

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.006

## 紫杉醇联合顺铂诱导的凋亡卵巢癌细胞的免疫原性

冯勤梅<sup>1</sup>, 王颖<sup>2</sup>, 葛海良<sup>2</sup>, 吴霞<sup>1</sup>, 狄文<sup>1\*</sup> (1. 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200127; 2. 上海交通大学医学院上海市免疫所, 上海 200025)

**[摘要]** 目的: 探讨紫杉醇联合顺铂诱导凋亡的卵巢癌细胞被 DCs 交叉提呈后能否促进免疫应答。方法: 常规贴壁法刺激正常人外周血单核细胞分化诱导为 DCs, 6 d 后将 DCs 和紫杉醇联合顺铂体外诱导的凋亡人卵巢癌细胞 HO8910 共同培养(凋亡组), 并以冻融细胞共培养 DCs 组(冻融组)或单独 DCs 组(空白组)作对照, 以激光共聚焦扫描和流式细胞仪检测不同培养组 DCs 的分化和成熟程度。分别将各组成熟 DCs 与同一来源的磁珠分选的 CD8<sup>+</sup>T 细胞共培养, <sup>3</sup>H-TdR 掺入法检测其增殖能力; LDH 释放反应检测 CTL 对肿瘤细胞的杀伤能力; 同时应用 ELISPOT 图像分析仪检测致敏后 CD8<sup>+</sup>T 细胞 INF- $\gamma$  的分泌能力。结果: (1) 紫杉醇联合顺铂诱导的凋亡卵巢癌细胞可被 DCs 有效吞噬, 并促进 DCs 的成熟及其抗原提呈作用; (2) <sup>3</sup>H-TdR 检测显示凋亡肿瘤细胞能诱导 CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖( $P < 0.05$ ); (3) LDH 释放实验与 ELISPOT 图像分析均证明凋亡肿瘤细胞诱导的 CTL 杀伤活性显著强于冻融组和空白组细胞( $P < 0.01$ )。结论: 紫杉醇联合顺铂诱导的凋亡卵巢癌细胞具有较强的免疫原性, 可促进 DCs 分化和成熟, 进一步促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖、分泌与杀伤功能。

**[关键词]** 卵巢肿瘤; 紫杉醇; 顺铂; 凋亡; 树突状细胞; CTL; 免疫应答

**[中图分类号]** R737.31; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2009)02-0130-06

## Immunogenicities of apoptotic ovarian cancer cells induced by paclitaxel combined with cisplatin

FENG Qin-mei<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>2</sup>, GE Hai-liang<sup>2</sup>, WU Xia<sup>2</sup>, DI Wen<sup>2</sup> (1. Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China; 2. Institute of Immunology, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore whether apoptotic ovarian cancer cells induced by chemotherapy drugs paclitaxel and cisplatin can be cross-presented by dendritic cells (DCs) and enhance immune responses. **Methods:** DCs were induced from peripheral blood monocytes cells by GM-CSF/IL-4 for 6 d, then they were stimulated with either apoptotic ovarian cancer HO8910 cells, frozen-thawed HO8910 cells or control cells for 4 h. Their surface markers and phagocytotic ability were detected by flow cytometry and confocal microscopic scanning assay, respectively. DCs of different groups were cultured with CD8<sup>+</sup>T cells isolated by magnetic cell sorting, and the ability of DCs to activate CD8<sup>+</sup>T cells was evaluated by <sup>3</sup>H-TdR, the activity of CTL to kill tumor cells was evaluated by LDH. Production of IFN- $\gamma$  by CD8<sup>+</sup>T cells was measured by ELISPOT. **Results:** Apoptotic ovarian cancer cells induced by chemotherapy drugs paclitaxel and cisplatin could be phagocytized by DCs, which subsequently promoted the maturation and antigen presenting ability of DCs. Apoptotic ovarian cancer cells implused DCs significantly promoted proliferation of CD8<sup>+</sup>T cells compared with that of control cells ( $P < 0.05$ ); they also significantly increased the cytotoxicity of CTL to kill tumor cells compared with that of frozen-thawed HO8910 cells and control cells as detected by LDH and ELISPOT (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Apoptotic ovarian cancer cells induced by paclitaxel and cisplatin exhibit strong immunogenicity and enhanced ability to promote DCs maturation and antigen presentation, subsequently enhance CD8<sup>+</sup>T cell proliferation and promote their ability to secrete IFN- $\gamma$  and kill tumor cells.

**[Key words]** ovarian neoplasms; paclitaxel; cisplatin; dendritic cell; apoptosis; CTL; immune response

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 130-135]

**[基金项目]** 上海市教育委员会科研项目(No.061012)。Supported by the Education Commission Research Project of Shanghai(No.061012)

**[作者简介]** 冯勤梅(1971-),女,山西省太原市人,博士,医师,主要从事肿瘤免疫方面的研究。

\* 通讯作者( Corresponding author). E-mail: diwen163@163.com

手术切除联合化疗能有效减少肿瘤负荷,那么手术和化疗后能否联合免疫治疗使免疫治疗发挥疗效是一个知之甚少的问题。系统化疗一方面可以导致淋巴细胞减少;另一方面又可以通过诱导凋亡来杀死肿瘤细胞,而凋亡的肿瘤细胞是否具有免疫原性一直是倍受争议的话题。部分研究<sup>[1-2]</sup>认为凋亡细胞不能启动有效的免疫应答甚至会诱发免疫耐受。然而近年研究<sup>[3-4]</sup>表明,化疗药物诱导的凋亡肿瘤细胞能够有效激发免疫应答,但是凋亡肿瘤细胞的免疫原性与肿瘤细胞的性质和化疗药物有关,不同化疗药物诱导的凋亡肿瘤细胞具有不同的免疫原性。鉴于上述研究,本课题探索卵巢癌一线化疗药紫杉醇+顺铂诱导的肿瘤细胞凋亡被 DCs 交叉提呈后,能否促进免疫应答,以明确凋亡的卵巢癌细胞是否具有免疫原性,为临床上制定合理的化疗联合免疫治疗方案提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂

紫杉醇、顺铂购自山东齐鲁制药厂。淋巴细胞分离液购自上海化学试剂厂, $\alpha$ -肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )均购自 R&D 公司,白介素 4(IL-4)、白介素 7(IL-7)均购自 Peprotech 公司。CD8<sup>+</sup>T 细胞 MicroBeads、Column 分选器购自 Miltenyi Biotec 公司,CFSE 活细胞探针购自 InChinnan Business 公司,鼠抗人抗体 CD14、CD80、CD83、CD86、CD1a 购自 Ebioscience 公司,Annexin-PI 抗体购自深圳晶美公司,RPMI 1640 培养液、0.25% 胰酶、胎牛血清(FBS)购自 GIBCO 公司。LDH 杀伤试剂盒(CYTO-TOX96<sup>TM</sup>)购自 PROMEGA 公司,ELISPOT 试剂盒购自 U-CyTech 公司。人卵巢癌 HO8910 细胞株为上海交通大学免疫所馈赠,人浓缩白细胞由健康自愿者提供。ELISPOT 图像分析仪为 BIOSYS 公司 BIOREADER-3000PRO。

### 1.2 流式细胞术检测紫杉醇+顺铂对卵巢癌 HO8910 细胞的致凋亡作用

将对数生长期 HO8910 细胞按紫杉醇和顺铂不同的作用剂量和不同时间分组处理,紫杉醇/顺铂质量浓度分别为 2.5/0.3、25/3、125/15、250/30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,分别作用 12、24 和 36 h 后,用 0.25% 胰酶消化贴壁细胞,细胞用 PBS 重悬至  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,取 100  $\mu\text{l}$ ,以药物未处理组为空白对照,参照 Annexin V-PI 试剂盒说明书以流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率,选择药物诱导凋亡的最佳剂量和时间作为下步实验的干预条件。

### 1.3 激光共聚焦显微镜观察 DCs 对凋亡肿瘤细胞的作用

消化对数增长期 HO8910 细胞株,以 PBS 重悬细胞至  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,加入 CFSE 终浓度为 25  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ,5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养箱共孵育 30 min,RPMI 1640 培养液洗涤细胞 1 次,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液重悬细胞,并铺板培养。次日加入紫杉醇和顺铂(浓度分别为 250、30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),培养 24 h 后取出(此条件为 1.2 实验中选择的诱导凋亡最佳作用浓度与作用时间),收集悬浮细胞,计数。用淋巴细胞分离液经密度梯度离心法分离获取正常人外周血单个核细胞后,加 GM-CSF/IL-4 诱导培养 DCs,培养 6 d 后的 DCs 与凋亡细胞以 1:1 比例共孵育,未处理 HO8910 细胞和 DCs 以相同比例共培养为对照,4 h 后取出,加入鼠抗人 PE-CD83 抗体,共孵育 30 min 后,用 PBS 洗涤细胞,并用 4% 的多聚甲醛固定悬浮细胞,置于细胞甩片机中  $800 \times g$  离心 3 min,将细胞固定于载玻片上,50% 甘油-PBS 封片,激光共聚焦显微镜检测(实验重复 3 次),观察 DCs 对凋亡肿瘤细胞的作用情况。

### 1.4 流式细胞术检测不同类型肿瘤抗原负载 DCs 表面标志的表达

DCs 培养至 6 d,PBS 冲洗收获所有的 DCs,分为 3 组进行实验:空白组(单纯 DCs);冻融组(HO8910 细胞在液氮与 37  $^\circ\text{C}$  水浴反复冻融 5 次收获的冻融抗原负载 DCs);凋亡组(HO8910 凋亡细胞负载 DCs)。各实验组共培养 4 h 后洗涤细胞,用 10% FBS 的 RPMI 1640 悬浮上述各实验组细胞,分别加入 TNF- $\gamma$  浓度至 100  $\text{ng}/\text{ml}$ ,培养 24 h 后流式细胞术检测 DCs 细胞表面 CD80、CD83、CD86 的表达,共测定 3 次。

### 1.5 肿瘤抗原负载 DCs 对抗原特异性 CTL 增殖的诱导作用

1.5.1 CD8<sup>+</sup>T 细胞的分选 收集与 DCs 同来源的悬浮细胞。分选步骤参照产品说明书操作。FACS 检测 CD8<sup>+</sup>T 细胞磁珠分选 PBMC 得到 CD8<sup>+</sup>T 细胞(流式细胞术检测其纯度 >95%)。

1.5.2 CTL 的诱导 将上述不同肿瘤抗原负载的 DCs 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞按细胞数 1:10 混合于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液[含 IL-7(10  $\text{ng}/\text{ml}$ )、IL-2(10  $\text{ng}/\text{ml}$ )]中,加于 24 孔板中(每孔 2 ml, $2 \times 10^6/\text{ml}$ ),置 37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养。培养第 3、5 天半量换液,补加细胞因子。隔 7 d 重复上述实验 1 次,每次刺激结束后 CTL 计数。

1.5.3 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法检测诱导后 CTL 的增殖

共刺激培养结束前 18 h 收集上述不同组别细胞, 用 10% FBS 的 RPMI 1640 调整细胞密度至  $2 \times 10^6/\text{ml}$ , 加入 96 孔培养板, 每孔 100  $\mu\text{l}$ , 每组设 5 复孔, 掺入  $^3\text{H-TdR}$   $1.85 \times 10^5 \text{Bq}/\text{孔}$ 。培养结束后多头细胞收集器收集细胞于玻璃纤维滤膜上, 烤箱烤干后, 将滤纸片放入闪烁液中, 在  $\beta$  液闪计数器上测定 cpm 值, 取 5 复孔的平均值。

### 1.6 LDH 释放实验检测肿瘤抗原负载 DCs 诱导 CTL 对 HO8910 细胞的杀伤作用

5% BSA RPMI 1640 重悬培养 2 次后的 CTL 细胞为效应细胞, 调整密度至  $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。消化对数生长期 HO8910 细胞为靶细胞, 5% BSA 的 RPMI 1640 调整细胞密度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ , 以效靶比为 50:1 各 100  $\mu\text{l}$  加入 96 孔圆底板混合培养。每种靶细胞设自然释放孔: 100  $\mu\text{l}$  靶细胞 + 100  $\mu\text{l}$  5% BSA RPMI 1640 培养液; 最大释放孔: 100  $\mu\text{l}$  靶细胞 + 1% NP-40 100  $\mu\text{l}$ ; 均设 3 复孔。将培养板移至 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱 4 h 后取出, 500  $\times g$  离心 3 min。每孔吸上清 50  $\mu\text{l}$  转移至 96 孔平底板, 加入 50  $\mu\text{l}$  LDH 底物反应液, 常温避光孵育 30 min, 加入 50  $\mu\text{l}$  终止液终止反应, 酶标仪测 492 nm 处测  $D$  值。CTL 细胞杀伤活性计算公式如下: 杀伤活性(%) = (实验组  $D$  值 - 靶细胞自然释放组  $D$  值) / (靶细胞最大释放组  $D$  值 - 靶细胞自然释放组  $D$  值)  $\times 100\%$ 。

### 1.7 ELISPOT 图像分析仪检测肿瘤抗原负载 DCs 诱导 CTL 细胞的 INF- $\gamma$ 分泌能力

采用 ELISPOT 图像分析方法检测, 方法参考试剂盒说明书。10% FBS RPMI 1640 培养液调整上述不同肿瘤抗原负载的  $\text{CD8}^+$  T 细胞密度至  $6 \times 10^6/\text{ml}$ , 同时调整生长期 HO8910 细胞密度至  $1 \times 10^5/\text{ml}$ , 以效靶比为 60:1、每孔各 100  $\mu\text{l}$  加入预先包被 INF- $\gamma$  抗体的 96 孔平底硝酸纤维膜板中。分别设阴性对照孔和加植物血凝素( PHA 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的阳性对照孔, 每组各设 2 复孔。置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱 24 h 后取出。倾倒入培养液, 每孔加入 200  $\mu\text{l}$  的去离子水低渗裂解细胞。Washing buffer 洗涤培养板, 加入生物素标记的抗体孵育 1 h 后加入亲和素孵育。最后 AEC 显色, 以去离子水洗涤终止显色过程, 置室温静置 30 min, 让膜自然干燥。ELISPOT 图像分析仪检测 96 孔板形成斑点数, 计算斑点数/ $5 \times 10^5$  CTL, 求出 2 孔的平均值。

### 1.8 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS11.5 软件包进行方差分析,  $P < 0.05$  为差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 紫杉醇 + 顺铂诱导人卵巢癌细胞株 HO8910 凋亡的最佳作用时间与剂量的选择

为确定紫杉醇和顺铂联合诱导人卵巢癌细胞株 HO8910 的最佳作用剂量和最适作用时间, 实验选取了 4 个作用浓度和 3 个作用时间点(见前)处理 HO8910 细胞, 结果显示, 紫杉醇和顺铂作用浓度分别为 125 和 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 作用时间 12 h 后细胞凋亡开始明显增加; 以 250 和 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  作用 24 h 细胞基本完全凋亡, 凋亡率为  $(76.12 \pm 10.56)\%$ 。显微镜下可见作用 24 h 后细胞呈悬浮状, 部分细胞胞膜不完整。作用 36 h 后 FCM 检测显示细胞大多呈坏死状态, 显微镜下观察发现细胞呈碎片状。上述结果表明, 紫杉醇和顺铂联合诱导 HO8910 细胞凋亡时, 质量浓度分别为 250 和 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、作用 24 h 为凋亡最适剂量和最佳时间点(图 1)。

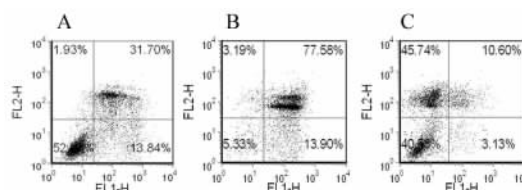


图 1 紫杉醇、顺铂不同浓度与不同时间作用的细胞凋亡率  
Fig.1 Apoptotic rates of ovarian cancer cells induced by different concentrations of paclitaxel and cisplatin at different time points

A: 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  paclitaxel and 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cisplatin for 12 h;  
B: 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  paclitaxel and 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cisplatin for 24 h;  
C: 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  paclitaxel and 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cisplatin for 36 h

### 2.2 DCs 对凋亡 HO8910 细胞的吞噬作用

比较 DCs 与凋亡 HO8910 细胞和未处理 HO8910 细胞共培养 4 h 后, DCs 对两类细胞的吞噬情况, 结果显示, 仅在凋亡组中可见 DCs 膜与凋亡细胞融合, DCs 细胞胞体内有凋亡小体, DCs 胞内出现小颗粒状溶解碎片等一系列 DCs 吞噬凋亡细胞的现象, 而在相同的时间 DCs 对正常的 HO8910 未见明显吞噬作用(图 2)。

### 2.3 不同类型肿瘤抗原负载 DCs 表面标志的表达

TNF- $\alpha$  作用 24 h 后, 流式细胞术显示空白组、冻融组 CD83 表达分别为  $(34.89 \pm 5.68)\%$ 、 $(36.86 \pm 6.56)\%$ , 两者间无差异, 但其在凋亡组中表达上升为  $(48.42 \pm 5.3)\%$ , 且与前两者间有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 共刺激分子在空白组、冻融组表达明显

上调但两组间无明显差异,其在凋亡组表达较前两组明显增高且有统计学意义( $P < 0.05$ ,图3)。

2.4 紫杉醇 + 顺铂诱导凋亡肿瘤细胞负载 DCs 促进 CTL 增殖

FACS 鉴定磁珠分选 PBMC 得到的  $CD8^+$ T 细胞纯度达到 96%。分别于每次刺激前后用活细胞定量计数法观察效应 T 细胞的增殖效应。效应 T 细

胞于培养第 1 周 3 组细胞数量未见明显改变。第 2 周凋亡组增殖约 1 倍,空白组数量较前增加但无差异,冻融组略有下降。同时<sup>3</sup>H-TdR 检测发现凋亡组 cpm 值较空白组与冻融组均有差异( $P < 0.05$ ),结果表明紫杉醇 + 顺铂诱导的凋亡细胞被 DCs 提呈后具有促进  $CD8^+$ T 细胞增殖的功能(图4)。

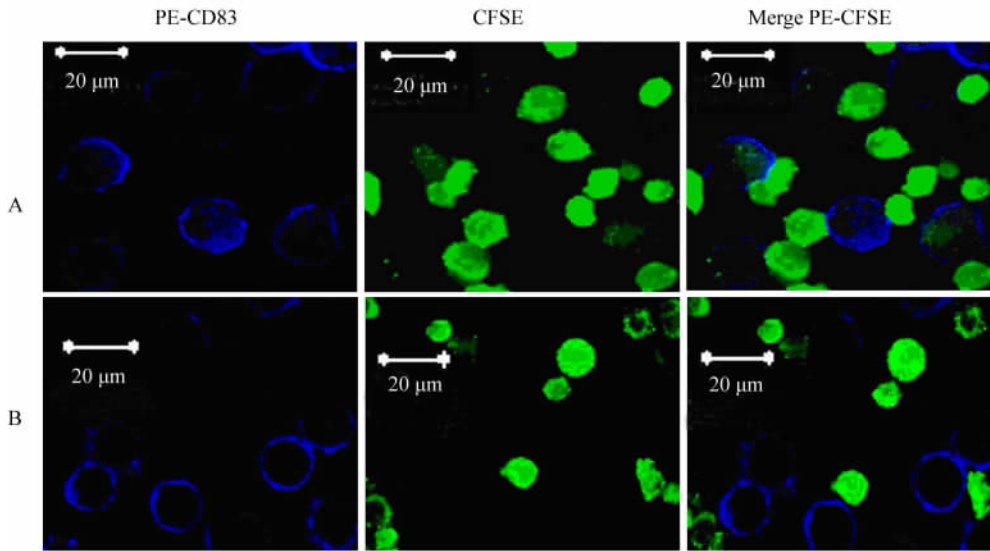


图2 激光共聚焦扫描检测 DCs 对凋亡 HO8910 细胞的吞噬作用

Fig. 2 Phagocytic functions of DCs against apoptotic HO8910 cells detected by LSCM

A: Apoptotic HO8910 cells; B: HO8910 cells

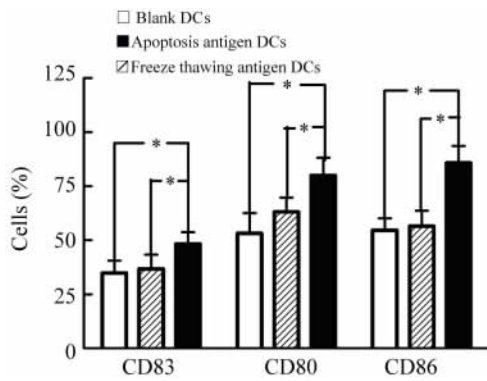


图3 不同肿瘤抗原刺激后 DCs 表面标志的表达

Fig. 3 Expression of CD80, CD83 and CD86 on DCs after stimulated with different tumor antigens

\*  $P < 0.05$  vs blank DCs or freeze thawing antigen DCs

2.5 凋亡肿瘤细胞负载 DCs 诱导的 CTL 对肿瘤细胞的杀伤作用

CytoTOX 非放射性细胞毒性试剂盒定量测定  $CD8^+$  效应 T 细胞裂解靶细胞 HO8910 后释放的 LDH。结果显示: 空白组、冻融组、凋亡组的 CTL 杀伤率分别为(  $19.02 \pm 2.6$  )%、(  $17.4 \pm 3.1$  )%、(  $32.18$

$\pm 5.2$  )%, 空白组与冻融组间无差异( $P = 0.27$ ), 凋亡组与其他两组均有显著差异( $P < 0.05$ )。结果表明, 紫杉醇 + 顺铂诱导卵巢癌凋亡细胞经 DCs 提呈后具有促进 CTL 特异性的杀伤功能。

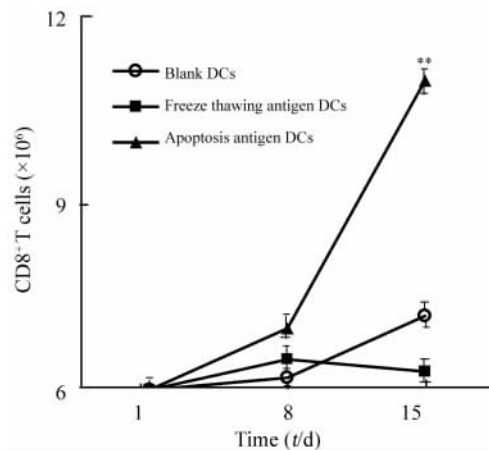


图4 凋亡肿瘤细胞负载 DCs 促进  $CD8^+$ T 细胞的增殖

Fig. 4 Apoptotic tumor cells antigen impulsed DCs increased the proliferation of  $CD8^+$ T cells

\*\*  $P < 0.01$  vs blank DCs or freeze thawing antigen DCs

### 2.6 凋亡肿瘤细胞负载 DCs 促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞的 INF- $\gamma$ 分泌能力

实验结果显示, 冻融 HO8910 与紫杉醇 + 顺铂诱导凋亡的 HO8910 经过 DCs 提呈, CD8<sup>+</sup>T 细胞再次作用 HO8910 后, 分泌 INF- $\gamma$  的 CD8<sup>+</sup>T 细胞数目在凋亡组明显增加(图 5、6), 两组间有明显差异( $P < 0.05$ )。且凋亡抗原脉冲 DCs 后刺激 CD8<sup>+</sup>T 细胞 INF- $\gamma$  的分泌较空白组明显增加( $P < 0.05$ )。值得注意的是未经抗原负载空白组的 DCs 刺激 CD8<sup>+</sup>T 细胞后其分泌功能较冻融组增加( $P < 0.05$ )。

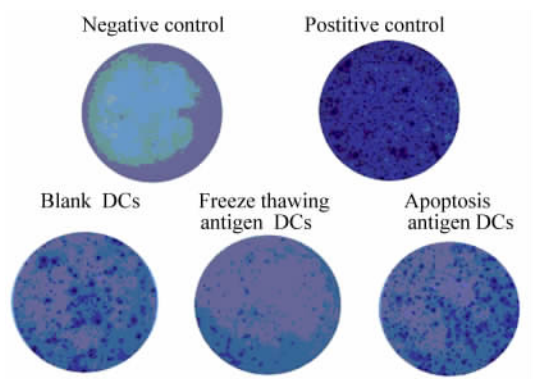


图 5 DCs 提呈不同肿瘤抗原后分泌 INF- $\gamma$  的 CD8<sup>+</sup>T 细胞  
Fig. 5 INF- $\gamma$  positive CD8<sup>+</sup>T cells induced by different tumor antigen-impulsed DCs

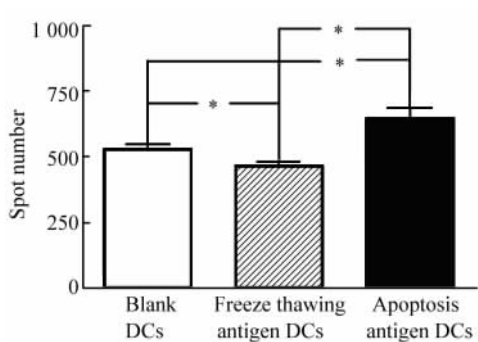


图 6 ELISPOT 分析不同抗原诱导的 CTLs 中抗原特异性分泌 INF- $\gamma$  的 CD8<sup>+</sup>T 细胞数  
Fig. 6 Numbers of INF- $\gamma$  positive CD8<sup>+</sup>T cells induced by different tumor antigen-impulsed DCs detected by ELISPOT

\*  $P < 0.05$  vs blank DCs or freeze thawing antigen DCs

### 3 讨论

肿瘤免疫治疗的一个巨大挑战是如何使抗原被有效交叉提呈并激发有效的抗肿瘤免疫应答。目前大多数化疗药是通过诱导细胞凋亡杀伤靶细胞, 如果凋亡细胞不具有免疫原性(或成为耐受原), 则化

疗药物诱导的大量凋亡肿瘤细胞不能被 APC 交叉提呈, 那么化疗后实施免疫治疗就有可能不能使免疫治疗发挥应有疗效<sup>[5]</sup>。基于上述原因, 凋亡细胞是否具有免疫原性、化疗后是否能实施免疫治疗以及如何合理应用免疫治疗一直是不断探索但仍然备受争议的研究领域。

研究<sup>[6-7]</sup>发现部分化疗药物诱导的凋亡细胞能促进 DCs 成熟, APC 被凋亡的肿瘤细胞激活后释放更多的前炎性细胞因子, 从而促进 APC 对肿瘤抗原的交叉提呈<sup>[8-9]</sup>, 那么 APC 摄取、提呈肿瘤抗原及活化肿瘤特异 T 细胞的总体功能增强, 有利于诱导抗肿瘤免疫应答<sup>[10-11]</sup>。进一步研究<sup>[12-13]</sup>表明, 部分化疗药物诱导的凋亡细胞作为抗原不需要识别肿瘤特异性肽段, 且不受 MHC 限制, 化疗诱导的凋亡细胞有望成为免疫治疗的自身疫苗。然而也有研究<sup>[14]</sup>发现丝裂霉素 C 致凋亡的肿瘤细胞不具有免疫原性。上述研究结果提示, 不同的肿瘤细胞经不同化疗药物作用后, 其免疫原性仍然存在不确定性。

紫杉醇和铂类是目前国内外公认的卵巢癌一线化疗药, 因此本研究探索该两药物化疗诱导凋亡卵巢癌细胞是否具有免疫原性。激光共聚焦显微镜显示, 培养 4 h 后仅在凋亡细胞共培养组中见 DCs 吞噬凋亡小体, 且 DCs 胞体内出现小颗粒状溶解碎片(图 2)。同时流式细胞检测发现 DCs 与凋亡细胞共培养组中, DCs 共刺激分子表达增高(图 3), 表明 DCs 负载凋亡细胞后其成熟度明显增加, 行使抗原提呈的功能显著增强。有学者<sup>[15]</sup>研究发现化疗后肿瘤抗原交叉提呈的总量(细胞增殖作为检测交叉提呈的指标)大约增加了 1 倍; 这意味着抗原量可能增加了 10 倍<sup>[16]</sup>。本实验与该结果相吻合, 紫杉醇 + 铂类诱导的凋亡卵巢癌细胞并不隔离抗原, 相反使交叉提呈的肿瘤抗原性显著增加。

不同抗原脉冲后的 DCs 与同一来源的 CD8<sup>+</sup>T 细胞共培养后显示, 与冻融组和空白组相比, 紫杉醇和铂类诱导的凋亡细胞被 DCs 有效提呈后促进了 CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖(图 4)。Nowak 等<sup>[17-18]</sup>把 2,2-二氟脱氧胞嘧啶核苷诱导凋亡细胞转染到成瘤小鼠体内, 结果发现肿瘤缩小了 80%, 且观察到由于凋亡细胞增加了交叉抗原的提呈, 进一步增加了特异性 CD8<sup>+</sup>T 的增殖与 CTL 的杀伤功能。本实验应用 LDH 释放试验和 ELISPOT 检测均显示紫杉醇 + 顺铂诱导的凋亡肿瘤细胞能促进 CTL 的杀伤与分泌功能(图 5、6)。值得注意的是与空白组相比, ELISPOT 检测结果显示相对效应细胞的增多(效/靶 60:1), 冻融组 CTL 的杀伤与分泌功能较空白组下



降且有统计学意义( $P = 0.04$ ),探究原因由于实验所用的 HO8910 为不表达 HLA-A2 的肿瘤细胞株,可能是 DCs 提呈的异体冻融肿瘤抗原封闭了更多的 CD8<sup>+</sup>T 细胞抗原识别位点而使其杀伤功能下降;而相对冻融抗原化疗药物诱导的凋亡细胞促进了 DCs 的提呈与 CD8<sup>+</sup>T 细胞的杀伤作用,推测凋亡细胞有可能与 MHC 的相对不限制性有关,但其具体原因有待进一步探讨。总之,与冻融抗原相比,凋亡的肿瘤抗原非但没有抑制了 CD8<sup>+</sup>T 细胞的功能,相反它使 CD8<sup>+</sup>T 细胞致敏、活化,生成具有杀伤能力的 CTL。

越来越多的研究认为化疗诱导的凋亡细胞促进免疫应答反应,化疗有可能促 APC 负载更多的肿瘤抗原,并给 CD8<sup>+</sup>T 细胞提供协同刺激信号<sup>[19]</sup>;同时,有效的化疗能够导致肿瘤的减灭,从而改变效应细胞与靶细胞的比率,使 CTL 杀死靶细胞的能力得到增强。本研究结果显示,紫杉醇 + 顺铂诱导的凋亡卵巢癌细胞具有较强的免疫原性,可促进树突状细胞的分化和成熟、促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖、分泌与杀伤功能。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Kim S, Elkon KB, Ma X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells [ J ]. *Immunity*, 2004, 21( 5 ): 643-653.
- [ 2 ] Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death [ J ]. *Nature*, 2000, 407( 6805 ): 784-788.
- [ 3 ] Correale P, Cusi MG, Del Vecchio MT, *et al.* Dendritic cell-mediated cross-presentation of antigens derived from colon carcinoma cells exposed to a highly cytotoxic multidrug regimen with gemcitabine, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin, elicits a powerful human antigen-specific CTL response with antitumor activity *in vitro* [ J ]. *J Immunol*, 2005, 175( 2 ): 820-828.
- [ 4 ] Chaput N, De Botton S, Obeid M, *et al.* Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference [ J ]. *J Mol Med*, 2007, 85( 10 ): 1069-1076.
- [ 5 ] Lake RA, van der Most RG. A better way for a cancer cell to die [ J ]. *N Engl J Med*, 2006, 354( 23 ): 2503-2504.
- [ 6 ] Negroni L, Samson M, Guignon JM, *et al.* Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90beta phosphorylation [ J ]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6( 10 ): 2747-2756.
- [ 7 ] Yoshimoto Y, Kawada M, Ikeda D, *et al.* Involvement of doxorubicin-induced Fas expression in the antitumor effect of doxorubicin on Lewis lung carcinoma *in vivo* [ J ]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5( 2 ): 281-288.
- [ 8 ] van der Most RG, Currie A, Robinson BW, *et al.* Cranking the immunologic engine with chemotherapy: using context to drive tumor antigen cross-presentation towards useful antitumor immunity [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 2 ): 601-604.
- [ 9 ] Stravopodis DJ, Margaritis LH, Voutsinas GE. Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex [ J ]. *Curr Med Chem*, 2007, 14( 29 ): 3122-3138.
- [ 10 ] 储以微,温锦娣,熊思东. 淋巴细胞减少状态下的肿瘤免疫格局改变及其意义 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14( 1 ): 7-13.
- [ 11 ] 储以微,刘荣军,张 镭,等. 肺癌患者化疗前后免疫细胞格局的改变及其临床意义 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13( 4 ): 253-256.
- [ 12 ] Vari F, Hart DN. Loading DCs with Ag [ J ]. *Cytotherapy*, 2004, 6( 2 ): 111-121.
- [ 13 ] Storkus WJ, Herrem C, Kawabe M, *et al.* Improving immunotherapy by conditionally enhancing MHC class I presentation of tumor antigen-derived peptide epitopes [ J ]. *Crit Rev Immunol*, 2007, 27( 5 ): 485-493.
- [ 14 ] Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, *et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death [ J ]. *J Exp Med*, 2005, 202( 12 ): 1691-1701.
- [ 15 ] Stumbles PA, Himbeck R, Frelinger JA, *et al.* Cutting edge: tumor-specific CTL are constitutively cross-armed in draining lymph nodes and transiently disseminate to mediate tumor regression following systemic CD40 activation [ J ]. *J Immunol*, 2004, 173( 10 ): 5923-5928.
- [ 16 ] Nelson D, Bundell C, Robinson B. *In vivo* cross-presentation of a soluble protein antigen: kinetics, distribution, and generation of effector CTL recognizing dominant and subdominant epitopes [ J ]. *J Immunol*, 2000, 165( 11 ): 6123-6132.
- [ 17 ] Nowak AK, Lake RA, Marzo AL, *et al.* Induction of tumor cell apoptosis *in vivo* increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells [ J ]. *J Immunol*, 2003, 170( 10 ): 4905-4913.
- [ 18 ] Ju SA, Cheon SH, Park SM, *et al.* Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-1BB monoclonal antibody in mice [ J ]. *Int J Cancer*, 2008, 122( 12 ): 2784-2790.
- [ 19 ] Heath WR, Belz GT, Behrens GM, *et al.* Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens [ J ]. *Immunol Rev*, 2004, 199: 9-26.

[ 收稿日期 ] 2009 - 02 - 24

[ 修回日期 ] 2009 - 03 - 17

[ 本文编辑 ] 王 莹