

自体肝癌细胞裂解物致敏的树突状细胞 诱导抗肝癌免疫的体外研究^①

陈 敏¹, 高 建², 彭明利¹, 任 红^{1,2}

1. 重庆医科大学 病毒性肝炎研究所, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学 附属第二医院肝病治疗中心, 重庆 400010

摘要: 从术后肝癌病人的外周血中诱导树突状细胞(DC), 并经自体肝癌细胞裂解物致敏 DC, 用流式细胞仪、³H-TdR 掺入法及 MTT 法检测了 DC 表面分子的表达、DC 刺激 T 细胞的增殖效应及 DC 诱导的 T 细胞对肝癌细胞的杀伤作用, 进而比较经自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 与其它条件下的 DC 功能的差异. 结果显示: 肝癌细胞裂解物致敏 DC 的功能较未致敏 DC 显著提高, 其可诱导自体混合淋巴细胞强的增殖效应, 同时诱导的 T 细胞对自体肝癌细胞有较强的杀伤率.

关键词: 树突状细胞; 癌; 肝细胞; 裂解物; 癌细胞

中图分类号: R512

文献标识码: A

肝癌为我国高发肿瘤, 现已居我国癌症的第二位, 死亡率高, 其治疗策略以早期手术切除, 中、晚期化学药物治疗或其它辅助治疗为主, 但总体预后不理想, 易复发. 近年来肿瘤的免疫治疗越来越受到重视, 它可作为一种与手术、放化疗联合应用的辅助疗法, 对清除术后的微小病灶, 预防肿瘤复发与转移有较好作用. 尤其是树突状细胞(dendritic cells, DC)在临床的逐步应用, 为治疗肿瘤及预防复发与转移开辟了新的途径. DC 是机体功能最强的抗原递呈细胞, 研究表明, 用肿瘤相关抗原致敏的 DC 可产生强大的诱导 T 细胞功能, 并可特异的杀伤肿瘤细胞^[1,2]. 由于 DC 疫苗的制作目前还缺乏一种标准的操作, 且其受到的影响因素较多, 因此作者拟用术后肝癌病人外周血经细胞因子诱导成 DC, 并经自体肝癌组织裂解物作抗原致敏, 在体外观察 DC 特异性抗肝癌细胞的功能, 为下一步 DC 在肝癌的辅助治疗中的临床应用提供实验基础.

1 材料与方 法

1.1 研究对象及主要试剂

15 例肝癌患者均为重庆医科大学附属第二医院肝胆外科手术患者, 年龄 23~62 岁, 术前未经放射疗法、化学疗法等治疗, 术后病理活体组织检查为肝细胞性肝癌.

试剂 rhGM-CSF、rhIL-4 和 rhIL-2(美国 PeproTech 公司), 胶原酶 IV、DNA 酶(美国 Sigma 公司), FITC 标记的鼠抗人单克隆抗体 CD1a、CD40、CD86、HLA-DR 及 FITC 标记的鼠 IgG1, κ (美国 BD-Pharmingen 公司), ³H-胸腺嘧啶(³H-TdR)(中国科学院原子能研究所), 淋巴细胞分离液(中国医学科学院血液学研究所). 人肝癌细胞株 HepG2 和人鼻咽癌细胞株 HNE-1 由本研究室保存.

① 收稿日期: 2006-09-05

作者简介: 陈 敏(1975-), 女, 四川成都人, 博士研究生, 主要从事乙型肝炎的免疫发病机理与免疫治疗方面的研究.

通讯作者: 任 红, 教授, 博士生导师.

1.2 方 法

1.2.1 自体肝癌细胞及其裂解物的制备

将手术切除的肝癌组织用无钙磷的 Hank's 液浸泡、洗涤,切去边缘硬化组织及结缔组织,将其尽可能地剪碎,经消化液(含 1% 胶原酶 IV 与 0.05% DNA 酶)37 °C 消化 30 min 制成细胞悬液,经 70 μm 筛网过滤去除未消化完全的组织块,用淋巴细胞分离液分离(2 000 rpm, 20 min),收集中间界面层的细胞即为肝癌细胞. 将新分离的自体肝癌细胞经 -70 °C 和 37 °C 反复冻融和超声破碎,离心取上清液,经 0.2 μm 滤膜过滤即为肝癌细胞裂解物,并经考马斯亮兰法作蛋白定量,冻存备用.

1.2.2 树突状细胞的体外培养

取肝癌患者外周血 50 mL,肝素抗凝,常规淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞,用 RPMI-1640 完全培养基重悬细胞,放置 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 2 h 后,吸出未贴壁细胞(供分离淋巴细胞用),留下贴壁细胞,加入含 rhGM-CSF 1000 U/mL 和 rhIL-4 500 U/mL 的 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,隔日加细胞因子(首次浓度的 1/2)和培养基(吸弃 30%, 加 50%),培养 7d 收集的细胞即为未致敏 DC. 在培养的第 6 天,加入肝癌细胞裂解物(120 μg/mL)共培养,过夜收获悬浮和轻度贴壁的细胞即为致敏 DC.

1.2.3 DC 细胞表型的测定

DC 用 PBS 洗 2 次,取 5×10^5 个细胞,加入 FITC 标记的单抗 15 μL,混匀后于 4 °C 放置 30 min,用含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 洗 2 次,然后用流式细胞仪测定细胞表面 CD1a, CD40, CD86 和 HLA-DR 分子的表达.

1.2.4 DC 体外诱导的淋巴细胞增殖效应

收集肝癌细胞裂解物致敏 DC、未致敏 DC、肝癌细胞裂解物、对照物与自体淋巴细胞以 1:20 的比例混合加入 96 孔板共孵育,每组设 3 个复孔,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 5 d,加入 ³H-TdR 1 μCi/孔,孵育 12 h,收获细胞,用液体闪烁计数器测定增殖效应(cpm 值).

1.2.5 DC 诱导的淋巴细胞毒活性的检测

将肝癌细胞裂解物致敏 DC、未致敏 DC、肝癌细胞裂解物、空白对照物分别与淋巴细胞按 1:20 比例混合,以含 hIL-2(100 U/mL)的 RPMI-1640 培养液培养,收集共培养 5 d 的淋巴细胞作为效应细胞,取 HepG2(异体肝癌细胞)、HNE-1(非肝癌源癌细胞)及自体肝癌细胞作为靶细胞,按 20:1, 40:1, 60:1 的效靶比加入效应细胞,同时设立单一靶细胞、单一效应细胞及空白对照,每组设 3 个复孔,按四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测淋巴细胞毒活性. 特异性细胞杀伤率 = $[1 - (\text{实验组 A 值} - \text{效应细胞 A 值}) / \text{靶细胞 A 值}] \times 100\%$.

1.2.6 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较用 *t* 检验, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 肝癌细胞裂解物对 DC 表型的影响

肝癌患者 PBMC 用 GM-CSF 和 IL-4 诱导培养 7 d 后,在光镜下可见大量具有树突样突起的悬浮细胞,并且细胞成簇分布(图 1). 流式细胞仪检测细胞表面的分子标记,结果显示, CD1a, CD40, CD86, HLA-DR 等分子均呈较高表达,这些分子为抗原递呈细胞所特有的标志,表明 DC 诱导成功. 结果还显示,DC 经肝癌细胞裂解物致敏后,DC 表面分子表达均有不同程度上调,其中以 CD1a、CD86 等分子表达上调明显(表 1),说明经致敏后 DC 为成熟 DC,可激活 T 淋巴细胞.

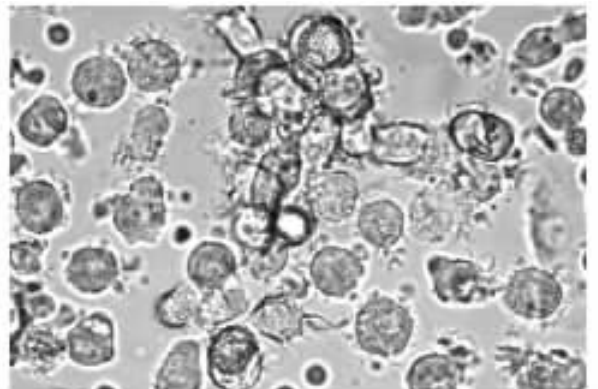


图 1 光镜下 DC 的形态(诱导 7 d, ×400 倍)
Fig. 1 Cellular Morphology of Dendritic Cells (Induced 7 Days, 400 Magnification)

表 1 肝癌细胞裂解物负载对 DCs 细胞表型的影响($\bar{x} \pm S$, $n=15$)

Table 1 The Changes of the Phenotype of DC after Loaded with Hepatoma Cell Lysate %

分 组	CD1a	CD40	CD86	HLA-DR
DC(未致敏)	71.37±10.75	42.02±15.25	68.23±12.3	89.25±6.18
DC(致敏)	81.58±15.12*	45.25±12.03	79.55±14.6**	93.51±7.01

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.05$, vs DC(未致敏).

2.2 DC 体外诱导的淋巴细胞增殖效应

肝癌细胞裂解物致敏的 DC 可诱导自体混合淋巴细胞强烈增殖反应($11\ 637 \pm 1\ 762$) cpm, 明显高于未致敏 DC 组($6\ 583 \pm 1\ 057$) cpm、肝癌细胞裂解物组($2\ 135 \pm 247$) cpm)和对照组($1\ 473 \pm 203$) cpm) ($p < 0.01$), 反应出致敏 DC 可强烈激活 T 淋巴细胞, 功能上具有很高的活性.

2.3 DC 诱导的淋巴细胞毒作用

我们在预实验中观察了各种不同的效应细胞与靶细胞比例条件下, 杀伤率随效靶细胞比例增加而上升, 尤其以 60 : 1 时杀伤效能最好. 致敏 DC、未致敏 DC、肝癌细胞裂解物和对照物等 4 组在 60 : 1 的效靶比条件下, 对 3 种靶细胞的杀伤率结果见表 2, 经肝癌细胞裂解物致敏的 DC 诱导的淋巴细胞对自体肝癌细胞有明显的细胞毒作用, 其对自体肝癌细胞的杀伤率明显高于对 HepG2 的杀伤率和 HNE-1 肿瘤细胞的杀伤率($p < 0.01$). 结果表明经自体癌细胞的裂解物致敏后的 DC 对自体肝癌细胞具有强大的杀伤作用, 且这种杀伤作用是特异性的, 明显强于非自体的肝癌细胞及其它种类的癌细胞. 进一步验证了外培养的 DC 经裂解物致敏具有很高的生物学活性, 为下一步的临床应用提供了基础.

表 2 致敏 DC 诱导的肝癌特异性 CTL 对靶细胞的杀伤率($\bar{x} \pm S$)的影响

Table 2 The Specific CTL Activity Stimulated by DCs Pulsed with Hepatoma Cell Lysates %

分 组	自体肝癌细胞	HepG2 细胞	HNE-1 细胞
DC(致敏)	81.72±9.49	49.37±11.21▲	17.14±5.65▲▲
DC(未致敏)	54.82±7.35*	34.81±8.25	15.27±3.83
肝癌细胞裂解物	36.47±5.91**	21.65±5.71	14.75±4.77
空白对照	24.15±6.17***	15.51±4.32	12.43±3.52

* : $p < 0.01$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.01$, vs DC 致敏组; ▲ : $p < 0.01$; ▲▲ : $p < 0.01$; vs 自体肝癌细胞.

3 讨 论

现已公认, 树突状细胞是体内最重要、功能最强的免疫递呈细胞, 它能广泛识别并能摄取加工外源抗原及体内变异抗原, 进而高表达 CD40、CD80、CD86 等共刺激分子, 并分泌多种细胞因子, 来进一步激活抗原特异性的淋巴细胞, 发挥抗病原体、抗肿瘤等功能^[3]. 研究表明, 肿瘤组织中 DC 数量较少、免疫功能失常、凋亡、不能识别隐蔽的肿瘤抗原等因素, 参与了肿瘤的发生发展过程. 如果在体外扩增 DC, 并用肿瘤相关的抗原刺激, 可有效的诱导 T 细胞产生特异性的抗肿瘤免疫应答^[4,5]. 因此, 提高体内 DC 细胞的免疫功能为肿瘤的治疗开辟了新的思路. 正是基于此, 国内外学者纷纷尝试将 DC 应用于各种肿瘤的治疗中, 其中研究较多的为黑色素瘤、直肠癌等, 已发展到了临床应用^[5-7].

肝癌为我国高发肿瘤, 其治疗策略以早期术疗, 中晚期化疗为主, DC 疫苗治疗肝癌及预防复发与转移还处在探索阶段. DC 的来源基本采用外周血 PBMC 经体外细胞因子 GM-CSF 及 IL-4 诱导而成, 但用何种抗原激活 DC 才能高效率激活 T 细胞? 国内外均有用肝癌细胞系破碎物、肿瘤组织裂解物、或单用肿瘤细胞来致敏 DC, 均有激活 T 细胞的效果. 其中自体肿瘤细胞裂解物因个体针对性强, 且方法较简单易行, 并可激发针对多个已知或未知的肿瘤相关抗原的 T 细胞免疫, 因此本研究采用自体肿瘤细胞裂解物激活 DC, 观察其激活 T 细胞诱导特异性抗肝癌免疫的效应^[6-9].

本研究结果表明, 经自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 可高表达共刺激分子 CD40、CD86, 共刺激分子是激活 T 细胞所必需的, 因此具激活 T 细胞的功能. 同时我们检测了致敏的 DC 刺激自体 T 细胞的能力, 结果显示淋巴细胞的增殖效应非常明显, 并可分泌较高浓度的 IFN- γ (数据未显示), 以及对自体肝癌细胞有

较强的特异性杀伤功能. 表明 DC 能对自体肝癌细胞裂解物进行有效的处理加工及递呈, 在体外经致敏 DC 激活的 T 细胞具强的免疫功能及能产生特异性的抗肝癌的效应. 因此, 可能为临床治疗肝癌及预防肝癌复发与转移开辟新的途径.

参考文献:

- [1] Jefford M, Maraskovsky E, Cebon J, *et al.* The use of Dendritic Cells in Cancer Therapy [J]. *Lancet*, 2001, 2(6): 343 – 353.
- [2] Van den Broeke LT, Daschbach E, Thomas EK, *et al.* Dendritic Cell-Induced Activation of Adaptive and Innate Antitumor Immunity [J]. *J Immunol*, 2003, 171(11): 5842 – 5852.
- [3] Mellman I, Steinman RM. Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines [J]. *Cell*, 2001, 106(3): 255 – 258.
- [4] Reinhard G, Marten A, Kiske SM, *et al.* Generation of Dendritic Cell-Based Vaccines for Cancer Therapy [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(10): 1529 – 1533.
- [5] Nestle FO, Banchereau J, Hart D. Dendritic Cells: On the Move From Bench to Bedside [J]. *Nat Med*, 2001, 7(7): 761 – 765.
- [6] Zhou Y, Bosch ML, Salgaller ML. Current Methods for Loading Dendritic Cells with Tumor Antigen for the Induction of Antitumor Immunity [J]. *J Immunother*, 2002, 25(4): 289 – 303.
- [7] Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, *et al.* Immune and Clinical Responses in Patients with Metastatic Melanoma to CD34(+) Progenitor-Derived Dendritic Cell Vaccine [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(17): 6451 – 6458.
- [8] 王国俊, 马清涌, 张 梅, 等. 树突状细胞介导的 T 淋巴细胞对肝癌细胞的特异性杀伤效应 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2005, 26(3): 257 – 259.
- [9] 朱学军, 曹雪涛, 雷 虹, 等. 弱酸洗脱提取的肿瘤抗原肽致敏的树突状细胞对 CTL 的体内、外激活 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20(2): 98.

The Study in Vitro of Anti-Hepatoma Immunity Induced by Dendritic Cells Pulsed with the Lysate of Autologous Hepatoma Cells

CHEN Min¹, GAO Jian², PENG Ming-li¹, REN Hong^{1,2}

1. Institute for Viral Hepatitis, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China;

2. The Treatment Center for Liver Diseases, The Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China

Abstract: Dendritic cells were induced from peripheral blood of post-operation patients with hepatoma, then pulsed with the autologous hepatoma cells lysate. The expression of surface marker on DCs was detected by FACS, and the lymphocyte proliferative response to DC stimulation was measured by ³H-TdR incorporation methods, then the specific cytolytic activity of CTL was assessed by MTT method. The DC function difference was further analyzed by comparing the DCs in different conditions. The results showed that the DCs with lysate pulsing were much more powerful than DCs without lysate pulsing, and they could induce the high proliferation effect on mixed lymphocytes and the high CTL cytotoxicity to autologous hepatoma cells.

Key words: dendritic cells; carcinoma; hepatocellular; lysate; cancer cells