

文章编号:1005-6947(2006)02-0094-04

· 胃癌专题研究 ·

胃癌细胞-DC融合疫苗T淋巴细胞激活效应的研究

张坤¹, 余佩武², 高朋芬³, 饶云²

(南京军区福州总医院 1.肝胆外科 3.眼科,福建福州 350025; 2.第三军医大学西南医院 普通外科,重庆 400038)

摘要:目的 探讨胃癌细胞-树突状细胞(dendritic cell, DC)融合疫苗激活杀伤性T淋巴细胞的效应特点,为胃癌的免疫治疗提供实验基础与理论依据。方法 (1)胃癌患者外周血单个核细胞经GM-CSF, IL-4, TNF- α 诱导分化获取成熟DC。(2)SGC7901胃癌细胞-DC经PEG诱导融合、HAT/HT筛选培养,获得纯净融合细胞。(3)混合淋巴细胞反应对融合细胞疫苗激活效应T淋巴细胞的增殖能力进行检测。结果 按上述方法,可获得具备典型特征的DC及纯净的融合细胞。融合疫苗显著刺激T淋巴细胞增殖,与T淋巴细胞在1:1效靶比时刺激能力最强,与对照组比较差异非常显著($P < 0.01$)。结论 胃癌细胞-DC融合疫苗具有较亲代DC更强的刺激T淋巴细胞增殖的能力,可能是其发挥更强抗肿瘤生物学效应的基础。

关键词:胃肿瘤/免疫学;树突状细胞;T淋巴细胞;淋巴细胞活化

中图分类号:R735.2; R311.144

文献标识码:A

Study on the activation effects to T lymphocytes by gastric cancer cell-dendritic cell fusion vaccines

ZHANG Kun¹, YU Pei-wu², GAO Peng-fen³, RAO Yun²

(1. Department of Hepatobiliary, 3. Department of Ophthalmology, Fuzhou General Hospital, PLA, Fuzhou 350025, China; 2. Department of General Surgery, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the activation effects to cytotoxic T lymphocytes by gastric cancer cell-dendritic cell (DC) fusion vaccines and to provide theoretical data for biological therapy of gastric cancer based on anti-tumor fusion vaccines. **Methods** (1) Peripheral blood mononuclear cells from gastric cancer patients were separated and co-cultured with granulocyte macrophage colony stimulating factors, interleukin-4 and tumor necrosis factor- α to generate mature dendritic cells. (2) The dendritic cells and SGC7901 cells were fused by use of polyethylene glycol, and the pure fusion cells were screened out and cultured with HAT and HT selective culture systems. (3) The ability of fusion cells to activate the cytotoxic T lymphocytes was investigated by using MLA method. **Results** (1) Mature dendritic cells were gained from gastric cancer patients' peripheral blood mononuclear cells by co-culturing with granulocyte-macrophage colony stimulating factors, interleukin-4 and tumor necrosis factor- α . (2) Dendritic cells and SGC7901 cells could be fused by PEG and could get pure fusion cells by culture with HAT/HT selective culture systems. (3) The fusion vaccines could strongly activate cytotoxic T lymphocytes, and there were significant differences between the fusion vaccine group and the control group. ($P < 0.01$). **Conclusions** Gastric cancer cell-dendritic cell fusion vaccine has stronger ability to stimulate the proliferation of T lymphocytes than that of parent dendritic cells, and may be a basis for induction of stronger anti-tumor biological effects.

收稿日期:2005-09-21; 修订日期:2006-01-16。

作者简介:张坤,男,山东沂水人,南京军区福州总医院主治医师,博士,主要从事消化道肿瘤的外科治疗及生物治疗方面的研究。

通讯作者:张坤 电话:0591-22859377(O); E-mail:zhangkun73@yahoo.com.cn。

Key words: Stomach Neoplasms/immunol; Dendritic Cell; T-lymphocytes; Lymphocyte Transformation

CLC number: R735.2; R311.144

Document code: A

基于树突状细胞(dendritic cell, DC)的抗肿瘤疫苗研究,为人们克服胃癌威胁,提高胃癌患者生存率带来希望。DC是机体重要的专职抗原提呈细胞,抗原递呈能否有效进行,直接关系到免疫激活和免疫耐受的诱导。而基于DC的抗肿瘤疫苗研究,即试图刺激DC,增强其抗原递呈及后续激活效应T淋巴细胞的能力,从而可以发挥强而有效的抗肿瘤生物学效应。为此笔者利用细胞融合技术,将DC与胃癌细胞进行融合,试图增强其抗原提呈及激活效应T淋巴细胞的活性,以杀伤胃癌细胞的能力,实现强而有效的抗胃癌免疫应答。本研究旨在为胃癌DC瘤苗免疫治疗提供理论基础和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂及仪器

重组人粒巨细胞集落刺激因子(rhGM-CSF, Pro-mega公司),rh白细胞介素4(IL-4, R&D System公司),肿瘤坏死因子 α (TNF- α , R&D System公司),聚乙二醇(PEG, Sigma公司),次黄嘌呤(H, Sigma公司),氨基喋呤(A, Sigma公司),胸腺嘧啶核苷(T, Sigma公司),丝裂霉素C(Potency公司日本), ^3H -TdR(中科院物理所1mCi/ml)。PE-IgG1单克隆抗体(Immunotech公司),PE-CD80单克隆抗体(Immunotech公司),PE-CD1a单克隆抗体(Immunotech公司),PE-HLA-DR单克隆抗体(Immunotech公司),FITC-IgG2b单克隆抗体(Immunotech公司),FITC-CD83单克隆抗体(Immunotech公司)。 β 液闪计数器(Beckman公司),尼龙毛纤维(上海中福公司),流式细胞仪(Beckman公司USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 SGC7901-DC融合疫苗的制备及检测 应用淋巴细胞分离液分离胃癌患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),加入rhGM-CSF(100ng/mL),rhIL-4(50ng/mL),静置培养6d,加入TNF- α (20ng/mL),第7天收获DC。SGC7901胃癌细胞、DC单细胞悬液以10:1比例均

匀混合,PEG诱导融合,HAT/HT筛选培养7d,收获纯净融合细胞疫苗。按相同细胞比例将SGC7901细胞、DC单纯混合培养而不诱导融合作为对照组。在均匀纯净融合细胞悬液中,分别加入PE-CD80直标荧光单克隆抗体、PE-CD1a直标荧光单克隆抗体、PE-HLA-DR直标荧光单克隆抗体、PE-IgG1直标荧光单克隆抗体(对照)、FITC-CD83直标荧光单克隆抗体、FITC-IgG2b直标荧光单克隆抗体(对照),充分震荡均匀染色,再次充分震荡并行流式细胞仪细胞表型检测,与普通培养DC细胞表型检测对比分析。

1.2.2 外周血T淋巴细胞获取 用淋巴细胞分离液分离获取PBMC,制备尼龙毛柱, 1×10^8 PBMC重悬于2mL DMEM培养基中,将均匀细胞悬液装入尼龙毛柱,关闭阀门置37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60min。37 $^{\circ}\text{C}$ 预温、含20%小牛血清的DMEM培养基洗脱毛柱2次,获取T淋巴细胞。苔盼蓝染色检测活细胞比例。

1.2.3 融合细胞刺激效应T淋巴细胞增殖能力检测 调节T淋巴细胞、融合细胞、混合培养组DC密度分别为 5×10^6 /mL。融合细胞及混合培养组DC以终浓度25mg/L的丝裂霉素C,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30min去除增殖能力。以梯度稀释法将融合细胞及混合培养组DC分别加入96孔板中,使T淋巴细胞与融合细胞及混合培养组DC的比例分别为100:1,50:1,10:1,1:1,每比例设6个复孔,静置培养3d。混合培养结束前,加入DMEM稀释的 ^3H -TdR,每孔实际放射比活度为1 μCi ,继续培养12h,以ZT-II型多头细胞收集器和“49”型玻璃纤维滤纸,大量磷酸缓冲液冲洗培养孔收集细胞,10%三氯乙酸、无水乙醇洗涤、固定。滤纸片以60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干后放入盛有闪烁记数液的记数瓶中,用Beckman液闪记数仪测量每分钟记数(counts per minute, CPM)值。以空白T细胞孔及空白DMEM培养基孔分别对照检测。

1.3 统计分析

所得数据取平均值,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS程序进行统计分析。均数的比较用 t 检验及单因素方差分析;率的比较用卡方检验

及多个独立样本比较的秩和检验。确定 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 融合细胞形态学观察及细胞表型检测

融合细胞体积较亲代细胞体积明显增大, 悬浮

生长, 胞浆透明, 形态规则, 多呈圆形, 细胞边界清晰, 胞膜完整, 细胞表面未见明显的毛刺样突起。其细胞表面分子 CD83, CD1a, CD80, HLA-DR 的表达水平均较普通培养的 DC 显著增高 (均 $P < 0.01$) (图 1, 表 1)。

FITC - 对照

CD83

PE - 对照

CD1a

CD80

HLA-DR

图 1 融合细胞表型检测流式图

表 1 融合细胞、普通培养 DC 细胞表型表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

分组	细胞表型			
	CD83	CD1a	CD80	HLA-DR
融合细胞组	80.16 ± 1.12	72.86 ± 2.48	81.24 ± 2.76	79.54 ± 1.60
普通 DC 组	75.54 ± 0.73	64.94 ± 0.52	61.56 ± 0.28	62.50 ± 0.66
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 2 不同效应细胞刺激 T 淋巴细胞增殖能力 (CPM, $\bar{x} \pm s$)

组别	效应细胞: T 淋巴细胞			
	1: 1	1: 10	1: 50	1: 100
融合细胞疫苗组	15083 ± 231	9608 ± 83	4214 ± 135	3020 ± 28
混合培养 DC 组	5977 ± 272	3019 ± 38	2086 ± 58	1500 ± 41
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 融合细胞刺激 T 淋巴细胞增殖效应

融合细胞表面分子 CD83, CD1a, CD80, HLA-DR 的表达较未处理 DC 明显增高; 其激发后续 T 淋巴细胞增殖的能力亦有明显增强。其中融合细胞激活 T 淋巴细胞的增殖能力与空白 T 淋巴细胞对照组及混合培养 DC 组比较差异非常显著 ($P < 0.01$); 混合培养 DC 组激活 T 淋巴细胞的增殖能力在 1: 1, 1: 10, 1: 50 比例时与空白 T 淋巴细胞组差异非常显著 ($P < 0.01$) (表 2, 图 2)。

图 2 不同效应细胞刺激 T 淋巴细胞增殖的能力

3 讨论

在肿瘤生物治疗研究中,DC因其具有强大抗原提呈及免疫激发能力而受到广泛重视;人们尝试采用多种途径增强DC功能,制备抗肿瘤疫苗^[1-2]。本研究将肿瘤细胞与DC融合,试图通过肿瘤抗原决定基因与DC基因重组取得更强的DC免疫激活效果。在SGC7901胃癌细胞与DC融合过程中,未融合亲代细胞及相同亲代细胞融合体被HAT/HT选择培养系统选择性地杀灭筛选而获取纯净融合细胞。融合细胞具有类似于亲代DC的悬浮生长特性,如细胞体积明显增大、细胞表面分枝状突起较亲代DC明显短小且稀少、细胞数量较亲代细胞明显减少等;反映出融合细胞具有独特的与亲代DC明显不同的细胞形态特征。同时融合细胞表型表达水平较未经修饰而正常培养的DC表型比较显著升高。表明融合细胞直接获取到肿瘤细胞抗原信息的同时又保持了类似于亲代DC的表面分子表达特点,但其细胞表型表达量却较亲代DC显著升高,从而在更多、更完整地对抗肿瘤抗原进行提呈的同时,发挥较亲代DC更强大的刺激后续免疫反应的能力。

DC加工处理提呈肿瘤抗原信息后,通过激活T淋巴细胞而发挥抗肿瘤细胞免疫效应。机体T淋巴细胞是不均一的细胞群体,根据其表面标志和功能特点可以分为不同的细胞亚群,其中Th细胞属CD4+T细胞亚群,Tc(CTL)则属CD8+细胞亚群。Tc亚群在体内以非活化的前体细胞(pTc)形式存在,在经过抗原激活及CD4+Th细胞协同作用下分化发育为效应Tc细胞后通过双信号途径发挥杀瘤作用。因此,机体内T淋巴细胞的数量及活性状态直接关系到机体抗肿瘤免疫反应的强弱^[3]。而修饰DC作为抗肿瘤疫苗的目的主要

是尽可能大地增强其刺激T淋巴细胞增殖及活性的能力^[4-5]。有研究^[6]报道使用抗原基因转染DC后,可在动物体内诱发强烈的抗原特异性CD4+Th及CD8+CTL产生。本实验发现融合细胞可强烈刺激T淋巴细胞增殖,且其刺激能力明显优于仅与SGC7901胃癌细胞混合培养的DC;提示通过细胞融合来修饰DC可以较强地增强其后续抗肿瘤免疫激发能力,从而使融合细胞用于抗肿瘤疫苗的研究成为可能。

参考文献:

- [1] Jesus C, Clifford MS. Dendritic cells: new tools for vaccination [J]. *Microbes Infect*, 2003, 5(2): 311-319.
- [2] Jade SH, Kangla T, Melanie B, *et al.* Antitumor immunity induced by dendritic cell-based vaccination is dependent on interferon- and interleukin-12 [J]. *J Surgical Res*, 2004, 116(1): 64-69.
- [3] Orentas RJ, Schauer D, Bin Q, *et al.* Electroporation of a weakly immunogenic neuroblastoma with dendritic cells produces a tumor vaccine [J]. *Cell Immunol*, 2001, 213(1): 4-13.
- [4] Brossart P, Wirths S, Stuhler G, *et al.* Induction of cytotoxic T lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide pulsed dendritic cells [J]. *Blood*, 2000, 96(9): 3102-3108.
- [5] Dorothee G, Ameyar M, Bettaieb A, *et al.* Role of Fas and granule exocytosis pathways in tumor infiltrating T lymphocyte induced apoptosis of autologous human lung carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2001, 91(6): 772-777.
- [6] You Z, Huang XF, Hester J, *et al.* Induction of vigorous helper and cytotoxic T cells as well as B cell responses by dendritic cells expressing a modified antigen targeting receptor-modified internalization pathway [J]. *J Immunol*, 2000, 165(8): 4581-4591.