

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.006

· 基础研究 ·

表达 CD40L 的小鼠结肠癌 colon26 瘤苗增强 DC 活性

武立华, 张超, 单保恩, 刘丽华, 艾军(河北医科大学第四医院 科研中心 暨 河北省肿瘤研究所 免疫室, 河北石家庄 050011)

[摘要] 目的: 观察表达 CD40L 的小鼠结肠癌 colon26 瘤苗体内外对 DC 活性的影响。方法: 以脂质体法将 CD40L 基因转染 colon26 细胞获得稳定表达 CD40L 的 colon26/CD40L 瘤苗。colon26/CD40L 细胞与小鼠骨髓来源 DC 共培养, 流式细胞术检测 DC 表型变化, RT-PCR 法检测细胞因子基因 *P19*、*P35*、*P40*、*IL-18* 和 *IFN- γ* 的表达, ELISA 法检测共培养上清中 IL-12、IL-23 和 *IFN- γ* 的水平。BALB/c 小鼠皮下注射 colon26 细胞制备荷瘤小鼠模型, colon26/CD40L 致敏 DC 治疗荷瘤结肠癌小鼠, ELISA 法检测荷瘤小鼠外周血中 IL-12、IL-23、*IFN- γ* 、IL-10 和 TGF- β 的水平, H-E 染色观察肝、脾和肿瘤组织的病理学变化。结果: 成功获得高表达 CD40L 的丝裂霉素(MMC)处理的 colon26/CD40L 瘤苗。DC 与 colon26/CD40L 瘤苗共培养后, DC 表面共刺激分子 CD80、CD86、MHC I 和 MHC II 表达增高($P < 0.01$); 共培养体系中可检测到 *P19*、*P35*、*P40*、*IL-18* 和 *IFN- γ* mRNA 的表达, 而在其他组未检测到上述基因的表达; 共培养细胞上清中有较高水平的 IL-12、IL-23 和 *IFN- γ* ($P < 0.01$)。colon26/CD40L 瘤苗致敏 DC 治疗组与 colon26/CD40L 瘤苗治疗组、DC 治疗组比较, 小鼠移植瘤的体积和质量明显减小和减少($P < 0.05$); 小鼠外周血 IL-12、IL-23 和 *IFN- γ* 明显升高($P < 0.01$), IL-10 和 TGF- β 明显降低($P < 0.01$); 小鼠移植瘤组织病理变化显著减轻。结论: 表达 CD40L 的丝裂霉素(MMC)处理的结肠癌瘤苗可促进 DC 的成熟, 刺激 DC 分泌细胞因子, 增强 DC 体内外活性, 从而增强治疗体系的抗肿瘤免疫效应。

[关键词] CD40L 基因; 树突状细胞; 结肠癌细胞; 基因转染

[中图分类号] R735.3+5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)05-0514-07

CD40L-expressing mouse colon cancer colon26 vaccine enhances DC activities

WU Li-hua, ZHANG Chao, SHAN Bao-en, LIU Li-hua, AI Jun(Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University & Department of Immunology, Tumor Research Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the *in vitro* and *in vivo* effects of CD40L-expressing murine colon cancer colon26 vaccine on activities of dendritic cells (DCs). **Methods:** The CD40L gene was transfected into colon26 cells using lipofectamine method, and the stable colon26/CD40L transfectants were obtained. Colon26/CD40L cells were co-cultured with DCs, and the phenotype of DCs was examined by flow cytometry; the expressions of cytokine genes such as IL-12, IL-23, IL-18 and *IFN- γ* were examined by RT-PCR; and the IL-12, IL-23 and *IFN- γ* levels in co-cultured supernatants were measured by ELISA. Tumor-bearing BALB/c mouse model was prepared by subcutaneous injection of colon26 cells, and treated with DCs impulsed with colon26/CD40L vaccine. IL-12, IL-23, *IFN- γ* , IL-10 and TGF- β levels in mouse peripheral blood were detected by ELISA; and the histopathological changes of the liver, spleen and tumor tissues were observed by H-E staining. **Results:** Colon26 cells stably expressing CD40L (colon26/CD40L vaccine) were successfully obtained. DCs, when co-cultured with colon26/CD40L vaccine, had up-regulated expressions of co-stimulatory molecules, including CD80, CD86, MHC I and MHC II ($P < 0.01$). The expressions of IL-12, IL-23, IL-18 and *IFN- γ* mRNA genes were only detected in DC-colon26/CD40L system, not in other co-cultured systems. And the DC-colon26/CD40L co-cultured system showed higher IL-12, IL-23 and *IFN- γ* levels ($P < 0.01$). Compared with mice treated with colon26/CD40L or DCs, mice treated with DCs-colon26/CD40L had smaller tumor volumes and lower weights ($P < 0.05$), increased IL-12,

[基金项目] 河北省科技厅科技计划项目(No.09276101D-29);河北省高校强势特色学科项目(No.2006-2010)。Project supported by the Research Program from the Science and Technology Bureau of Hebei Province(No.09276101D-29), and the Scientific Foundation for Major Characteristic Discipline in Higher Institutions of Hebei Province(No.2006-2010)

[作者简介] 武立华(1983-),女,河北省石家庄人,硕士,主要从事肿瘤生物治疗的研究。E-mail:wulihua0817@sina.com

[通信作者] 艾军(AI Jun, corresponding author), E-mail:liangaiyudi@yahoo.com.cn

IL-23, and IFN- γ levels in the peripheral blood ($P < 0.01$), decreased IL-10 and TGF- β levels ($P < 0.01$), and better histopathological changes of tumor tissues. **Conclusion:** CD40L-expressing colon cancer cells can promote the maturation, induce the cytokine secretion, and enhance the activities of DCs *in vitro* and *in vivo*.

[**Key words**] CD40L gene; dendritic cell; colon cancer cell; gene transfection

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(5): 514-520]

树突状细胞(dendritic cell, DC)是机体内抗原提呈功能最强的、唯一能在体内激活初始型 T 细胞的抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC),同时可以通过主要组织相容性复合体 II 类分子(major histocompatibility complex class II molecule, MHC II)和 MHC I 类分子途径提呈抗原,并提供充分的共刺激信号,在 T 细胞抗肿瘤免疫应答的启动、调控过程中起着关键的作用^[1]。DC 的活化过程需要一系列刺激信号,CD40 分子激活是目前公认的诱导 DC 成熟的经典刺激物之一。研究^[2]表明,转染 CD40L 的肿瘤细胞制备物致敏的 DC 疫苗有较强的激发抗肿瘤特异免疫反应的能力。本研究观察 CD40L 转染的小鼠结肠癌 colon26 细胞与 DC 共培养对 DC 功能及活性的影响,探讨 CD40L 瘤苗致敏的 DC 在结肠癌治疗中的作用,为结肠癌免疫治疗靶点的选择提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系和动物

小鼠结肠癌细胞株 colon26 由河北医科大学第四医院科研中心保存。雌性 BALB/c 小鼠购自河北医科大学动物中心(动物合格证号为 911073),鼠龄 6~8 周,体质量为(16.0 \pm 2.0)g,于清洁级环境饲养。携 CD40L 的重组质粒 pMKITneo-CD40L 和空白质粒 pMKITneo-rector 由日本千叶县癌症中心研究局病理研究部 Masatoshi Tagawa 博士惠赠^[2]。

1.2 重组质粒转染 colon26 细胞

以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养结肠癌 colon26 细胞。参照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒说明书,将重组质粒转染结肠癌 colon26 细胞,分别命名为实验组(colon26/CD40L)和空质粒组(colon26/空载),未转染的细胞为对照组(colon26)。培养 48 h 后加入终质量浓度为 300 μ g/ml 的 G418 筛选阳性细胞,2 周后获得转染成功的细胞,采用有限稀释法挑选转染成功的单个细胞,反复筛选和传代,挑选在抗性培养液中生长良好的细胞。

1.3 流式细胞术检测转染细胞表面分子的表达

收集处于对数生长期的各组细胞各(5~10) \times

10⁵ 个重悬于 PBS,加入 PE-抗 CD40 抗体、PE-抗 CD40L 抗体、FITC-抗 CD80 抗体、FITC-抗 CD86 抗体、FITC-抗 MHC I 抗体、PE-抗 MHC II 抗体,同时使用 PE 或 FITC 标记的同型对照抗体与细胞的反应作为对照,避光 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,离心去上清液,用 PBS 清洗细胞后,将细胞重悬于 0.5 ml PBS,流式细胞仪检测各组细胞 CD40、CD40L、CD80、CD86、MHC I 和 MHC II 分子表达情况。

1.4 DC 的纯化及与肿瘤细胞的共培养

取 BALB/c 雌性小鼠的胫骨和股骨,去掉骨端,用含 10% FCS 的 RPMI 1640 冲出骨髓腔内的细胞,用红细胞裂解液去除红细胞。细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 2 h,去除非黏附细胞后继续在含 GM-CSF(20 ng/ml)、IL-4(20 ng/ml)的 10% FCS 中继续培养 7 d。收集非黏附的细胞,用 CD11c⁺ 磁珠进行分选,分选后细胞即为 DC。用荧光染料 PKH67(dark green histograms)标记以丝裂霉素处理的肿瘤细胞(2 \times 10⁵/孔),再与 DC(6 \times 10⁵/孔)在 24 孔培养板中共培养 24 h。收集各组共培养细胞,标记 CD80、CD86、MHC I 和 MHC II 抗体,应用流式细胞术检测 DC 表面共刺激分子的表达。

1.5 半定量 RT-PCR 检测共培养细胞中细胞因子基因 mRNA 的表达

经丝裂霉素处理的肿瘤细胞(2 \times 10⁵/孔)与 DC(6 \times 10⁵/孔)在 24 孔培养板中共培养 24 h,提取共培养细胞 RNA。合成第一链的 cDNA,cDNA 产物的扩增按如下引物和条件:(1)P19 基因,正义引物为 5'-CACAGAGCCAGCCAGATCTGAGAAGC-3',反义引物为 5'-CCATGGGAACCTGGGCATCCTTAAGC-3';94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。(2)P35 基因,正义引物为 5'-ACCTGCTGAAGACCACAGATG-3',反义引物为 5'-TTTCACTCTGTAAGGGTCTGC-3';94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,53 $^{\circ}$ C 退火 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。(3)P40 基因,正义引物为 5'-CCAGAGACATGGAGT-CATAG-3',反义引物为 5'-GGGTCTGGTTTGATGAT-GTC-3';94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。(4)IL-18 基因,正义引物为 5'-ATTACTCGAGGAACAATGGCTGCCATGTC-3',反义

引物为 5'-ATTACTCGAGAAGGCGCATGTGTGCTA-ATC-3';94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,35 个循环,72 °C 延伸 1 min。(5) *IFN-γ* 基因,正义引物为 5'-TGC GGCCTAGCTCTGAGACAATG-3',反义引物为 5'-TGAATGCTTGGCGCTGGACCTG-3';94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,35 个循环,72 °C 延伸 1 min。(6) *IFN-γ* 诱导的单因子基因(*Mig*)基因,正义引物为 5'-GACATTCTCGGACTTCACTC-3',反义引物为 5'-GATTCAGGGTGTGTTGGT-3';95 °C 变性 5 s,55 °C 退火 10 s,35 个循环,72 °C 延伸 1 min。(7) *β-actin* 基因,正义引物为 5'-AGAGGAAATCGTCCGTGAC-3',反义引物为 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3';94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,35 个循环,72 °C 延伸 5 min。*β-actin* 基因作为对照,RT-PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,使用凝胶图像分析系统进行光密度扫描分析。

1.6 ELISA 法检测共培养上清中细胞因子的分泌
经丝裂霉素处理的瘤苗 (2×10^5 /孔) 与 DC 细胞 (6×10^5 /孔) 在 24 孔培养板中共培养 24 h,收集各组培养上清,用 ELISA 法检测共培养上清中 IL-12、IL-23、*IFN-γ* 的分泌情况。

1.7 共培养细胞的体内抗肿瘤实验
收集呈对数生长的 colon26 细胞,于 BALB/c 小鼠右侧肩背部皮下注射细胞悬液 (1×10^6 /只),构建荷结肠癌小鼠模型。待小鼠成瘤后,定期给予治疗。治疗实验分为丝裂霉素处理的 colon26/CD40L 致敏 DC 细胞治疗组、丝裂霉素处理的 colon26/CD40L 瘤苗治疗组、DC 细胞治疗组。治疗制剂都经小鼠腹腔注射,0.2 ml (2×10^6 个细胞)/次,每隔 6 d 进行 1 次,共进行 3 次治疗。对照组每只注射 PBS,0.2 ml/次。定期观察小鼠移植瘤大小,计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。眼球取血后用 ELISA 法检测血清中 IL-12、IL-23、*IFN-γ*、IL-10 和 TGF- β 的水平。治疗结束后处死小鼠,仔细观察移植瘤有无远处转移,留取肿瘤、肝、脾组织,采用 H-E 染色观察组织的病理学变化。

1.8 统计处理
使用 SPSS13.0 统计学软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验和方差分析,以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *CD40L* 基因对结肠癌细胞表面分子的影响
将小鼠 *CD40L* 基因转染 colon26 细胞后,得到稳定表达 *CD40L* 的肿瘤细胞系 colon26/CD40L。colon26/CD40L 细胞表面大量表达 *CD40L* 分子,高达 39.42%,而亲本的 colon26 细胞和 colon26/空载细胞 *CD40L* 表达分别为 0.73%、0.62%。colon26/CD40L 细胞的 *CD80*、*CD86* 分子较转染前明显增高 ($P < 0.05$),而 *MHC I*、*MHC II* 分子无明显变化 (图 1,表 1)。

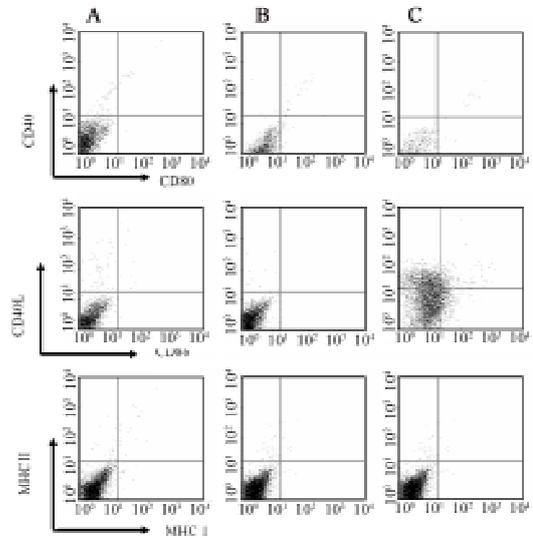


图 1 流式细胞术检测 *CD40L* 基因转染后 colon26 细胞表面分子的变化
Fig. 1 Surface molecules change in colon26 cells after *CD40L* gene transfection as detected by flow cytometry
A: Colon26 cells; B: Colon26/vector cells;
C: Colon26/CD40L cells

表 1 *CD40L* 基因转染对结肠癌 colon26 细胞表面分子的影响 (%)

Tab. 1 Influence of *CD40L* gene transfection on surface molecules expressions on colon cancer colon26 cells

| Group | CD40 | CD40L | CD80 | CD86 | MHC I | MHC II |
|----------------|--------------|----------------|---------------|---------------|-------------|-------------|
| colon26 | 0.26 ± 0.04 | 0.73 ± 0.12 | 0.65 ± 0.08 | 0.12 ± 0.05 | 0.41 ± 0.04 | 0.83 ± 0.07 |
| colon26/vector | 0.22 ± 0.04 | 0.62 ± 0.10 | 0.61 ± 0.12 | 0.24 ± 0.06 | 0.33 ± 0.04 | 0.85 ± 0.05 |
| colon26/CD40L | 0.12 ± 0.03* | 39.42 ± 3.27** | 1.62 ± 0.18** | 6.95 ± 0.07** | 0.37 ± 0.04 | 0.90 ± 0.10 |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs colon26 group or colon26/vector group

2.2 DC 细胞与 colon26/CD40L 瘤苗共培养对 DC 的影响

小鼠骨髓细胞经体外细胞因子诱导培养成 DC, 细胞开始时呈球形贴壁生长, 细胞大小一致; 在 GM-CSF、IL-4 的诱导下, 细胞逐渐呈半悬浮、悬浮状态生长, 胞膜逐渐形成毛刺状突起, 细胞数量无明显增加。经 7 d 培养后, 收集半悬浮、悬浮生长细胞即为未成熟的 DC, 经 CD11c⁺ 磁珠标记并筛选, CD11c⁺ DC 纯度可达 92.88% (图 2)。DC 与 PKH67 标记的 colon26 或 colon26/CD40L 瘤苗混合培养, 结果显示, 与 DC + colon26 相比, DC + colon26/CD40L 可形成更多的集落, 且 DC 表面 CD80、CD86、MHC I、MHC II 的表达水平也显著升高 ($P < 0.05$), colon26/CD40L 活化 DC 的 CD86 表达水平与 LPS 刺激 DC 的表达水平几乎相同 (图 3, 表 2)。

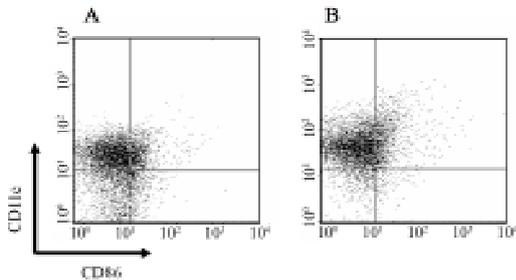


图 2 CD11c 磁珠分选前后 DC 中 CD11c 的表达
Fig. 2 CD11c expression on DC before and after sorted by CD11c-conjugated magnetic beads
A: Unsorted DC; B: Sorted DC

2.3 DC 与 colon26/CD40L 瘤苗共培养体系中细胞因子基因 mRNA 的表达

在 DC 与 colon26/CD40 L 瘤苗共培养组, 可检测到 *P19*、*P35*、*P40*、*IL-18*、*IFN-γ*、*IFN-γ* 诱导的单因子 (*Mig*) 基因 mRNA 的表达, 而在 DC、colon26 以及 DC 与 colon26 共培养组均未检测到以上基因的表达 (图 4)。

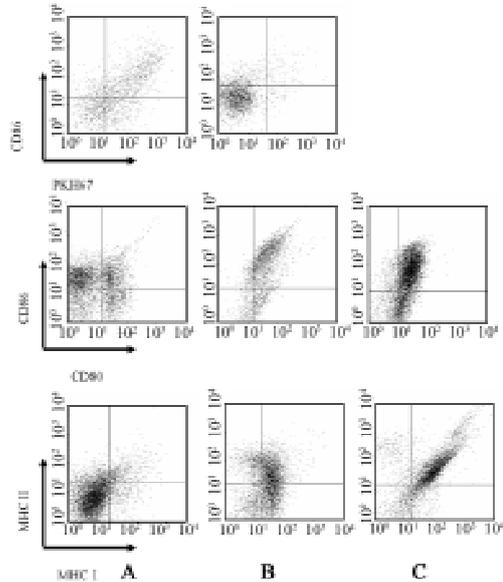


图 3 与 colon26/CD40L 瘤苗共培养后 DC 细胞表型的变化
Fig. 3 Phenotypic changes of DC after cultured with colon26/CD40L vaccine
A: DC cultured with colon26; B: DC cultured with colon26/CD40L; C: DC cultured with LPS

表 2 与 colon26/CD40L 瘤苗共培养后 DC 细胞表面共刺激分子的变化 (%)

Tab. 2 Changes of co-stimulatory molecules on DC after cultured with colon26/CD40L vaccine (%)

| Group | CD80 | CD86 | MHC I | MHC II |
|--------------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| DC + colon26 | 23.21 ± 1.22 | 50.26 ± 2.35 | 15.88 ± 2.21 | 21.86 ± 1.99 |
| DC + colon26/CD40L | 76.06 ± 2.09** | 70.02 ± 1.79* | 46.18 ± 2.15** | 50.22 ± 1.83** |
| DC + LPS | 71.05 ± 1.61 | 61.19 ± 2.45 | 58.23 ± 1.74 | 58.77 ± 2.06 |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DC + colon26 group

2.4 DC 与 colon26/CD40L 瘤苗共培养上清中细胞因子的水平

在 DC 与 colon26/CD40L 瘤苗共培养上清中, IL-12、IL-23 和 IFN-γ 的水平明显高于 DC 组和 DC 与 colon26 共培养组, 与 LPS 刺激 DC 产生的 IFN-γ 相当 (图 5)。

2.5 colon26/CD40L 瘤苗致敏 DC 的体内活性

BALB/c 小鼠在注射 colon26 细胞 7 d 后, 注射部位出现质地较硬的结节, 说明荷瘤小鼠模型成功建立, 成瘤率达 100%。随即给予 DC 和 (或) colon26/CD40L 瘤苗治疗, 经 3 次治疗后, DC 联合 colon26/CD40L 瘤苗治疗组荷瘤小鼠肿瘤 [(2.25 ± 0.05) cm³, (2.30 ± 0.04) g] 明显比 colon26/CD40L 瘤苗治疗组 [(2.96 ± 0.07) cm³, (2.88 ± 0.05) g]、

DC 细胞治疗组[(3.06 ± 0.07) cm³, (2.82 ± 0.03) g]及对照组[(4.00 ± 0.09) cm³, (4.79 ± 0.15) g]减小(*P* < 0.05), colon26/CD40L 瘤苗治疗组、DC 细胞治疗组荷瘤小鼠肿瘤大小及瘤重无明显差别, 但均低于对照组(*P* < 0.05)。各组抑瘤率分别为 47.92%、32.95%、32.26% 和 0。

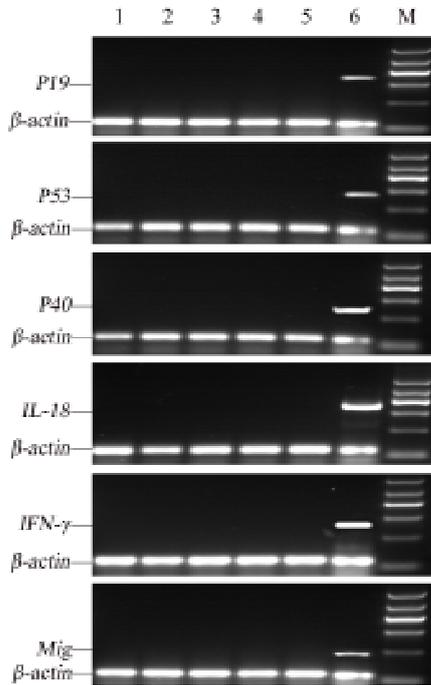


图 4 DC 与 colon26/CD40L 瘤苗共培养体系中细胞因子基因 mRNA 的表达

Fig. 4 Expression of cytokine mRNA in DC and colon26/CD40L vaccine co-cultured system

1: Colon26; 2: Colon/CD40L; 3: DC; 4: DC cultured with Colon26; 5: DC cultured with colon26/vector; 6: DC cultured with colon26/CD40L; M: Marker

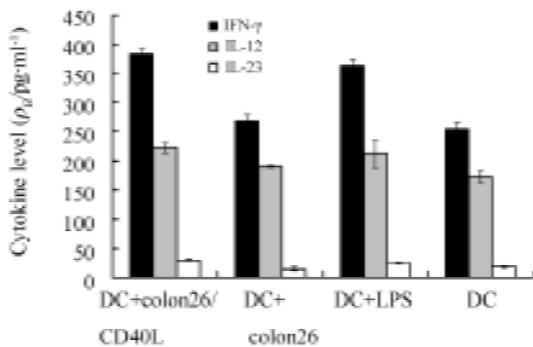


图 5 DC 与 colon26/CD40L 瘤苗共培养上清中细胞因子的水平

Fig. 5 Cytokine levels in supernatant of DC and colon26/CD40L vaccine co-cultured system

colon26/CD40L 瘤苗与 DC 联合治疗组荷瘤小鼠外周血清中 IL-12、IL-23、IFN- γ 高于 colon26/CD40L 瘤苗治疗组、DC 治疗组和对照组, IL-10 和 TGF- β 则呈较低水平(*P* < 0.05, 图 6)。

H-E 染色病理结果(图 7)显示, colon26/CD40L 瘤苗治疗组、DC 治疗组的肿瘤组织切片中可见大量的肿瘤细胞, 病灶周围有少量炎性细胞浸润, 有坏死灶; 而在联合治疗组肿瘤病灶内有大量炎性细胞浸润, 并伴有大片坏死, 肿瘤细胞散在分布, 肿瘤局限化。以上 3 个治疗组均未发现肝、脾转移。对照组肿瘤组织切片中可见大量肿瘤细胞, 只见极少量炎细胞浸润, 并可在肝、脾组织中发现转移灶。

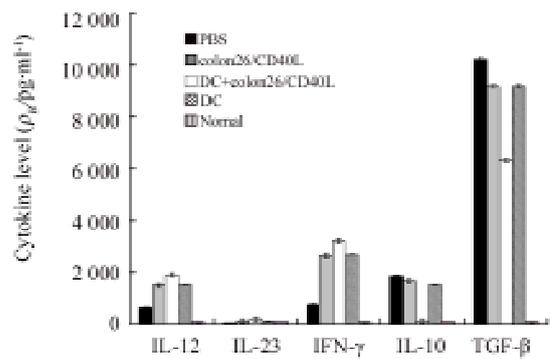


图 6 经治疗后各组荷瘤小鼠血清中细胞因子水平
Fig. 6 Cytokine levels in mouse serum of different groups after therapy

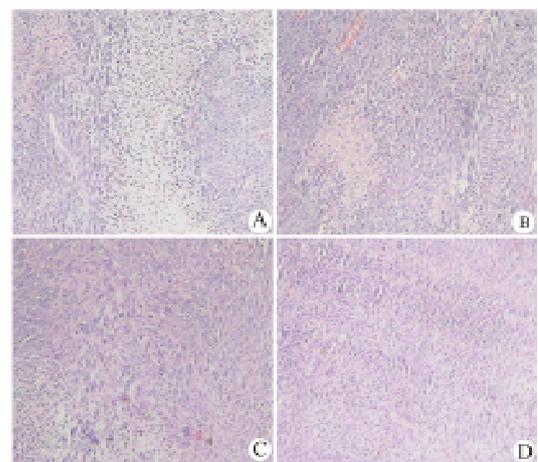


图 7 经治疗后各组荷瘤小鼠肿瘤、脾和肝组织病理学变化 (H-E, ×200)

Fig. 7 Histopathological changes of liver, spleen and tumor from tumor-bearing mice in different groups after treatment (H-E, ×200)

A: DC + colon26/CD40L; B: DC;

C: colon26/CD40L; D: Control

3 讨论

DC 疫苗作为对免疫学经典“疫苗”概念的扩展,越来越受到人们的关注。体内、外实验^[34]证实,用不同形式的肿瘤抗原体外冲击致敏 DC 后应用,可以产生较强的抗肿瘤免疫,并能抑制肿瘤生长和转移。全肿瘤细胞抗原可向机体提供肿瘤细胞全面的抗原信息,不需要了解肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)的性质及其抗原表位,可以激发针对多个已知或未知的肿瘤相关抗原的反应。

全肿瘤细胞抗原的制备方法主要有细胞裂解物和凋亡细胞两种。有研究表明,¹³⁷Cs 照射处理后凋亡的肿瘤细胞以及丝裂霉素(MMC)处理的肿瘤细胞,致敏 DC 的效果要优于反复冻融肿瘤细胞的裂解物,而¹³⁷Cs 照射处理后凋亡的肿瘤细胞与 MMC 处理的肿瘤细胞效果相当^[5]。本研究通过将 CD40L 基因导入小鼠结肠癌 colon26 细胞提高了细胞的免疫原性,并采用经 MMC 处理的 colon26/CD40L 细胞来致敏小鼠骨髓来源的 DC。

DC 在体内含量极少,并且恶性肿瘤患者体内 DC 的功能处于抑制状态,目前只能依赖分离 DC 前体细胞后,在体外培养扩增以获取足够治疗量的 DC。未成熟 DC 在受到肿瘤抗原刺激后,细胞表面的共刺激分子表达会上调进入成熟阶段,所以表面分子表达增加是 DC 成熟的表型特征。本研究在体外培养小鼠骨髓细胞 7 d 后,经免疫磁珠筛选可获得大量纯度在 92% 以上的 CD11c⁺ DC。经 MMC 处理的 colon26/CD40L 细胞刺激后,发现 DC 细胞表面 CD80、CD86、MHC I 和 MHC II 分子显著升高,表明该方法可以获得成熟的 DC^[2]。

在 DC 成熟以致产生抗肿瘤的免疫应答中,CD40 起着非常重要的作用。CD40-CD40L 介导的信号能够诱导抗原提呈细胞的活化,上调其黏附分子、共刺激分子等表达^[6-7]。本研究发现,MMC 处理的 colon26/CD40L 细胞致敏 DC 可增强 IL-12、IL-23、IL-18 和 IFN- γ 的分泌。IL-12 是 Th1 细胞相关的异二聚体细胞因子,促进 Th1 细胞诱发的免疫反应,调节 Th1/Th2 细胞之间的平衡,介导活化 T 细胞和自然杀伤细胞的直接有丝分裂和 IFN- γ 分泌。IL-23 是 Oppmann 等^[8]在 2000 年报告的一个新的细胞因子,由活化的树突状细胞和巨噬细胞产生,其生物学活性与 IL-12(p35/p40)相似。IL-23 可促进记忆性 T 细胞增殖,诱导活化的 T 细胞和树突状细胞产生 IFN- γ 和 IL-12 等细胞因子。IL-18 在多种组织和细胞中均可检测到 mRNA 表达,主要由单核/

巨噬细胞产生,T、B 细胞中几乎不表达。IL-18 对多种肿瘤细胞显示出较强的抑瘤效应,主要通过促进树突状细胞的成熟和巨噬细胞、NK 及 CTL 的杀瘤效应而实现^[9-11]。因此本研究的实验表明,应用 CD40L 转染结肠癌细胞在增强肿瘤细胞免疫原性的同时,还有效地诱导了 DC 的成熟,增加 DC 的细胞因子的分泌。

在小鼠结肠癌模型中,本研究观察到,经 MMC 处理 colon26/CD40L 细胞致敏的 DC 治疗后,小鼠肿瘤体积和重量小于其他治疗组;本研究还在荷瘤鼠血清中检测到较高水平的 IL-12、IL-23 和 IFN- γ ,但血清中 IL-10、TGF- β 水平则较低。IL-10 是一抑制性的细胞因子,对免疫应答具有负调节作用。IL-10 由巨噬细胞、Th2 类细胞产生,可以上调 Th2 类细胞因子的合成,抑制 Th1 类细胞因子的合成,特别是 IFN- γ 的产生。TGF- β 是一种多功能的细胞因子,通过细胞表面的受体信号转导途径调控细胞的增殖、分化、凋亡和免疫功能,而且可以显著抑制 T 淋巴细胞增殖、杀伤活性和下调组织细胞 MHC 的表达^[12-13]。在体内,TGF- β 可以激活 Th2 细胞亚型、抑制 Th1 细胞亚型分化^[14]。本实验说明,经 colon26/CD40L 细胞致敏的 DC 治疗后,荷瘤鼠体内 Th1 类细胞因子的合成增强,Th2 类细胞因子的合成减弱,表现出较好的抗肿瘤作用。

本研究观察到在 colon26/CD40L 致敏 DC 治疗组,肿瘤病灶内有大量炎性细胞浸润,并伴有大片坏死,肿瘤细胞散在分布,肿瘤局限化。因此本研究的实验表明,经 MMC 处理的 colon26/CD40L 细胞致敏的 DC 治疗效果优于单纯 DC 治疗和单纯 colon26/CD40L 瘤苗治疗。用转染 CD40L 的 colon26 肿瘤细胞可诱导 DC 成熟,DC 可在体内有效提呈肿瘤抗原并激发有效的抗肿瘤免疫反应。

[参考文献]

- [1] 潘春华,罗荣城. 树突状细胞疫苗在肿瘤免疫治疗领域的研究现状[J]. 中国免疫学杂志, 2003, 19(10): 732-735.
- [2] Tada Y, O-Wang J, Yu L, Shimozato O, Wang YQ, Takiguchi Y, et al. T-cell-dependent antitumor effects produced by CD40 ligand expressed on mouse lung carcinoma cells are linked with the maturation of dendritic cells and secretion of a variety of cytokines[J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(2): 451-456.
- [3] Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, Milling A, Thiemann M, Sherev T, et al. Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients[J]. Int J Cancer, 2004, 110(5): 730-740.
- [4] Murphy G, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A. Phase I

- clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen [J]. *Prostate*, 1996, 29 (6): 371-380.
- [5] 苏延军, 任秀宝, 王长利, 李 慧, 郝希山. 比较以凋亡肿瘤细胞和肿瘤细胞裂解物制备疫苗的效果 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25 (12): 5223-5226.
- [6] Okuzawa M, Shinohara H, Kobayashi T, Iwamoto M, Toyoda M, Tanigawa N. Psk, a protein-bound polysaccharide, overcomes defective maturation of dendritic cells exposed to tumor-derived factors *in vitro* [J]. *Int J Oncol*, 2002, 20 (6): 1189-1195.
- [7] Gonzalez G, Crombet T, Catala M, Mirabal V, Hernandez JC, Gonzalez Y, et al. A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: Report of a pilot clinical trial [J]. *Ann Oncol*, 1998, 9 (4): 431-435.
- [8] Tepper RI, Mule JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells [J]. *Hum Gene Ther*, 1994, 5 (2): 153-164.
- [9] Watkins SK, Egilmez NK, Suttles J, Stout RD. IL-12 rapidly alters the functional profile of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Immunol*, 2007, 178 (3): 1357-1362.
- [10] Dai S, Zhou X, Wang B, Wang Q, Fu Y, Chen T, 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.
- [11] Lian H, Jin N, Li X, Mi Z, Zhang J, Sun L, et al. Induction of an effective anti-tumor immune response and tumor regression by combined administration of IL-18 and Apoptin [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56 (2): 181-192.
- [12] Muraoka RS, Koh Y, Roebuck LR, Sanders ME, Brantley-Sieders D, Gorska AE, et al. Increased malignancy of Neu-induced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta [J]. *Mol Cell Bio*, 2003, 23 (23): 8691-8703.
- [13] Wolfrum LA, Walz TM, James Z, Fernandez T, Letterio JJ. p21Cip1 and p27Kip1 act in synergy to alter the sensitivity of naive T cells to TGF-beta-mediated G₁ arrest through modulation of IL-2 responsiveness [J]. *J Immunol*, 2004, 173 (5): 3093-3102.
- [14] King C, Davies J, Mueller R, Lee MS, Krahl T, Yeung B, et al. TGF-beta1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype [J]. *Immunity*, 1998, 8 (5): 601-613.
- [收稿日期] 2010-06-10 [修回日期] 2010-08-09
[本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

高通量筛选法筛选新的 TLR2 激动剂

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 在宿主的免疫防御中起重要作用, 根据它们在细胞中定位的不同分为两大类: 一类在胞内小室 (intracellular compartments) 中表达; 另一类在细胞表面表达。TLR2、TLR1 以及 TLR6 均属于后者。TLR2 需与 TLR1 或 TLR6 共同作用, 识别细菌肽聚糖、磷壁酸、脂蛋白等。TLR2 激动剂及其衍生物在治疗炎症、病毒感染等方面有着良好的应用前景, 但目前缺乏高通量筛选 TLR2 激动剂的方法。论文作者介绍了高通量筛选 TLR2 激动剂的方法和新发现的 TLR2 激动剂。

研究人员将携带 IL-8 荧光素酶报告基因的外源性 TLR1、2 和 6 重组质粒转入人结肠上皮 SW620 细胞中, 并在每个细胞培养孔中分别加入人工合成化学文库 (synthetic chemical library, 内含 24 000 种复合物); 然后检测上清液中荧光素酶活性, 共筛选出 217 种 TLR2/1 和 TLR2/6 的激活物。这 217 种激活物继续用 pFLAG-CMV 载体和 IL-8 荧光素酶报告基因系统转入 SW620 细胞再次筛选, 最后鉴定出 16 种 TLR 途径依赖的 TLR2 激活物。筛选出的 TLR2 激活物均为芳香族化合物, 相对分子质量为 300 000 ~ 500 000, 有着 3-羧基苯噻吩-苯胺基相似的核心结构, 且与目前已知的 TLR2 激动剂结构均不相同。

筛选出的 TLR2 激活物大多数通过 TLR2/TLR1 完成活化实验。其中激活物 A、B 和 C 可剂量依赖性活化 TLR2/1, 最低激活质量浓度仅为 10 ng/ml; 与之相比, 目前已知的 TLR2/1 激动剂 Pam3CSK4 的最低激活质量浓度为 10 μg/ml; 且激活物 A、B 和 C 在最高浓度水平时, 也不能激活 TLR2/6。激活物 A 可诱导小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞分泌 TNF-α, 激活物 B、C 则不能。提示激活物 B、C 仅能激活人 TLRs, 具有人的种属特异性。

TLR1 的第 320 位酪氨酸与 TLR2 的第 324 位亮氨酸、323 位酪氨酸之间存在疏水作用, TLR1 的第 321 位谷氨酸与 TLR2 的第 321 位精氨酸之间存在离子相互作用, 对这些氨基酸残基进行点突变, 结果显示, Pam3CSK4 和新筛选的 TLR2 激活物均失去活化作用。TLR1 第 311 位缬氨酸被谷氨酸代替后, Pam3CSK4 的活性仍保持不变, 而激活物 A 的活性骤然下降, 激活物 B、C 的活性也部分减弱。总之, 本研究采用高通量筛选法发现了新的人工合成的小分子 TLR2 激活物, 有利于进一步推进 TLR2 及其激动剂的结构和功能的研究, 同时 TLR2 激活物的衍生物有望显现出较好的药理学活性和临床应用前景。

[吴鉴今 摘译, 徐红梅 审阅. Guan Y, Omueti-Ayoade K, Mutha SK, Hergenrother PJ, Tapping RI. *J Biol Chem*, 2010, 285 (31): 23755-23762.]