

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.02.008

· 基础研究 ·

## 人工抗原提呈细胞体外激活肝癌 CD8<sup>+</sup> T 细胞

夏士珊<sup>1</sup>, 向晓星<sup>2</sup>, 龚卫娟<sup>3</sup> (1. 仪征市人民医院 消化内科, 江苏 仪征 211400; 2. 苏北人民医院 消化内科, 江苏 扬州 225001; 3. 扬州大学医学院 免疫教研室, 江苏 扬州 225001)

**[摘要]** **目的:** 探讨人工抗原提呈细胞(artificial antigen presenting cell, aAPC) K32/4-IBBL/CD86 对肝癌 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化作用。**方法:** 磁珠法分选 HLA-A 2 阳性肝癌患者外周血 CD8<sup>+</sup> T 细胞, aAPC 与 CD8<sup>+</sup> T 细胞按不同比例(1:1、1:2、1:3)混合培养, 诱导 CTL。锥虫蓝拒染法测定 CTL 的生长曲线, MTS/PMS 法检测 CTL 的增殖, 流式细胞术检测 CTL 分泌 IFN- $\gamma$  的能力, MTT 法检测 CTL 对人肝癌细胞株 BEL7402 和自体肝癌细胞的杀伤作用。**结果:** 肝癌患者外周血 CD8<sup>+</sup> T 细胞经 aAPC 作用后, 增殖能力明显增强, 按 1:1、1:2、1:3 比例混合培养后第 8 天分别为  $(21.2 \pm 2.5) \times 10^5$ 、 $(17.6 \pm 3.2) \times 10^5$ 、 $(15.3 \pm 2.8) \times 10^5$ , 明显高于对照组的  $(8.5 \pm 0.15) \times 10^5$  ( $P < 0.01$ ), 混合培养后分泌 IFN- $\gamma$  的 CTL 比例分别为  $(26.2 \pm 1.91)\%$ 、 $(21.3 \pm 1.38)\%$ 、 $(18.6 \pm 1.20)\%$ , 明显高于对照组的  $(0.1 \pm 0.02)\%$  ( $P < 0.01$ )。aAPC 活化的 CTL 对 BEL7402 细胞和自体肝癌细胞的杀伤率较对照组显著增强, 按 1:3 混合培养后得到的 CTL 对 BEL7402 细胞和自体肝癌细胞的杀伤率分别为  $(21.8 \pm 4.3)\%$  和  $(25.6 \pm 3.6)\%$ , 明显高于对照组的  $(3.8 \pm 1.8)\%$  和  $(3.8 \pm 2.0)\%$  ( $P < 0.01$ ); 效靶比为 50:1 时, 1:1 混合培养组 CTL 对 BEL7402 细胞的杀伤率  $(56.8 \pm 3.0)\%$  和对自体肝癌细胞的杀伤率  $(64.8 \pm 4.2)\%$  明显高于 1:2 混合培养组的  $(44.3 \pm 2.6)\%$ 、 $(56.1 \pm 3.4)\%$  和 1:3 混合培养组的  $(38.9 \pm 4.7)\%$ 、 $(46.2 \pm 4.7)\%$  ( $P < 0.05$ )。**结论:** aAPC 在体外可高效活化肝癌患者 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 诱导 CTL 分泌 IFN- $\gamma$ , 且 CTL 对人肝癌细胞株 BEL7402 和自体肝癌细胞具有明显的杀伤作用。

**[关键词]** 人工抗原提呈细胞; 肝癌; CD8<sup>+</sup> T 细胞; CTL; IFN- $\gamma$

**[中图分类号]** R735.7; R730.51

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)02-0148-06

## Artificial antigen presenting cells *in vitro* activate CD8<sup>+</sup> T cells of hepatocellular carcinoma

XIA Shi-shan<sup>1</sup>, XIANG Xiao-xing<sup>2</sup>, GONG Wei-juan<sup>3</sup> (1. Department of Gastroenterology, Yizheng People's Hospital, Yizheng 211400, Jiangsu, China; 2. Department of Gastroenterology, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu, China; 3. Department of Immunology, School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the activation of CD8<sup>+</sup> T cells of hepatocellular carcinoma (HCC) stimulated by the artificial antigen presenting cells (aAPC) (K32/4-IBBL/CD86). **Methods:** Peripheral CD8<sup>+</sup> T cells of HLA-A\*0201 positive HCC patients were enriched by MACS separation system. CD8<sup>+</sup> T cells were cultured with aAPC at different ratios (3:1, 2:1 and 1:1), and CTLs were induced. Growth curve of CTLs was examined by trypan blue exclusion assay; MTS/PMS assay was used to detect the proliferation of CTLs; the IFN- $\gamma$  secreting CTLs were assayed by FACS; the cytotoxicity of CTLs on a human liver cancer cell line BEL7402 and self-HCC cells was tested using MTT method. **Results:** The proliferation of peripheral CD8<sup>+</sup> T cells stimulated with aAPC was significantly increased. At days 8, the CTL cell numbers of aAPC to CD8<sup>+</sup> T cells at 1:1, 1:2, 1:3 groups was significantly higher than those in the control group ( $[21.2 \pm 2.5] \times 10^5$ ,  $[17.6 \pm 3.2] \times 10^5$ ,  $[15.3 \pm 2.8] \times 10^5$  vs  $[8.5 \pm 0.15] \times 10^5$ ,  $P < 0.01$ ); and the proportion of IFN- $\gamma$  secreting CTLs in 1:1, 1:2, 1:3 groups was higher than those in the control group ( $[26.2 \pm 1.91]\%$ ,

**[基金项目]** 江苏省卫生厅预防医学学科基金资助项目(No. Y201032)。Project supported by the Scientific Research Foundation of Preventive Medicine of Health Bureau of Jiangsu Province(No. Y201032)

**[作者简介]** 夏士珊(1978-),女,江苏省仪征市人,硕士生,主要从事肝癌免疫方面的研究。E-mail: xss780109@sina.com

**[通信作者]** 向晓星(XIANG Xiao-xin, corresponding author), E-mail: xiangxx1965@yahoo.com.cn

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120328.1504.003.html>

[ 21.3 ± 1.38 ]%, [ 18.6 ± 1.20 ]% vs [ 0.1 ± 0.02 ]%,  $P < 0.01$ ). The cytotoxicity of aAPC-activated CTLs against BEL7402 cells and self-HCC cells in 1:3 group was stronger than that in the control group ([ 21.8 ± 4.3 ]% vs [ 3.8 ± 1.8 ]%,  $P < 0.01$ ; [ 25.6 ± 3.6 ]% vs [ 3.8 ± 2.0 ]%,  $P < 0.01$ ). A higher cytotoxic rate on BEL7402 cells and self-HCC cells in the 1:1 group at a ratio of E (effect): T (target) as 50:1 was achieved compared with that in the 1:2 and 1:3 groups ([ 56.8 ± 3.0 ]% vs [ 44.3 ± 2.6 ]%, [ 38.9 ± 4.7 ]%,  $P < 0.05$ ; [ 64.8 ± 4.2 ]% vs [ 56.1 ± 3.4 ]%, [ 46.2 ± 4.7 ]%,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** aAPC can effectively activate CD8<sup>+</sup>T cells of HCC patients, and the resultant CTLs not only secrete IFN- $\gamma$  but also efficiently kill human liver cancer BEL7402 cells and self-HCC cells.

[ **Key words** ] artificial antigen presenting cell (aAPC); hepatocellular carcinoma (HCC); CD8<sup>+</sup>T cell; CTL; IFN- $\gamma$   
[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19(2): 148-153 ]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,预后极差。对于肝癌,手术无疑是治疗的最有效手段,但手术之后几乎难以避免转移和复发;而就诊时已有转移的进展期肝癌,传统方法的疗效更是有限。近年来随着分子生物学、肿瘤免疫学和基因工程技术的发展,以肿瘤免疫治疗(immunotherapy)为代表的肿瘤生物治疗(biotherapy)作为综合治疗中重要的部分,为HCC的治疗带来转机。肿瘤的过继免疫治疗(adoptive immunotherapy, AIT)一直是肿瘤生物治疗研究中最为活跃的一个领域,向肿瘤患者转输具有抗肿瘤活性的免疫细胞(特异性的和非特异性的)可直接杀伤肿瘤,或激发机体免疫应答杀伤肿瘤细胞,达到治疗肿瘤的目的。人工抗原提呈细胞(artificial antigen presenting cell, aAPC)体外活化CTL具有操作简单、重复性好、成本低的优点,而且近年来不断产生令人鼓舞的临床疗效<sup>[1-5]</sup>。本研究通过观察aAPC活化的CD8<sup>+</sup>T细胞体外增殖及杀伤活性,研究aAPC作为一种新型过继免疫疗法对肝癌细胞的作用机制,为CD8<sup>+</sup>T细胞进一步临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

收集江苏省扬州市苏北人民医院2009年6月至2010年6月25例HLA-A2阳性的肝癌患者,所有病例均由两位以上病理科医生确诊。其中男性20例,女性5例,男女比例4:1,年龄范围35~60岁,中位年龄47.6岁。经知情同意后取得患者外周血和肿瘤组织,肝癌患者术前均未行放、化疗。手术切除的肿瘤组织病理学诊断均为HCC,以无菌操作收集肿瘤组织于含抗生素的培养液中,酶消化后分离肿瘤细胞待用。

### 1.2 主要细胞株及试剂

人工抗原提呈细胞K32/4-IBBL/CD86由扬州大学医学院免疫实验室提供<sup>[6-7]</sup>,人肝癌细胞株

BEL-7402(HLA-A2表达阳性)购于上海中科院细胞库。基因重组人IL-2、IL-7购自德国美天旎公司,鼠抗人CD3McAb购自美国BD公司,CD8磁珠和分选器购自德国美天旎公司,三种抗生素(青霉素、链霉素及卡那霉素)、潮霉素、G418、丝裂霉素、RPMI-1640培养基为美国Gibco产品,胎牛血清购于杭州四季青生物公司,PHA购于晶美生物工程技术有限公司,Ficoll常规分离液为Axis-shield公司,MTT、锥虫蓝染液、MTS/PMS试剂盒均为美国Sigma公司产品。流式细胞仪及所需HLA-A2、CD3、CD4、CD8、IFN- $\gamma$ 抗体均由美国BD公司提供。

### 1.3 CTL的制备

取肝癌患者的肝素抗凝血20ml,经淋巴细胞分离液密度梯度分离PBMC,计数、调整密度为 $1 \times 10^7$ 个/ml,加入20 $\mu$ l CD8磁珠,避光2~8 $^{\circ}$ C孵育15min后,用1640培养基震荡,悬浮细胞,12 000 $\times$ g 10min离心去上清,用500 $\mu$ l 1640培养基悬浮细胞,将悬浮液过柱后用500 $\mu$ l 1640培养基洗涤3次,将柱子从分选架上移开,将其放在收集细胞的试管上,加1ml 1640培养基在柱子里,用活塞用力冲洗柱子,收集到的细胞即为CD8<sup>+</sup>T细胞。调整密度为 $1 \times 10^6$ /ml,取50 $\mu$ l细胞悬液加入20 $\mu$ l CD8-FITC抗体,混匀,避光15min,加入1ml PBS震荡,洗涤、离心,去上清后,加入400 $\mu$ l PBS悬浮细胞,上FACS检测,结果显示用磁珠分选的细胞纯度可达96%以上<sup>[8]</sup>。

将aAPC用丝裂霉素(10 $\mu$ g/ml)作用2h,洗涤2次,然后按0.5 $\mu$ g/ml的要求加入抗CD3的抗体,作用0.5h。将aAPC与磁珠分选的肝癌患者外周血的CD8<sup>+</sup>T细胞按1:1、1:2、1:3、0:1的不同比例混合培养,取经aAPC刺激培养8d的CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞即为CTL。

### 1.4 自体肝癌细胞的分离

无菌条件下取实体瘤标本,先用Hank's液,冲洗2次后,剪成1~3mm小块,经研磨悬于Hank's

液, 6 号针头吸取上层液后过 120 目铜网, 获得肝细胞悬液。经 Ficoll-Hypaque,  $12\ 000 \times g$ , 离心 20 min 后, 收集肿瘤细胞, 并用 RPMI 1640 液制成  $5 \times 10^5$ /ml 单个细胞悬液, 备用。使用前锥虫蓝染色, 测定拒染细胞活力在 95% 以上。

1.5 锥虫蓝拒染法检测 aAPC 诱导后 CTL 的增殖

实验分为 aAPC 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞按 1:1 比例混合培养组(简称 1:1 混合培养组)、aAPC 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞按 1:2 比例混合培养组(简称 1:2 混合培养组)、aAPC 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞按 1:3 比例混合培养组(简称 1:3 混合培养组)、单独 CD8<sup>+</sup>T 细胞组(空白对照组)4 组。具体实验步骤: 取 HLA-A2 阳性肝癌患者(25 例)的肝素抗凝血 15 ml, 经淋巴细胞分离液密度梯度分离 PBMC<sup>[9]</sup>, 用磁珠分选法分离得到 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 调整 CD8<sup>+</sup>T 细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/ml。将 aAPC( $5 \times 10^5$  个/ml)用丝裂霉素( $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )作用 2 h 洗涤 2 次后, 然后按  $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  加入抗 CD3 的抗体作用 0.5 h。将 aAPC 与磁珠分选的肝癌患者外周血的 CD8<sup>+</sup>T 细胞按 1:1、1:2、1:3、0:1 的比例混合培养于 75 ml 培养瓶中, 第 1 天加 IL-2 20 ng/ml、植物血凝素  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , 第 4 天加 IL-7 10 ng/ml。第 7、14、21 天半量换液后加 IL-2 20 ng/ml; 第 10、17 天半量换液后加 IL-7 10 ng/ml。并于 1、4、7、10、14、17、21、24 d 计数, 观察增殖曲线。

1.6 MTS/PMS 法检测 aAPC 诱导 CTL 的增殖

取 aAPC 与 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞按 1:1、1:2、1:3、0:1 的比例共孵育 5 d 和 8 d 的 CTL, 用 1640 培养基将 CTL 密度调整到  $5 \times 10^5$ /ml, 在 96 孔板中每孔加入  $2 \times 10^4$  个, 每孔重复 3 次, 用 MTS/PMS 法检测 CTL 的增殖。MTS/PMS 法检测细胞增殖步骤: 解冻 MTS/PMS, 将 2 ml MTS + 100  $\mu\text{l}$  PMS 轻轻混匀, 分别于 96 孔培养板中每孔加入 20  $\mu\text{l}$  MTS/PMS, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  继续培养 4 h 终止, 于 490 nm 吸光处, 酶标仪检测  $D$  值, 计数细胞抑制率。细胞抑制率(%) =  $[(D \text{ 对照组} - D \text{ 实验组}) / D \text{ 对照组}] \times 100\%$ 。

1.7 胞内染色法检测 CTL IFN- $\gamma$  的分泌<sup>[10]</sup>

CTL( $1 \times 10^6$  个)加入 PMA 和 ionomycin 培养过夜, 取出细胞前 4 h 加 BFA 共孵育; 从 96 孔板吸取细胞, PBS 洗涤一遍, 加入 CD8 单抗, 40  $^{\circ}\text{C}$  0.5 h 后, PBS 洗涤 1~2 次, 去上清; 每 EP 管加入 100  $\mu\text{l}$  固定液, 混匀, 室温暗室孵育 20 min; 加入 1 ml 破膜剂至每只 EP 管中,  $12\ 000 \times g$  离心 5 min, 弃上清; 重复以上步骤; 加入 95  $\mu\text{l}$  破膜剂重悬, 加入 5  $\mu\text{l}$  干扰素单抗, 使每管为 100  $\mu\text{l}$ , 室温暗室孵育 20 min; 加入 1 ml 破膜剂, 离心 5 min, 弃上清。400  $\mu\text{l}$  PBS

重悬, FACS 分析 CTL IFN- $\gamma$  的分泌。

1.8 MTT 法检测 CTL 对 BEL7402 细胞和自体肝癌细胞的杀伤作用

将 aAPC 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞按不同比例(1:1、1:2、1:3、0:1)混合培养获得 CTL, 将 CTL 和靶细胞 BEL7402 或自体肝癌细胞分组加入 96 孔板中, CTL: BEL7402 或 CTL: 自体肝癌细胞为 1:1、10:1、50:1, 另设单独靶细胞和 CTL 组, 每组 3 个复孔, 每孔的液体总量为 100  $\mu\text{l}$ , 置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的孵箱中孵育 12 h。加入 5 mmol MTT 10  $\mu\text{l}/\text{孔}$ , 培养 4 h 离心, 弃上清, 加入二甲亚砜 100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ , 使其充分裂解。在酶标仪上于 570 nm 处读出各实验组的  $D$  值, 计算其细胞杀伤率。细胞杀伤率计算公式如下: 细胞杀伤率(%) =  $[1 - ( \text{实验组 } D \text{ 值} - \text{单独效应细胞组 } D \text{ 值} ) / \text{单独靶细胞组 } D \text{ 值}] \times 100\%$ 。

1.9 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS16.0 统计软件, 组间差异采用多个样本均数两两比较, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HLA-A2 阳性的肝癌患者的鉴定<sup>[11]</sup>

肝癌患者外周血加入 anti-HLA-A2-FITC 单抗, 通过流式细胞仪确定 HLA-A2 型别, 以大于 90% 的外周血染色阳性者确定为 HLA-A2 阳性个体(图 1)。

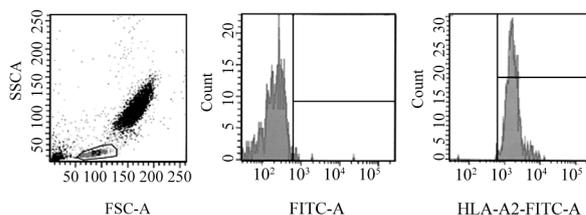


图 1 FACS 鉴定 HLA-A2 阳性肝癌患者  
Fig. 1 HLA-A2 positive liver cancer patients identification by FACS

2.2 经 aAPC 刺激 24 d 的 CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖曲线

25 例肝癌患者外周血 15 ml 来源的 CD8<sup>+</sup>T 细胞在体外经不同比例 aAPC 诱导培养后, 观察 24 d 时 CD8<sup>+</sup>T 细胞数量变化情况, 发现 1:3、1:2、1:1 混合培养组的 CD8<sup>+</sup>T 细胞数明显多于对照组 [ $(64.0 \pm 3.2) \times 10^5$ 、 $(80.0 \pm 2.5) \times 10^5$ 、 $(128.0 \pm 4.5) \times 10^5$  vs  $(0.005 \pm 0.001) \times 10^5$ ,  $P < 0.01$  ]。而且经 aAPC 刺激后的 CD8<sup>+</sup>T 细胞生存时间明显延长, 其增殖能力至少保持至 35 d; 而未经 aAPC 刺激

的 CD8<sup>+</sup>T 细胞培养至 21 d 时,大部分细胞已经死亡(图 2)。

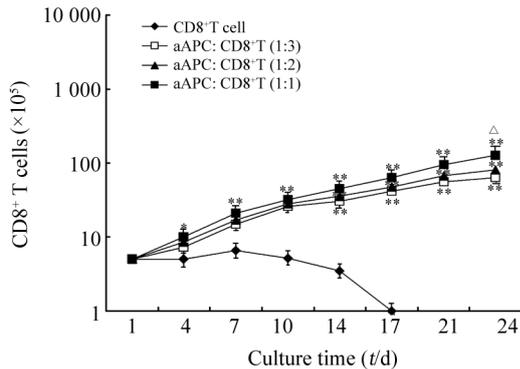


图 2 不同比例 aAPC 刺激后 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖曲线

Fig. 2 Growth curve of CD8<sup>+</sup>T cells after stimulation with different ratios of aAPC

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs CD8<sup>+</sup>T cell group;

△  $P < 0.05$  vs aAPC: CD8<sup>+</sup>T (1:3) group

### 2.3 aAPC 促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖

用 aAPC(加 CD3 单抗孵育)体外刺激 CD8<sup>+</sup>T 细胞后,结果(图 3)显示,1:1、1:2、1:3 混合培养后第 5 天增殖的细胞数明显高于对照组 [  $(20.8 \pm 1.5) \times 10^5$ 、 $(16.4 \pm 1.2) \times 10^5$ 、 $(14.7 \pm 1.2) \times 10^5$  vs  $(6.2 \pm 0.5) \times 10^5$ ,  $P < 0.01$  ],第 8 天增殖的细胞数明显高于对照组 [  $(21.2 \pm 2.5) \times 10^5$ 、 $(17.6 \pm 3.2) \times 10^5$ 、 $(15.3 \pm 2.8) \times 10^5$  vs  $(8.5 \pm 0.15) \times 10^5$ ,  $P < 0.01$  ];且 1:1 混合培养组增殖的细胞数较 1:2、1:3 混合培养组明显增多。由此可见,aAPC 能促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖,且具有剂量和时间依赖性。

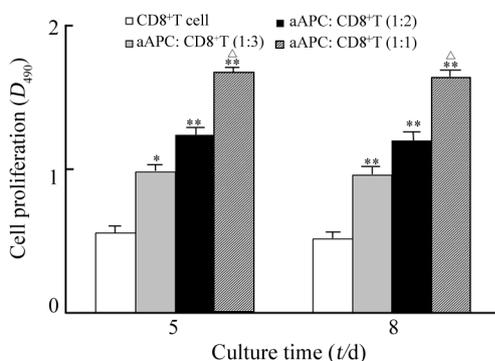


图 3 不同比例 aAPC 刺激后 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖

Fig. 3 Proliferation of CD8<sup>+</sup>T cells after stimulation with different ratios of aAPC

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs CD8<sup>+</sup>T cell group;

△  $P < 0.05$  vs aAPC: CD8<sup>+</sup>T (1:3) group

### 2.4 aAPC 上调 CTL 分泌 IFN- $\gamma$ 的能力

本研究收集经 aAPC 刺激培养 8 d 后生成的 CTL,流式细胞术检测结果(图 4)显示,按 1:1、1:2、1:3 混合培养后分泌 IFN- $\gamma$  的 CTL 比例明显高于对照组 [  $(26.2 \pm 1.91)\%$ 、 $(21.3 \pm 1.38)\%$ 、 $(18.6 \pm 1.20)\%$  vs  $(0.1 \pm 0.02)\%$ ,  $P < 0.01$  ],且 1:1 混合培养组分泌 IFN- $\gamma$  的 CTL 比例明显高于 1:2 和 1:3 混合培养组。结果说明,aAPC 能明显上调 CTL 分泌 IFN- $\gamma$  的能力。

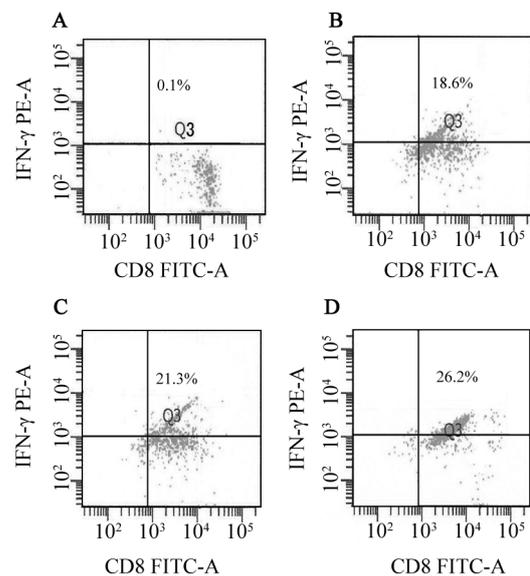


图 4 流式细胞术检测 aAPC 刺激 CTLs 分泌 INF- $\gamma$

Fig. 4 Secretion of IFN- $\gamma$  by CTLs after stimulation with aAPC

A: CD8<sup>+</sup>T cells; B: aAPC: CD8<sup>+</sup>T (1:3)

C: aAPC: CD8<sup>+</sup>T (1:2); D: aAPC: CD8<sup>+</sup>T (1:1)

### 2.5 aAPC 体外激活的 CTL 高效杀伤 BEL7402 细胞及自体肝癌细胞

MTT 法检测 CTL 对 BEL7402 细胞及自体肝癌细胞的杀伤作用,结果(图 5、6)显示,当效靶比为 50:1 时,1:1 混合培养组 CTL 对 BEL7402 细胞的杀伤率明显高于 1:2 和 1:3 混合培养组和对照组 [  $(56.0 \pm 3.0)\%$  vs  $(44.3 \pm 2.6)\%$ 、 $(38.9 \pm 4.7)\%$ 、 $(3.8 \pm 2.0)\%$ ,  $P < 0.05$  ],同时其对自体肝癌细胞的杀伤率也明显高于 1:2 和 1:3 混合培养 [  $(64.8 \pm 4.2)\%$  vs  $(56.1 \pm 3.4)\%$ 、 $(46.2 \pm 4.7)\%$ 、 $(3.8 \pm 2.0)\%$ ,  $P < 0.05$  ]。

效靶比为 50:1 时对 BEL7402 杀伤率明显高于 1:1、10:1 的杀伤率 [  $(56.80 \pm 4.6)\%$  vs  $(34.60 \pm 2.1)\%$ 、 $(48.20 \pm 3.7)\%$ ,  $P < 0.05$  ]。效靶比为 50:1 时对自体肝癌细胞杀伤率也明显高于 1:1、10:1 的杀伤率 [  $(64.80 \pm 4.2)\%$  vs  $(38.70 \pm 2.2)\%$ 、

( $52.30 \pm 3.5$ )%,  $P < 0.05$  ]。由此可见, 经 aAPC 体外诱导扩增的 CTL 对 BEL7402 和自体肝癌细胞的杀伤率与对照组相比显著增强, 而且随着 aAPC 细胞数的增多和效靶 (E:T) 比例的升高, 杀伤作用逐渐提高。

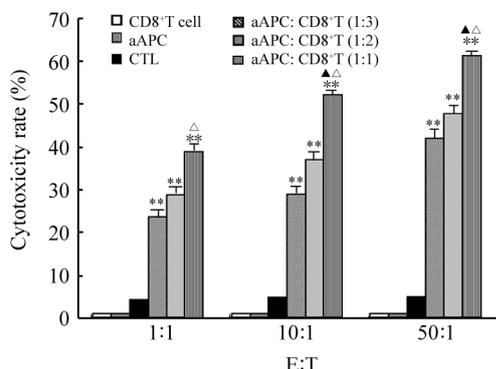


图 5 aAPC 激活的 CTL 对 BEL7402 细胞的杀伤

Fig. 5 Cytotoxicity of aAPC-activated CTLs on BEL7402 cells

\*\*  $P < 0.01$  vs CD8<sup>+</sup> T cell group;  $\Delta P < 0.05$  vs aAPC: CD8<sup>+</sup> T (1:3) group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs E:T (1:1) group

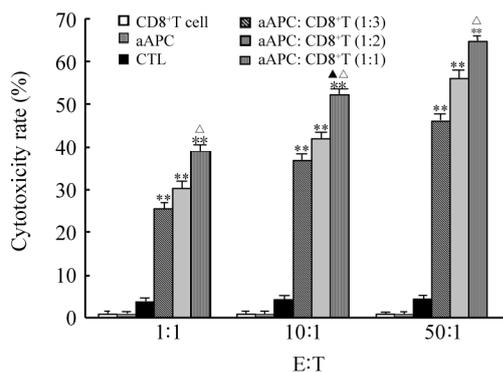


图 6 aAPC 激活的 CTL 对自体肝癌细胞的杀伤

Fig. 6 Cytotoxicity of aAPC-activated CTLs on self-HCC cells

\*\*  $P < 0.01$  vs CD8<sup>+</sup> T cell group;  $\Delta P < 0.05$  vs aAPC: CD8<sup>+</sup> T (1:3) group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs E:T (1:1) group

### 3 讨论

晚期肿瘤患者体内免疫细胞往往处于无能状态, 几乎完全丧失免疫清除功能<sup>[12-13]</sup>。而肿瘤的过继免疫治疗主要针对那些经手术治疗切除肿瘤病灶及局部淋巴结清扫的患者, 如果结合肿瘤的免疫生

物治疗有望彻底清除体内残留的肿瘤细胞, 抑制肿瘤的复发和转移, 从而最大限度地延长患者的生存。到目前为止, 国内外关于 aAPC 的研究很多, 但大多局限于体外实验及细胞株的研究<sup>[14-19]</sup>。本课题组分离出 HLA-A2 阳性的肝癌患者自体肝癌细胞, 观察 aAPC 活化的 CD8<sup>+</sup> T 细胞 (即 CTL) 对肝癌细胞的杀伤作用。

细胞免疫功能的执行者是 T 淋巴细胞, 而 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞代表两类主要的 T 细胞亚群。其中 CD8<sup>+</sup> T 细胞可分为幼稚型和效应/记忆型, CTL 是其效应阶段, 也是 CD8<sup>+</sup> T 细胞的主要功能亚群。其中 CD8<sup>+</sup> CTL 是机体细胞免疫的主要效应细胞<sup>[20]</sup>。静止的 CTL 以前体细胞形式存在, 在识别并结合靶细胞表面抗原多肽-MHC-I 类分子复合物后, 活化为抗原特异性的 CTL 效应细胞, 发挥特异性杀伤靶细胞的功能。CTL 也可通过分泌细胞因子 IFN- $\gamma$  杀伤肿瘤细胞<sup>[21]</sup>。CTL 在细胞免疫中具有重要作用, 特别是在抗肿瘤、抗病毒及抗胞内感染的作用尤为明显。

随着免疫识别理论的进展, 目前认为在肿瘤免疫中, T 细胞并非识别完整的肿瘤抗原分子, 而是识别与 MHC 分子结合提呈的抗原表位 (短肽)。CTL 可通过特异性识别与人类 HLA 分子结合的肿瘤抗原表位而介导肿瘤杀伤。我国大部分肝癌患者 AFP 升高, AFP 抗原肽与 HLA-A2 分子结合在 MHC-I 分子表面才能被 CTL 识别, 从而发挥杀伤作用。而且有研究<sup>[22-24]</sup>表明, 与肝癌有关的其他特异性抗原如 HBsAg、NY-ESO-1、MAGE-1、MAGE-3 等都需要与 HLA-A2 分子结合, 激活体内抗原特异性 CTL, 发挥杀伤肿瘤细胞作用。另外亦有研究<sup>[23]</sup>表明, 我国肝癌患者以 HLA-A2 为主, 阳性率为 53.5%。因此, 我们选择研究基于 HLA-A2 阳性的肝癌患者。

本研究结果显示, 肝癌患者外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞经 aAPC 体外刺激培养后, CTL 的增殖能力显著增强, 而且 CTL 分泌 IFN- $\gamma$  能力显著升高, 表明 CTL 杀伤肿瘤细胞的活性增强, 且按 1:1 刺激培养后, CTL 分泌 IFN- $\gamma$  升高最明显。研究结果还显示, 体外扩增的 CTL 杀伤肝癌细胞株和自体肝癌细胞的能力较对照组显著增高。

本研究获得了大量的活性较高的 CTL, 输入这种经体外大量扩增的高活性的自体 CTL 给晚期失去手术机会的肝癌患者的治疗带来了希望, 同时也为下一步利用肝癌相关特异性抗原制备肿瘤疫苗奠定了基础<sup>[26]</sup>。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Breous E, Thimme R. Potential of immunotherapy for hepatocellular carcinoma [ J ]. *Hepatology*, 2011, 54( 4 ): 830-834.
- [ 2 ] Korangy F, Höchst B, Manns MP, Greten TF. Immune responses in hepatocellular carcinoma [ J ]. *Dig Dis*, 2010, 28( 1 ): 150-154.
- [ 3 ] Bray SM, Vujanovic L, Butterfield LH. Dendritic cell-based vaccines positively impact natural killer and regulatory T cells in hepatocellular carcinoma patients [ J ]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 201( 1 ): 249-281.
- [ 4 ] Haruta I, Yamauchi K, Aruga A, et al. Analytical study of the clinical response to two distinct adoptive immunotherapies for advanced hepatocellular carcinoma: Comparison between LAK cell and CTL therapy [ J ]. *Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 1996, 19( 3 ): 218-223.
- [ 5 ] Ge L, Zhang JG, Samathanam CA, et al. Cytotoxic T cell immunity against the non-immunogenic, murine hepatocellular carcinoma Hepal-6 is directed towards the novel alternative form of macrophage colony stimulation factor [ J ]. *Cell Immunol*, 2009, 259( 2 ): 117-127.
- [ 6 ] Hua Zhang, Kristen M, Marcela V, et al. 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8<sup>+</sup> cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy [ J ]. *The Journal of Immunology*, 2007, 179( 9 ): 4910-4918.
- [ 7 ] Weijuan Gong, Mingchun Ji, Zhengfeng Cao. Establishment and characterization of a cell based artificial antigen-presenting cell for expansion and activation of CD8<sup>+</sup>T cells *ex vivo* [ J ]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2007, 5( 1 ): 47-53.
- [ 8 ] 董文川, 喻新建, 童春容, 等. 应用免疫磁珠法分离脐血 CD34<sup>+</sup>造血细胞 [ J ]. *北京医科大学学报*, 1997, 29( 3 ): 275-277.
- [ 9 ] 吴鹏, 刘映峰, 陈允钦, 等. 提高人外周血单核细胞分离率的方法探讨 [ J ]. *实用医学杂志*, 2008, ( 5 ): 707-708.
- [ 10 ] Hussell T, Openshaw PJ. Intracellular IFN- $\gamma$  expression in natural killer cells precedes lung CD8<sup>+</sup> T cell recruitment during respiratory syncytial virus infection [ J ]. *Gen Virol*, 1998, 79( 11 ): 2593-2601.
- [ 11 ] 田伟, 李立新, 郭实士, 等. 中国南方汉族群体 HLA-A2 基因亚型分析 [ J ]. *中国免疫学杂志*, 2000, 16( 4 ): 198-199.
- [ 12 ] Waalen J. Genetic testing opens brave new world [ J ]. *Ann Intern Med*, 1997, 126( 12 ): 139-140.
- [ 13 ] Nace G, Evankovich J, Eid R, et al. Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: Endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity [ J ]. *J Innate Immun*, 2012, 4( 1 ): 6-15.
- [ 14 ] Sun S, Cai Z, Langlade-Demoyen P, et al. Dual function of Drosophila cells as APCs for naive CD8<sup>+</sup> T cells: Implications for tumor immunotherapy [ J ]. *Immunity*, 1996, 4( 1 ): 555-564.
- [ 15 ] Latouche JB, Sadelain M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18( 4 ): 405-409.
- [ 16 ] Dupont J, Latouche JB, Ma C, et al. Artificial antigenpresenting cells transduced with telomerase efficiently expand epitope-specific, human leukocyte antigen-restricted cytotoxic T cells [ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 5 ): 5417-5427.
- [ 17 ] Oosten LE, Blokland E, van Halteren AG, et al. Artificial antigen-presenting constructs efficiently stimulate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes [ J ]. *Blood*, 2004, 104( 4 ): 224-226.
- [ 18 ] Pitkin L, Lugdilik S, CorhisMey C, et al. Expression of CC chemokine receptor in tonsillar cancer predicts cervical nodal metastasis, systemic relapse and survival [ J ]. *Br J Cancer*, 2007, 97( 5 ): 670-677.
- [ 19 ] Kodama J, Hasangno W, Kusumoto T, et al. Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer [ J ]. *Annals of Oncology*, 2007, 18( 1 ): 70-76.
- [ 20 ] 龚非力. 医学免疫学 [ M ]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2004: 151-115.
- [ 21 ] Ge L, Zhang JG, Delgado C, et al. Cytotoxic T cell immunity against the non-immunogenic, murine, hepatocellular carcinoma Hepal-6 is directed towards the novel alternative form of macrophage colony stimulation factor [ J ]. *Cell Immunol*, 2009, 259( 2 ): 117-127.
- [ 22 ] Butterfield LH, Meng WS, Koh A, et al. T cell responses to HLA-A\*0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein [ J ]. *Immunol*, 2001, 166( 8 ): 5300-5308.
- [ 23 ] Yoshikawa T, Nakatsugawa M, Suzuki S, et al. HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cell [ J ]. *Cancer Sci*, 2011, 102( 5 ): 918-925.
- [ 24 ] Moore TV, Lyons GE, Brasic N, et al. Relationship between CD8-dependent antigen recognition, T cell functional avidity, and tumor cell recognition [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58( 5 ): 719-728.
- [ 25 ] Jennifer D, Walter E, Lawrence J, et al. HLA-restricted epitope identification and detection of functional T cell responses by using MHC-peptide and costimulatory microarrays [ J ]. *PNAS*, 2005, 102( 10 ): 3744-3749.
- [ 26 ] Ireland JM, Unanue ER. Processing of proteins in autophagy vesicles of antigen-presenting cells generates citrullinated peptides recognized by the immune system [ J ]. *Autophagy*, 2012, 208( 13 ): 2625-2632.

[ 收稿日期 ] 2011-11-03

[ 修回日期 ] 2012-02-25

[ 本文编辑 ] 王莹