

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.01.004

树突状细胞感染 *PSMA/4-1BBL* 基因重组腺病毒后的免疫功能变化

杨明花,王帅,孙海燕,刘晓辉,马楠,隋承光(中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所,辽宁沈阳110001)

[摘要] **目的:**观察复制缺陷型腺病毒介导的人前列腺特异性膜抗原(*prostate specific membrane antigen, PSMA*)基因和肿瘤坏死因子配体超家族成员4-1BB配体(4-1BB ligand, *4-1BBL*)基因体外共同感染的树突状细胞(dendritic cell, DC)的免疫学功能变化。**方法:**Ad-GFP空载体感染未成熟DC,确定最适MOI。将感染的健康志愿者外周血来源DC分为Ad-*PSMA/4-1BBL*-DC组(共感染组)、Ad-*PSMA*-DC组、Ad-*4-1BBL*-DC组、Ad-GFP-DC组以及未感染DC组,荧光倒置显微镜观察DC的形态学变化,流式细胞仪分析CD80、CD83、CD86等表型变化,Western blotting检测DC上*PSMA*和*4-1BBL*蛋白的表达,ELISA法检测各组DC上清的IL-12水平,CCK-8法检测各组DC刺激自体T淋巴细胞增殖能力及对人前列腺癌细胞株LNCap、Du145和22RV的细胞毒作用。**结果:**确定最佳MOI为200。共感染组DC表面CD80、CD83、CD86、HLA-DR共刺激分子均上调,明显高于未感染DC组[(38.72±0.99)%、(44.65±0.77)%、(63.60±0.75)%、(62.25±0.58)% vs (28.27±1.04)%、(28.08±1.16)%、(41.05±1.33)%、(46.87±1.12)%; $P < 0.05$]。共感染组IL-12分泌水平明显高于单个基因重组腺病毒感染组及未感染组[(134.29±2.22) vs (79.51±1.60)、(70.33±1.13)、(69.67±1.43)、(28.88±2.97) pg; $P < 0.05$]。DC:T同一比例下,共感染组刺激自体T细胞增殖能力明显高于单感染组及未感染组($P < 0.05$)。*PSMA/4-1BBL*-DC-CTL对*PSMA*阳性的LNCap细胞的杀伤率明显高于对另两种*PSMA*阴性细胞DU145、22RV的杀伤率($P < 0.05$),也明显高于*PSMA*-DC-CTL组、*4-1BBL*-DC-CTL组的杀伤率($P < 0.05$)。**结论:**Ad-*PSMA/4-1BBL*感染后,DC不但高分泌IL-12,还能刺激和增强肿瘤特异性CTL对*PSMA*阳性前列腺癌细胞的杀伤作用;Ad-*PSMA*和Ad-*4-1BBL*共感染DC较单一感染DC能更有效诱导肿瘤特异性CTL。

[关键词] 树突状细胞;前列腺特异性膜抗原基因;*4-1BBL*基因;细胞毒性T淋巴细胞;前列腺癌

[中图分类号] R730.51;R737.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)01-0022-07

Changes in immune function of dendritic cells infected by recombinant adenovirus containing *PSMA* and *4-1BBL* genes

YANG Ming-hua, WANG Shuai, SUN Hai-yan, LIU Xiao-hui, MA Nan, SUI Cheng-guang (Cancer Research Institute, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To observe changes in immune function of dendritic cells (DCs) infected by recombinant adenovirus containing human prostate specific membrane antigen (*PSMA*) and 4-1BB ligand (*4-1BBL*) genes. **Methods:** The empty Ad-GFP infected immature DCs at different multiplicities of infection (MOI), and the optimal MOI was determined. DCs from peripheral blood of healthy volunteers were infected with recombinant adenoviruses at the optimal MOI. The DCs were allocated into five groups: co-infected group (Ad-*PSMA/4-1BBL*-DC), *PSMA*-infected group (Ad-*PSMA*-DC), *4-1BBL*-infected group (Ad-*4-1BBL*-DC), negative control group (Ad-GFP-DC) and non-infected group. Morphological changes of DCs were observed under a fluorescence microscope; and the phenotype changes of CD80, CD83, CD86 of transfected DCs were detected by FACS, and the expressions of *PSMA* and *4-1BBL* proteins was detected by Western blotting. IL-12 concentrations of DC supernatant in different groups were measured by ELISA. Allogenic T cell proliferations stimulated with DCs in different groups and the cytotoxic effect on prostate cancer cell lines LNCap, Du145 and 22RV were analyzed by CCK-8 assay. **Results:** The optimal MOI was 200. The immunophenotype expressed in the co-infected DC group, such as CD80, CD83, CD86, HLA-DR, was significantly higher than that expressed in the other DC

[基金项目] 辽宁省科技厅科学技术计划项目资助(No.2010225034)。Project supported by the Science and Technology Program from Science and Technology Bureau of Liaoning Province (No.2010225034)

[作者简介] 杨明花(1986-),女,河南灵宝市人,硕士,主要从事分子肿瘤学研究。E-mail:yymhwin2012@163.com

[通信作者] 隋承光(SUI Cheng-guang, corresponding author), E-mail:cgsui1964@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120109.1701.006.html>

groups ($[38.72 \pm 0.99]\%$, $[44.65 \pm 0.77]\%$, $[63.60 \pm 0.75]\%$, $[62.25 \pm 0.58]\%$ vs $[28.27 \pm 1.04]\%$, $[28.08 \pm 1.16]\%$, $[41.05 \pm 1.33]\%$, $[46.87 \pm 1.12]\%$; $P < 0.05$). The secretion of IL-12 in supernatant was greatly higher in the co-infected group than that in single-infected group or non-infected DC group ($[134.29 \pm 2.22]$ vs $[79.51 \pm 1.60]$, $[70.33 \pm 1.13]$, $[69.67 \pm 1.43]$, $[28.88 \pm 2.97]$ pg; $P < 0.05$). At the same rate of DCs to T, the co-infected group had a more significant increase in allogenic T cell proliferation than other single-infected group or non-infected group ($P < 0.05$). The cytotoxic rate of PSMA/4-1BBL-DC-CTL against PSMA positive target LNCap cells was significantly stronger than that against PSMA negative target cells such as DU145 and 22RV cells ($P < 0.05$), and also higher than that of PSMA-DC-CTL and 4-1BBL-DC-CTL ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ad-PSMA/4-1BBL-infected DCs not only own high secretion of IL-12, but also stimulate and enhance the cytotoxic effect of tumor specific CTLs against PSMA positive prostate cancer cells which highly express PSMA protein. In addition, the DCs infected with Ad-PSMA and Ad-4-1BBL induce more effective tumor specific CTLs than single-infected DCs.

[**Key words**] dendritic cell; prostate specific membrane antigen gene (*PSMA*); *4-1BBL* gene; cytotoxic T lymphocyte (CTL); prostate cancer

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(1): 22-28]

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前已知体内功能最强的抗原提呈细胞(antigen present cell, APC)^[1]。人体的抗肿瘤免疫是以T细胞介导的细胞免疫为主^[2]。初始T细胞的完全激活需要双重信号刺激^[3],既需要抗原刺激信号,即T细胞受体(dendritic cell receptor, TCR)与抗原肽-MHC分子复合物结合的第一信号;又必须有非抗原特异的和非MHC限制的共刺激信号相互作用,即T细胞和APC表面多种黏附分子提供的共刺激信号。只有双信号共同刺激才能有效激活特异性的T细胞,完成细胞免疫,杀灭肿瘤细胞^[4]。前列腺特异性膜抗原基因(prostate specific membrane antigen, *PSMA*)在各种类型的前列腺组织中都有表达,但其在前列腺癌和多种实体瘤新形成的血管中(正常组织的新生血管无*PSMA*表达)会过度表达^[5],它已成为前列腺癌免疫治疗的良好靶点。4-1BB ligand(4-1BBL)是新近发现的表达于APC表面的共刺激分子^[6],能与T细胞表面4-1BB分子结合,产生的共刺激信号主要作用于应答晚期,能协同CD28进一步活化T细胞^[7]。本研究中以人*PSMA*和*4-1BBL*基因共同转染DC制备的DC疫苗,既可增强T细胞激活过程中第一信号的作用,又可以加强第二信号的作用,克服现有DC疫苗共刺激分子表达欠佳和细胞易于凋亡的缺陷,使DC的抗原提呈能力大大增强,从而提高DC疫苗的抗肿瘤效应。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

Ad-PSMA、Ad-4-1BBL、Ad-GFP为本室构建,外周血单个核细胞来源于健康志愿者,3种前列腺癌

细胞株LNCap、Du145和22RV均由本实验室保存。RPMI 1640、胎牛血清购自Gibco公司,重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组人白细胞介素-4(rhIL-4)、重组人肿瘤坏死因子 α (rhTNF- α)购自厦门特宝公司,淋巴细胞分离液、PBS购自博士德生物工程有限公司,藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的鼠抗人CD80和CD86、别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)标记的鼠抗人CD83、多甲藻叶绿素蛋白(peridinin chlorophyll protein, PerCP)标记的鼠抗人HLA-DR均购自BD PharMingen公司,总蛋白裂解酶、蛋白酶抑制剂、CCK8检测试剂盒购自碧云天公司,三色预染蛋白Marker购自MBI公司,兔抗人PSMA、4-1BBL单克隆抗体购自Epitomics公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、兔抗人 β -actin多克隆抗体、ECL发光试剂盒购自康为世纪公司,PE/7-AAD细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司,ELISA法检测IL-12试剂盒购自达科为生物科技有限公司。

1.2 外周血来源的DC和CTL的体外诱导培养

血细胞分离机分离和富集健康志愿者外周血单个核细胞, Ficoll淋巴细胞分离液密度梯度离心初步纯化单个核细胞, PBS洗涤2遍, 细胞计数并以锥虫蓝染液检测细胞活力。用含10%血清的RPMI 1640培养基重悬细胞, 调整密度至 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 接种于 25 cm^2 培养瓶中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下贴壁2 h。将未贴壁细胞吸至另一培养瓶中用于CTL细胞的体外诱导; 贴壁细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养, 并加入细胞因子GM-CSF 100 ng/ml、IL-4 50 ng/ml, 每3 d半量换液并补加细胞因子, 培养第1、5天倒置显微镜

观察细胞生长情况及形态变化;诱导 6 d, 加入 TNF- α 1 000 U/ml 刺激 DC 成熟, 7~8 d 可收获成熟 DC, 荧光显微镜下观察细胞变化。

1.3 流式细胞术检测不同 MOI Ad-GFP 质粒感染未成熟 DC 的感染效率和 DC 的凋亡率

轻吹收集培养 5 d 的半贴壁未成熟 DC, 将其接种于 24 孔板, 每孔 $5 \times 10^5/0.2$ ml, 培养基为无血清 RPMI 1640 0.2 ml; 调整 Ad-GFP 病毒液活性浓度至 2×10^7 PFU/ μ l。将未成熟 DC 分成 5 组, 每组 3 个复孔, 分别按 MOI 为 50、100、200、300、400 加入相应的病毒量, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h, 期间每隔 15 min 摇晃培养板, 以使病毒均匀感染。2 h 后加入含 10% FBS、hGM-CSF(100 ng/ml)、hIL-4(50 ng/ml) 的 RPMI 1640 培养基, 继续在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。分别于 12、24、48 h 在倒置荧光显微镜下观察同一 MOI 下绿色荧光蛋白的表达情况, 计算感染效率; 同时在感染 48 h 后用流式细胞仪检测不同 MOI 下 GFP 阳性率。收集不同 MOI 作用下的 DC, 每组约 5×10^5 个细胞, 分别加入 5 μ l 7-AAD 染液、450 μ l 结合缓冲液、1 μ l Annexin V-PE 染液, 流式细胞仪检测不同 MOI 下 DC 的凋亡率, 寻找最适 MOI。

1.4 Western blotting 法检测 PSMA、4-1BBL 蛋白在 DC 的表达

收集培养 5 d 的半贴壁未成熟 DC, 制成单细胞悬液。按最适 MOI, 加入相应的病毒量, 分成 4 组: Ad-PSMA/4-1BBL-DC 组、Ad-PSMA-DC 组、Ad-4-1BBL-DC 组、Ad-GFP-DC 组。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。然后用 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂裂解各组细胞, 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 5 min 后, 将上清液转移至干净的 Eppendorf 管中, -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。配制 10% 的分离胶和 5% 浓缩胶, 上样进行电泳。以湿转法将电泳后的蛋白质从凝胶转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温摇晃封闭 2 h, TBST 中按 1:2 000 和 1:1 000 加入兔抗人 PSMA 和 4-1BBL 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 洗膜, 10 min/次, 共 3 次。然后用 TBST 按 1:2 500 稀释酶标二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。于暗室中以 ECL 化学发光法发光显色。

1.5 直接免疫荧光法测定未感染 DC 与腺病毒感染 DC 的表型

选用 PE 标记的 CD80 和 CD86、PerCP 标记的 HLA-DR 和 APC 标记的 CD83, 分别收集 PBMC 来源的诱导第 5 天(未成熟 DC)、诱导第 8 天(成熟

DC)以及腺病毒感染(Ad-PSMA/4-1BBL-DC、Ad-PSMA-DC、Ad-4-1BBL-DC、Ad-GFP-DC)后 48 h 的 DC, PBS 洗 2 次(1 000 \times g 离心 5 min), 调整细胞密度至 1×10^6 /ml, 每个 EP 管中加入约 1×10^6 个细胞(体积为 1 ml), 分别加入荧光抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, PBS 洗 2 遍, 0.5 ml PBS 重悬细胞, 将细胞移入专用流式细胞仪离心管中进行表型分析。

1.6 ELISA 法测定各组 DC 培养上清中 IL-12 的水平

按最适 MOI 加入相应的病毒量感染 DC, 分成 5 组: Ad-PSMA/4-1BBL-DC 组、Ad-PSMA-DC 组、Ad-4-1BBL-DC 组、Ad-GFP-DC 组和普通 DC 组, 感染 48 h 后取各组细胞培养上清, 应用 ELISA 试剂盒检测各组的 IL-12 分泌量。

1.7 CCK-8 法检测不同感染组 DC 刺激 T 淋巴细胞增殖及其对前列腺癌细胞的细胞毒作用

1.7.1 混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR) 收集培养 5 d 的半贴壁未成熟 DC, 按最适 MOI 加入相应的病毒量, 分成 5 组: Ad-PSMA/4-1BBL-DC 组、Ad-PSMA-DC 组、Ad-4-1BBL-DC 组、Ad-GFP-DC 组和普通 DC 组; 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 作为刺激细胞备用。使用前加入终质量浓度为 10 g/ml 的丝裂霉素 37 $^{\circ}$ C、30 min 孵育, 再用 1640 不全培养液洗 3 遍, 调整细胞密度至 1×10^6 /ml。单个核细胞悬浮于含 10% 胎牛血清 1640 培养液中, 每 3 d 补加新鲜培养基, 并补加 IL-2, 调整细胞密度至 1×10^6 /ml, 作为反应细胞备用。将上述制备好的 5 组刺激细胞与反应细胞分别按 1:10、1:20、1:40 比例于 96 孔板中混合培养, 同时设单纯刺激细胞和反应细胞对照组, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 96 h。然后按 CCK-8 试剂盒说明, 每孔加入反应试剂 20 μ l, 反应 4 h 后用酶联免疫分析仪测定每孔光密度值, 计算刺激指数(stimulation index, SI), 以 SI 评价不同感染组 DC 疫苗对 T 细胞增殖的影响, 另外可以确定 DC 与 T 细胞共培养的最佳细胞比例。SI = 实验组 D 值/(反应细胞对照组 D 值 + 刺激细胞对照组 D 值)。

1.7.2 细胞毒作用检测 按上述方法制备刺激细胞(各组 DC 疫苗)和反应细胞(CTL 细胞), 并按共培养的最佳比例将其共同培养, 用完全培养基悬浮细胞密度至 2×10^6 /ml, 加入 IL-2(500 U/ml)、GM-CSF(100 ng/ml)、IL-4(50 ng/ml), 每 3 d 补加细胞因子及培养液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 5 d。取对数生长期的 3 种前列腺癌细胞 LNCap、Du145 和 22RV 作为靶细胞, 以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板, 待细胞贴壁 24 h 后加入不同效靶比(10:1,

20:1,40:1)的 DC-CTL 细胞(5组)以及 CTL 细胞对照组,继续培养 24 h,加入 CCK8 溶液 20 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,酶联免疫分析仪检测每孔 D 值,按照公式计算杀伤率。杀伤率(%) = $[1 - (\text{实验组 } D - \text{单独效应细胞组 } D) / \text{单独靶细胞组 } D] \times 100\%$ 。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数的多重比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养 DC 在荧光显微镜下的形态

在荧光倒置显微镜(图 1)下,可见培养 1 d 的细胞贴壁生长,呈均匀分布的细胞集落,细胞个小,形状不规则,边缘可见细小伪足,无树枝样突起。培养 5 d 时,较多细胞呈半悬浮生长,大部分细胞呈梭型及不规则形状,细胞体积较以前增大,细胞分别聚集生长,胞体增大,细胞周边出现菌幕样突起。Ad-GFP 感染 DC 后培养第 7 天时,细胞体积较前增大,周边刺突十分明显,突起较粗大,分支较明显,细胞形态似星形或梭形,细胞核明显,细胞聚集生长,形态上与普通培养 7 d 的 DC 无差别。

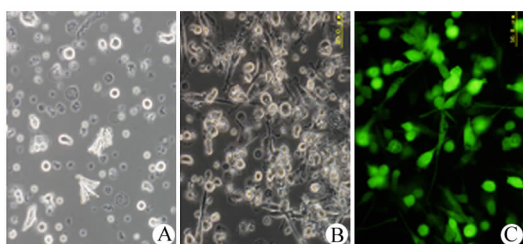


图 1 感染 Ad-DFP 前后 DC 的形态($\times 400$)

Fig.1 Morphology of DCs before and after Ad-DFP infection($\times 400$)

A: 1 d before infection; B: 5 d before infection; C: 7 d after infection

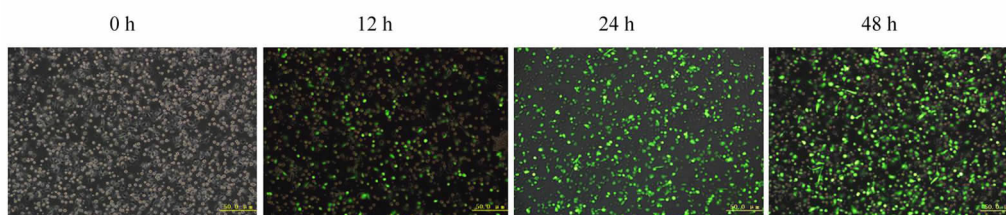


图 3 荧光显微镜观察不同时间点 Ad-GFP 感染 DC 的效率($\times 100$)

Fig.3 Infection efficiency of Ad-GFP at different time points detected by fluorescence microscopy ($\times 100$)

2.2 Ad-GFP 空病毒质粒不同 MOI 感染未成熟 DC 的感染效率和活性

流式细胞术检测结果(图 2)显示,当 MOI 为 200 时,Ad-GFP 感染效率最高,可达 $(89.48 \pm 1.13)\%$,与 MOI 50、MOI 100、MOI 300、MOI 400 组之间差异有统计学意义($P < 0.05$);MOI 200 时 DC 的凋亡率仅为 $(7.24 \pm 0.14)\%$,比 MOI 50、MOI 300、MOI 400 组 DC 的凋亡率均低($P < 0.05$),故确定最适 MOI 为 200。固定 MOI 为 200,分别于感染后 12、24、48 h 荧光倒置显微镜下观察 GFP 阳性表达情况。结果(图 3)显示,感染后 48 h 时的 GFP 表达最高,可达 85% 以上。

2.3 感染后 DC 中 PSMA 和 4-1BBL 蛋白的表达

收集 Ad-PSMA/4-1BBL、Ad-PSMA、Ad-4-1BBL、Ad-GFP 感染组 DC 的蛋白,Western blotting 法检测结果(图 4)显示,感染 Ad-PSMA 以及共感染组 DC 中能够有效表达 PSMA,感染 Ad-4-1BBL 以及共感染组 DC 中能够有效表达 4-1BBL,而 Ad-GFP 感染组的 DC 不表达此两种蛋白。

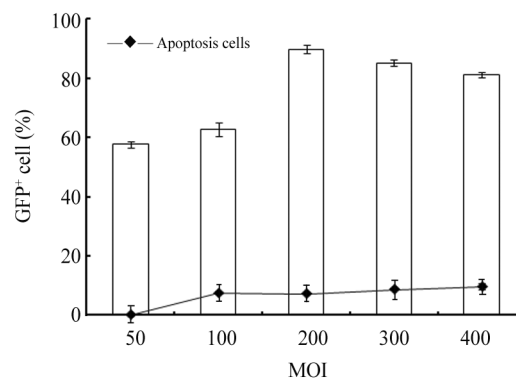


图 2 FCM 检测不同 MOI 下 Ad-GFP 感染 DC 的效率及 DC 的凋亡率

Fig.2 Infection efficiency of Ad-GFP on DCs and apoptosis rate of DCs at various MOI detected by FCM

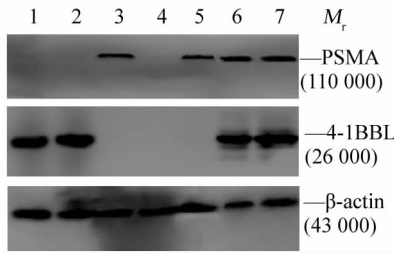


图4 Western blotting 验证人 PSMA、4-1BBL 在 DC 的表达

Fig.4 Identification of human PSMA and 4-1BBL expressions on DCs by Western blotting

1,2: Ad-GFP-4-1BBL group;
3,5: Ad-GFP-PSMA group;
4: Ad-GFP group; 6, 7: Ad-PSMA/4-1BBL group

2.4 培养 5 d 的未成熟 DC 与腺病毒感染后各组 DC 表面共刺激分子的表达

流式检测结果(表1)显示,培养 5 d 的未成熟 DC 表达很低的表面共刺激分子和 MHC-II 类分子;培养 8 d 的腺病毒感染和未感染组 DC 均具有成熟 DC 的特征,而且腺病毒感染组 DC(Ad-PSMA/4-1BBL-DC 组、Ad-PSMA-DC 组、Ad-4-1BBL-DC 组、Ad-GFP-DC 组)表面的 CD80、CD83、CD86、HLA-DR 分子表达均上调,显著高于未感染 DC ($P < 0.05$)。共感染组的 CD83、HLA-DR 分子表达明显高于其他感染组和普通 DC 组 ($P < 0.05$),该组的 CD80、CD86 表达量虽高于 Ad-4-1BBL-DC 组,但无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明,重组腺病毒介导 PSMA 和 4-1BBL 转染 DC 后能明显促进后者的成熟,并上调各共刺激分子的表达,以共感染组的作用最强。

表1 5 d-DC、8 d-DC 组及各感染组 DC 的表型分析(%)

Tab.1 Phenotype analysis of various infected DCs, 5 d-DCs and 8 d-DCs

Group	CD80	CD83	CD86	HLA-DR
5 d-DC	22.95 ± 3.34	18.93 ± 1.65	29.64 ± 0.83	29.17 ± 0.81
8 d-DC	28.27 ± 1.04*	28.08 ± 1.16*	41.05 ± 1.33*	46.87 ± 1.12*
Ad-GFP-DC	29.68 ± 0.61	32.62 ± 1.07	50.70 ± 0.83 [△]	49.29 ± 0.53
Ad-PSMA-DC	33.29 ± 1.13 [△]	36.02 ± 0.71 [△]	53.30 ± 0.86 [△]	53.00 ± 1.62 [△]
Ad-4-1BBL-DC	36.35 ± 0.50 [△]	37.45 ± 0.69 [△]	63.04 ± 0.77 ^{△△}	54.20 ± 0.71 [△]
Ad-PSMA/4-1BBL-DC	38.72 ± 0.99 [△]	44.65 ± 0.77 ^{△▲}	63.60 ± 0.75 ^{△△}	62.25 ± 0.58 ^{△▲}

* $P < 0.05$ vs 5 d-DC group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs 8 d-DC group; [▲] $P < 0.05$ vs 8 d-DC, Ad-PSMA-DC, Ad-4-1BBL-DC, Ad-GFP-DC respectively

2.5 感染和非感染的 DC 培养上清中 IL-12 的含量

取感染 48 h 后成熟的各组 DC 以及未感染 DC 的培养上清,ELISA 法测定结果显示,各个感染组 DC 培养上清中的 IL-12 含量均高于未感染组 ($P < 0.05$),Ad-PSMA/4-1BBL-DC 组 IL-12 含量又高于各个单感染组[(134.29 ± 2.22) vs (79.51 ± 1.60)、(70.33 ± 1.13)、(69.67 ± 1.43)、(28.88 ± 2.97)pg, $P < 0.05$]。结果表明,重组腺病毒介导 PSMA 和 4-1BBL 转染 DC 后使后者分泌 IL-12 的能力大大增强,且以 Ad-PSMA/4-1BBL-DC 组增强最为明显。

2.6 病毒感染对 T 淋巴细胞增殖的影响

经 CCK8 法检测结果显示,各感染组 DC 均能刺激自体 T 淋巴细胞增殖,在 DC:T 同一比例下,共感染组刺激自体 T 细胞增殖能力明显高于其他感染组及未感染组 ($P < 0.05$),而其他各单感染组间则无显著差异 ($P > 0.05$)。另外,各感染组 DC 与 T

细胞比例为 1:20 时刺激 T 细胞的增殖能力略强于其他比例,但无统计学意义(图 5)。

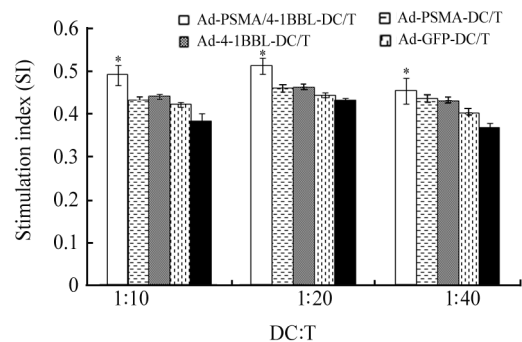


图5 重组腺病毒感染对 T 淋巴细胞增殖的影响
Fig.5 Effect of recombinant adenovirus infection on proliferation of T lymphocytes

* $P < 0.05$ vs Ad-PSMA-DC/T, Ad-4-1BBL-DC/T, Ad-GFP-DC/T, DCs/T respectively

2.7 重组腺病毒感染 DC 诱导的 CTL 对胰腺癌细胞的杀伤作用

CCK8 检测结果(表 2)显示,经病毒感染 DC 诱导的 CTL(除 Ad-GFP-DC 组)对 3 种前列腺癌细胞的杀伤率均明显高于普通 DC 刺激组以及单独 CTL 组;各组效靶比为 40:1 时,杀伤作用均最强。在同一效靶比条件下,Ad-PSMA/4-1BBL-DC-CTL、Ad-PSMA-DC-CTL、Ad-4-1BBL-DC-CTL 组对 PSMA 高表达的 LNCap 细胞的杀伤率明显高于对另外两种 PSMA 阴性的前列腺癌细胞 Du145 和 22RV 的杀伤率

($P < 0.05$)。另外,Ad-PSMA/4-1BBL-DC-CTL 对 3 种前列腺癌细胞的杀伤率显著强于 Ad-PSMA-DC-CTL、Ad-4-1BBL-DC-CTL($P < 0.05$);而 Ad-PSMA-DC-CTL 和 Ad-4-1BBL-DC-CTL 组之间的杀伤率则无显著差异($P > 0.05$),但与 Ad-GFP-DC-CTL、普通 DC-CTL 和单独 CTL 组杀伤率差异显著($P < 0.05$)。结果表明,PSMA/4-1BBL 两种肿瘤相关抗原腺病毒感染 DC 较以单一肿瘤相关抗原感染,可以更有效地诱导肿瘤特异性 CTL,增强其对 PSMA 阳性表达的前列腺癌 LNCap 细胞的杀伤作用。

表 2 重组腺病毒感染后 DC 诱导的细胞毒性 T 淋巴细胞对 3 种前列腺癌细胞的杀伤能力(%)
Tab.2 Cytotoxic ability of cytotoxicity T lymphocytes induced by recombinant adenovirus infected DCs on three kinds of prostate cancer cells(%)

Target cell	E:T	Ad-PSMA/4-1 BBL-DC-CTL	Ad-PSMA- DC-CTL	Ad-4-1BBL- DC-CTL	Ad-GFP-DC-CTL	DC-CTL	CTL
LNCap	10:1	75.24 ± 0.66 ^{△*} ▲	72.18 ± 0.43 ^{△*}	69.52 ± 1.63 ^{△*}	64.28 ± 1.63	63.96 ± 1.47 [*]	29.85 ± 0.38
	20:1	81.78 ± 1.55 ^{△*}	80.87 ± 1.50 ^{△*}	80.56 ± 1.43 ^{△*}	76.92 ± 0.92 [*]	74.51 ± 0.85 [*]	33.46 ± 1.38
	40:1	92.56 ± 0.56 ^{△*} ▲	89.76 ± 0.44 ^{△*}	89.70 ± 1.21 ^{△*}	80.97 ± 1.12	78.75 ± 0.99 [*]	37.98 ± 0.49
DU145	10:1	68.71 ± 0.63 [△]	66.61 ± 0.95 [△]	65.24 ± 2.04 [△]	63.22 ± 1.86	60.83 ± 1.03	35.81 ± 0.76
	20:1	78.23 ± 1.68 ^{△*} ▲	74.49 ± 1.10 [△]	73.23 ± 0.33 [△]	66.96 ± 0.82	64.73 ± 1.68	40.90 ± 1.10
	40:1	85.52 ± 0.82 ^{△*} ▲	80.21 ± 1.20 [△]	79.83 ± 1.07 [△]	76.66 ± 0.37	73.52 ± 1.29	51.84 ± 2.24
22RV	10:1	68.24 ± 1.24 [△]	68.16 ± 0.82 [△]	67.89 ± 0.94 [△]	58.81 ± 0.48	56.34 ± 1.23	37.90 ± 1.39
	20:1	77.59 ± 0.58 [△]	76.15 ± 0.71 [△]	77.64 ± 0.41 [△]	71.52 ± 0.74	71.87 ± 1.75	51.08 ± 0.86
	40:1	89.63 ± 0.93 ^{△*} ▲	83.50 ± 0.85 [△]	83.14 ± 1.52 [△]	79.66 ± 0.64	74.50 ± 1.45	62.35 ± 0.97

[△] $P < 0.05$ vs Ad-GFP-DC or DC-CTL or CTL group; ^{*} $P < 0.05$ vs DU145 cells or 22RV cells (at the same E:T);

▲ $P < 0.05$ vs Ad-PSMA-DC-CTL or Ad-4-1BBL-DC-CTL group

3 讨论

人类恶性肿瘤的免疫原性较低,以及未找到特异性抗原等原因导致 DC 肿瘤疫苗的效果不佳^[8],另外,患者自身 DC 数量少及功能缺陷,无法有效提呈抗原。PSMA 是一种比前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)和前列腺酸性磷酸酶(prostatic acid phosphatase, PAP)更加敏感和特异的前列腺癌标记物,它在前列腺癌组织中表达的高度特异性使其成为靶向治疗最好的靶标之一^[9]。用 PSMA 基因修饰 DC 可以使 PSMA 抗原长久地表达,产生对 CTL 的持续刺激作用,并且能够提供多种内源性抗原肽,通过与内源表达蛋白相似的途径提呈 MHC-I 类分子。但是,前列腺癌细胞能通过分泌其他某些细胞因子,如 IL-10、TGF- β 等,抑制 DC 共刺

激分子的表达,从而抑制对特异性 CTL 的激活,这些因素极大地影响了 DC 疫苗的疗效。如何增强 DC 功能,抵抗前列腺癌微环境作用成为 DC 疫苗成败的关键^[10-13]。

4-1BBL 是新近发现的表达于抗原提呈细胞表面的共刺激分子,属于 TNF 配体超家族成员,能与 T 细胞表面 4-1BB 分子结合,产生的共刺激信号主要作用于应答晚期,能协同 CD28 进一步活化 T 细胞,且对记忆性 CD8⁺ T 细胞群的存活和应答是必需的。该对共刺激分子在免疫应答、免疫调节以及抗肿瘤、病毒感染和移植排斥等方面都起着重要的作用^[14-15]。Wiethe 等^[16]发现,用重组腺病毒介导的 E7 和 4-1BBL 基因共同感染 DC,可提高 DC 诱导的 CTL 对 E7 高表达的肿瘤细胞的特异性杀伤。本研究中将 PSMA 基因联合 4-1BBL 基因共同修饰 DC,

以达到既能增强 CTL 对肿瘤细胞或组织的靶向性攻击,又能克服现有 DC 疫苗共刺激分子表达欠佳和细胞易于凋亡的缺陷。

DC 是终末期细胞,用脂质体、磷酸钙、电转移等非病毒载体方法感染外源基因效率都很低 (<1%)。有人用逆转录病毒载体介导外源基因感染 DC,效率也很低,只有 10%~30%,且逆转录病毒介导的基因会整合入细胞染色体中^[17]。本实验利用 E1、E3 缺陷型重组腺病毒介导 *PSMA*、*4-1BBL* 基因感染未成熟 DC,在 MOI 为 200 时,有 85% 以上的 DC 能被感染^[18]。用腺病毒作为载体转导外周血 DC 比其他来源 DC 有更高的感染效率^[19]。当然,该系统也有一定的缺陷,如瞬时感染作用时间较短,病毒载体的免疫原性等问题还有待解决。

本研究中用复制缺陷性重组腺病毒介导 *PSMA* 和 *4-1BBL* 体外共同感染 DC,从形态、分子表型、免疫学功能等方面分析其对 DC 的影响。结果发现,感染后 DC 可以成功表达 *PSMA* 和 *4-1BBL* 两种抗原,可以上调 DC 表面 CD80、CD86 等共刺激分子的表达,明显促进 DC 的成熟,同时又提高了 DC 分泌 IL-12 的水平,大大提高了 DC 的抗原提呈能力。病毒感染 DC 较普通 DC 刺激 T 淋巴细胞增殖能力增强,而且病毒感染 DC 诱导下的 CTL 对 *PSMA* 高表达的 LNCap 细胞具有明显的杀伤活性,而对低表达 *PSMA* 蛋白的 DU145,22RV 细胞杀伤率虽较普通 DC-CTL 有所提高,但不如对 LNCap 细胞杀伤率提高显著;在不同感染组刺激下,共感染组 DC 诱导的 CTL 活性最强。

[参 考 文 献]

- [1] Srivastava RM, Khar A. Dendritic cells and their receptors in anti-tumor immune response [J]. *Curr Mol Med*, 2009, 9(6): 708-724.
- [2] Nencioni A, Grünebach F, Schmidt SM, et al. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, 65(3): 191-199.
- [3] DeFina R, Christopher K, He H, et al. Analysis of costimulation by 4-1BBL, CD40L and B7 in graft rejection by gene expression profiles [J]. *J Mol Med*, 2003, 81 (10): 655-663.
- [4] Seo SK, Park HY, Choi JH, et al. Blocking 4-1BB/4-1BB ligand interactions prevents herpetic stromal keratitis [J]. *J Immunol*, 2003, 171 (2): 576-583.
- [5] Marchal C, Redondo M, Padilla M, et al. Expression of prostate specific membrane antigen (PSMA) in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia [J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19(3): 715-800.
- [6] Watts TH. Tnf/ Tnfr family members in costimulation of T cell responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23(1): 23-68.
- [7] Dawicki W, Watts TH. Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell response *in vivo* [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34 (3): 743-751.
- [8] Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2 (4): 293-299.
- [9] Wang Wei, Mo Zengnan. Advances in prostate specific membrane antigen targeted therapies for prostate cancer [J]. *Nat J Androl*, 2010, 16(6): 547-551.
- [10] Arlen PM, Gulley JL. Therapeutic vaccines for prostate cancer: A review of clinical data [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2005, 6 (6): 592-596.
- [11] Pirtskhalashvili G, Shurin GV, Gambotto A, et al. Transduction of dendritic cells with Bcl-xL increases their resistance to prostate cancer-induced apoptosis and antitumor effect in mice [J]. *J Immunol*, 2000, 165(4): 956-1964.
- [12] Kobie JJ, Wu RS, Kurt RA, et al. Transforming growth factor beta inhibits the antigen presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(8): 1860-1864.
- [13] Moon G, Park JC, Chae YK, et al. Current status of experimental therapeutics for prostate cancer [J]. *Cancer Lett*, 2008, 266(2): 116-134.
- [14] 王群. 4-1BBL 研究进展 [J]. *国外医学: 免疫学分册*, 2003, 26(6): 304-307.
- [15] Lynch DH. The promise of 4-1BB (CD137)-mediated immunomodulation and the immunotherapy of cancer [J]. *Immunol Rev*, 2008, 222(3): 277-286.
- [16] Wiethel C, Dittmar K, Doan T, et al. Provision of 4-1BB ligand enhances effector and memory CTL responses generated by immunization with dendritic cells expressing a human tumor-associated antigen [J]. *J Immunol*, 2003, 170(6): 2912-2922.
- [17] Rajesh K, Schabowsky S, Srivastava AK, et al. 4-1BB ligand as an effective multifunctional immunomodulator and antigen delivery vehicle for the development of therapeutic cancer vaccines [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(10): 3945-3954.
- [18] Shen H, Weng XD, Liu XH, et al. The change and clinical significance of recombinant adenovirus mediated mouse h-PSMA and 4-1BBL gene transfection of dendritic cells [J]. *J Clin Urol*, 2010, 25(3): 230-234.
- [19] Villaret D, Glisson B, Kenady D, et al. A multicenter phase II study of tgDC-EIA for the intratumoral treatment of patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Head Neck*, 2002, 24(7): 661-669.

[收稿日期] 2011-09-19

[修回日期] 2011-12-22

[本文编辑] 韩丹