论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0404-04

胃癌细胞-树突状细胞融合疫苗肿瘤细胞杀伤活性研究

张 坤[1],余佩武[1],高朋芬[2],饶 云[1] (第三军医大学西南医院:[1]普通外科,[2]全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 对胃癌细胞-树突状细胞(dendtitic cells, DCs)融合疫苗激活杀伤性T淋巴细胞体内外肿瘤细胞杀伤活性进行研究,为胃癌DC疫苗免疫治疗提供实验依据。**方法** 胃癌患者外周血单个核细胞经GM-CSF,IL-4,TNF-α定向诱导获取DC。DC与SGC7901胃癌细胞经PEG诱导融合、HAT/HT筛选培养获得纯净融合细胞。MTT比色法检测融合疫苗体外杀伤胃癌细胞的细胞毒作用。观察融合疫苗对胃癌裸鼠种植瘤模型肿瘤生长的影响,流式细胞术AnnexinV/PI双标法检测瘤细胞凋亡,观察融合疫苗对肿瘤组织病理学改变的影响。**结果** ①胃癌患者外周血单个核细胞体外定向诱导分化,可获得具备典型形态特征及表型的DC。②DC与SGC7901细胞经PEG诱导融合,HAT/HT筛选培养,可获得纯净融合细胞。③体外MTT比色检测,融合疫苗胃癌细胞杀伤率为(81.47±5.25)%,与混合培养DC组(70.53±2.46)%差异显著($P<0.05$),与单纯T细胞组(21.67±2.55)%差异非常显著($P<0.01$)。④融合疫苗组荷瘤裸鼠终末肿瘤体积平均(1.298±0.021) cm^3,与对照组差异非常显著($P<0.01$),抑瘤率为57.8%。⑤融合疫苗组肿瘤细胞凋亡率(54.9±1.38)%,坏死率为(21.04±1.47)%;与对照组瘤细胞凋亡百分率(20.02±0.39)%,坏死百分率(1.23±0.03)%比较差异非常显著($P<0.01$)。⑥融合疫苗组肿瘤组织与对照组比较显著出血、坏死,瘤组织内大量淋巴细胞浸润。**结论** 融合细胞疫苗激活T淋巴细胞体内外均可诱导显著胃癌细胞杀伤细胞毒活性;其应用于荷瘤动物体内,可以明显减慢肿瘤生长速度,诱导更多肿瘤细胞凋亡。

关键词:胃癌;树突状细胞;融合疫苗;瘤细胞杀伤

中图法分类号:R392.12;R730.51;R735.2 **文献标识码**:A

Cytotoxic effects of gastric cancer cell-DC fusion vaccines

ZHANG Kun[1], YU Pei-wu[1], GAO Peng-fen[2], RAO Yun[1] ([1]Department of General Surgery, [2]Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study on the cytotoxic effects *in vivo* and *in vitro* of the T lymphocytes which were activated by the DC-gastric cancer cell fusion vaccines. **Methods** The mononuclear cells were separated from the peripheral blood of gastric cancer patients and co-cultured with granulocyte-macrophage colony stimulating factors, interleukin-4 and tumor necrosis factor-α to generate mature dendritic cells. The human gastric cancer SGC7901 cells and the dendritic cells were fusioned by using polyethylene glycol, and the pure fusion cells were screened out by culturing with HAT and HT selective culture systems. The mixture of SGC7901 and DC without fusion and the T lymphocytes served as controls. The ability of fusion cells activated by T lymphocytes to kill SGC7901 gastric cancer cells was investigated by MTT *in vitro*. The anti-tumor effects were evalutated by detecting the growth of the new planted tumors in the nude mice, the apoptosis and proliferation of the planted cancer cells, the pathological changes of the tumor tissues and the prohibitive rate for planted tumors before and after the application of the fusion cell vaccine. **Results** The mature dendritic cells were obtained from peripheral blood mononuclear cells of gastric cancer patients successfully. Dendritic cells and SGC7901 cells were fusioned and the pure fusion cells were got. Fusion vaccine could induce strong anti-tumor biological effects *in vivo* and *in vitro*: Tumor growth was remarkably inhibited and the tumor size in mice receiving fusion cells was (1.298±0.021) cm^3, smaller than that in mice receiving T lymphocytes as treatment [(2.429±0.033) cm^3] ($P<0.01$). The inhibitory rate of the planted tumors was 57.8%. Detected by Annexin-V/PI double labeling flow-cytometry, the apoptosis rate of tumor cells in mice receiving fusion cells was (54.9±1.38)%, higher than that in the mice receiving T lymphocytes [(20.02±0.39)%] ($P<0.01$). The tumor

作者简介:张 坤(1973-),男,山东省沂水县人,博士,主治医师,主要从事消化系肿瘤的外科治疗与生物治疗方面的研究,现在南京军区福州总医院肝胆外科。电话:(0591)22859377

通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@sina.com

收稿日期:2005-06-13;修回日期:2005-08-26

tissues in the mice receiving fusion cells had more infiltrated lymphocytes, apoptotic cells, hemorrhage and necrosis than in the mice receiving T lymphocytes. **Conclusion** The fusion vaccine could inhibit the tumor growth and accelerate the apoptosis of tumor cells.

Key words: gastric cancer; dendritic cell; fusion vaccine; cytotoxic effect

树突状细胞(dendtitic cells, DCs)是机体主要抗原递呈细胞，而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。在此基础之上，国内外学者通过各种手段获取癌细胞抗原，试图刺激DC，以增强其抗原递呈及后续免疫激发能力。既往对基于DC的抗肿瘤疫苗研究中所采用主要方法有：癌细胞冻融[1]、超声粉碎[2]等获取癌细胞裂解产物，将其作为粗提抗原刺激DC，或将癌细胞抗原决定mRNA转入DC，试图增强其抗原提呈及免疫激发能力[3]，但这些方法本身都存在很大的局限性和不稳定性。为克服这一限制，随着近年来细胞融合技术的出现和逐步成熟，国内外学者开始尝试应用细胞融合技术进行DC与肿瘤细胞的融合，初步观察到融合细胞可能具有较普通DC更强的免疫激发能力。而胃癌作为常见并且严重威胁人类健康的恶性肿瘤，其本身固有的缺乏特异性肿瘤抗原、癌细胞抗原性相对较弱的特点，使其生物治疗相对困难，若能将DC与胃癌细胞进行融合来实现DC对胃癌细胞抗原的最大提呈，则有可能取得满意的胃癌生物治疗效果。为此，我们尝试利用细胞融合技术，将DC与胃癌细胞进行融合，希望能加强其激活T淋巴细胞活性及杀伤胃癌细胞的能力，实现强而有效的抗胃癌免疫应答。在本实验中我们将对融合疫苗体内外对胃癌细胞的杀伤活性进行观察，希望能为胃癌DC疫苗免疫治疗提供一定的实验基础和理论依据。

1　材料与方法

1.1　主要仪器及试剂

rhGM-CSF(Promega)，rhIL-4(R&D System)，TNF-α(R&D System)，聚乙二醇(Polyethylene glycol，Sigma)，次黄嘌呤(Hypoxanthine，Sigma)，氨基喋呤(Aminopterin，Sigma)，胸腺嘧啶核苷(Thymidine，Sigma)，自动免疫酶标仪(FL600 USA)，流式细胞仪(Beckman Coulter USA)，碘化丙啶染液(PI Sigma)，Annexin-V/PI凋亡检测试剂盒(Roche Co.)。

1.2　实验方法

1.2.1　SGC7901-DC融合疫苗制备　　应用淋巴细胞分离液分离胃癌患者外周血单个核细胞，rhGM-CSF(100 ng/ml)，rhIL-4(50 ng/ml)，静置培养6 d，加入TNF-α(20 ng/ml)，第7天收获DC。SGC7901胃癌细胞、DC单细胞悬液10∶1比例均匀混合，PEG诱导融合，HAT/HT筛选培养7 d，收获纯净融合细胞疫苗。按相同细胞比例将SGC7901细胞与DC单纯混合培养而不行诱导融合，作为对照。

1.2.2　MTT比色法体外细胞毒活性检测　　SGC7901胃癌细胞悬液，接种于96孔板，细胞数1 × 10^4/孔，静置培养24 h。尼龙毛法获取外周血T淋巴细胞，苔盼蓝染色检测活细胞比例>98%。调节融合细胞、混合培养DC、T淋巴细胞密度分别为5 × 10^6/ml，将融合细胞+T淋巴细胞、混合培养DC+T淋巴细胞分别1∶1均匀混合，静置培养3 d，调节混合细胞悬液密度分别为1 × 10^5/ml，均匀混合使细胞散在。分别取融合细胞+T淋巴细胞、混合培养DC+T淋巴细胞各100 μl，含细胞数为1 × 10^4，加入培养于96孔板的SGC7901胃癌细胞中，每组设3个复孔，以单纯培养的T淋巴细胞按相同细胞密度及数量加入培养SGC7901细胞，作为对照。静置培养48 h后每孔加入5 mg/ml浓度的MTT各20 μl，继续静置培养4 h后吸除培养基，每孔分别加入100 μl DMSO，均匀震荡混匀10 min。自动免疫酶标仪测定光吸收值，测定波长570 nm、参考波长630 nm，空白培养基孔作为对照参数。按公式：

$$\text{肿瘤细胞抑制率}=\frac{\text{对照孔平均}D_{(570-630)}-\text{实验孔平均}D_{(570-630)}}{\text{对照孔平均}D_{(570-630)}}\times 100\%$$

$$D_{(570-630)}=D_{(570)}-D_{(630)}$$

计算效应细胞对肿瘤细胞的杀伤抑制率，以判断不同效应细胞对培养肿瘤细胞的体外杀伤细胞毒作用。

1.2.3　融合细胞疫苗体内抗胃癌作用观察

1.2.3.1　SGC7901胃癌细胞裸鼠种植瘤体积检测　　SGC7901单细胞悬液裸鼠骶尾部皮下注射，制备胃癌细胞裸鼠种植瘤模型。种植瘤形成后，分别在不同时相点游标卡尺测量肿瘤长(a)、宽(b)、高(c)各径长，按公式：肿瘤体积(V)=π/6(abc)cm^3计算肿瘤体积。调节T淋巴细胞、融合细胞、混合培养组DC细胞密度分别为5 × 10^6/ml，分别按1∶1比例将融合细胞+T淋巴细胞，混合培养组DC+T淋巴细胞均匀混合，同时取PBS设置对照。分别经裸鼠尾静脉注射效应细胞(0.5 ml细胞数2.5 × 10^6个)，每4天注射1次，连续5次，注射开始后每4天检测肿瘤体积变化，至注射完毕1周后为止，观察不同效应细胞对肿瘤体积变化的影响。按公式 抑瘤率(%)=[1-(治疗组开始平均瘤体积-治疗组结束平均瘤体积)/(对照组开始平均瘤体积-对照组结束平均瘤体积)]×100 计算应用肿瘤疫苗的抑瘤率。

1.2.3.2　种植瘤细胞凋亡检测　　注射完毕后1周，取种植瘤标本，制备均匀瘤细胞悬液，Annexin V-FITC/PI染液染色，应用流式细胞仪对瘤细胞凋亡进行检测。

1.2.3.3　种植瘤组织病理学观察　　分别取各组肿瘤组织标本甲醛固定，常规石蜡包埋、切片，HE染色，光镜下观察组织学变化。

1.3　统计学分析

所得数据取平均值，以$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS统计程序进行t检验及单因素方差分析。

2　结果

2.1　SGC7901-DC融合细胞疫苗获取及纯化

细胞融合的过程首先是细胞质融合，然后通过有丝分裂细

胞核合二为一，形成新的杂合细胞，肿瘤抗原编码基因导入DC后能在DC内表达肿瘤抗原。在PEG诱导下SGC7901细胞与DC融合。在HAT/HT培养液中未融合的亲本细胞及融合的同核细胞，因为细胞核苷酸的合成主要途径被阻断而又不能利用外源性核苷酸原料而发生死亡。只有成功融合的细胞疫苗由于酶的补偿而能筛选、保存下来。融合细胞体积较亲代DC及SGC7901细胞均明显增大，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，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性。

2.2 融合细胞疫苗体外对SGC7901胃癌细胞的杀伤效应

SGC7901-DC融合细胞疫苗体外激活T淋巴细胞对培养SGC7901胃癌细胞的杀伤率为(81.47±5.25)%，混合培养组DC体外激活T淋巴细胞对培养SGC7901胃癌细胞的杀伤率为(70.53±2.46)%，而外周血获取T淋巴细胞对培养SGC7901胃癌细胞的杀伤率为(21.67±2.55)%。融合细胞疫苗组及混合培养DC组体外杀伤肿瘤细胞的细胞毒活性与单纯T淋巴细胞组比较差异非常显著($P<0.01$)，融合细胞疫苗组与混合培养DC组比较差异显著($P<0.05$)。

2.3 融合细胞疫苗体内抗胃癌作用

2.3.1 融合细胞疫苗对种植瘤体积变化的影响 SGC7901细胞裸鼠骶尾部皮下注射10日后开始出现种植瘤结节，注射3周后种植瘤结节约(0.602±0.002) cm^3大小，此时将裸鼠分组，在不同时相点分别注射融合细胞疫苗+T淋巴细胞混合液及混合培养DC+T淋巴细胞混合液，同时设置PBS注射组形成对照。结果显示融合细胞疫苗+T淋巴细胞混合液组种植瘤体积增长明显减慢，混合培养DC+T淋巴细胞混合液组及PBS对照组裸鼠种植瘤体积仍明显增大，尤以PBS对照组瘤体增长迅速。至治疗结束，对照组裸鼠出现明显精神萎靡，活动、进食减少等表现，肿瘤表面中央出现大小不等的破溃、出血；融合细胞疫苗+T淋巴细胞混合液注射组裸鼠种植瘤体积显著小于对照组($P<0.01$)，与混合培养DC+T淋巴细胞混合液组比较亦有显著差异($P<0.01$)，而混合培养DC+T淋巴细胞混合液组与PBS注射对照组之间在开始注射的一周内差异不显著($P>0.05$)，注射1周后出现显著差异($P<0.01$)(表1)。

表1 不同时相点各组动物种植瘤体积的变化(cm^3，$\bar{x}\pm s$)

组别	时相点(d)										
	1	5	10	14	18	21	25	29	33	37	44
对照组	0	0	0.098±0.005	0.201±0.002	0.398±0.002	0.602±0.002	0.905±0.009	1.220±0.013	1.874±0.017	2.215±0.018	2.429±0.033
混合培养DC组	0	0	0.098±0.005	0.201±0.002	0.398±0.002	0.602±0.002	0.733±0.003	1.067±0.004[b]	1.476±0.008[b]	1.920±0.014[b]	2.122±0.022[b]
融合疫苗组	0	0	0.098±0.005	0.201±0.002	0.398±0.002	0.602±0.002	0.700±0.006	0.905±0.008[a]	1.154±0.012[a]	1.221±0.018[a]	1.298±0.021[a]

a：$P<0.01$，与混合培养DC组及对照组比较；b：$P<0.01$，与对照组比较

抑瘤率=[1-(0.603-1.298)/(0.603-2.429)]×100%=57.8%

2.3.2 融合细胞疫苗对肿瘤细胞凋亡的影响 应用PBS注射荷瘤动物，对瘤细胞正常凋亡、坏死过程不产生明显影响，至注射结束，瘤细胞凋亡百分率为(20.02±0.39)%，坏死百分率为(1.23±0.03)%。混合培养DC+T淋巴细胞注射荷瘤动物，可诱导部分种植瘤细胞的凋亡、坏死，至注射完毕凋亡百分率为(36.9±0.51)%，坏死百分率为(6.57±0.33)%，与PBS组差异显著($P<0.01$)；而荷瘤动物经融合细胞疫苗+T淋巴细胞的混合注射，不但在肿瘤体积方面表现出明显的生长减慢，在诱导细胞凋亡、坏死方面也与混合培养DC组及PBS组差异非常显著($P<0.01$)，凋亡百分率为(54.9±1.38)%，坏死百分率为(21.04±1.47)%。

2.3.3 融合细胞疫苗对种植瘤组织病理形态学变化的影响

PBS组皮下种植瘤细胞呈明显浸润性生长，细胞排列紊乱，可形成不规则腺腔样结构，肿瘤细胞异型性明显。肿瘤组织内血管丰富，肿瘤细胞间及肿瘤间质内有部分淋巴细胞浸润，瘤组织内出血、坏死灶较少(图1)。混合培养DC组与PBS组比较，其组织学、细胞形态学特征等方面差别不明显，但肿瘤细胞间及肿瘤组织间质内淋巴细胞浸润较PBS组增多，瘤组织内出现部分局灶性出血、坏死。与PBS组及混合培养DC组比较，融合细胞疫苗组肿瘤组织内更多见细胞水肿、坏死，细胞质疏松，细胞核淡染，染色质边集，肿瘤细胞间及瘤组织间质内可见大量淋巴细胞浸润，瘤组织内出现大片的瘤细胞坏死、溶解灶，局部组织出血、坏死(图2)。

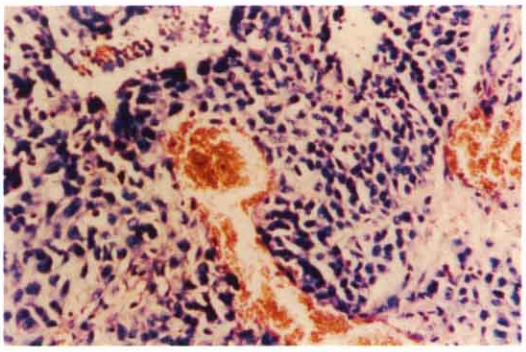


图1 PBS对照组种植瘤的光镜观察组织特点 (HE×200)

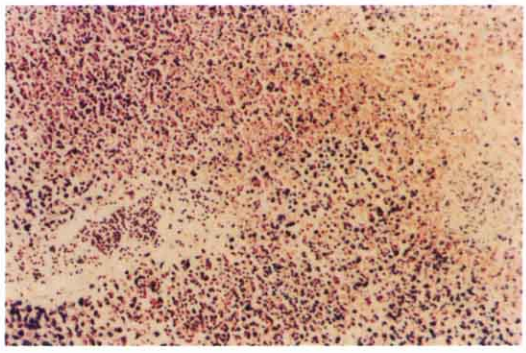


图2 融合细胞疫苗组种植瘤的光镜观察组织特点 (HE×100)

3　讨论

3.1　融合细胞疫苗激活T淋巴细胞体外对SGC7901胃癌细胞的杀伤

检测细胞的存活与增殖，过去常用的方法有染料排斥法和掺入同位素的释放法。前者易受主观因素的影响，产生误差较大；后者因可以产生放射同位素的污染，使其应用受到限制。MTT[3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-dipheny tetrazolium bromide，四甲基偶氮唑盐]微量酶反应比色测定法由Mosmann等创立后，成为一种有效的检测细胞存活和生长的方法。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的MTT还原为难溶性的蓝紫色结晶物(Formazan)并沉积在细胞中，而死细胞则无此功能。二甲基亚砜(DMSO)可以将沉积于细胞中的蓝紫色结晶物溶解，用自动免疫酶标仪测定其光吸收值，可以间接反映活细胞的数量，在一定数量范围内，MTT结晶物的形成与细胞数量成正比。在前述实验中，我们证实融合细胞疫苗与效应T淋巴细胞在1:1效靶比条件下，可以产生最佳的T淋巴细胞激活增殖效果，因此，在本实验中，我们利用融合细胞疫苗1:1效靶比激活的效应T淋巴细胞，应用MTT比色法，检测不同效应细胞组对培养SGC7901胃癌细胞的杀伤活性，结果显示，与混合培养DC组及单纯T淋巴细胞组比较，融合细胞疫苗组对靶细胞—SGC7901细胞的杀伤能力明显增强。

3.2　融合细胞疫苗激活T淋巴细胞体内对SGC7901胃癌细胞的杀伤

DC通过诱导产生大量的效应细胞—CTL、启动效应细胞迁移至肿瘤部位[4]、分泌细胞因子(如IL-18)和趋化因子(chemokine)(如巨噬细胞炎性蛋白-1γ—macrophage inflammatory protein-1γ)选择性趋化T细胞通过血管内皮屏障而增加肿瘤部位的效应T细胞数量、保持效应T细胞在肿瘤部位的长期存在、释放某些抗血管生成物质(如IL-12、IFN-γ)及前血管生成因子而影响肿瘤血管的形成等诸多机制发挥抗肿瘤作用。而肿瘤组织局部DC与淋巴细胞的浸润程度与患者预后密切相关，临床观察证实肿瘤组织DC(tumor infiltrating dendritic cells，TIDC)的浸润密度和癌周组织淋巴细胞反应强度与手术后的5年生存率呈正相关，胃癌患者肿瘤组织中DC、淋巴细胞浸润程度与患者的远处淋巴结和腹腔转移以及病情恶化程度呈负相关[5]。增强DC的抗原递呈及激活T淋巴细胞的能力，是DC用于抗肿瘤生物治疗的理论基础和出发点。在本实验中，培养SGC7901胃癌细胞裸鼠皮下注射10 d后，在注射部位开始形成新生种植瘤结节，随时间推移，种植瘤体积逐渐增大；分别应用融合细胞疫苗+T淋巴细胞、混合培养DC+T淋巴细胞及PBS对照注射后，发现应用融合细胞疫苗组动物种植瘤体积增长速度明显减慢，与对照组出现非常显著的差异；混合培养DC组动物种植瘤体积的增长较对照组也出现一定的减慢，但远不及融合细胞疫苗对种植瘤所产生的影响。说明融合细胞刺激效应T细胞活性及激发后续抗肿瘤免疫反应的能力得到大大加强。

既往的研究证实，致敏DC的抗肿瘤疫苗通过皮下、腹腔、静脉等不同的途径应用于荷瘤动物，会取得不同的治疗效果，皮下及腹腔内注射，效应细胞会更多的定居于注射局部，而很难移行至肿瘤组织，从而不能有效发挥激活效应细胞的免疫功能[6]，因此在本实验中，我们经荷瘤动物尾静脉注入获取的融合细胞疫苗，以取得更好的治疗效果。注射后分别对3组荷瘤动物种植瘤组织进行病理形态学观察，发现应用融合细胞疫苗后，种植瘤组织出现较对照组肿瘤组织明显增多充血、出血、坏死灶，肿瘤组织间质内淋巴细胞浸润明显增多。混合培养DC组动物肿瘤组织间质内的淋巴细胞浸润较对照组也有较明显的增多，但瘤组织内未出现明显的出血、坏死病灶。应用流式细胞仪检测不同效应细胞对种植瘤组织所产生的影响，即可发现，融合细胞疫苗的应用可以诱导更多肿瘤细胞的凋亡、坏死，从而体现为种植瘤组织内的更多出血、坏死病灶及种植瘤体积增长的减慢，融合细胞表现出明显抑制种植瘤生长的作用；说明融合细胞疫苗可以发挥激活更强的抗肿瘤免疫反应的效用。

参考文献：

[1] ABDEL-WAHAB Z, DEMATOS P, HESTER D, *et al*. Human dendritic cells, pulsed with either melanoma tumor cell lysates or the gp100 peptide(280－288), induce pairs of T-cell cultures with similar phenotype and lytic activity[J]. Cell Immunol, 1998, 186(1): 63－74.

[2] MUKHERJI B, CHAKRABORTY N G, YAMASAKI S, *et al*. Induction of antigen-specific cytolytic T cells *in situ* in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(17): 8078－8082.

[3] EPPLER E, HORIG H, KAUFMAN H L, *et al*. Carcinoembryonic antigen (CEA) presentation and specific T cell-priming by human dendritic cells transfected with CEA-mRNA[J]. Eur J Cancer, 2002, 38(1): 184－193.

[4] PACZESNY S, UENO H, FAY J, *et al*. Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(6): 439－447.

[5] LISSONI P, VIGORE L, FERRANTI R, *et al*. Circulating dendritic cells in early and advanced cancer patients: diminished percent in the metastatic disease[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 1999, 13(4): 216－219.

[6] IINUMA T, HOMMA S, NODA T, *et al*. Prevention of gastrointestinal tumors based on adenomatous polyposis coli gene mutation by dendritic cell vaccine[J]. J Clin Invest, 2004, 113(9): 1307－1317.

(编辑　陈聪连)