

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.01.006

· 专题报道 ·

## EPHA2 基因腺病毒感染树突状细胞诱导 CTL 对胶质瘤细胞的杀伤作用

陈宏颀<sup>1</sup>, 袁邦清<sup>2</sup>, 王守森<sup>1</sup>, 郑兆聪<sup>1</sup>, 高进喜<sup>1</sup>, 王如密<sup>1</sup>(1. 南京军区福州总医院 神经外科, 福建 福州 350000; 2. 南京军区福州总医院 476 医院 神经外科, 福建 福州 350002)

**[摘要]** **目的:**研究 EPHA2 基因修饰的树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)对 U251 胶质瘤细胞的杀伤效应,为胶质瘤的免疫治疗提供新的方法。**方法:**将重组 EPHA2 腺病毒 rAd-EPHA2 感染 HLA-A2 阳性的人外周血来源的 DC,制备 EPHA2 基因修饰的 DC 疫苗,Western blotting 和 FACS 方法检测感染后 DC 的 EPHA 表达。以 DC 疫苗体外刺激 HLA-A2 阳性的单个核细胞,酶联免疫斑点实验(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)和标准<sup>51</sup>Cr 释放实验分别检测 DC 疫苗所诱导的 CTL 活性和对 HLA-A2 阳性的 U251 细胞的杀伤作用(另设 rAd-LacZ 感染的 DC 组和 PBS 组作为对照)。**结果:**成功制备了 EPHA2 基因修饰的 DC 疫苗,其可有效表达 EPHA2 蛋白。与感染 rAd-LacZ 的 DC 和 PBS 组相比,感染 rAd-EPHA2 的 DC 疫苗能有效激发 CTL 活性([187 ± 21] vs [12 ± 4], [18 ± 5]个,  $P < 0.01$ );所诱导的 CTL 对胶质瘤 U251 细胞有明显的杀伤效应([45.7 ± 6.8]% vs [7.1 ± 4.5]%,  $P < 0.01$ ),对自身淋巴细胞没有杀伤效应。**结论:**EPHA2 基因修饰的 DC 疫苗能有效激发 CTL 活性,并对胶质瘤 U251 细胞有明显的杀伤活性。

**[关键词]** EPHA2 基因;树突状细胞;胶质瘤

**[中图分类号]** R739.4; R730.51

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)01-0035-05

## Cytotoxic effect of CTLs elicited by dendritic cells infected with adenovirus containing EPHA2 gene on glioma cells

CHEN Hong-jie<sup>1</sup>, YUAN Bang-qing<sup>2</sup>, WANG Shou-seng<sup>1</sup>, ZHENG Zhao-cong<sup>1</sup>, GAO Jin-xi<sup>1</sup>, WANG Ru-mi<sup>1</sup>(1. Department of Neurosurgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian, China; 2. Department of Neurosurgery, No. 476 Hospital of Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350002, Fujian, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the cytotoxic effect of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) induced by dendritic cells (DCs) modified by EPHA2 gene on U251 glioma cells, and to provide new ways for glioma immune therapy. **Methods:** DCs originated from the HLA-A2<sup>+</sup> PBMCs were infected with recombinant adenovirus containing EPHA2 full length cDNA, and the DC vaccine modified by EPHA2 gene was prepared. The expression of EPHA on DCs was detected by Western blotting and FACS. HLA-A2<sup>+</sup> PBMCs were stimulated by the DC vaccine *in vitro*. The specificity CTL activity induced by rAd-EPHA2-DCs and the cytotoxicity on HLA-A2<sup>+</sup> U251 glioma cells were detected by enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) and standard <sup>51</sup>Cr release experiment. **Results:** The DC vaccine modified by EPHA2 gene was successfully prepared, and EPHA2 protein was effectively expressed. Compared to DCs infected with rAd-LacZ and PBS groups, DCs infected with rAd-EPHA2 stimulated CTL activity effectively ([187 ± 21] vs [12 ± 4], [18 ± 5];  $P < 0.01$ ) and the CTLs induced by rAd-EPHA2-DCs produced cytotoxicity effect on U251 cells obviously ([45.7 ± 6.8]% vs [7.1 ± 4.5]%,  $P < 0.01$ ), and did not cause the cytotoxicity of its own lymphocytes. **Conclusion:** The DC vaccine modified by EPHA2 gene can stimulate the specificity CTL response effectively, and can cause cytotoxicity on glioma U251 cells obviously.

**[Key words]** EPHA2 gene; dendritic cell; glioma

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(1): 35-39]

**[基金项目]** 福建省自然科学基金资助项目(No. 2006J0373)。Project supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2006J0373)

**[作者简介]** 陈宏颀(1970-),男,福建省福州市人,副主任医师,主要从事胶质瘤治疗的基础和临床研究

**[通信作者]** 陈宏颀(CHEN Hong-jie, corresponding author), E-mail: hongjiechen99@163.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120109.1659.005.html>

胶质细胞瘤的生长特点为浸润性生长,与正常脑组织无明显界限,瘤体生长快、病程短。目前国内外对于胶质瘤的治疗普遍为手术、放疗和化疗等。由于手术切除的不彻底性、射线易引起脑组织放射性坏死、化疗药物受阻于血脑屏障及药物的毒性作用等原因,胶质细胞瘤的治疗没有明显的进展<sup>[1-3]</sup>。受体型酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)是一类肿瘤候选生物标记分子,促红细胞生成素产生肝细胞受体(erythropoietin producing hepatoma cell line receptor, EPH)家族是 RTK 中最大的亚家族。EPHA2 为 A 型 EPH 分子家族的重要成员,在神经元发育、细胞侵袭和黏附调控等方面具有重要作用<sup>[4-6]</sup>。本研究拟将携带 *EPHA2* 基因的腺病毒感染树突状细胞(dendritic cell, DC),制备 *EPHA2* 特异的 DC 疫苗,观察 *EPHA2*-DC 疫苗诱导的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)对胶质瘤 U251 细胞的杀伤作用,为胶质瘤的免疫治疗提供新的策略。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

携带 *EPHA2* 的腺病毒和对照 *LacZ* 腺病毒由本实验室表达并纯化。将 *EPHA2* 的 cDNA 片段插入腺病毒穿梭载体 pShuttle-CMV 的 CMV 启动子下游,并与腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 在大肠杆菌 BJ5183 中进行胞内同源重组,再将重组腺病毒载体在 293 细胞中包装成重组腺病毒 rAd-EPHA2。HLA-A2 阳性的胶质瘤 U251 细胞由本实验室保存。RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司,酶联免疫斑点实验(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)试剂盒购于法国 Diaclone 公司,Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> 购自北京同位素公司,GM-CSF、IL-4 和 LPS 购自美国 Minneapolis 公司。

### 1.2 DC 的体外培养

取 HLA-A2 阳性的健康人外周血,分离单个核细胞,加入含 GM-CSF、IL-4(终活性浓度均为 1 000 U/ml,)的 RPMI 1640 完全培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养,第 5 天加入 LPS(终质量浓度为 100 ng/ml)以诱导扩增 DC。DC 诱导成熟后,用光镜观察 DC 的形态。

### 1.3 *EPHA2* 腺病毒对 DC 的体外感染

将 DC 置于 6 孔培养板中,每孔 5 × 10<sup>6</sup> 个细胞,以最佳 MOI 将重组 *EPHA2* 腺病毒 rAd-EPHA2 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度下感染成熟 DC,4 h 后加入新鲜 RPMI 1640 完全培养基,继续培养 48 h,以 30

Gy 的 γ 射线照射。感染前后 DC 中 EPHA2 蛋白的表达变化采用 Western blotting 和 FACS 方法检测。

### 1.4 体外刺激实验诱导 CTL 的活化

分别用感染 rAd-EPHA2、rAd-LacZ 的 DC 及 PBS 对照 DC 共 3 组与 HLA-A2 阳性的健康人外周血单个核细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度下进行混合培养,共 3 周,每周补充终活性浓度为 1 000 U/ml 的 IL-2。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基调节细胞密度至 1 × 10<sup>6</sup>/ml,作为 CTL 效应细胞备用。

### 1.5 ELISPOT 法检测 CTL 的活化

参照使用说明书进行检测。调整 CTL 至 1 × 10<sup>6</sup>/ml,于 96 孔培养板中每孔加入 100 μl CTL 悬液,各设 3 个复孔,温育 48 h。空白对照不加 CTL 温育。以 ELISPOT 分析仪检测色斑数目,间接反映 CTL 的活化。

### 1.6 靶细胞的制备与标记

胶质瘤 U251 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基体外培养,收集细胞,离心洗涤 2 次后,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞密度至 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml,取 1 ml,加入 100 μl Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>,37 °C 温育 90 min,600 × g 离心 6 min,洗涤 3 次,调整密度至 1 × 10<sup>5</sup>/ml。

### 1.7 细胞毒性实验检测 DC 疫苗诱导 CTL 的杀伤效应

采用标准<sup>51</sup>Cr 释放试验。将效应细胞与靶细胞按照效靶比(E/T)100:1、50:1、25:1 加入到 96 孔 U 型板中,每组效靶比设 3 个复孔。最大释放组和最小释放组分别加 100 μl 2 mol/L HCl 和 100 μl RPMI 1640 培养基。将平板于 500 r/min 振荡 30 s 后,37 °C 温育 4 h。1 000 × g 离心 10 min,取上清液 100 μl 移入一次性塑料试管中,用 γ 计数器分别测定各孔<sup>51</sup>Cr 释放量。<sup>51</sup>Cr 释放率(%) = [(实验组 cpm - 最小释放 cpm)/(最大释放 cpm - 最小释放 cpm)] × 100 %。

### 1.8 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 统计软件对数据进行方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 细胞因子诱导后 DC 的形态学特点

光镜观察 DC 的形态(图 1),培养 7 d 时,细胞呈不规则形,并形成大量的毛刺突出,结果显示,经细胞因子诱导后,DC 诱导成熟。

## 2.2 rAd-EPHA2感染后 DC 疫苗 EPHA2 蛋白的表达

在 DC 感染 4 h 后,以 Western blotting 和 FACS 方法检测 EPHA2 的表达,分析重组腺病毒 rAd-EPHA2 的感染效果。Western blotting 结果(图 2)显示,rAd-EPHA2 可介导 DC 有效表达 EPHA2,阳性对照 U251 细胞也出现条带,而阴性对照则未出现条带。FACS 结果(图 3)也证实,rAd-EPHA2 可介导 DC 有效表达 EPHA2。

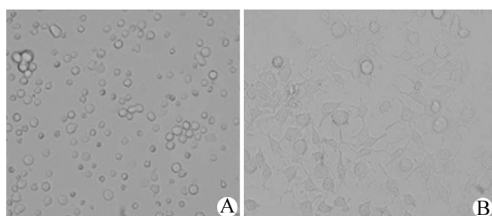


图 1 细胞因子诱导后 DC 的形态学改变(×100)

Fig. 1 Change of phenotype of DCs after cytokine stimulation(×100)

A:0 d; B:7 d

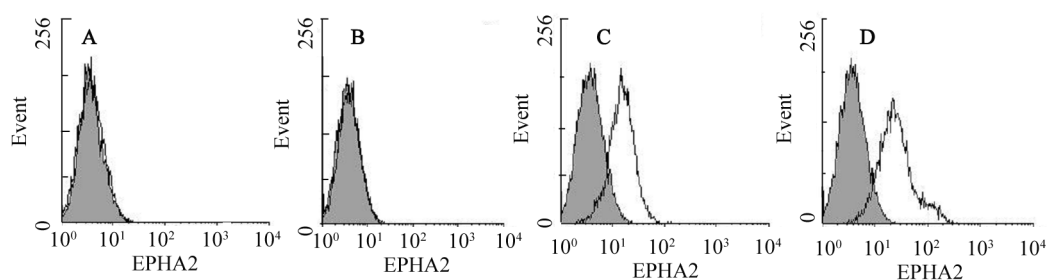


图 3 FACS 检测 DC 感染 rAd-EPHA2 腺病毒后 EPHA2 的表达

Fig. 3 EPHA2 expression after DCs were infected with rAd-EPHA2 detected by FACS

A: PBS; B: rAd-LacZ; C: rAd-EPHA2; D: U251 cells

## 2.4 DC 疫苗激发诱导 CTL 的杀伤效应

DC 刺激 PBMC 后诱导的 CTL 对胶质瘤 U251 细胞产生特异性细胞毒效应,结果(图 4)显示,当效靶比为 100:1 时,与感染 rAd-LacZ 的 DC 组和 PBS 组相比,感染 rAd-EPHA2 的 DC 疫苗所诱导的 CTL 对 U251 细胞有明显的细胞毒杀伤效应[(45.7 ± 6.8)% vs (7.1 ± 4.5)% ,  $P < 0.01$  ]。另外,同时观察了诱导的 CTL 对 EPHA2 阴性的自身淋巴细胞的杀伤性,结果发现,各组均没有明显的杀伤效应。因此,感染 rAd-EPHA2 的 DC 疫苗能有效激发 CTL 产生细胞毒作用,对胶质瘤 U251 细胞有较强的特异性杀伤作用,而对自身淋巴细胞没有杀伤作用。

## 2.3 DC 疫苗激发 CTL 活性

为了证实感染 rAd-EPHA2 的 DC 能有效激发 CTL 的活性,用 ELISPOT 法检测各实验组 CTL 所形成的斑点数目。结果表明,感染 rAd-EPHA2 的 DC 疫苗激发 CTL 活性的斑点数目明显高于 rAd-LacZ 组和 PBS 组[(187 ± 21) vs (12 ± 4)、(18 ± 5)个,  $P < 0.05$  ]。结果提示,感染 rAd-EPHA2 的 DC 疫苗有较强的免疫效应,能有效激发 CTL 活性。

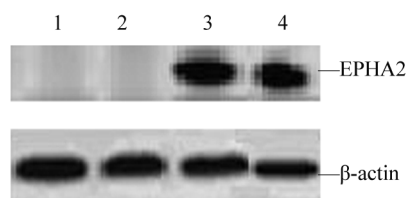


图 2 Western blotting 检测 DC 感染 rAd-EPHA2 腺病毒后 EPHA2 的表达

Fig. 2 EPHA2 expression after DCs were infected with rAd-EPHA2 detected by Western blotting

A: PBS; B: rAd-LacZ; C: rAd-EPHA2; D: U251 cells

## 3 讨论

肿瘤的发生是由于细胞间信号转导功能异常造成细胞异常增殖或不能发生凋亡。RTK 在细胞的生长及分化中起重要作用<sup>[7-9]</sup>,EPH 是 RTK 家族中最大的亚族。根据 EPH 受体和其配体的结合特异性,将 EPH 受体分为 A、B 两类,受 EPHA 激活的 EPH 受体称为 EPHA,而受 EPHB 激活的 EPH 受体称为 EPHB。EPHA2 是 EPHA 亚家族 14 个受体成员中的第 2 个,其配体为 EPHA1。EPHA2 将外界刺激信号传递给细胞核,转化成细胞效应信号通路的关键成员,参与细胞的黏附、运动,维持细胞骨架的

稳定;而过表达 EPHA2 可导致肿瘤的形成,参与肿瘤的侵袭、浸润及转移。乳腺癌、前列腺癌、食管癌、非小细胞肺癌、结肠癌及卵巢癌等多种实体瘤组织中均存在 EPHA2 的高表达,且 EPHA2 的表达水平与肿瘤的恶性程度之间存在正相关,可能是恶性肿瘤治疗的一个新靶点<sup>[7-9]</sup>。

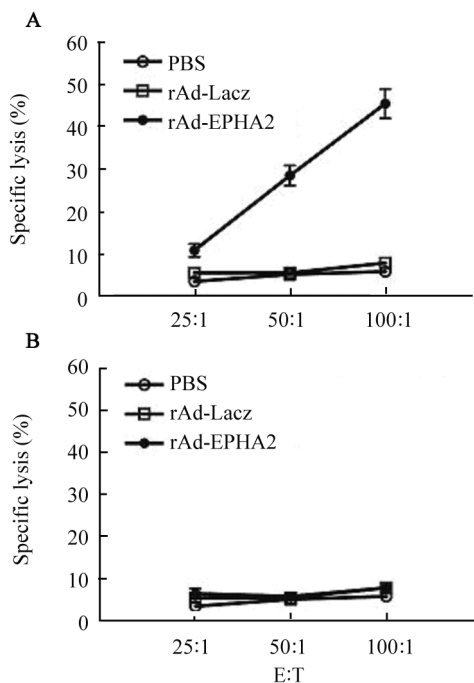


图 4 感染 rAd-EPHA2 的 DC 激发 CTL 的杀伤活性

Fig. 4 Specific lysis of CTLs elicited by rAd-EPHA2 infected DCs

A: Target cells were U251 cells; B: Target cells were autologous lymphocytes

恶性肿瘤患者免疫力低下,缺乏强有力的抗肿瘤免疫应答,使肿瘤抗原不能被有效地提呈给淋巴细胞,造成肿瘤细胞“免疫逃逸”<sup>[10-12]</sup>。因此如何能有效地促进免疫系统对肿瘤抗原的提呈以诱导有效的抗癌免疫效应是肿瘤免疫治疗的一个关键的问题。DC 是目前所发现的功能最强的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC),能直接激活初始 T 细胞,在诱导特异性抗肿瘤细胞免疫中起关键作用,可有效抑制肿瘤生长<sup>[13-15]</sup>。以不同形式的肿瘤抗原负载 DC,制备 DC 疫苗,可使肿瘤抗原被有效摄取并提呈,提供更有效的特异性主动免疫,以 DC 为基础的肿瘤疫苗已在肿瘤治疗中发挥了重要作用。在各种形式的 DC 疫苗中,肿瘤抗原基因感染 DC 后,可以内源性持续表达肿瘤抗原,并由 MHC-I 类途径得到充分提呈和功能放大,通常其免疫激

发能力比非基因感染的瘤苗高出数十倍,有其独特的应用价值<sup>[16-18]</sup>。以往有利用 EPHA2 进行抗肿瘤研究的报道,并取得了一定的效果<sup>[19-21]</sup>。

本研究利用腺病毒的高效感染效率,制备了携带 EPHA2 的腺病毒,并感染 DC 细胞。体外实验证明,EPHA2 腺病毒能有效感染 DC 细胞,并介导 EPHA2 的表达。为证实感染 EPHA2 腺病毒的 DC 所激发的 CTL 对靶细胞具有细胞毒效应,本研究观察了 DC 刺激 PBMC 后诱导的 CTL 对胶质瘤 U251 细胞的特异性细胞毒效应。结果表明,感染 rAd-EPHA2 DC 所诱导的特异性 CTL 对胶质瘤 U251 细胞有明显的细胞毒效应,而对照组诱导的 CTL 对胶质瘤 U251 细胞基本无特异性杀伤。另外,实验同时观察了诱导的 CTL 对 EPHA2 阴性的自身淋巴细胞的杀伤性,结果提示各组均没有明显的杀伤效应。

总之,感染 rAd-EPHA2 的 DC 疫苗能有效激发 CTL 产生细胞毒作用,对胶质瘤 U251 细胞有较强的特异性杀伤作用,而对自身淋巴细胞没有杀伤作用,制备的 DC 疫苗为胶质瘤的免疫治疗提供了潜在的新手段。

[参考文献]

[1] Fukushima T, Takeshima H, Kataoka H. Anti-glioma therapy with temozolomide and status of the DNA-repair gene MGMT [J]. *Anti Res*, 2009, 29(11): 4845-5484.

[2] Oliver L, Olivier C, Marhuenda FB, et al. Hypoxia and the malignant glioma microenvironment: Regulation and implications for therapy [J]. *Cur Mole Pharmacol*, 2009, 2(3): 263-284.

[3] Hargrave D. Paediatric high and low grade glioma: The impact of tumour biology on current and future therapy [J]. *Brit J Neurosurg*, 2009, 23(4): 351-363.

[4] Jun G, Guo H, Klein BE, et al. EPHA2 is associated with age-related cortical cataract in mice and humans [J]. *PLoS genet*, 2009, 5(7): e1000584.

[5] Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA. The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer [J]. *Arch Path Lab Med*, 2009, 133(3): 413-422.

[6] Okazaki T, Ni A, Baluk P, et al. Capillary defects and exaggerated inflammatory response in the airways of EPHA2-deficient mice [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(6): 2388-2399.

[7] de la Fuente BP, Dalmau J, Rosenfeld M. Glioma therapy up-date [J]. *Neurologia*, 2007, 22(3): 159-169.

[8] Norden AD, Wen PY. Glioma therapy in adults [J]. *Neurologist*, 2006, 12(6): 279-292.

[9] Massimino M, Biassoni V. Use of high-dose chemotherapy in front-line therapy of childhood malignant glioma [J]. *Exp Rev Anticancer Ther*, 2006, 6(5): 709-717.

[10] Curigliano G, Locatelli M, Fumagalli L, et al. Immunizing against breast cancer: A new swing for an old sword [J]. *Breast*, 200,

- 18: S51-S54.
- [ 11 ] Sauerborn M, Schellekens H. B-1 cells and naturally occurring antibodies: Influencing the immunogenicity of recombinant human therapeutic proteins? [ J ]. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20( 6 ): 715-721.
- [ 12 ] Ramsay AG, Clear AJ, Kelly G, et al. Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: Implications for the tumor microenvironment and immunotherapy [ J ]. *Blood*, 2009, 114( 21 ): 4713-4720.
- [ 13 ] Okudaira K, Hokari R, Tsuzuki Y, et al. Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model [ J ]. *Int J Oncol*, 2009, 35( 4 ): 741-749.
- [ 14 ] Ali OA, Emerich D, Dranoff G, et al. *In situ* regulation of DC subsets and T cells mediates tumor regression in mice [ J ]. *Sci Transl Med*, 2009, 1( 8 ): 8-19.
- [ 15 ] Cao DY, Yang JY, Yue SQ, et al. Comparative analysis of DC fused with allogeneic hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and autologous tumor cells as potential cancer vaccines against hepatocellular carcinoma [ J ]. *Cell Immunol*, 2009, 259( 1 ): 13-20.
- [ 16 ] Faure F, Mantegazza A, Sadaka C, et al. Long-lasting cross-presentation of tumor antigen in human DC [ J ]. *Eur J Immunol*, 2009, 39( 2 ): 380-390.
- [ 17 ] Gerner MY, Mescher MF. Antigen processing and MHC-II presentation by dermal and tumor-infiltrating dendritic cells [ J ]. *J Immunol*, 2009, 182( 5 ): 2726-2737.
- [ 18 ] Fry TJ, Shand JL, Milliron M, et al. Antigen loading of DC with irradiated apoptotic tumor cells induces improved anti-tumor immunity compared to other approaches [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58( 8 ): 1257-1264.
- [ 19 ] van Geer MA, Bakker CT, Koizumi N, et al. Ephrin A2 receptor targeting does not increase adenoviral pancreatic cancer transduction *in vivo* [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15( 22 ): 2754-2762.
- [ 20 ] Noblitt LW, Bangari DS, Shukla S, et al. Decreased tumorigenic potential of EPHA2-overexpressing breast cancer cells following treatment with adenoviral vectors that express Ephrin A1 [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11( 11 ): 757-766.
- [ 21 ] Noblitt LW, Bangari DS, Shukla S, et al. Immunocompetent mouse model of breast cancer for preclinical testing of EphA2-targeted therapy [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12( 1 ): 46-53.
- [ 收稿日期 ] 2011 - 09 - 11 [ 修回日期 ] 2011 - 12 - 02  
[ 本文编辑 ] 韩丹

· 简 讯 ·

## 2010 年国内论文被引用次数较多的高校

排序	单 位	被引用次数	论文增长趋势( % )
1	北京大学	30 554	3.2
2	上海交通大学	30 136	-8.7
3	浙江大学	29 105	-2.7
4	华中科技大学	23 288	-11.1
5	清华大学	22 916	-4.4
6	中山大学	19 809	4.5
7	首都医科大学	18 920	9.8
8	中南大学	18 828	-5.4
9	北京协和医学院	18 057	-
10	四川大学	17 778	-19.0
11	南京大学	17 328	28.7
12	复旦大学	16 528	-1.2
13	同济大学	15 393	-4.3
14	武汉大学	13 375	-2.3
15	西安交通大学	13 240	-4.7
16	吉林大学	12 954	-5.4
17	哈尔滨工业大学	12 227	-13.0
18	第二军医大学	10 724	0.6
19	山东大学	10 551	-14.9
20	中国地质大学	10 532	10.4

注:国内论文被引用指 1988 - 2010 年国内发表的论文在 2010 年国内被引用