文章编号:1000-5404(2006)02-0163-03

论著

SGC7901-DC 融合细胞疫苗表型变化特点的研究

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 利用细胞融合技术,获取SGC7901胃癌细胞-DC融合细胞疫苗,并对融合细胞表型变化进行检测,了解其变化特点,为基于树突状细胞的融合疫苗研究及应用提供实验依据。**方法** 利用聚乙二醇(PEG)诱导SGC7901胃癌细胞、树突状细胞融合,利用HAT、HT筛选培养系统对融合细胞进行筛选培养,获取纯净融合疫苗;应用直标荧光单克隆抗体进行染色,流式细胞仪检测细胞表型变化特点。**结果** SGC7901胃癌细胞-DC融合后,融合细胞具备独特的形态学特点,其细胞表面分子表达较亲代DC显著升高。**结论** SGC7901胃癌细胞-DC融合细胞疫苗具备独特形态学特点,其细胞表面分子表达较亲代DC显著升高,成为其具备更强生物学效应的细胞学基础。

关键词: SGC7901; DC; 融合疫苗; 表型变化
中图法分类号: R392-33; R372.7; R735.2 **文献标识码**: A

The phenotype changes of SGC7901 gastric cancer cell-dendritic cell fusion vaccine

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 obtain SGC7901 gastric cancer cell-dendritic cell fusion vaccines by cell fusion technology. The phenotype changes of the fusion cells were detected to provide experimental data for the following research work. **Methods** The SGC7901 gastric cancer cells and dendritic cells were induced to be fused by PEG and the pure fusion cells were obtained by selective culture with the HAT/HT culture system. The phenotype changes of the fusion cells were detected by flow cytometer. **Results** The fusion cells had special morphologic characteristic and the phenotypes of the fusion cells were remarkably higher than the parental dendritic cells. **Conclusion** The SGC7901 gastric cancer cell-dendritic cell fusion cells kept special morphologic characteristic and their phenotypes were significantly higher than the parental dendritic cells, which may be the cellular base for their stronger biological effects.

Key words: SGC7901; dendritic cell; fusion vaccine; phenotype

胃癌是严重威胁人类健康的消化道恶性肿瘤,近年来生物治疗手段为改善患者预后带来希望。尤其是基于树突状细胞(dendritic cells, DC)的抗肿瘤疫苗研究,取得了许多可喜的成就。国内外学者通过各种手段获取癌细胞抗原刺激DC,希望能增强其抗原递呈及后续免疫激发能力。既往基于DC的抗肿瘤疫苗研究手段如癌细胞冻融[1]、超声粉碎等获取癌细胞裂解产物,将其作为粗提抗原刺激DC,癌细胞抗原决定mRNA转入DC,或将DC与癌细胞混合培养等,仍存在不同程度的局限性。而胃癌缺乏特异性肿瘤抗原且癌细胞抗原性相对较弱的特点,使其生物治疗更加困难。若能将DC与胃癌细胞进行融合以实现DC对胃癌细胞抗原的最大提呈,则有可能取得满意的生物治疗效果。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制备融合细胞疫苗,对其细胞表型变化特点进行检测,进一步观察其变化规律,希望能为胃癌DC疫苗的研究提供实验基础与理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

rhGM-CSF(Promega), rhIL-4(R&D System), TNF-α(R&D System),聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG分子质量5 000, Sigma),次黄嘌呤(Hypoxanthine H, Sigma),氨基喋呤(Aminopterin A, Sigma),胸腺嘧啶核苷(Thymidine T, Sigma),PE-CD80、PE-CD1a、PE-HLA-DR、PE-IgG1、FITC-CD83、FITC-IgG2b直标荧光单克隆抗体(Sigma)。

1.2 实验方法

1.2.1 50% PEG配制 PEG 2.0 g,放入青霉素小瓶,加胶塞并插一针头,8磅高压蒸汽灭菌15 min后取出;56 ℃水浴中融化,37 ℃水浴;配制好的MEM培养基37 ℃水浴;吸取1 ml PEG + 1 ml MEM,37 ℃水浴充分混匀。

作者简介:张 坤(1973-),男,山东省沂水市人,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向的研究。现在南京军区福州总医院肝胆外科。电话:(0591)22859377

收稿日期:2005-03-04;修回日期:2005-05-18

1.2.2 HAT 选择性培养系统 100 × HT:50 ml 去离子水 + 68 mg 次黄嘌呤(H) + 19 mg 胸腺嘧啶核苷(T),70 ℃水浴助溶使充分溶解;100 × A:50 ml 去离子水 + 0.88 mg 氨基喋呤(A),加 1.0 mol/L NaOH 0.25 ml 助溶,1 mol/L HCl 调节 pH 值至 7.4;HAT 选择性培养液:DMEM 完全培养基 100 ml + HT 母液 1 ml + A 母液 1 ml,0.75% $NaHCO_3$ 调节 pH 值至 7.2 ~ 7.4;HT 选择性培养液:DMEM 完全培养基 100 ml + HT 母液 1 ml,0.75% $NaHCO_3$ 调节 pH 值至 7.2 ~ 7.4。

1.2.3 SGC7901 胃癌细胞复苏培养 冻存 SGC7901 细胞,快速 37 ℃水浴复苏;DMEM 完全培养基 37 ℃,饱和湿度,5% CO_2 孵箱静置培养。

1.2.4 胃癌患者外周血 DC 分离培养 应用淋巴细胞分离液分离胃癌患者外周血单个核细胞;DMEM 完全培养基 37 ℃,饱和湿度,5% CO_2 孵箱静置培养;2.5 h 后吸除培养基,去除未贴壁细胞,更换培养基并加入细胞因子:rhGM-CSF 100 ng/ml、rhIL-4 50 ng/ml;静置培养 6 d 后,加入 TNF-α 20 ng/ml,第 7 天收获 DC。

1.2.5 SGC7901-DC 融合细胞疫苗制备 制备 SGC7901 均匀单细胞悬液,细胞密度为 1×10^8/ml;制备 DC 单细胞悬液,细胞密度为 1×10^7/ml;SGC7901 单细胞悬液与 DC 单细胞悬液 10∶1 比例均匀混合;离心 1 000 r/min,离心 10 min,向细胞沉淀中缓慢滴加 1 ml PEG 溶液,吸管轻柔吹打,使细胞混合均匀;静置 1 min,使两种细胞充分接触、融合;9 ml MEM 培养基终止融合,离心沉淀(800 r/min,离心 8 min),弃上清;DMEM 完全培养基 37 ℃、饱和湿度、5% CO_2 孵箱静置培养 24 h;更换 HAT 选择性培养液,静置培养 14 d;更换 HT 选择性培养液,筛选培养 7 d;收获纯净融合细胞疫苗。

1.2.6 DC 及融合细胞疫苗形态学观察 分别取筛选培养的纯净融合细胞,亲代 DC,SGC7901 胃癌细胞,倒置显微镜、扫描电镜、透射电镜形态学特点观察。

1.2.7 融合细胞、亲代 DC 细胞表型检测 分别取纯净融合细胞、亲代 DC 均匀单细胞悬液;应用 PE-CD80,PE-CD1a,PE-HLA-DR,PE-IgG1(对照),FITC-CD83,FITC-IgG2b 直标荧光单克隆抗体(对照)充分震荡均匀染色(4 ℃、避光、30 min);染色结束后,再次充分震荡并行流式细胞仪细胞表型检测。

1.3 统计学处理

数据以($\bar{x} \pm s$)% 表示;采用 SPSS 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 融合细胞形态学观察

SGC7901-DC 融合细胞体积明显增大,悬浮生长,多呈圆形,细胞表面未见明显的毛刺样突起(图 1);透射电镜观察,可见由细胞膜伸出的树枝状突起较 DC 明显短小且非常稀少,核形不规则,细胞质内富含线粒体;扫描电镜观察,可见细胞形态均匀,主要呈圆形生长,表面绒毛状细胞突起较 DC 明显短小、稀少。而亲代 SGC7901 胃癌细胞为贴壁生长,多呈现梭形(图 2),亲代 DC 为悬浮生长,细胞多呈现圆形,细胞表面可见大量毛刺样突起(图 3)。



图 1 SGC7901-DC 融合细胞 (倒置显微镜 × 200)
图 2 培养 SGC7901 胃癌细胞 (倒置显微镜 × 200)
图 3 培养树突状细胞 (倒置显微镜 × 200)

2.2 融合细胞表型检测

经 PEG 诱导融合、HAT/HT 选择培养系统筛选培养所获取的纯净融合细胞,其细胞表面分子表达水平为:CD83(80.16 ± 1.12)%,CD1a(72.86 ± 2.48)%,CD80(81.24 ± 2.76)%,HLA-DR(79.54 ± 1.60)%。较亲代 DC 显著增高($P < 0.01$)。

2.3 亲代 DC 表型检测

DC 诱导培养第 3 天细胞表型检测,分别为 CD83(7.56 ± 0.18)%,CD1a(3.22 ± 0.38)%,CD80(7.38 ± 0.09)%,HLA-DR(12.76 ± 0.24)%;培养第 7 天检测,分别为 CD83(75.54 ± 0.73)%,CD1a(64.94 ± 0.52)%,CD80(61.56 ± 0.27)%,HLA-DR(62.50 ± 0.66)%;培养 14 d 检测,CD83(76.04 ± 0.10)%,CD1a(67.96 ± 0.38)%,CD80(65.66 ± 0.56)%,HLA-DR(67.48 ± 0.28)%;经统计分析表明,细胞培养第 7、14 天细胞表面分子表达与培养 3 d 比较差异均非常显著($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 细胞融合意义及融合细胞形态学变化特点

肿瘤生物治疗研究中,DC 因其强大抗原提呈及免疫激发能力受到广泛重视,人们尝试采用多种途径增强 DC 功能,制备抗肿瘤疫苗[2]。如应用肿瘤抗原多肽、肿瘤细胞蛋白提取物(超声粉碎、冻融)刺激 DC,回输至荷瘤宿主,可显著诱导机体产生抗原特异性 CTL。但由于受 MHC 分子限制等,使其临床应用受到

限制[3]。为了能够在不明确肿瘤抗原的情况下有效激发抗肿瘤免疫反应，有学者应用来源于肿瘤细胞的 mRNA 体外刺激 DC[4]，结果诱导小鼠了特异性的抗肿瘤免疫反应，提示肿瘤细胞 mRNA 可能替代肿瘤抗原刺激 DC，增加细胞表面共刺激分子表达，刺激 DC 分泌 IL-12 及激发 CTL 活性的能力[5]，有效用于肿瘤免疫治疗；而肿瘤相关抗原（TAA）基因及细胞因子基因等也被广泛尝试导入 DC，进行抗肿瘤免疫激发效应的研究[6]。肿瘤细胞与 DC 融合，将肿瘤抗原决定基因与 DC 基因重组，可能会取得更强的 DC 免疫激活效果[7,8]。

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[9]，肿瘤抗原编码基因导入 DC 后能在 DC 内表达肿瘤抗原[7]。在本研究中，我们获取了纯净 SGC7901-DC 融合细胞即“杂交细胞”。发现融合细胞具有类似于 DC 的悬浮生长特性，而不保留亲代 SGC7901 胃癌细胞的贴壁生长特性。光镜、电镜观察，可见细胞体积较亲代 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。

3.2　融合细胞表型变化特点及意义

抗肿瘤疫苗的研制是肿瘤免疫治疗研究的热点之一。目前的研究策略主要包括：①对肿瘤细胞进行修饰或改造，提高肿瘤细胞免疫原性，使肿瘤抗原能够被有效的呈递从而能激活机体抗肿瘤免疫系统，达到抑制或杀伤机体内肿瘤细胞的目的；②通过各种手段增强 APC 的抗原提呈能力，提高抗原提呈效率，增强 APC 对肿瘤杀伤效应细胞的刺激和激活能力，从而发挥更强、更有效的杀瘤活性。

如前所述，既往的研究多通过癌细胞破碎获取肿瘤抗原肽、肿瘤细胞培养上清刺激抗原提呈细胞、肿瘤细胞与 APC 共培养、肿瘤抗原相关基因转染抗原提呈细胞等手段来增强 APC 的功能，发现 APC 抗原提呈及免疫激活能力均有所增强。随着对 DC 本身特性及其在免疫反应体系中所占有重要地位研究的不断深入，基于 DC 的抗肿瘤疫苗研究取得很大进展，国内外学者通过各种手段修饰 DC，使其抗原递呈功能不断增强，尤其是通过电穿孔、化学诱导剂诱导等手段实现的肿瘤细胞与 DC 的融合[10]，使 DC 抗肿瘤疫苗的研究更进一步。

在本研究中，我们将胃癌、DC 通过 PEG 诱导进行融合，经 HAT/HT 选择培养系统筛选培养后获得纯净融合细胞，并对融合细胞进行流式细胞仪细胞表型检测。结果提示，融合细胞的细胞表型表达水平与未经修饰而正常培养的 DC 细胞表型比较差异显著。可见 DC 与 SGC7901 胃癌细胞融合后，融合细胞表面分子表达较正常培养的未修饰 DC 细胞表型有很大程度的升高，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、更完整的对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。

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] HIRAMOTO J S, TSUNG K, BEDOLLI M, *et al*. Antitumor immunity induced by dendritic cell-based vaccination is dependent on interferon-gamma and interleukin-12[J]. J Surg Res, 2004, 116(1): 64－69.

[3] RONGCUN Y, SALAZAR ONFRAY F, CHARO J, *et al*. Identification of new HER2/neu-derived peptide epitopes that can be elicit specific CTL against autologous and allogeneic carcinomas as and melanomas[J]. J Immunol, 1999, 163(2): 1037－1044.

[4] HEISER A, MAURICE M A, YANCEY D R, *et al*. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA[J]. J Immunol, 2001, 166(5): 2953－2960.

[5] KALADY M F, ONAITIS M W, EMANI S, *et al*. Sequential delivery of maturation stimuli increases human dendritic cell IL-12 production and enhances tumor antigen-specific immunogenicity[J]. J Surg Res, 2004, 116(1): 24－31.

[6] MILLER P W, SHARMA S, STOLINA M, *et al*. Intratumoral administration of adenoviral interleukin 7 gene-modified dendritic cells augments specific antitumor immunity and achieves tumor eradication[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(1): 53－65.

[7] SIDERS W M, VERGILIS K L, JOHNSON C, *et al*. Induction of specific antitumor immunity in the mouse with the electrofusion product of tumor cells and dendritic cells[J]. Mol Ther, 2003, 7(4): 498－505.

[8] SHIMOKUBO S, WAKAMATSU S, MAEDA Y, *et al*. Fusion of mature dendritic cells and human T-lymphotropic virus type I infected T cells: its efficiency as an antigen-presenting cell[J]. Virology, 2002, 301(1): 13－20.

[9] FOSTER T P, RYBACHUK G V, ALVAREZ X, *et al*. Overexpression of gK in gK-transformed cells collapses the Golgi apparatus into the endoplasmic reticulum inhibiting virion egress, glycoprotein transport, and virus-induced cell fusion[J]. Virology, 2003, 317(2): 237－252.

[10] SCOTT TAYLOR T H, PETTENGELL R, CLARKE I, *et al*. Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1500(3): 265－279.

（编辑　陈聪连）