

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.007

不同方式负载 AFP 抗原的 DC 诱导抗肝癌 HepG2 细胞免疫效应的比较

李洁羽^{1,2,3}, 陈明水^{2,3}, 周智锋^{2,3}, 王玲^{2,3}, 陈淑萍^{2,3}, 叶韵斌^{1,2,3} (1. 福建医科大学基础医学院, 福建福州 350100; 2. 福建医科大学教学医院福建省肿瘤医院肿瘤免疫学研究室, 福建, 福州 350014; 3. 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福建福州 350014)

[摘要] **目的:** 比较 AFP 抗原以不同方式负载 DCs 对后者生物学功能的影响及体外刺激 CTL 对肝癌 HepG2 细胞的杀伤作用。**方法:** 分离健康供者外周血单个核细胞培养 DC, 分别用 (A) 人工合成 AFP 抗原肽、(B) HepG2 细胞裂解物、(C) HepG2 细胞分泌的外泌体 (tumor exosome, T-exo)、(D) AFP 抗原的重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus expressing α -fetoprotein antigen, rAAV/AFP) 致敏 DC 前体细胞及 (E) 未负载抗原的 DC 作为对照, 经 GM-CSF、IL-4 及 LPS 联合诱导 DCs 分化成熟。流式细胞术检测 rAAV/AFP 病毒感染效率、各组 DCs 表型及其刺激初始 T 细胞的增殖效应, 7-ADD/CFSE 双染法流式细胞术检测各组 DCs 诱导 CTL 对 AFP 阳性 HepG2 细胞的杀伤作用。**结果:** 几种抗原负载方式均可诱导 DCs 成熟、促进 CTL 增殖及特异性识别并杀伤 HepG2 细胞, 但 rAAV/AFP 感染 DCs 后, 其 CD83、CD86、ICAM-1、CD58、CD40 分子表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), rAAV/AFP + DC 组和 HepG2-Texo + DC 组对 HepG2 细胞的杀伤作用均分别显著优于其他抗原负载 (AFP/peptide + DC、HepG2 lysate + DC) 组 [(44.92 ± 4.12)% vs (28.42 ± 3.29)%、(24.28 ± 1.79)%、(41.40 ± 2.87)% vs (28.42 ± 3.29)%、(24.28 ± 1.79)%; 均 $P < 0.05$]。**结论:** rAAV/AFP 高效感染 DCs 后能有效刺激初始 T 细胞增殖, 并增强 CTL 对 AFP 阳性靶细胞的杀伤活性, 而负载 Texo 的 DCs 也能诱导显著的抗肝癌效应, 上述结果为基于 DCs 的肝癌疫苗的研发提供新的思路。

[关键词] 树突状细胞; 肝癌; 细胞毒 T 细胞; 腺相关病毒; 外泌体

[中图分类号] R735.7; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)05-0590-06

Comparison of cytotoxic effects against liver cancer HepG2 cells by DCs loaded with AFP antigen in different ways

Li Jieyu^{1,2,3}, Chen Mingshui^{2,3}, Zhou Zhifeng^{2,3}, Wang Ling^{2,3}, Chen Shuping^{2,3}, Ye Yunbin^{1,2,3} (1. College of Basic Medical of Fujian Medical University, Fuzhou 350100, Fujian, China; 2. Tumor Immunology Laboratory, Teaching Hospital of Fujian Medical University & Fujian Province Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China; 3. Fujian Key Laboratory of Translational Medicine, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the cytotoxic effects of the cytotoxic T lymphocytes (CTLs) induced by dendritic cells (DCs) loaded with alpha-fetoprotein (AFP) in different approaches. **Methods:** Peripheral blood monocytes were isolated from healthy donors. The adhesive precursor DCs were cultured in the presence of rhGM-CSF and rhIL-4 for 6 d. The cytokine-treated DCs were then left untreated as a control, infected with recombinant AFP-carrying adeno-associated viral vector (rAAV/AFP), or loaded respectively with AFP peptide, HepG2 cell lysate, and HepG2-derived exosomes (T-exo). Changes in CD83, CD86, ICAM-1, CD58 And CD 40 in DCs before and after AFP loading were assessed by Western blotting. Autologous T cells were co-cultured with the various AFP-loaded DCs loaded at a ratio of 10:1 for 48 h.

[基金项目] 国家卫生和计划生育委员会科研基金——福建省卫生教育联合攻关计划资助项目 (No. WKJ-FJ-04); 厦门大学药学院-福建省肿瘤医院促进科技合作联合研究基金资助项目 (No. 2014LY-2L-04)。Project supported by the National Health and Family Planning Commission Science Research Foundation-Health Education Joint Research Program of Fujian Province (No. WKJ-FJ-04), and the Joint Research Foundation of Promoting Science and Technology Cooperation between School of Pharmaceutical Sciences of Xiamen University and Fujian Provincial Cancer Hospital (No. 2014LY-2L-04)

[作者简介] 李洁羽 (1975 -), 女, 福建省福州市人, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫学研究, E-mail: 2013ljy@sina.com

[通信作者] 叶韵斌 (Ye Yunbin, corresponding author), E-mail: zyunbin@189.cn

The proliferative activity and cytotoxicity against HepG2 cells of DC-induced T cells were assessed by flow cytometry. **Results:** AFP antigen induced maturation of DCs. The expression of surface molecules CD83, CD86, ICAM-1, CD58 and CD40 in DCs infected with the rAAV/AFP vector was significantly increased compared with the naïve DCs ($P < 0.05$). AFP-loaded DCs increased the proliferation of T cells. The cytotoxic activity against HepG2 cells was $(41.40 \pm 2.87)\%$, $(44.9 \pm 4.12)\%$, $(28.42 \pm 3.29)\%$, and $(24.28 \pm 1.79)\%$ for T cells after induction by T-exo-loaded DCs, rAAV/AFP-infected DCs, AFP peptide-loaded DCs and HepG2 lysate-treated DCs respectively ($P < 0.05$). **Conclusions:** AFP and T-exosome are capable of increasing the proliferative activity of DCs and the cytotoxic activity of CTL against HepG2 cells. Our finding may have significant implications in the development of DC-based vaccines for liver cancer.

[**Key words**] dendritic cells(DC); liver cancer; cytotoxic T cells; adeno-associated virus(AAV); exosome

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(5): 590-596]

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国高发的恶性肿瘤之一,起病隐匿、预后差、生存期短,严重危害人类健康,每年新发和死亡病例均占全球总数的 50% 左右^[1]。随着对肿瘤认识的不断深入,治疗理念也发生着改变,生物免疫治疗因其安全、高效和无毒副作用等特点,已成为继手术及化疗之后第四大肿瘤治疗方法^[2]。基于树突状细胞(dendritic cell, DC)的免疫治疗通过诱导针对肿瘤抗原的特异性杀伤的细胞毒性淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL),凸显出独特的优越性而成为研究的热点^[3]。甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)是原发性肝细胞癌的特异性标志物,大约 2/3 的 HCC 患者血清高表达 AFP,故其成为肝癌免疫治疗的潜在靶点。肿瘤抗原的提呈在诱导特异性抗肿瘤免疫应答中起关键作用,利用负载肿瘤抗原的 DC 进行恶性肿瘤的免疫治疗是抗肿瘤主动免疫治疗的主要研究方向。目前 DC 疫苗制备常用的策略有:肿瘤细胞裂解物冲击致敏 DC^[4],肿瘤表面弱酸洗脱的肿瘤肽或高浓度的合成肽直接致敏 DC^[5],病毒或非病毒载体转导肿瘤细胞的 cDNA 或 mRNA 直接转染 DC 等^[6]。本研究旨在比较不同的 AFP 抗原致敏方式制备的 DC 疫苗的生物功能差异以及体外的刺激细胞毒性淋巴细胞对肝癌 HepG2 细胞的杀伤作用,为进一步研究新型 DC 疫苗应用于肿瘤免疫治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

肝癌细胞株 HepG2 为本实验室保存。AFP157-166 抗原肽由 GenScript 公司合成(HPLC 分析其纯度 $> 95\%$, DMSO 溶解, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存), rAAV/AFP 购自南京威洛克公司,细胞培养液 RPMI 1640、DMEM 及 Cell Trace™ CFSE Cell Proliferation Kit 购自 Gibco Invitrogen 公司, IL-4、GM-CSF、LPS 及胎牛血清(FBS)购自 PeproTech 公司, 7-ADD/CFSE Cell-Me-

diated Cytotoxicity Assay Kit 购自美国 Cayman 公司,淋巴细胞分离液(Ficoll 1.077 g/ml)购自天津血研所,一抗(鼠抗 AFP、CD9、CD63 单抗)购自 Abcam 公司。流式细胞仪 FACS Canto II 为美国 BD 公司产品,透射电镜为日立公司产品。

1.2 肝癌细胞裂解物制备

收集对数生长期 HepG2 细胞,置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反复冻融,超声破碎,离心取上清液,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤作为肝癌细胞裂解物,同时进行蛋白定量,冻存备用。

1.3 肿瘤细胞外泌体(tumor exosome, T-exo)的分离与鉴定

1.3.1 分离 选取对数生长期 HepG2 细胞,加入无血清的 DMEM 培养 12 h 后收集细胞培养上清液, $300 \times g$ 离心($4\text{ }^\circ\text{C}$) 10 min 去除细胞, $800 \times g$ 低温离心 30 min 去除细胞碎片, $10\ 000 \times g$ 低温离心 30 min 取上清液,用离心超滤管以 $1\ 000 \times g$ 离心 30 min 浓缩,并将 30 g/L 的蔗糖重水垫、浓缩液和 PBS 以 3:3:4 的比例依次加入离心管中,以 $100\ 000 \times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 超速离心 60 min。取出承载 Exo 的蔗糖/重水缓冲垫,置于 100 kD MWCO 超滤离心管中 $1\ 000 \times g$ 离心 30 min,用 PBS 洗涤后得到的 T-exo, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,采用 BCA 法定量 T-exo 的总蛋白, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 透射电镜观察 T-exo 形态 取 $20\text{ }\mu\text{l}$ T-exo 悬液滴于载样铜网上,室温静置 1 min,滴加 2% 磷钨酸(pH 7.0)室温负染 1 min,白炽灯下烤干后,透射电镜下观察并拍照。

1.3.3 Western blotting 法检测 T-exo 膜标志分子 CD63、CD9 及肝癌抗原 AFP 的表达 T-exo 经超声波冲击破膜后,采用 BCA 法测定蛋白浓度,取 $30\text{ }\mu\text{g}$,行 10% SDS-PAGE 分离,湿转至 PVDF 膜,室温封闭 1 h,分别加入 CD63、CD9、AFP(鼠源性,均按 1:1 000 稀释)和 GAPDH(1:10 000)一抗, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育

过夜, TBST 缓冲液洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗鼠或山羊抗兔 IgG 二抗, 室温孵育 2 h, 洗涤后加入 ECL 化学发光试剂显影。采用 Image Lab 4.1 凝胶图像分析软件分析灰度值, 以目的蛋白条带与 GAPDH 条带灰度值比值表示各目的蛋白表达水平。实验重复 3 次。

1.4 DC 的分离和培养

常规抽取健康志愿者外周血 50 ml (肝素抗凝), Ficoll 分离 PBMC, 经贴壁获得 DC 前体细胞, 加入含 rhGM-CSF 和 rhIL-4 的完全培养基, 第 6 天收获细胞并按负载 AFP 的不同方式分 5 组: A, 人工合成 AFP 抗原肽 (10 ng/ml); B, HepG2 细胞裂解物 (100 μ g/ml); C, HepG2 细胞分泌的 T-exo (25 μ g/ml); D, rAAV/AFP (1 $\times 10^{10}$ Vg/ml); E, 未负载抗原的 DC 作为对照。

1.5 流式细胞术检测 rAAV/AFP 病毒感染的效率及各组 DC 表型

收集 rAAV 感染第 6 天的 D 组 DC 和其他各组 DC, 分别加入 CD83、CD209 (ICAM-3)、CD1a、CD80、CD86、CD54 (ICAM-1)、CD58 (LFA-3)、CD11a (LFA-1a)、CCR7、HLA-ABC、HLA-DR、CD40 等荧光标记抗体或相应的同型对照抗体, 混匀后室温避光孵育 30 min, PBS 缓冲液洗涤后, 流式细胞术检测上述分子的表达量以及 rAAV 感染 DC 后绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达。

1.6 CTL 细胞的诱导

常规密度梯度离心分离 PBMC, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱孵育 3 h, 去除贴壁细胞, 调整非贴壁细胞密度为 1 $\times 10^6$ /ml。收集诱导第 8 天的不同方式负载肝癌抗原的 DC 疫苗和未经肝癌抗原致敏的 DC 作为刺激细胞, 调整细胞密度为 1 $\times 10^5$ /ml, 加入丝裂霉素 C 25 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min, PBS 洗 3 次, 完全培养基悬浮, 与经磁珠分选的 CD3⁺T 淋巴细胞 (简称初始 T 淋巴细胞, 1 $\times 10^6$ 个细胞/孔) 按 1:10 的比例混合, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱共孵育 48 h。

1.7 流式细胞术检测 DC 诱导初始 T 淋巴细胞的增殖效应

以活细胞荧光标记物羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE) 为细胞增殖示踪物, 收集初始 T 淋巴细胞于预温的培养基中, 调节密度至 1 $\times 10^6$ /ml, 每 ml 细胞中加入 2 μ l CFSE 贮存液, 终浓度为 10 μ mol/L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 加入 5 倍体积的冷培养基, 终止染色, 冰上孵育 5 min, 离心沉淀细胞, 新鲜培养基洗 3 次。将 4 组致敏的 DC 及其对照组 DC 分别与

CFSE 染色的初始 T 淋巴细胞 1:10 比例混合共孵育 48 h 后收集细胞, 将单纯淋巴细胞组设为对照, 流式细胞仪 488 nm 激发光检测细胞增殖。同时收集与 DC 细胞共孵育 48 h 的 T 淋巴细胞, 用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 70% 乙醇固定 12 h, PI 染色后流式细胞术检测细胞周期。实验重复 3 次。

1.8 CFSE/7-AAD (PI) 双染流式细胞术检测各组 DC 诱导 CTL 对 HepG2 细胞的杀伤效应

按 CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit 试剂说明, 将靶细胞 HepG2 细胞重悬于 CFSE 染液中, 调整密度至 1 $\times 10^6$ /ml, 分别收集各组效应细胞 400 $\times g$ 离心 5 min, 调整效应细胞密度至 5 $\times 10^6$ 个/ml。效靶细胞 25:1 混合, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下孵育 4 h (或更久), 400 $\times g$ 离心 5 min 后吸弃上清。将细胞重悬于 0.5 ~ 1 ml 7-AAD 染液混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min, 400 $\times g$ 离心 5 min, 用 0.5 ~ 1 ml Assay Buffer 重悬细胞。流式细胞仪 FL1 通道检测 CFSE 的荧光强度, FL3 通道检测 7-AAD 的荧光强度, CFSE 和 7-AAD 双标记的细胞为死亡的靶细胞, 检测 CFSE 和 7-AAD 双标记细胞百分比^[7-8], 计算效应细胞的杀伤活性。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), LSD 检验和 Dunnett (双侧) 检验进行组间两两比较, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T-exo 的形态及其膜标志分子 CD9、CD63 及肝癌抗原 AFP 分子的表达水平

透射电镜观察结果 (图 1) 显示, HepG2 肝癌细胞株来源的 T-exo 为直径介于 30 ~ 100 nm 的膜性微囊, 呈圆形或椭圆形, 腔内为低电子密度成分, 散在分布或聚集成团。Western blotting 检测结果 (图 2) 显示, T-exo 表达膜相关标志分子 CD63、CD9 及抗原分子 AFP 的表达量分别为 (0.64 \pm 0.26)、(0.84 \pm 0.67) 和 (0.58 \pm 0.39)。

2.2 rAAV/AFP 病毒感染的效率

荧光显微镜检测结果 (图 3) 显示, 携带 AFP 的 rAAV 成功感染 DC, 镜下 DC 呈现绿色荧光。流式细胞术检测感染效率达到 89.3%。

2.3 不同方式负载 AFP 对 DC 表型的影响

各组分别用 IL-4、GM-CSF 诱导 DC 分化增殖, 以不同方式将抗原负载 DC 后, LPS 促其成熟, 第 7 天收集成熟 DC 细胞, 流式细胞术检测结果 (表 1) 表明 rAAV/AFP 感染 DC 后 CD83、CD86、CD54、

CD58、CD40 分子表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 而其他不同方式负载组之间没有显著差异, 均能促进 DC 成熟及相关分子的表达。

2.4 不同方式负载 AFP 的 DC 对初始 T 淋巴细胞增殖的影响

5 组 DC 分别与初始 T 细胞 (1:10) 共孵育 48 h, CFSE/7-AAD (PI) 双染流式细胞术检测结果 (图 4) 显示, DC 疫苗可诱导强烈的增殖反应, CFSE 染色荧光衰减部分 (CFSE⁻) 代表细胞增殖, 各组 CFSE⁻ 百分率分别是 A 为 (70.92 ± 2.02)%、B 为 (66.08 ± 1.36)%、C 为 (67.44 ± 3.12)%、D 为 (77.26 ± 3.02)% 和 E 为 (54.86 ± 1.89)%, 均显著高于单纯淋巴细胞组 F (22.24 ± 2.82)% ($P < 0.05$), 抗原负载组诱导初始 T 细胞增殖效应也显著高于无抗原负载 DC 组 ($P < 0.05$)。rAAV/AFP 感染 DC 组与其他方式致敏 DC 组相比, 刺激 T 细胞增殖能力明显增强 ($P < 0.05$)。

流式细胞术检测细胞周期, 结果 (图 5) 显示, 与单纯淋巴细胞组相比, 各组 DC 疫苗 S 期和 G₂/M 期细胞明显增加 ($P < 0.05$), 而 rAAV/AFP 组除与 DC-AFP/Peptide 组 S 期细胞比较无统计学意义外 ($P > 0.05$), 与其他各组比较均有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.5 不同方式负载 AFP 的 DC 体外诱导 CTL 对 HepG2 细胞的杀伤效应

在效靶比为 25:1 条件下各组 CTL 与 HepG2 肝癌细胞株共培养 4 h 后, 流式细胞术检测 CFSE/7-AAD 双标记细胞百分比, 结果 (图 6) 显示, 经 AFP 抗原致敏 DC 诱导的 CTL 对肝癌细胞有明显的细胞毒作用, 显著高于 F、G 对照组 ($P < 0.05$)。rAAV/AFP 感染 DC 组与 T-exo 致敏 DC 组对 AFP 阳性的

HepG2 肝癌细胞系有较强的杀伤作用, 杀伤率分别为 (41.40 ± 2.87)% 和 (44.92 ± 4.12)%, 明显高于其他组 ($P < 0.05$)。

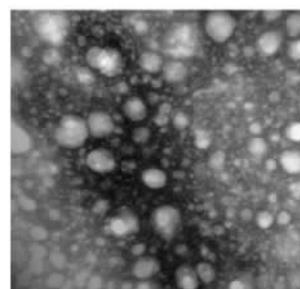


图 1 HepG2 细胞来源的 T-exo 电镜下结构 (×150 000)

Fig. 1 Electron micrograph of T-exo derived from HepG2 cells (×150 000)

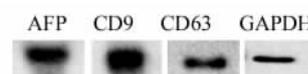


图 2 Western blotting 检测 T-exo 中 AFP、CD9 和 CD63 的表达

Fig. 2 Western blotting analysis of AFP, CD9 and CD63 in HepG2-derived T-exo

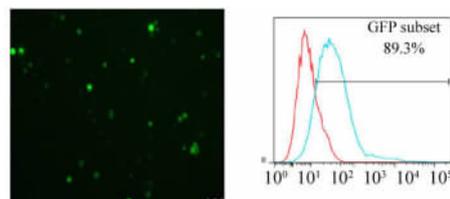


图 3 rAAV/AFP 感染 DC 的效率 (×40)

Fig. 3 Flow cytometric analysis of rAAV/AFP infection in DC (×40)

表 1 流式细胞术分析各组 DC 表面分子的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Expression of surface markers in DCs by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$)

Group	Control	DC + AFP/Peptide	DC + rAAV/AFP	DC + HepG2-lysate	DC + HepG2-Exo
CD1a	27.36 ± 13.09	32.24 ± 11.71	37.04 ± 7.53	31.48 ± 7.53	33.02 ± 8.68
CD83	66.62 ± 10.33	74.62 ± 11.13	86.24 ± 5.47*	82.08 ± 4.39	74.68 ± 10.27
CD209	81.76 ± 6.68	85.92 ± 4.02	94.08 ± 2.10	84.68 ± 4.03	83.13 ± 5.00
CD80	53.24 ± 6.74	65.74 ± 21.93	69.04 ± 33.73	62.12 ± 12.91	56.94 ± 13.23
CD86	76.78 ± 9.03	86.58 ± 5.68	94.84 ± 1.93*	88.74 ± 2.63	80.64 ± 3.38
CD54	68.16 ± 8.97	80.68 ± 4.57*	89.96 ± 7.57*	78.82 ± 3.53*	81.56 ± 6.55*
CD58	79.00 ± 7.83	85.23 ± 9.61	88.69 ± 10.46*	82.20 ± 8.38	82.90 ± 11.37
CD11a	82.7 ± 4.87	82.08 ± 3.63	84.36 ± 13.15	81.42 ± 10.98	87.84 ± 6.62
CCR7	46.18 ± 17.12	54.46 ± 27.1	58.16 ± 37.28	59.3 ± 29.78	57.56 ± 26.17
HLA-ABC	97.54 ± 0.98	98.08 ± 1.52	99.7 ± 0.17	98.6 ± 0.44	99.38 ± 0.26
HLA-DR	93.12 ± 3.24	96.9 ± 1.39	98.7 ± 0.72	97.16 ± 1.04	96.56 ± 1.55
CD40	74.88 ± 5.08	77.18 ± 16.77	87.68 ± 6.27*	80.55 ± 7.71	74.90 ± 10.92

* $P < 0.05$ vs Control

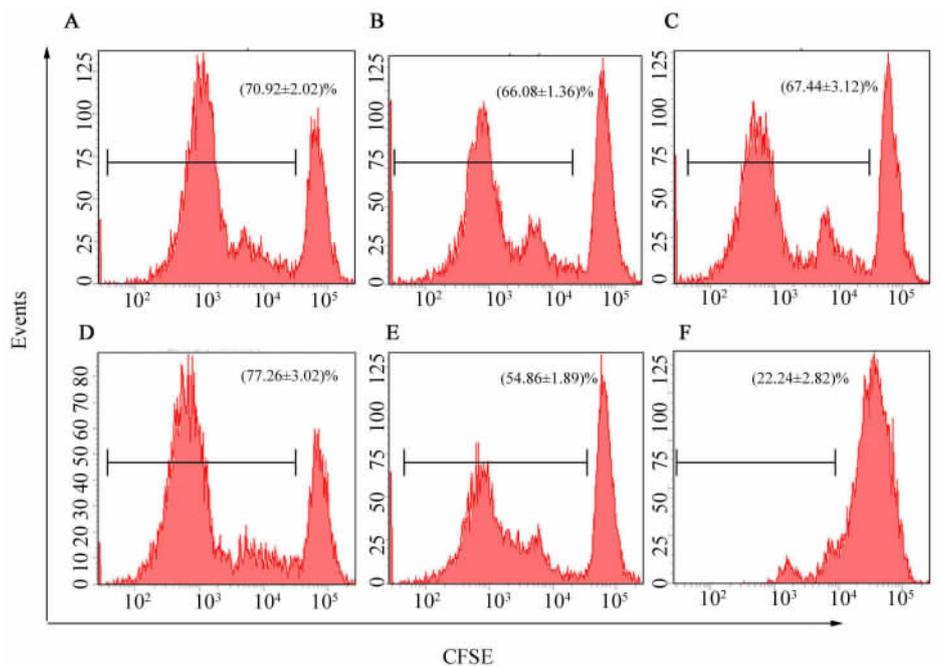


图 4 CFSE 染色法检测不同方式负载 AFP 的 DC 对初始 T 淋巴细胞增殖的影响

Fig. 4 Proliferation of native T lymphocyte induced by AFP antigen loaded-DCs in different ways with CFSE

A: Lymphocyte + DC-AFP/Peptide; B: Lymphocyte + DC-HepG2 lysate; C: Lymphocyte + DC-HepG2-Exo;
 D: Lymphocyte + DC-rAAV/AFP; E: Lymphocyte + DC Control; F: Lymphocyte

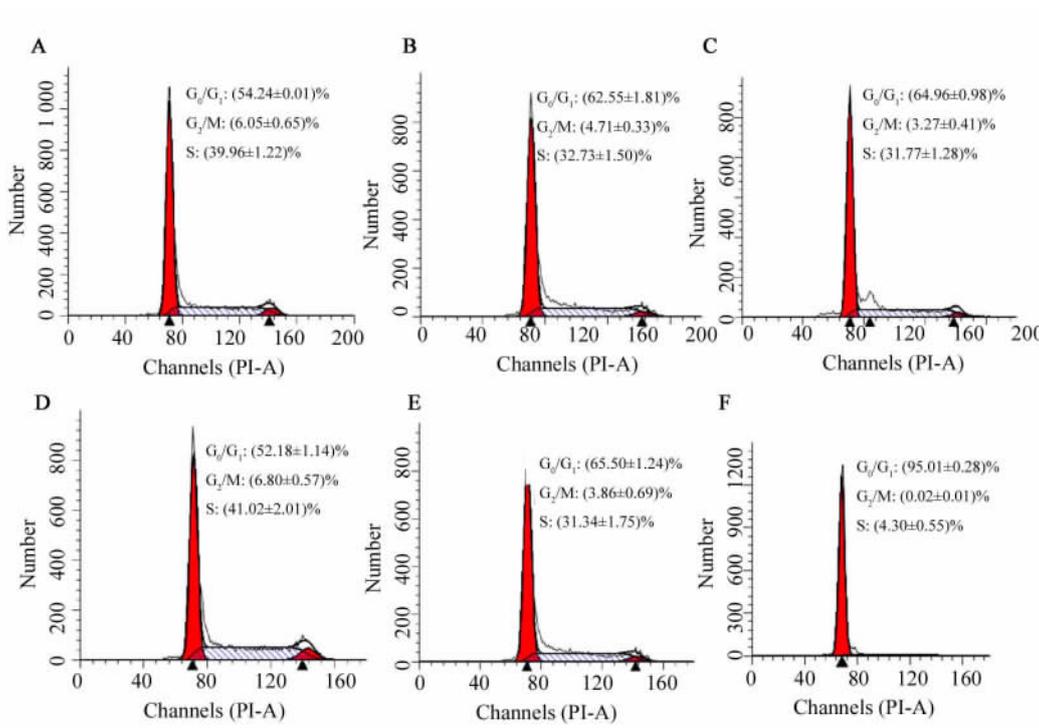


图 5 不同方式负载 AFP 的 DC 对初始 T 淋巴细胞增殖周期的影响

Fig. 5 Proliferation cycle of native T lymphocyte induced by AFP antigen loaded-DCs in different ways

A: Lymphocyte + DC-AFP/Peptide; B: Lymphocyte + DC-HepG2-lysate; C: Lymphocyte + DC-HepG2-Exo;
 D: Lymphocyte + DC-rAAV/AFP; E: Lymphocyte + DC-Control; F: Lymphocyte

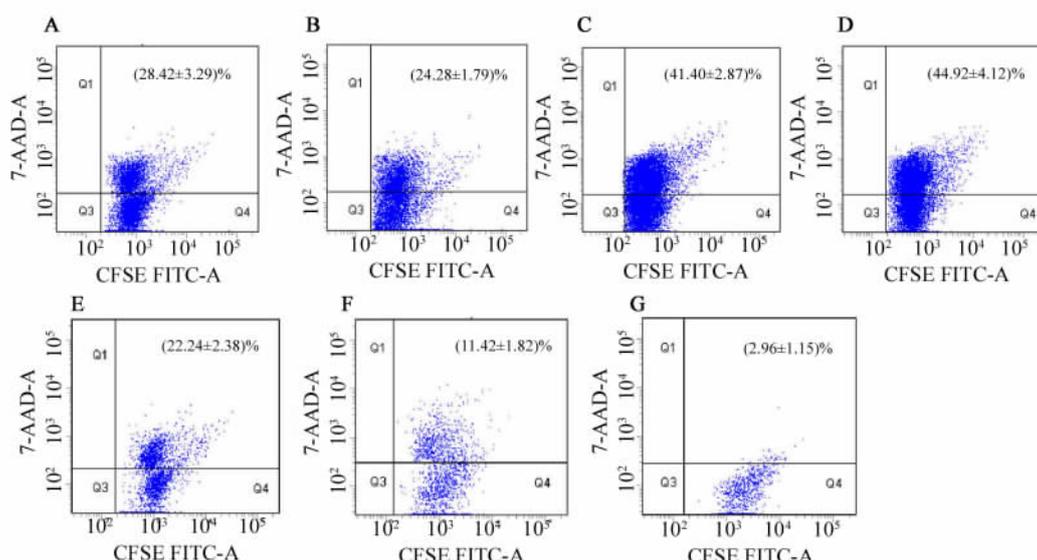


图6 各组 DC 诱导 CTLs 对 HepG2 细胞的杀伤

Fig.6 Cytotoxic effect of CTLs induced by different DCs against HepG2 cells

A: AFP/Peptide-DC + CTL + HepG2 ; B: HepG2-lysate-DC + CTL + HepG2 ; C: HepG2-exo-DC + CTL + HepG2 ;
D: rAAV/AFP-DC + CTL + HepG2; E: Control-DC + CTL + HepG2; F: Lym + HepG2; G: HepG2

3 讨论

2013 年《科学》杂志提出肿瘤治疗的突破在于肿瘤免疫治疗,预示着癌症免疫治疗时代已经来临。DC 是体内功能最强的专职抗原提呈细胞,研究^[9-10]发现,DC 表面表达其标志分子 CD1a、CD83、CD209 (ICAM-3),共刺激分子 CD80、CD86,黏附分子 CD54 (ICAM-1)、CD58 (LFA-3),迁移分子 CD11a (LFA-1a)、CCR7,抗原提呈分子 HLA-ABC、HLA-DR,信号转导分子 CD40 等,随着 DC 细胞成熟这些分子表达水平随之增高。临床上肿瘤患者由于体内 DC 数量少、成熟度低且协同刺激分子表达不足,易造成机体的免疫耐受。因此,体外扩增成熟 DC,增强 DC 促进淋巴细胞增殖分化能力是肿瘤免疫治疗的一大优势。动物实验^[11]已证实,以 DC 为基础的疫苗免疫是很有前景的癌症治疗手段,如何将合适的抗原信息以更理想方式的致敏 DC,并诱导 CTL 杀伤效应是肿瘤免疫治疗中需要解决的关键问题。

目前,常见的抗原负载 DC 细胞的手段^[46]包括:(1)已知序列的抗原肽;(2)自体肿瘤的弱酸洗脱抗原;(3)凋亡的肿瘤细胞;(4)全肿瘤细胞裂解物;(5)DC 与肿瘤细胞融合;(6)病毒载体携带抗原基因转染 DC;(7)提取的肿瘤 exosomes 冲击 DC 等。本研究通过对不同方式负载 AFP 抗原的 DC 的表型变化、其对促进初始 T 淋巴细胞增殖及诱导 CTL 对

肝癌细胞 HepG2 杀伤作用的比较,探讨不同方式负载抗原的 DC 疫苗的抗肿瘤免疫效应。

本研究结果表明,与未负载抗原的 DC 相比,负载 AFP 抗原的 DC 功能相关分子表达升高,成熟度也提高,从而证实了 AFP 抗原以不同方式负载 DC 均能诱导 DC 成熟活化。而在负载抗原的 DC 各组中,利用病毒载体介导抗原基因感染 DC 细胞的方法因其明确的靶向性、较高的转染效率而凸显出优势。在本课题组前期的研究及其他学者的报道^[12-13]中发现,AAV 对 DC 转染效率 > 85% 且能增加 DC 表面标志 CD83、CD86、CD54、CD58、CD40 分子表达水平,从而上调 DC 的功能。在 DC 制备过程中,抗原基因的表达至关重要,当以 rAAV/AFP 感染 DC 后,流式细胞仪检测 89% 的 DC 成功表达 AFP 抗原,实现抗原信息成功加载。基因转染后是否会影响 DC 的成熟,本实验结果显示,rAAV/AFP 感染的 DC,第 6 天具备典型的成熟 DC 形态,高表达多种成熟 DC 的表面标志,表明 rAAV 感染对 DC 的成熟无明显影响。

研究^[14]报道,成熟的 DC 能通过直接接触或分泌功能性细胞因子等方式诱导 CTL 细胞增殖,促进其细胞因子的分泌并增强抗肿瘤活性。本研究结果显示,各种方式负载 AFP 抗原的成熟 DC 均能促进初始 T 淋巴细胞增殖,而 rAAV/AFP 感染 DC 组具有更强的增殖活性,表明以肿瘤抗原基因制备的 DC

在促进 T 细胞增殖能力方面高于以肿瘤抗原蛋白制备的 DC。同时本研究进一步验证了经各组 AFP 抗原刺激的 DC 诱导 CTL 细胞对肝癌细胞 HepG2 的杀伤能力。流式细胞术检测结果表明, rAAV/AFP 感染 DC 组与 T-exo 致敏 DC 组对 AFP 阳性的 HepG2 肝癌细胞的杀伤活性明显高于其他致敏组和对照组。说明 rAAV/AFP + DC 和 T-exo + DC 可有效诱导 CTL 并提高其对肿瘤细胞的杀伤能力。

T-exo 指肿瘤细胞来源的外泌体, 是由活细胞分泌的膜性微囊结构, 根据细胞来源的不同其组分和功能也不同。蛋白组学分析显示, T-exo 表达 MHC-I 类分子、四穿膜蛋白、热激蛋白及肿瘤相关抗原等^[15-16], 有很强的免疫原性, 其成分简单, 作为肿瘤疫苗, 既避免了肿瘤细胞裂解物成分的复杂性, 又不同于肿瘤抗原肽半衰期短、转导效率低。其被 DC 摄取后, 可激活 T 淋巴细胞, 诱导机体特异性的抗肿瘤免疫效应^[17-18]。T-exo 作为新兴亚细胞肿瘤疫苗, 是近年来疫苗研究的又一热点。笔者在本实验中采用超滤离心联合蔗糖密度梯度超速离心的方法从 HepG2 肝癌细胞培养上清中提取 T-exo, 电镜下观察呈圆形或椭圆形, 直径介于 30 ~ 100 nm 的膜性微囊, 表面表达标志分子 CD63、CD9, 同时携带有肝癌相关抗原 AFP。研究结果表明, 负载 T-exo 的 DC 可刺激 T 淋巴细胞的增殖并诱导 CTL 细胞对 HepG2 细胞的杀伤效应。T-exo 可作为肿瘤抗原的重要来源, 启动免疫效应细胞介导的保护性抗肿瘤反应, 为基于 DC 的非细胞型肿瘤疫苗的探索开拓新的思路, 为肿瘤免疫治疗的深入研究提供依据。

综上, rAAV/AFP-DC 和 T-exo-DC 两种抗原负载手段均能使携带的抗原信息在 DC 上获得良好表达, 并诱导出强大而特异的 CTL 杀伤效应, 使有限数量 DC 获得功能的最大化, 因此具有广泛的临床应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Hontscha C, Borck Y, Zhou H, et al. Clinical trials on CIK cell: first report of the international registry on CIK cells (IRCC) [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(2): 305-310.
- [3] Sbiera S, Wortmann S, Fassnacht M. Dendritic cell based immunotherapy—a promising therapeutic approach for endocrine malignancies [J]. *Horm Metab Res*, 2008, 40(2): 89-98.
- [4] Rosenblatt J, Kufe D, Avigan D. Dendritic cell fusion vaccines for cancer immunotherapy [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5(5): 703-715.
- [5] Butterfield LH, Ribas, Dissette VB, et al. A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with for alpha-fetoprotein peptides [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(9): 2817-2825.
- [6] Butterfield LH, Ribas A, Economou JS. Chapter 10-DNA and dendritic cell-based genetic immunization against cancer [M] // Lattime EC, Gerson S. *Gene Therapy of Cancer (Second Edition)*. London: Academic Press Inc, 2002, 179-198.
- [7] Lecoeur H, Février M, Garcia S, et al. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity [J]. *J Immunol Methods*, 2001, 253(1/ 2): 177-187.
- [8] 石秀敏, 牛超, 李敏, 等. 细胞毒性 T 淋巴细胞活性检测方法进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(3): 429-432.
- [9] 曹雪涛. 树突状细胞的分化发育、抗原提呈及其功能调控的研究 [J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25(5): 547-549.
- [10] Peng X, Hussain SF, Paterson Y. The ability of two listeria monocytogenes vaccine targeting human papilloma virus-16E7 to induce an anti tumor response correlates with myeloid dendritic cell function [J]. *Immunol*, 2004, 172(10): 6030-6038.
- [11] Kalinski P, Urban J, Narang R, et al. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need [J]. *Future Oncol*, 2009, 5(3): 379-390.
- [12] 尤长宣, 罗荣城, 苏瑾, 等. 腺相关病毒介导乳腺癌 BA46 基因转移的实验研究 [J]. *中华微生物与免疫学杂志*, 2004, 24(9): 724-727.
- [13] Liu Y, You CX, Luo RC, et al. Use and specificity of breast cancer antigen/milk protein BA46 for generating anti-self -cytotoxic T lymphocytes by recombinant adeno-associated virus based gene loading of dendritic cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3): 304-312.
- [14] Gao D, Li C, Xie X, et al. Autologous tumor lysate-pulsed dendritic cell immunotherapy with cytokine-induced killer cells improves survival in gastric and colorectal cancer patients [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e93886.
- [15] André F, Schanz NE, Chaput N, et al. Tumor-derived exosome A new source of tumor rejection antigens [J]. *Vaccine*, 2002, 20(Suppl 4): A28-31.
- [16] Cho JA, Lee YS, Kim SH, et al. MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine model [J]. *Cancer Lett*, 2009, 275(2): 256-265.
- [17] Marton A, Vizler C, Kusz E, et al. Melanoma cell-derived exosomes alter macrophage and dendritic cell functions in vitro [J]. *Immunol Lett*, 2012, 148(1): 34-38.
- [18] BU N, WU H, SUN B, et al. Exosome-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8⁺ cytotoxic T cells in patients with glioma [J]. *J Neurooncol*, 2011, 104(3): 659-667.

[收稿日期] 2015 - 04 - 02 [修回日期] 2015 - 08 - 10

[本文编辑] 阮芳铭