肿瘤组织中高表达^[1-2]。NY-ESO-1(New York-esophageal-1)是 CT 抗原中免疫性最强的一类抗原^[3]。研究表明^[4-5] NY-ESO-1 在肝癌组织中有较高的表达率(30% ~ 40%); Korangy^[6]也首次在肝癌患者体内发现针对 NY-ESO-1 的特异性免疫反应。因此, NY-ESO-1 抗原对肝癌免疫治疗具有重要的临床应用价值。本研究以原核表达纯化的 NY-ESO-1 蛋白肽为抗原冲击 DCs, 激发特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL),对肝癌细胞株进行体外杀伤实验,为 NY-ESO-1 应用于临床肝癌治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 质粒与细胞株

含 NY-ESO-1 cDNA 的重组质粒 pGEX-ESO1 由本课题组自行构建^[7]。肝癌细胞株 HepG2、9706 购自中科院上海细胞库,肝癌细胞株 H2P、H4M 为中山大学附属第一医院病理科原代培养建株^[8]。

1.2 主要试剂

RPMI 1640 干粉和 Trizol 试剂购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司, L-谷氨酰胺、二甲基亚砷(DMSO)和四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Sigma 公司。重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombination human granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor, rhGM-CSF)、重组白细胞介素 4(recombination human interleukin-4, rhIL-4)、重组人白细胞介素-2(recombination human interleukin-2, rhIL-2)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)购自 Peprotech 公司。藻红蛋白(phycoery-

thrin, PE)标记的小鼠抗人 CD83、抗 HLA-DR 抗体及异硫氰酸(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的小鼠抗人 CD86、抗 CD80 单克隆抗体购自 Pharmingen 公司, Ficoll 淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂,鼠抗人 NY-ESO-1 单克隆抗体(克隆号为 E978)购自美国 Zymed 公司,免疫组化试剂盒购自福州迈新公司。

1.3 NY-ESO-1 蛋白的分离和纯化

重组质粒 pGEX-ESO1 转化大肠杆菌 BL21, 经异丙基硫化- β -D-半乳糖苷(isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG)诱导表达。取 1 000 ml 菌液, 然后 10 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}C$ 离心 5 min, 菌体用 50ml 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)重悬, 冰浴, 超声裂解细菌, 冰浴放置 30 min, 12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}C$ 离心 20 min, 取上清液, 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polysacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)鉴定目的蛋白的表达情况。用 5 ml 谷胱甘肽硫转移酶(glutathin- S-transferase, GST)层析柱分离纯化融合蛋白, 凝胶薄层扫描分析蛋白纯度, Bradford 方法定量, -70 $^{\circ}C$ 保存。

1.4 肝癌细胞株培养和 NY-ESO-1 蛋白检测

用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液常规培养肝癌细胞株 HepG2、9706、H2P 和 H4M, 待长满瓶底后胰酶消化传代。将已灭菌处理的玻片放在消毒的培养皿中, 用 DAKO 笔划一直径约 15 mm 的圆圈, 将细胞悬液(细胞密度为 1×10^5 个/ml)滴入圈中, 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养箱过夜, 取出玻片, PBS 洗涤后冷丙酮固定 10 min, Elivision 二步法免疫组化检测 NY-ESO-1 蛋白表达。

1.5 DCs 的体外培养及抗原致敏

采用 Ficoll 常规分离正常献血员外周血, 获得单个核细胞, 调整其细胞密度为 1×10^7 个/ml, 加 2 ml 于 6 孔板中, 在 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 2 h 后, 吸去悬浮细胞, 加入 DCs 培养基(含 rhGM-CSF 100 ng/ml、rhIL-4 50 ng/ml 的 RPMI 1640), 置于 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 每 3 d 半量换液 1 次。通过倒置显微镜观察 DCs 树突状外形, 同时采用流式细胞仪检测 DCs 表面 HLA-DR、CD80、CD83、CD86 的表达。收集第 6 天的 DCs, 调整细胞密度为 1×10^6 个/ml, 接种于 24 孔板中, 分别加入 GST-ESO1 蛋白(50 $\mu g/ml$)100 μl , GST 蛋白(50 $\mu g/ml$)

100 μ l 和 PBS 100 μ l, 培养 24 h, 然后加入 TNF- α (50 U/ml), 继续培养 48 h。

1.6 T 淋巴细胞的制备及 CTL 的体外诱导

取同一个体外周血, Ficoll 常规分离单个核细胞, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h 后, 吸出悬浮细胞, 用培养液调整其细胞密度为 1×10^7 个/ml, 分以下几组按照淋巴细胞与 DCs 细胞数量比为 10 : 1 的比例混合培养: A 组为淋巴细胞 + NY-ESO-1 冲击后 DCs (50 μ g/ml 融合蛋白 100 μ l 冲击的 DCs), B 组为淋巴细胞 + GST 冲击后 DCs (50 μ g/ml GST 蛋白 100 μ l 冲击的 DCs), C 组为淋巴细胞 + 未冲击 DCs (未冲击的正常 DCs), 单独淋巴细胞为空白对照组 (无 DCs), 分别记为 NY-DC-CTL, GST-DC-CTL, Untreated-DC-CTL, No-DC-CTL。每 3 d 半量换液, 补充 PHA 和 rhIL-2 (促进 DCs 的成熟, 增强 DCs 的抗原提呈能力), 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 7 d。MTT 法测定波长 570 nm 的光密度 (D) 值, 按下列公式计算刺激指数 (stimulating index, SI): $SI = D$ 实验组 / D 空白对照组。然后调整淋巴细胞与 DCs 数量比分别至 20 : 1、50 : 1、100 : 1, 同样按照上述 A 至 D 的分组重复以上实验步骤, 以比较不同比率下淋巴细胞的增殖能力。每组计数 3 次, 取平均值。以未与 DCs 混合培养的淋巴细胞作为空白对照。

1.7 CTL 杀伤效应的检测

以培养第 7 天的 CTL 为效应细胞, 以 HepG2 肝癌细胞为靶细胞, 按效靶比 (CTL 与 HepG2 细胞数量比) 为 10 : 1, 在以下各组中同时加入 CTL 和靶细胞进行杀伤实验, 其中靶细胞为 5×10^4 个/孔, 每组 3 个复孔, 另设 PBS 为空白对照。将效应细胞 NY-DC-CTL, GST-DC-CTL, Untreated-DC-CTL, No-DC-CTL 分别作用于靶细胞, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 24 h; 另设 CTL 对照组与靶细胞对照组。以肝癌细胞 H2P 为靶细胞, 重复上述实验分组。接着调整效靶比分别为 20 : 1、50 : 1、100 : 1, 同样按照上述分组重复以上实验步骤, 比较不同效靶比情况下 CTL 的杀伤效应。

在结束培养前 4 h 吸弃上清, 加入新鲜配置的 MTT (5 mg/ml) 20 μ l/孔, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h, 弃上清, 加入 DMSO 150 μ l/孔, 室温下振荡, 酶标检测仪检测各孔 570 nm 波长处 D 值, 计算杀伤率: 杀伤率 (%) = [单独靶细胞对照组 D 值 - (不同效靶比实验组 D 值 - 单独效应细胞对照组 D 值)] / 单独靶细胞对照组 D 值 \times 100%。

1.8 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用统计软件 SPSS11.0 进行方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 NY-ESO-1 蛋白肽的表达和纯化

重组质粒 pGEX-ESO1 转化大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导 4 h, 裂解后进行 SDS-PAGE 分析, 含 pGEX-ESO1 质粒的大肠杆菌 BL21 表达相对分子质量约 36 000 的蛋白, 含空载体的细菌表达相对分子质量为 26 000 的 GST 蛋白。超声裂解细菌后取可溶性部分用 GST 层析柱分离纯化, 得到了相对分子质量约为 36 000 的目的蛋白 (图 1)。经 SDS-PAGE 及凝胶薄层扫描鉴定后, Bradford 方法测得目的蛋白的质量浓度为 50 μ g/ml。

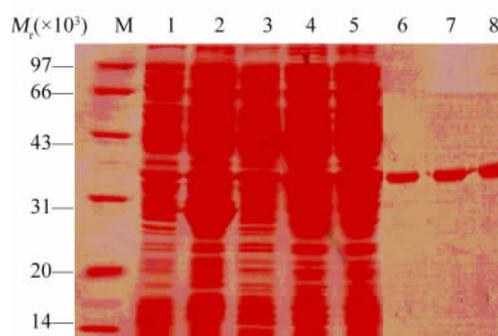


图 1 GST-ESO1 蛋白的表达与纯化

Fig. 1 Expression and purification of GST-ESO1

M: Marker; 1: pGEX4T-1 transformation, without IPTG induction; 2: pGEX4T-1 transformation, with IPTG induction; 3: pGEX-ESO1 transformation, without IPTG induction; 4, 5: pGEX-ESO1 transformation, with IPTG induction; 6-8: Purified GST-ESO1

2.2 肝癌细胞株 NY-ESO-1 蛋白的表达

采用免疫组化 Elivision 二步法检测肝癌细胞株 HepG2、9706、H2P、H4M 的 NY-ESO-1 蛋白, 可见 HepG2、9706、H4M 细胞质中有棕黄色的阳性颗粒, 而 H2P 细胞为阴性 (图 2A, 2B; 9706、H4M 结果未显示)。因此, 选择 NY-ESO-1 蛋白阳性的 HepG2 肝癌细胞为 CTL 攻击的靶细胞, 而 NY-ESO-1 阴性的 H2P 为阴性对照组细胞。

2.3 DCs 的鉴定

Ficoll 法常规分离正常献血员外周血, 获得单个核细胞, 细胞因子 rhGM-CSF 和 rhIL-4 联合诱导培养树突状细胞。在培养第 2 天, 大部分细胞贴壁生长, 细胞形态出现不规则改变, 少量细胞悬浮, 周边可见少量突起; 继续培养第 3~4 天, 悬浮细胞逐

渐增多,并聚集成大小不一的细胞团,细胞毛刺样突起增多;至第 6~7 天,细胞分散悬浮,体积变大,形态不规则,从胞体周围伸出多个长短不一的树突状突起,呈现 DCs 的典型形态(图 3)。加入 GST-ESO1 蛋白及 TNF- α 培养 48 h 后,收集 DCs 行流式细胞仪检测。结果显示,HLA-DR 为 91.4%,CD86 为 70.5%,CD83 为 71.2%,CD80 为 55.3% (图 4)。

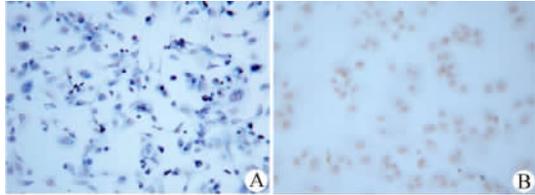


图 2 肝癌细胞株 NY-ESO-1 的表达

Fig. 2 Expression of NY-ESO-1 in HCC cell lines($\times 100$)

A: HepG2 cells; B: HP2 cells

2.4 NY-ESO-1 致敏的 DCs 诱导 CTL 产生

将同源淋巴细胞与负载抗原的 DCs 混合培养 7 d 后,结果显示:负载抗原的 DCs 和未负载抗原的 DCs 均能诱导 CTL 的产生,有大的细胞克隆形成。经 MTT 法检测,负载抗原的 DCs 诱导 CTL 产生的能力较后者增强。从组间比较结果来看,以 GST-ESO1 融合蛋白致敏的 DCs 对淋巴细胞的刺激增殖能力最强。淋巴细胞与 DCs 的数量比为 50 : 1 时,该 DCs 诱导 CTL 的效果最为显著 ($P < 0.05$)。未负载抗原的 DCs 和仅负载 GST 的 DCs 尽管可以刺激淋巴细胞增殖,诱导 CTL,但两组间未见明显差异 ($P > 0.05$,表 1)。

2.5 NY-ESO-1 致敏 DCs 诱导的 CTL 对肝癌细胞株的杀伤作用

经负载 GST-ESO1 融合蛋白的 DCs 诱导的 CTL (NY-DC-CTL)对 GST-ESO1 阳性的肝癌细胞 HepG2 的杀伤率显著性高于 GST-DC-CTL、Untreated-DC-CTL 和 No-DC-CTL 组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),而经

负载 GST 蛋白的 DCs 刺激的 CTL (GST-DC-CTL 组)与未负载抗原的 DCs 刺激的 CTL (Untreated-DC-CTL 组)相比较,两者对于 HepG2 的杀伤作用无显著性差异 ($P > 0.05$),但杀伤作用均高于未经 DCs 刺激组(No-DC-CTL 组;图 5,表 2)。

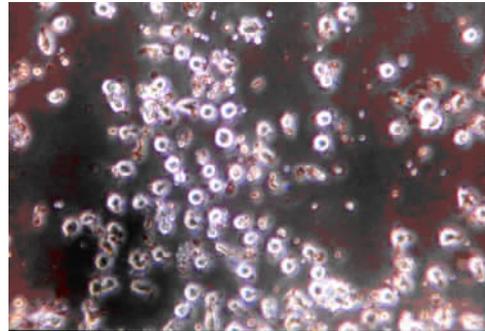


图 3 树突状细胞培养第 7 天的形态($\times 200$)

Fig. 3 Morphology of DCs after cultured with GM-CSF and IL-4 for 7 d

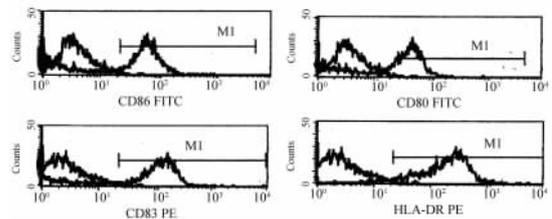


图 4 流式细胞仪检测树突状细胞表面分子的表达

Fig. 4 Phenotypes of DCs detected by flow cytometry

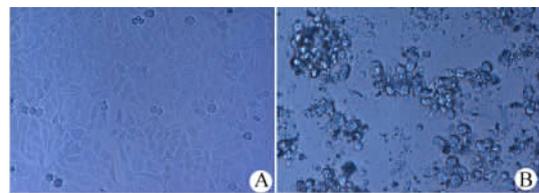


图 5 CTL 对 HepG2 细胞的特异性杀伤作用($\times 200$)

Fig.5 CTL killed HepG2 cells in a antigen specific manner($\times 200$)

A: HepG2 cells; B: HP2 cells

表 1 DCs 诱导淋巴细胞增殖的刺激指数

Tab. 1 Stimulation index(SI) of DCs in stimulating lymphocyte proliferation

Group	DC : Lymphocyte			
	1 : 10	1 : 20	1 : 50	1 : 100
NY-DC-CTL	3.15 \pm 0.27	4.10 \pm 0.28 *	4.41 \pm 0.35 *	3.88 \pm 0.23
GST-DC-CTL	2.36 \pm 0.21	2.86 \pm 0.18	2.88 \pm 0.23	2.58 \pm 0.26
Untreated-DC-CTL	2.14 \pm 0.24	2.45 \pm 0.20	2.66 \pm 0.31	2.57 \pm 0.25

* $P < 0.05$ vs others group

从效靶比来看,前三组随着效靶比增加,CTL对HepG2的杀伤作用逐渐增强,于效靶比50:1时达到最高峰($P < 0.01$)(表2)。以NY-ESO-1阴性表达的肝癌细胞株H2P为靶细胞的实验组,NY-ESO-1

冲击后DCs诱导的CTL对其无明显杀伤作用,在效靶比为10:1、20:1、50:1和100:1时,杀伤率分别为 14.24 ± 3.07 、 15.89 ± 3.19 、 22.56 ± 4.14 以及 22.16 ± 4.78 ,组间无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 CTL对靶细胞HepG2的杀伤活性(%)
Tab. 2 Anti-tumor activity of CTL on HepG2 cells(%)

Group	E:T			
	10:1	20:1	50:1	100:1
NY-DC-CTL	$28.45 \pm 2.34^*$	$32.53 \pm 3.21^*$	$53.23 \pm 3.78^{**}$	$45.13 \pm 5.89^*$
GST-DC-CTL	18.39 ± 3.55	20.86 ± 4.19	$25.76 \pm 4.84^\Delta$	24.82 ± 4.91
Untreated-DC-CTL	13.85 ± 3.71	17.55 ± 4.96	$23.61 \pm 4.40^\Delta$	23.02 ± 4.21
No-DC-CTL	10.43 ± 3.61	11.54 ± 4.02	10.67 ± 5.35	12.21 ± 4.43

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs No-DC-CTL group; $^\Delta P < 0.05$ vs NY-DC-CTL group

3 讨论

近年来,随着免疫学、分子生物学的发展,以肿瘤免疫治疗为代表的生物治疗已成为肿瘤治疗的热点,尤其可能在控制肿瘤复发转移的过程中发挥重要作用,可作为肿瘤常规治疗后重要的辅助治疗手段之一。国内外学者在肝细胞癌生物治疗方面也进行了多方面的尝试,如甲胎蛋白、DCs疫苗等治疗肝细胞癌取得了一定的进展^[9-10]。

CT抗原是20世纪90年代发现的肿瘤特异性抗原,具有免疫原性、肿瘤分布的广泛性和表达的特殊性等特点,是肿瘤免疫治疗的理想靶标,已发现MAGE、NY-ESO-1、BAGE等44个家族,91个转录产物。NY-ESO-1是1997年Chen^[11]在食道癌中首次鉴定并命名的,该基因定位于人染色体Xq28上,其转录单位大小约0.8 kb,编码180个氨基酸,相对分子质量约18 000。NY-ESO-1是CT抗原中免疫原性最强的蛋白之一,包括20多种针对T淋巴细胞和B淋巴细胞的抗原表位,并不断有新的表位发现^[12-14]。NY-ESO-1制成的多肽疫苗已用于多种肿瘤的研究和黑色素瘤的临床试验^[15-17]。其在肝癌组织中有较高的表达率,使得NY-ESO-1成为肝癌免疫治疗的候选靶标。本课题自行构建重组质粒pGEX-ESO1,含NY-ESO-1 3'末端276 bp片段,该段基因表达的蛋白肽不仅含有HLA-I、HLA-II识别的表位,还有同时识别两者的表位,可以刺激CTL与CD4⁺T淋巴细胞,有助于提高肿瘤免疫治疗的

效果。因此,以该蛋白肽作为抗原致敏DCs,一方面保存了NY-ESO-1蛋白的免疫原性,另一方面克服了多肽疫苗HLA表型的限制,因此免疫效果更好,使用范围更加广泛。

DCs是功能最强的抗原提呈细胞,能激活静息T细胞,其激发T细胞增殖的能力是巨噬细胞和B细胞的100倍^[18]。成熟DCs高表达MHC-I、MHC-II、共刺激分子和黏附分子,还能分泌IL-12等细胞因子,因此负载肿瘤抗原的DCs进入体内后不仅保证肿瘤抗原被有效摄取和提呈,而且可提供活化T细胞所必须的共刺激信号,使T细胞被充分激活和有效增殖。近年来利用DCs提呈肿瘤抗原诱导特异性抗肿瘤免疫取得快速进展。实验^[19]证实,用肿瘤抗原冲击致敏DCs,可以在体内外诱导CTL的生成,激发机体产生特异性抗肿瘤免疫功能。NY-ESO-1抗原在肝细胞癌组织中的表达率较高^[20],因此,应用NY-ESO-1抗原致敏DCs诱导针对肝细胞癌的特异性杀伤作用有较高临床应用价值。

本研究采用原核表达的GST-ESO1融合蛋白肽作为抗原致敏DCs,诱导T淋巴细胞产生针对肝细胞癌的特异性杀伤作用,结果提示经融合蛋白肽刺激的DCs能有效刺激T淋巴细胞的增殖,诱导CTL的产生;CTL对表达NY-ESO-1的肝癌细胞株HepG2产生了明显的特异杀伤作用,并随效靶比的增高而增强。为了排除GST蛋白在其中所起的作用,另设立GST致敏DCs诱导组作为对照之一,发现GST-ESO1融合蛋白致敏DCs诱导的CTL对肝癌

细胞的杀伤率显著性高于未经 DCs 诱导组 ($P < 0.01$)、未经抗原致敏 DCs 诱导组和 GST 致敏 DCs 诱导组 (均 $P < 0.05$)。另外,为了证实 NY-ESO-1 的特异性杀伤作用,实验采用不表达 NY-ESO-1 抗原的 H2P 细胞株作为对照,在相同的条件下发现 CTL 对 H2P 细胞无明显杀伤作用。上述结果表明 GST-ESO1 抗原冲击后 DCs 诱导产生的 CTL 的杀伤功能是 NY-ESO-1 抗原特异性的, GST 部分对于上述杀伤功能的发挥无直接作用。

本实验通过原核表达获得 NY-ESO-1 蛋白,致敏 DCs,成功诱导出 CTL,该 CTL 具有特异性的抗肿瘤效应,为肝细胞癌的免疫治疗提供了实验依据,对其他肿瘤的治疗也有一定的借鉴作用,为临床肿瘤的免疫治疗提供一条可行性方案。

[参 考 文 献]

- [1] Odunsi K, Jungbluth AA, Stockert E, *et al.* NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (18): 6076-6083.
- [2] Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, *et al.* Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(7):1551-1555.
- [3] Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, *et al.* Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes [J]. *J Exp Med*, 1998, 187(2): 265-270.
- [4] 陈红松,覃柳亮,陈慰峰,等. 肿瘤特异性肿瘤/睾丸抗原在肝癌组织中的表达[J]. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(3): 145-148.
- [5] Luo G, Huang S, Xie X, *et al.* Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas[J]. *Cancer Immun*, 2002, 2(1):11-20.
- [6] Korangy F, Ormandy LA, Bleck JS, *et al.* Spontaneous tumor-specific humoral and cellular immune responses to NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(13): 4332-4341.
- [7] 张文敏,肖刚,张萌,等. 人 NY-ESO-1 基因的原核表达、纯化和初步应用[J]. *中国肿瘤临床*, 2005, 32(11): 626-629.
- [8] 张萌,文剑明,胥建敏,等. 从门静脉癌栓建立肝癌细胞株及其细胞遗传特征的研究[J]. *癌症*, 2002, 21(11): 1203-1207.
- [9] Butterfield LH, Ribas A, Potter DM, *et al.* Spontaneous and vaccine induced AFP-specific T cell phenotypes in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(12): 1931-1943.
- [10] Chiriva-Internati M, Grizzi F, Wachtel MS, *et al.* Biological treatment for liver tumor and new potential biomarkers[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(3): 836-843.
- [11] Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, *et al.* A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(5): 1914-1918.
- [12] Derré L, Bruyninx M, Baumgaertner P, *et al.* Distinct sets of alpha TCRs confer similar recognition of tumor antigen NY-ESO-1157-165 by interacting with its central Met/Trp residues[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105(39):15010-15015.
- [13] Matsuzaki J, Qian F, Luescher I, *et al.* Recognition of naturally processed and ovarian cancer reactive CD8⁺ T cell epitopes within a promiscuous HLA class II T-helper region of NY-ESO-1[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(8): 1185-1195.
- [14] Sharma P, Gnjatic S, Jungbluth AA, *et al.* Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T cell epitope in a patient with bladder cancer[J]. *Cancer Immun*, 2003, 3(1): 19-31.
- [15] Chen Q, Jackson H, Parente P, *et al.* Immunodominant CD4⁺ responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(25): 9363-9368.
- [16] Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, *et al.* Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(31): 12837-12842.
- [17] Adams S, O'Neill DW, Nonaka D, *et al.* Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant [J]. *J Immunol*, 2008, 181(1):776-784.
- [18] Levin D, Constant S, Pasqualini T, *et al.* Role of dendritic cells in the priming of CD4⁺ T lymphocytes to peptide antigen *in vivo*[J]. *J Immunol*, 1993, 151(12): 6742-6750.
- [19] Schott M, Feldkamp J, Lettmann M, *et al.* Dendritic cell immunotherapy in a neuro-endocrine pancreas carcinoma [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2001, 55 (2): 271-278.
- [20] 邢宝才,袁艳华,胡志国,等. NY-ESO-1/LAGE-1 基因在肝癌组织中的表达及其诱导的体液免疫应答[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(23): 1980-1982.

[收稿日期] 2008 - 12 - 09

[修回日期] 2008 - 12 - 30

[本文编辑] 徐红梅