

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2009·01·012

· 基础研究 ·

## IL-18 基因增强肿瘤抗原致敏 DC 诱导的 CTL 特异性杀伤肝癌细胞

杨静悦<sup>1</sup>, 曹大勇<sup>2</sup>, 刘文超<sup>1\*</sup>, 斯小明<sup>1</sup>(1. 第四军医大学西京医院肿瘤中心, 细胞生物学国家重点学科; 2. 第四军医大学西京医院肝胆外科, 西安 710032)

[摘要] 目的: 探讨腺病毒介导的白细胞介素-18(IL-18)基因转染能否使肿瘤抗原冲击的树突状细胞(dendritic cell, DC)在体外诱导出更强的抗肿瘤免疫反应。方法: 携 IL-18 的重组腺病毒载体感染经肝癌细胞株 HepG2 冻融抗原致敏的 DC(AdIL-18-HepG2/DC), FACS 分析 AdIL-18-HepG2/DC 表面分子的表达, ELISA 法检测 IL-18 的分泌水平, <sup>3</sup>H-TdR 掺入法检测 T 淋巴细胞增殖能力, MTT 法检测细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤效应。结果: AdIL-18-HepG2/DC 较未转染 DC 能高水平地表达 CD1a、CD11c、CD80、CD86 以及 HLA-DR; 较未经 IL-18 转染的 DC 分泌较高水平的 IL-18。AdIL-18-HepG2/DC 能非常有效地刺激自体 T 细胞增殖(CPM 值为 228 018 ± 1 079), 其刺激强度显著强于 AdIL-18DC、HepG2/DC、AdlzcZ/DC 及 DC(均  $P < 0.05$ )。当靶细胞为 HepG2 时, AdIL-18-HepG2/DC 诱导的 CTL 杀伤活性显著高于其他各组(均  $P < 0.05$ ), 并且其杀伤能力与效应细胞数量成正比。结论: IL-18 基因转染且肝癌抗原致敏的 DC 可以显著增强 DC 的特异性抗肿瘤效应。

[关键词] 树突状细胞; 肝癌; 白细胞介素-18; 肿瘤抗原

[中图分类号] R735.7; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)01-055-04

## Interleukin-18 enhances specific antitumor activity of CTL induced by tumor-antigen pulsed dendritic cells

YANG Jing-yue<sup>1</sup>, CAO Da-yong<sup>2</sup>, LIU Wen-chao<sup>1\*</sup>, SI Xiao-ming<sup>1</sup>(1. Department of Oncology, State Key Subject of Cell Biology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Xijing Hospital, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective:** To study whether interleukin(IL)-18 can promote tumor antigen-pulsed dendritic cells(DCs) to induce specific CTL against hepatocellular carcinoma(HCC) *in vitro*. **Methods:** The recombinant adenovirus expression plasmid AdIL-18 was transfected into DCs pulsed by HepG2 lysates(AdIL-18-HepG2/DC). The surface molecules of AdIL-18-HepG2/DCs were analyzed by flow cytometry. IL-18 levels in culture supernatant of AdIL-18-HepG2/DCs were measured by ELISA. The ability of AdIL-18-HepG2/DC to induce proliferation of autologous T lymphocytes was evaluated by <sup>3</sup>H-TdR assay. The *in vitro* CTL antitumor activity induced by AdIL-18-HepG2/DC on HepG2 cell was detected by MTT. **Results:** IL-18 promoted expression of CD1a, CD11c, CD80, CD86 and HLA-DR on HepG2/DCs compared with untransfected DCs. AdIL-18-HepG2/DCs secreted more IL-18 *in vitro* compared with untransfected DCs. AdIL-18-HepG2/DC effectively stimulated proliferation of autologous T cells(CPM being 228 018 ± 1 079); the stimulating effect was significantly higher than those of AdIL-18DC, HepG2/DC, AdlzcZ/DC, and DC(all  $P < 0.05$ ). CTL induced by TAA pulsed/IL-18 modified DC had significantly higher cytotoxicity against HepG2 cells compared with that induced by other DCs. **Conclusion:** AdIL-18-HepG2/DCs have enhanced ability to induce specific CTL in killing hepatocellular carcinoma HepG2 cell line.

[Key words] dendritic cell; hepatocellular neoplasms; interleukin-18; tumor antigen

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(1): 55-58]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672391); 全军医药卫生科研资助项目基金(No. 06MA205); 陕西省自然科学基金资助项目(No. 2004C222)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30672391); the Medical and Health Foundation of the PLA(No. 06MA205); the Natural Science Foundation of the Shaanxi Province(No. 2004C222)

[作者简介] 杨静悦(1978-), 女, 陕西省西安市人, 博士, 主治医师, 从事肿瘤免疫治疗研究。E-mail: yangjy@fmmu.edu.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: xjcancer@fmmu.edu.cn

树突状细胞(dendritic cell, DC)在初始免疫应答中起到了非常重要的作用,其摄取抗原后,加工提呈至细胞内主要组织相容性复合体 II 类分子,形成肽-主要组织相容性复合体分子复合物,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<sup>[1-4]</sup>。利用转基因技术将细胞因子、共刺激分子和趋化因子等基因导入 DC,可增强肿瘤细胞的免疫原性,提高宿主对肿瘤抗原的识别能力以及增强 DC 对肿瘤抗原的提呈功能等,从而诱导更强的抗肿瘤免疫效应。研究已证实经细胞因子修饰的 DC,诱导特异性 CTL 的能力增强<sup>[5-7]</sup>。IL-18 是一种 Th1 型细胞因子,可诱导 Th1 型细胞因子产生、激活 NK 细胞、刺激 T 细胞增殖和增强 CTL 的杀伤活性,对于改善肿瘤患者的 Th1 型免疫应答功能低下的状况可能会起到很好的效果。本研究采用抗原冲击 DC 并联合 IL-18 基因转染的方法,观察其对肝癌细胞的杀伤活性,为临床抗肝癌免疫治疗提供实验依据。

## 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- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )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 HLA-DR、CD80 McAb,藻红蛋白 (PE) 标记的鼠抗人 CD86、CD1a、CD11c McAb 购自 BD PharMingen 公司。胎牛血清、RPMI 1640 购自 GIBCO 公司,DMSO 购自 Sigma 公司。人肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721 系本室常规传代培养。

### 1.2 肝癌细胞冻融抗原的制备

收集处于对数生长期的 HepG2 细胞,用 RPMI 1640 培养基配成  $1 \times 10^7$ /ml 的细胞悬液,  $-80^\circ\text{C}$  反复冻融 4 次,  $4 \times 200 \times g$  离心 30 min,收集上清,  $0.22 \mu\text{m}$  微孔膜过滤后作为肿瘤冻融抗原备用。

### 1.3 树突状细胞的培养

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,  $5\% \text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  孵育 2 h 后,吸去非贴壁细胞,贴壁细胞以含  $10\% \text{FCS}$  的 RPMI 1640 培养 6 d,并且每隔 2~3 d 补充 GM-CSF ( $100 \text{ ng/ml}$ ) 和 IL-4 ( $1000 \text{ U/ml}$ )。

### 1.4 肿瘤抗原多肽体外冲击 IL-18 基因转染的树突状细胞

将 IL-18 重组腺病毒表达载体 AdIL-18 (滴度为  $3.15 \times 10^9$  PFU/ml)、对照腺病毒表达载体 AdV-

LacZ (含对照基因 LacZ,滴度为  $2.90 \times 10^9$  PFU/ml) 纯化并稀释为  $1 \times 10^8$  PFU/ml 备用;感染时,取培养第 6 天的 DC,加入肿瘤冻融抗原(抗原与 DC 之比为  $5:1$ ,抗原量以冻融前 HepG2 细胞的数量计),同时加入 100 MOI 重组腺病毒 AdIL-18 或 AdLacZ,置  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  孵箱中,培养 120 min 后洗去上清,加入完全培养基继续培养。于感染后第 24、48 h 分别收集培养上清,ELISA 法检测上清中 IL-18 的分泌水平;X-gal 染色方法测定腺病毒介导基因转染 DC 的转染效率。

### 1.5 流式细胞术检测树突状细胞的表型

收集 DC 细胞,调整细胞密度  $5 \times 10^9$ /L,各取  $50 \mu\text{l}$ ,加入  $1:20$  灭活正常兔血清  $10 \mu\text{l}$ ,  $4^\circ\text{C}$  封闭 10 min,分别加入单克隆抗体 CD1a-PE、CD11c-PE、HLA-DR-FITC、CD86-PE、CD80-FITC,  $4^\circ\text{C}$  避光 30 min 后,PBS 洗 2 次,流式细胞术检测 DC 表型分子。

### 1.6 DC 刺激 T 细胞增殖能力的检测

收集各组 DC:(1)培养至第 7 天的正常 DC (DC);(2)AdIL-18 基因感染 DC (AdIL-18/DC);(3)肿瘤抗原多肽冲击的 AdIL-18 基因感染 DC (AdIL-18-HepG2/DC);(4)肿瘤抗原多肽冲击的 DC (HepG2/DC);(5)AdLacZ 基因感染的 DC (AdLacZ/DC);经  $^{60}\text{Co}$  ( $30 \text{ Gy}$ ) 照射灭活,分别以  $2 \times 10^3$ /孔接种于 96 孔培养板作为刺激细胞。于多孔板中加入 T 淋巴细胞 ( $1 \times 10^5$ ) 作为反应细胞,终体积为  $200 \mu\text{l}$ ;结束培养前 16 h 加入  $^3\text{H-TdR}$  ( $1.85 \times 10^4 \text{ Bq/孔}$ ),常规收集细胞,置 WALLAC1409 液闪仪上检测,计放射性核素每分钟闪烁计数 (CPM) 值,结果用 3 复孔均值表示。

### 1.7 ELISA 检测 DC 上清中 IL-18 含量

收集各组 DC 培养上清,ELISA 法检测各组上清中 IL-18 含量。每组设 6 复孔。

### 1.8 MTT 法检测细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤效应

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。将淋巴细胞与刺激细胞按  $20:1$  比例接种于 24 孔板作为效应细胞。收集 HepG2、SMMC-7721 细胞作为靶细胞,将效应细胞与靶细胞按  $10:1$ 、 $20:1$  和  $40:1$  混合接种于 96 孔板,终体积为  $200 \mu\text{l}$ 。  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培养 24 h 后,加入 MTT (终质量浓度  $0.5 \text{ mg/L}$ ),再培养 4 h,补入  $150 \text{ ml}$  DMSO,用酶联免疫检测仪在  $490 \text{ nm}$  处检测  $D_{490}$  值。计算杀伤效率:CTL 杀伤效率 (%) =  $[1 - (\text{效靶 } D_{490} - \text{效应细胞 } D_{490}) / \text{靶细胞 } D_{490}] \times 100\%$

### 1.9 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件处理,组间差异采用  $t$

检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DC 体外培养及其表型

经 rhGM-CSF 与 rhIL-4 体外共培养 6 d, 加入冻融抗原和 100 MOI 重组腺病毒 AdIL-18 后, 流式细胞术检测结果显示, 经 IL-18 基因转染、抗原冲击的 DC 其细胞表型分子与空白组 DC 对比明显上调: CD1a 为  $(71.6 \pm 6.1)\%$ , CD11c 为  $(86.8 \pm 4.2)\%$ , CD80 为  $(86.1 \pm 4.1)\%$ , CD86 为  $(85.4 \pm 5.8)\%$ , HLA-DR 为  $(88.9 \pm 5.4)\%$  (图 1,  $P < 0.01$ )。

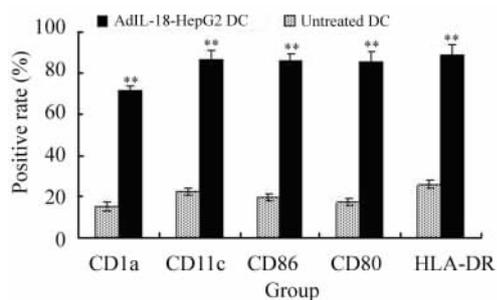


图 1 转染 IL-18 基因可增强 HepG2/DC 表面分子的表达

Fig. 1 IL-18 gene-transfected-TAA pulsed DCs enhanced surface molecule expression of HepG2/DCs

\*\*  $P < 0.01$  vs untreated DC

### 2.2 IL-18 基因转染 DC 效率及分泌 IL-18 的水平

培养 6 d 后获得外周血单个核细胞来源的 DC, 加入肿瘤冻融抗原后, 经 MOI 值 100 AdLacZ 基因修饰, X-gal 染色鉴定显示 LacZ 转染率大于 90%。转染后 24、48 h AdIL-18-HepG2/DC 上清中 IL-18 的分泌量分别为  $(7.35 \pm 0.12)$  mg/L 和  $(8.78 \pm 0.18)$  mg/L。其他 HepG2/DC、AdLacZ/DC 及空白 DC 组均无 IL-18 分泌。

### 2.3 AdIL-18-HepG2/DC 对 T 淋巴细胞的刺激作用

结果表明, HepG2/DC 组能刺激自体 T 淋巴细胞增殖, 与空白 DC 组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ); 经 IL-18 基因修饰的 DC, 即使没有抗原冲击 (AdIL-18/DC), 也能使自体 T 细胞增殖 (CPM 值为  $10\ 100 \pm 950$ ), 但显著低于 HepG2/DC 组 ( $P < 0.05$ ); AdIL-18-HepG2/DC 能显著刺激自体 T 细胞增殖 (CPM 值为  $228\ 018 \pm 1\ 079$ ), 与其他各组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2)。

### 2.4 IL-18 基因转染/抗原冲击 DC 诱导的 CTL 杀伤活性

CTL 活性检测结果显示, 在不同效靶比条件下, AdIL-18-HepG2/DC 组均能显示对 HepG2 产生高效

杀伤活性, 其杀伤能力与效应细胞数量成正比, 显著高于 AdLacZ/DC 和 DC 组 ( $P < 0.05$ ); 在同一效靶比 (40:1) 时, AdIL-18-HepG2/DC 对 HepG2 细胞有明显的杀伤活性 ( $75.6 \pm 3.8\%$ ), 显著高于未转染 DC 组 [ $(23.4 \pm 2.7)\%$ ,  $P < 0.05$ , 图 3], 且 AdIL-18-HepG2/DC 组诱导的 CTL 对 HepG2 细胞杀伤率高于另一肝癌细胞 SMMC7721, 显示其杀伤活性具有抗原特异性 (图 4)。

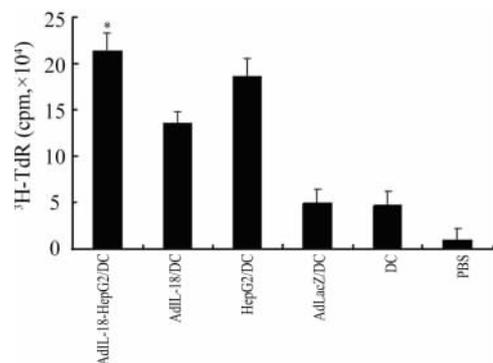


图 2 IL-18 基因转染/肿瘤抗原冲击的 DCs 促进 T 淋巴细胞的增殖

Fig. 2 IL-18 gene-transfected HepG2/DC increased proliferation of autologous T lymphocytes

\*  $P < 0.05$  vs HepG2/DC, AdIL-18/DC, AdLacZ/DC, DC or PBS, respectively

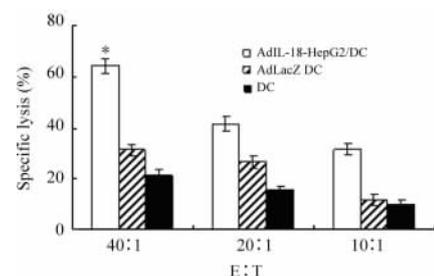


图 3 IL-18 增强不同效靶比时 CTL 对 HepG2 的特异杀伤作用

Fig. 3 IL-18 increased cytotoxicity of CTL to HepG2 cell at different effector:target ratios

\*  $P < 0.05$  vs AdLacZ/DC or DC

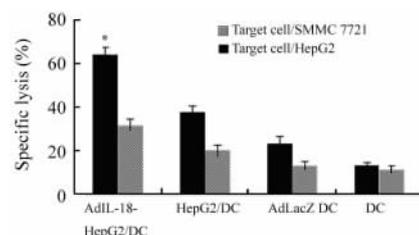


图 4 CTL 对不同肿瘤细胞株的杀伤活性

Fig. 4 Cytotoxicity of CTL against different tumor cell lines

\*  $P < 0.05$  vs SMMC7721 cell

### 3 讨论

DC 是机体内最有效、功能最强的抗原提呈细胞,在激发免疫反应中起核心作用。体内 DC 能及时地捕捉和加工处理抗原,并表达 MHC-肽复合物,上调许多细胞表面共刺激分子,激活 T 细胞介导免疫应答。大量研究表明,DC 在诱导高效特异细胞免疫反应,特别是特异性 CTL 介导的细胞免疫及抗肿瘤免疫中发挥关键作用<sup>[8-9]</sup>。但有资料显示<sup>[10-12]</sup>,在其诱导的抗肝癌中 CTL 活性较低,并对已形成的肿瘤治疗效果欠佳。进一步加强抗肝癌免疫效应,提高肝癌肿瘤抗原基因转染 DC 瘤苗的疗效对肝癌的治疗具有重要意义。IL-18 是一种 Th1 型细胞因子,可诱导 Th1 型因子产生、激活 NK 细胞、刺激 T 细胞增殖、增强 CTL 的杀伤活性,对于改善肿瘤患者 Th1 型的免疫应答功能低下可能会起到很好的作用。本课题将腺病毒载体介导的 IL-18 转染抗原冲击致敏 DC,研究 IL-18 基因修饰的树突状细胞瘤苗能否增强对原发性肝癌的免疫治疗作用及相关机制<sup>[13-14]</sup>。

本实验中经 IL-18 基因修饰、抗原冲击致敏的 DC 表面的共刺激分子及 HLA-DR 都明显升高,能分泌较高水平的 IL-18,同时能显著刺激 T 细胞增殖,且 AdIL-18-HepG2/DC 刺激 T 细胞增殖的能力最强,表明经肿瘤抗原冲击联合 IL-18 基因修饰的 DC 可以显著地促进自体 T 细胞增殖。CTL 杀伤实验结果显示,在不同效靶比的条件下,AdIL-18-HepG2/DC 组能诱导出对 HepG2 高效特异性的杀伤效应,其杀伤能力与效应细胞数量成正比,显著高于 AdLacZ/DC 和 DC 组;在同一效靶比时,AdIL-18-HepG2/DC 对 HepG2 细胞的杀伤率显著高于未转染 DC 组。AdIL-18-DC 组能诱导抗原特异性的 CTL 杀伤率,显著高于另一靶细胞 SMMC7721。

基于上述结果,本研究证明了 HepG2 冻融抗原冲击的 DC 可诱导自体淋巴细胞产生 HepG2 抗原特异性 CTL,对 HepG2 发挥高效特异的杀伤作用,IL-18 基因修饰能进一步显著增强肿瘤抗原冲击 DC 的体外抗肿瘤免疫效应。

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening[ J ]. *Semin Liver Dis*, 2005, 25(2):143-154.  
[ 2 ] Tanaka F, Hashimoto W, Robbins PD, *et al.* Therapeutic and specific antitumor immunity induced by co-administration of imma-

ture dendritic cells and adenoviral vector expressing biologically active IL-18[ J ]. *Gene Ther*, 2002, 9(21): 1480-1486.

- [ 3 ] Vujanovic L, Ranieri E, Gambotto A, *et al.* IL-12p70 and IL-18 gene-modified dendritic cells loaded with tumor antigen-derived peptides or recombinant protein effectively stimulate specific type-1 CD4<sup>+</sup> T-cell responses from normal donors and melanoma patients *in vitro*[ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(8): 798-805.  
[ 4 ] Yamanaka R, Honma J, Tsuchiya N, *et al.* Tumor lysate and IL-18 loaded dendritic cells elicits Th1 response, tumor-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells in patients with malignant glioma[ J ]. *J Neurooncol*, 2005, 2(1): 107-113.  
[ 5 ] Tucci M, Quatraro C, Dammacco F, *et al.* Increased IL-18 production by dendritic cells in active inflammatory myopathies[ J ]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1107: 184-192.  
[ 6 ] Schumacher L, Ribas A, Dissette VB. Human dendritic cell maturation by adenovirus transduction enhances tumor antigen-specific T-cell responses[ J ]. *J Immunother*, 2004, 27(3): 191-200.  
[ 7 ] Dai S, Zhou X, Wang B, *et al.* Enhanced induction of dendritic cell maturation and HLA-A\* 0201-restricted CEA-specific CD8 ( + ) CTL response by exosomes derived from IL-18 gene-modified CEA-positive tumor cells[ J ]. *J Mol Med*, 2006, 84(12):1067-1076.  
[ 8 ] 孙黎飞,曹雪涛,田野苹,等. IL-2 基因修饰对树突状细胞表达细胞因子的影响[ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*,2000, 7(1): 21-24.  
[ 9 ] Hao S, Bai O, Yuan J, *et al.* Dendritic cell-derived exosomes stimulate stronger CD8<sup>+</sup> CTL responses and antitumor immunity than tumor cell-derived exosomes[ J ]. *Cell Mol Immunol*, 2006, 3(3): 205-211.  
[ 10 ] Bontkes HJ, Kramer D, Ruizendaal JJ, *et al.* Tumor associated antigen and interleukin-12 mRNA transfected dendritic cells enhance effector function of natural killer cells and antigen specific T-cells[ J ]. *Clin Immunol*, 2008, 127(3): 375-384.  
[ 11 ] Tong XM, Zheng SE, Bader A, *et al.* Construction of expression vector of hTERT- hIL18 fusion gene and induction of cytotoxic T lymphocyte response against hTERT[ J ]. *Eur J Med Res*, 2008, 13(1): 7-14.  
[ 12 ] 李媛媛,谢裕安.以树突状细胞为基础的肝癌免疫治疗研究进展[ J ]. *内科*,2008, 3(2): 230-233.  
[ 13 ] Xia D, Li F, Xiang J. Engineered fusion hybrid vaccine of IL-18 gene-modified tumor cells and dendritic cells induces enhanced antitumor immunity[ J ]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2004, 19(3): 322-330.  
[ 14 ] Chaudhry UI, Kingham TP, Plitas G, *et al.* Combined stimulation with interleukin-18 and CpG induces murine natural killer dendritic cells to produce IFN-gamma and inhibit tumor growth[ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66(21): 10497-10504.

[ 收稿日期 ] 2008 - 11 - 10 [ 修回日期 ] 2008 - 12 - 26

[ 本文编辑 ] 韩丹