

体外联合抗原修饰的树突状细胞的抗癌效应

贺子彪, 杨伟明, 焦保庭, 宋辉

贺子彪, 杨伟明, 焦保庭, 宋辉, 遵义医学院附属医院普外科
贵州省遵义市 563003
贵州省科技基金资助项目, No. 20033040
通讯作者: 杨伟明, 563003, 遵义医学院附属医院普外科.
yangweiming2004@126.com
电话: 0852-8608941
收稿日期: 2007-08-28 修回日期: 2007-12-06

Anti-tumor activity of dendritic cells modified by *in vitro* joint antigen

Zi-Biao He, Wei-Ming Yang, Bao-Ting Jiao, Hui Song

Zi-Biao He, Wei-Ming Yang, Bao-Ting Jiao, Hui Song,
Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi
Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China
Supported by: the Science and Technology Foundation of
Guizhou Province, No. 20033040
Correspondence to: Wei-Ming Yang, Department of Gen-
eral Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College,
Zunyi 563003, Guizhou Province,
China. yangweiming2004@126.com
Received: 2007-08-28 Revised: 2007-12-06

Abstract

AIM: To study the immune activity of dendritic cells (DCs) in colon cancer after modification by *in vitro* joint antigen.

METHODS: DCs were isolated and purified from peripheral blood mononuclear cells of patients with colon cancer, by combination of granulocyte/macrophage colony stimulating factor and interleukin-4. In time-efficiency experiments, DCs were modified by tumor antigen and analyzed by flow cytometry. DCs of the best group and T lymphocytes were incubated for different periods of time. The results were determined by MTT test, and the T lymphocytes were incubated for different time with the DC-destroyed tumor cells. In dose-efficiency experiments, DCs were modified by tumor antigen and different concentrations of staphylococcus aureus enterotoxin B (SEB) for the best time gained from the above step, and analyzed by flow cytometry. DCs of the best group and T lymphocytes were incubated in different proportions for the best time. The T lymphocytes were incubated with the DCs and different proportions and destroyed tumor cells.

RESULTS: In time-efficiency first step experiments, DCs modified by the antigen expressed especial molecules of DCs more, DCs in the 36 h group expressed them most. In time-efficiency second step experiments, the cell-killing rate was the highest in the 36 h group, and differed significantly from the other groups (35.92 ± 0.71 vs 14.85 ± 1.24 , 35.92 ± 0.71 vs 9.68 ± 1.25 , 35.92 ± 0.71 vs 17.97 ± 1.01 , 35.92 ± 0.71 vs 20.32 ± 0.92 , $P < 0.05$). In dose-efficiency first step experiments, DCs modified by the joint antigen expressed special molecules of DCs more, DCs in the joint antigen (SEB: $100 \mu\text{g/L}$) group expressed them the most on the seventh day; the T lymphocytes incubated with the DCs modified with joint antigen destroyed more tumor cells than those incubated with the DCs modified with tumor antigen in the same proportion ($P < 0.05$). The T lymphocytes incubated with the DCs modified with joint antigen in the proportion of 1 : 100 destroyed the most tumor cells (47.70 ± 2.84 vs 28.99 ± 6.95 , 47.70 ± 2.84 vs 40.02 ± 3.65 , 47.70 ± 2.84 vs 34.55 ± 3.21 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: The best time is 36 h when DCs obtain tumor antigen and are modified or present tumor antigen *in vitro*. When SEB and tumor antigen are made to modify DCs, the best concentration of SEB is $100 \mu\text{g/L}$. The best ratio of DCs and T lymphocytes is 1 : 100.

Key Words: Dendritic cells; T lymphocyte; *Staphylococcus aureus* enterotoxin B; Colon carcinoma

He ZB, Yang WM, Jiao BT, Song H. Anti-tumor activity of dendritic cells modified by *in vitro* joint antigen. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 105-108

摘要

目的: 研究结肠癌患者外周血树突状细胞(dendritic cell, DC)体外联合抗原诱导后的免疫活性。

方法: 从结肠癌患者外周血中分离并培养DC, 时效实验中分时段以肿瘤抗原修饰DC, 取最佳组与T淋巴细胞共孵不同时间, 用MTT检验其对肿瘤细胞的杀伤率; 量效实验中将

背景资料

DC是体内功能最强的专职抗原递呈细胞, 也是唯一能激活初始型T细胞的APC, 处于免疫反应的中心地位。SEB是金黄色葡萄球菌产生的系列肠毒素之一, 其至少表现出3种生物学特性: 致热原性、超抗原性和增加外毒素的致死能力。SEB抗肿瘤作用目前认为: 主要通过依赖超抗原的细胞介导的细胞毒作用、激活T淋巴细胞并促使释放大细胞因子的直接和间接杀伤作用, 产生强大的杀伤或抑制肿瘤细胞效应。但其对宿主有较大的系统毒性作用, 而不能直接体内治疗肿瘤。DC通过摄取上述抗原并递呈给T细胞, 从而激发高效而特异的免疫反应, 主动杀伤肿瘤。

研发前沿
如何有效诱导DC成熟并发挥其特异抗肿瘤作用是当前研究的热点。DC疫苗未来在临床上应用尚需考虑以下问题:如何恰当选择DC致敏抗原及DC来源、疫苗的应用方式、途径、剂量及辅助治疗、疫苗的毒性、副作用及远期疗效、免疫应答的持续时间。

肿瘤抗原和不同浓度金黄色葡萄球菌肠毒素B(staphylococcus aureus enterotoxin B, SEB)在上一步得出的最佳时间内修饰DC, 取最佳组按不同比例(DC:T淋巴细胞)来共孵上一步得出的最佳共孵时间, 用MTT检验其对肿瘤细胞的杀伤率。

结果: 时效实验组抗原修饰36 h组DC特有分子表达最高, 对结肠腺癌细胞的杀伤率也最高, 与其他组比较有差异(35.92 ± 0.71 vs 14.85 ± 1.24 , 35.92 ± 0.71 vs 9.68 ± 1.25 , 35.92 ± 0.71 vs 17.97 ± 1.01 , 35.92 ± 0.71 vs 20.32 ± 0.92 , $P < 0.05$)。量效实验组联合抗原修饰第7天(SEB: $100 \mu\text{g/L}$)DC表达DC特有分子最高, 在联合修饰组内, 以1:100组的杀伤率最高, 与其他组比较有显著差异(47.70 ± 2.84 vs 28.99 ± 6.95 , 47.70 ± 2.84 vs 40.02 ± 3.65 , 47.70 ± 2.84 vs 34.55 ± 3.21 , $P < 0.01$)。

结论: 体外DC抗原修饰和递呈的最佳时间都是36 h, 联合应用超抗原SEB的最佳值 $100 \mu\text{g/L}$, DC与T淋巴细胞的最佳共孵比例是1:100。

关键词: 树突状细胞; T淋巴细胞; 金黄色葡萄球菌肠毒素B; 结肠癌

贺子彪, 杨伟明, 焦保庭, 宋辉. 体外联合抗原修饰的树突状细胞的抗癌效应. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 105-108
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/105.asp>

0 引言

树突状细胞(dendritic cell, DC)在诱导宿主对肿瘤的高效而特异的细胞免疫反应中起关键作用^[1]。由于肿瘤细胞分泌的免疫抑制因子, 常导致DC不能或递呈抗原能力低下^[2]。我们以结肠癌患者的DC在体外经GM-CSF及IL-4共诱导, 并经该患者结肠腺癌原代培养细胞制备的肿瘤抗原和金黄色葡萄球菌肠毒素B(staphylococcus aureus enterotoxin B, SEB)激活后, 诱导同源的T淋巴细胞, 研究其免疫活性。

1 材料和方法

1.1 材料 经病理确诊的Dukes C期结肠腺癌患者1例, 男性, 49岁, 粒/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素-4(IL-4)(Peprotech公司), 尼龙毛柱(北京天来生物医学科技有限公司), 淋巴细胞分离液(密度 1077 g/L , Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养肿瘤细胞^[3-4]: 手术切取结肠腺癌患者原发病灶经组织块原代培养获得肿瘤细胞,

流式细胞仪鉴定其为一倍体癌细胞, 免疫组化CEA检验阳性, 该癌细胞贴壁生长, 以 100 mL/L FCS+PRMI 1640于pH7.2-7.4, 37°C 、 50 mL/L CO_2 饱和湿度条件的细胞培养箱中培养, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代培养。

1.2.2 制备肿瘤抗原^[3-4]: 6×10^5 个对数生长期癌细胞用PBS液洗2遍, PBS液调致 1 mL , 放入 -80°C 冰箱内, 10 min后迅速放入 37°C 水浴中, 待其完全融化后, 再次放入 -80°C 冰箱内, 反复4次, 将冻融物 4000 r/min 离心, 30 min, 取上清液通过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 除去细胞碎片, PBS调致 6×10^8 肿瘤细胞/L, 收集滤液作为肿瘤抗原(紫外分光光度法测定, 以Lowry-Kalchar公式计算其蛋白浓度为 0.4 g/L), -40°C 保存备用。

1.2.3 分离和培养T淋巴细胞^[3-4]: 患者外周血加淋巴细胞分层液(密度 1077 g/L)分离获单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), RPMI1640调细胞数为 $5 \times 10^9/\text{L}$, 置 37°C 、 50 mL/L CO_2 、饱和湿度条件的细胞培养箱培养2 h, 收集非黏附性细胞, 以聚丙稀Petri培养皿培养选择性地除去巨噬细胞; 尼龙毛柱过滤除去B细胞, 获T淋巴细胞。RPMI1640调细胞数为 $1 \times 10^9/\text{L}$ 移入培养瓶中, 37°C 、 50 mL/L CO_2 、饱和湿度条件细胞培养箱培养, 每2 d更换半量新鲜淋巴细胞培养液(RPMI 1640+ 100 mL/L FCS)。

1.2.4 DC细胞的体外诱导培养^[3-4]: 上述留有黏附细胞的培养瓶中, 每瓶加 5 mL DC培养液(RPMI 1640+ 100 mL/L 血清, 含 100 mg/L GM-CSF和 10 mg/L IL-4)诱导DC。 37°C 、 50 mL/L CO_2 、饱和湿度条件的细胞培养箱培养, 每2 d更换半量新鲜DC培养液, 培养至第5天收获细胞。

1.2.5 DC体外抗原修饰与递呈的时效关系实验: 上述收获的DC培养第5天, 调细胞浓度为 $1 \times 10^8/\text{L}$, 加入相应用癌细胞制备的肿瘤抗原(按肿瘤细胞数与DC数比例为3:1), 37°C 、 50 mL/L CO_2 、饱和湿度条件下分别培养24 h, 36 h, 48 h, 以制备肿瘤抗原修饰的DC。用流式细胞仪鉴定及分析DC, 选用最佳组(36 h组)与T淋巴细胞共同培养。在24孔板上按DC:T淋巴细胞为1:100的比例, 每孔加入肿瘤抗原修饰后的DC 1×10^4 和T淋巴细胞 1×10^6 , 每个时段各6孔。 37°C 、 50 mL/L CO_2 、饱和湿度条件下分别共同培养12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 激发T淋巴细胞活性。以DC激活的T淋巴细胞为效应细胞, 设为时效实验组(DC+T淋巴细胞组); 以单独T淋巴细胞为效应细胞, 设为时效对照组(T淋巴细胞组); 以癌细胞为靶细胞, 设

表 1 时效实验抗原修饰后流式细胞仪表型分析结果(%)

DC流式分析结果	CD11c	CD80	HLA-DR
修饰前	0.31	0.17	0.83
24 h组	1.45	1.01	3.76
36 h组	15.01	3.20	25.91
48 h组	0.94	0.39	11.18

单独靶细胞为时效阴性对照组. 每组6孔. 采用MTT法检测, 以效靶比10:1(T淋巴细胞每孔 1×10^5 个, 癌细胞每孔 1×10^4 个)将T淋巴细胞和靶细胞(浓度为 $1 \times 10^8/L$), 加入DC+T淋巴细胞组以及T淋巴细胞组中. 培养20 h, 每孔加入MTT(5 g/L)10 μ L, 混匀, 37℃继续孵育4 h, 加入DMSO 100 μ L, 振荡10 min, 30 min内酶联免疫检测仪测各组560 nm处A值并记录数值, 结果以6孔均数表示. 计算效应细胞对肿瘤的杀伤率, 肿瘤细胞杀伤率(%) = (对照组A值-实验组A)/对照组A值 $\times 100\%$.

1.2.6 DC体外联合抗原修饰与递呈的量效关系实验: 上述收获的DC培养第5天调细胞浓度为 $1 \times 10^8/L$, 量效抗原修饰实验组1加入结肠癌细胞制备的冻融抗原(肿瘤细胞数与DC数比例为3:1), 量效抗原修饰实验组2-5加入冻融抗原(肿瘤细胞数与DC数比例为3:1)和SEB, 并使SEB终浓度为25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L, 每组6孔, 37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度条件下培养36 h制备抗原修饰的DC. 各取修饰后DC 4×10^5 个, 进行流式细胞仪分析. 取最佳联合修饰组DC(SEB: 100 mg/L)进行下一步实验. 两块24孔板上按DC:T淋巴细胞分别为1:1, 1:10, 1:100, 1:1000的比例, 一块24孔板加入肿瘤抗原、SEB共同修饰的DC和T淋巴细胞, 一块24孔板加入肿瘤抗原修饰的DC和T淋巴细胞, 37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度条件下分别培养36 h, 以激发T淋巴细胞活性. 分别以肿瘤抗原修饰的DC激发T淋巴细胞、联合抗原修饰的DC激发T淋巴细胞为效应细胞, 设为量效抗原递呈实验组A、量效抗原递呈实验组B, 以结肠癌细胞为靶细胞, 设单独靶细胞为抗原递呈阴性对照组, 每组6孔. 采用MTT法检测, 方法同1.2.5, 得肿瘤细胞杀伤率(%).

统计学处理 所有变量均以mean \pm SD表示, *t*检验分析两变量间差异性.

2 结果

2.1 DC体外抗原修饰与递呈的时效关系 应用rhGM-CSF和rhIL-4联合诱导单个核细胞分化的

表 2 时效实验组对结肠腺癌细胞的杀伤率(%) (mean \pm SD, *n* = 6)

分组		杀伤率
时效实验组	DC+ T淋巴细胞12 h	14.85 \pm 1.24
	DC+ T淋巴细胞24 h	9.68 \pm 1.25
	DC+ T淋巴细胞36 h	35.92 \pm 0.71
	DC+ T淋巴细胞48 h	17.97 \pm 1.01
时效对照组		20.32 \pm 0.92

表 3 量效实验组抗原修饰第5天和第7天流式细胞仪表型分析结果(%)

DC流式分析结果	CD11c	CD80	HLA-DR
第5天	0.21	0.10	0.59
第7天结肠癌抗原修饰后	0.31	0.17	0.83
第7天联合抗原修饰后SEB 25 mg/L	0.38	0.26	0.99
50 mg/L	0.95	0.39	11.18
100 mg/L	15.01	3.20	25.91
200 mg/L	1.46	1.63	2.11

DC, 用结肠癌细胞冻融抗原修饰DC使其成熟, 结果见表1. 时效实验组按照肿瘤细胞杀伤率计算公式分别计算出时效实验组对肿瘤细胞的杀伤率, 结果见表2.

2.2 DC体外联合抗原修饰与递呈的量效关系 应用rhGM-CSF和rhIL-4联合诱导单个核细胞分化的DC, 分别以肿瘤抗原、不同浓度的SEB联合修饰和单用肿瘤抗原修饰, 第5天和第7天分别加PE标记CD11c, FITC标记CD80, PE/CY5标记HLA-DR免疫荧光染色后进行流式细胞仪分析, 检测结果见表3. 按照肿瘤细胞杀伤率计算公式分别计算出量效抗原递呈实验组对肿瘤细胞的杀伤率, 结果见表4.

3 讨论

DC是体内功能最强的专职抗原递呈细胞, 也是唯一能激活初始型T细胞(naive T cell)的APC, 处于免疫反应的中心地位. DC表面不仅形成MHC-II肽复合物作为克隆型T细胞表面受体的配体, 成熟DC还高表达共刺激分子B7-1(CD80)、B7-2(CD86)CD40、CD50(ICAM-3)及CD54(ICAM-1)等起关键作用的辅助信号, 可诱导T淋巴细胞增殖并分泌IL-12等细胞因子产生Th1型免疫应答而发挥抗肿瘤作用. 但肿瘤患者体内DC存在功能上的缺陷. 如何有效诱导DC成熟并发挥其特异抗肿瘤作用是当前研究的热点.

我们采用外周静脉血通过密度梯度离心的

应用要点

本次实验从体外DC抗原修饰和递呈的时间及剂量或比例等方面的研究得出了相应的最佳值, 为下一步实验提供可靠依据. 为临床DC瘤苗的应用进行了一次有益的探索. 联合抗原修饰和进一步提高结肠癌DC疫苗效率将给其临床应用带来新的希望.

名词解释

依赖超抗原的细胞介导的细胞毒作用: 超抗原所激活的T细胞(CTL)能对表达MHC类分子的靶细胞产生细胞毒作用, 是超抗原和抗体结合后, 由于有了表面标记, 而引发具有细胞毒性作用的细胞的攻击, 进而清除抗原, 这种作用叫依赖超抗原的细胞介导的细胞毒作用。

表 4 抗原递呈实验组对结肠腺癌细胞的杀伤率(mean \pm SD, $n = 6$)

DC : T淋巴细胞	T淋巴细胞+结肠癌细胞抗原递呈	
	联合抗原修饰的DC	结肠癌细胞冻融抗原修饰的DC
1 : 1	28.99 \pm 6.95	19.34 \pm 5.17 ^a
1 : 10	40.02 \pm 3.65	20.83 \pm 2.73 ^a
1 : 100	47.70 \pm 2.84 ^b	33.66 \pm 2.10 ^{ab}
1 : 1000	34.55 \pm 3.21	12.15 \pm 4.02 ^a

^a $P < 0.05$ vs 联合抗原修饰的DC; ^b $P < 0.01$ vs 其他组。

方法获得PBMC, 经rhGM-CSF和rhIL-4联合刺激诱导分化为DC, 经FCM分析表明, 细胞在培养过程中表达DC特有的CD11c、CD80和HLA-DR分子, 并在肿瘤抗原修饰后进一步上调, 与文献报道的结果一致^[5], 即我们获得了本实验需要的DC。在本实验中不同修饰和共孵时段表现出不同的杀瘤效果, 其中均以36 h为最佳。表明DC体外抗原修饰与递呈有一定的时间关系, 这与DC特殊的功能有关, DC将摄入细胞内的肿瘤抗原消化降解为抗原肽片段, 与细胞内MHC分子结合成抗原肽-MHC分子复合物并表达在细胞表面, 完成这一抗原修饰过程需要一定时间。修饰后的DC在与T淋巴细胞接触过程中将其抗原信息传递给T淋巴细胞, 完成这一抗原递呈过程也需要的一段时间。以及与体外DC的成熟和寿命有一定关系。DC随其成熟而功能增强, 随其衰老功能减弱。我们得出其体外DC肿瘤抗原修饰和递呈的最佳时间都是36 h。

本实验中, 超抗原SEB/肿瘤抗原联合修饰的DC比仅用肿瘤抗原修饰的DC表达CD11c等特有分子的百分比要高, 随SEB量的增大而增加, 在100 mg/L达到最大值, 再增加反而下降。100 mg/L SEB+肿瘤抗原联合修饰的DC与T淋巴细胞共孵后的杀伤肿瘤细胞效应强于单用肿瘤抗原修饰的DC与T淋巴细胞共孵后的杀伤肿瘤细胞效应($P < 0.05$)。SEB是金黄色葡萄球菌产生的系列肠毒素之一, 其通过依赖超抗原的细胞介导的细胞毒作用 (superantigen dependent cell mediated cytotoxicity, SDCC)、激活T淋巴细胞并促使释放大量细胞因子的直接和间接杀伤作用, 产生强大的杀伤或抑制肿瘤细胞效应^[6-7]。DC将其以内源性抗原的形式与MHC I 分子结合, 形成MHC I 肽复合物, 再进入高尔基复合体经糖化、修饰, 最后通过分泌小泡的方式表达在细胞表面, 与CD8+ T淋巴细胞相互作用。但其对宿主有较大的系统毒性作用, 随着其浓度增

大对细胞的毒性增加, 降低DC的功能, 最佳SEB值是100 mg/L。另外, DC与T淋巴细胞以不同比例(1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000)共孵后其杀伤肿瘤细胞效应在DC与T淋巴细胞以1 : 100最高, 说明负载SEB/肿瘤抗原的DC已成功摄取了相应抗原, 加工后经MHC类分子呈递给T淋巴细胞, 同时通过共刺激分子、黏附分子等将T淋巴细胞激活, DC与T淋巴细胞以此比例共同孵育, T淋巴细胞发挥最大限度活性, 特异性杀伤该肿瘤细胞的能力增强, 显示了修饰后的DC递呈抗原能力的量效关系。DC与T淋巴细胞最佳共孵比例是1 : 100。

总之, 本次实验得出了体外DC抗原修饰和递呈的最佳时间都是36 h, 联合应用超抗原SEB的最佳值100 mg/L, DC与T淋巴细胞的最佳共孵比例是1 : 100。为下一步实验提供可靠依据, 为临床DC瘤苗的应用进行了一次有益的探索。联合抗原修饰和进一步提高结肠癌DC疫苗效率将给其临床应用带来新的希望。

4 参考文献

- Babatz J, Rollig C, Lobel B, Folprecht G, Haack M, Gunther H, Kohne CH, Ehninger G, Schmitz M, Bornhauser M. Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 268-276
- Pinzon-Charry A, Schmidt CW, Lopez JA. The key role of CD40 ligand in overcoming tumor-induced dendritic cell dysfunction. *Breast Cancer Res* 2006; 8: 402
- 冯毅, 杨伟明, 焦保庭, 杨建永, 王璜. 大肠癌肿瘤抗原修饰的树突状细胞活性检测. *郑州大学学报(医学版)* 2007; 42: 237-239
- 杨建永, 杨伟明, 焦保庭, 冯毅, 黄璜. 超抗原和肿瘤抗原修饰树突状细胞的活性研究. *遵义医学院学报* 2006; 29: 229-231
- 朱学军, 曹雪涛, 于益之, 陈国友, 万涛, 马施华, 唐华, 章卫平. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定. *中国肿瘤生物治疗杂志* 1997; 4: 302-306
- 申志华, 邢飞跃, 陈代雄. 超抗原SE抗肿瘤研究进展. *遵义医学院学报* 2002; 25: 168-172
- 张子蕾, 张秀英. 超抗原抗肿瘤的研究进展. *医学理论与实践* 2004; 17: 27-28

编辑 李军亮 电编 郭海丽

同行评价

本文研究方法设计合理, 结果可信, 具有一定的参考价值。