文章编号:1000-5404(2007)09-0763-04

论著

人DeltaNp73α基因修饰的树突状细胞抗瘤免疫学效应研究

胡义杰,范士志,蒋耀光,李志平,陈建明,何 勇 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042)

提 要: 目的 研究DeltaNp73α重组腺病毒转染树突状细胞诱导的特异性免疫抗瘤作用。**方法** 人脐静脉血经梯度离心及IL-4、GM-CSF诱导培养树突状细胞;DeltaNp73α重组腺病毒增强离心法转染树突状细胞,观察DeltaNp73α对树突状细胞活化、凋亡的影响;同时检测其所诱导的DeltaNp73α特异性细胞毒性T淋巴细胞对不同DeltaNp73α表达水平肿瘤细胞的细胞毒性作用。**结果** Western blot证实重组腺病毒转染树突状细胞后DeltaNp73α的有效表达;DeltaNp73α修饰的树突状细胞凋亡率显著低于对照组;DeltaNp73α修饰树突状细胞诱导的细胞毒性T细胞可以有效的杀伤DeltaNp73α高表达的A549/DeltaNp73α细胞、K-562细胞;且这种免疫抗瘤作用可能与靶肿瘤细胞DeltaNp73α水平相关。**结论** DeltaNp73α修饰的树突状细胞,其凋亡率降低;并可以有效诱导针对DeltaNp73α高表达肿瘤细胞的特异免疫抗瘤作用。

关键词: DeltaNp73α;树突状细胞;重组腺病毒;免疫抗瘤
中图法分类号: R392.5; R394; R734.2 **文献标识码**: A

In vitro anti-tumor immune response induced by dendritic cells transfected with DeltaNp73α recombinant adenovirus

HU Yi-jie, FAN Shi-zhi, JIANG Yao-guang, LI Zhi-ping, CHEN Jian-ming, HE Yong (Thoracic and Cardiovascular Surgery Research Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of dendritic cells infected with adenovirus vector encoding DeltaNp73α on breaking the immune tolerance and inducing immunity against DeltaNp73α-overexpressing tumor. **Methods** Immature dendritic cells generated in the presence of interleukin-4 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor from human umbilical cord blood were transfected with recombinant adenovirus vector encoding full-length human DeltaNp73α cDNA by centrifugal force method. Viability and activation status of DCs after transfection were assessed by flow cytometric analysis, and induction of DeltaNp73α-specific CTL response was also evaluated by the cytotoxic assay against DeltaNp73α-overexpressing human tumor cells. **Results** DeltaNp73α expression in the transfected DCs was confirmed by Western blotting. DeltaNp73α enhanced DCs survival. A significant DeltaNp73α-specific CTL-stimulatory ability were observed in the DeltaNp73α-overexpressing cell lines, A549/DeltaNp73α and K-562. **Conclusion** DeltaNp73α enhances the survival of dendritic cells. Adenovirus vector-mediated DeltaNp73α-transfected DCs can effectively induce strong antigen-specific T cell response.

Key words: DeltaNp73α; dendritic cells; recombinant adenovirus; anti-tumor immune response

机体对肿瘤的免疫主要通过T细胞特异性杀伤来实现;而有效激活特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL),是实现肿瘤主动免疫治疗的关键[1]。树突状细胞(dendritic cells,DCs)是目前发现的体内功能最强、也是唯一能激活初始T淋巴细胞的抗原呈递细胞,它能高水平的表达与抗原呈递有关的MHC-Ⅰ类、MHC-Ⅱ类分子以及多种共刺激分子、黏附分子,可摄取肿瘤特异性相关抗原,吞噬处理凋亡或坏死肿瘤细胞等颗粒性抗原,具有"交叉呈递

基金项目:国家自然科学基金(30600611),第三军医大学中青年基金(XG200540)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30600611) and the Research Funs for Young Scholars by Third Military Medical University of China (XG200540)
作者简介:胡义杰(1979-),男,湖北省荆门市人,博士研究生,医师,主要从事肺癌生物治疗方面的研究。电话: 13228687328, E-mail: gysjf_hu@yahoo.com.cn
通讯作者:何 勇,E-mail:heyong8998@yahoo.com.cn
收稿日期:2006-12-12;**修回日期**:2007-01-08

(cross-presentation)"外源性抗原的能力。因此肿瘤抗原基因修饰的 DCs 体外免疫成为肿瘤免疫基因治疗的新途径[2]。由于肿瘤细胞具有高度异质性和基因不稳定性,寻找能有效刺激 DCs 发生 CTL 的特异性肿瘤相关抗原成为肿瘤免疫治疗一大热点。本研究采用含 DeltaNp73α cDNA 的重组腺病毒转染修饰 DCs,以期诱导针对高表达 DeltaNp73α 的肿瘤细胞的特异 CTL 反应,为进一步的动物及临床实验研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

脂质体转染 pcDNA3-DeltaNp73α-HA 并经由 G418 筛选的 DeltaNp73α 高表达的肺腺癌 A549/DeltaNp73α 细胞株由我科保存[3];DeltaNp73α 阳性表达的人慢性髓细胞白血病细胞 K-562 细胞株由第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室提供;DeltaNp73α 缺失表达的人乳腺癌 MCF-7 细胞株由第三军医大学西南医院全军烧伤研究所提供。

1.2 重组腺病毒[4]

复制缺陷性腺病毒 Ad-DeltaNp73α 含全长人 DeltaNp73α cDNA,由我科通过 Adeasy 系统构建,即将 DeltaNp73α cDNA 与穿梭质粒 pAdTrack-CMV 连接、转入含骨架质粒 pAdeasy-1 的 *E. Coli.* BJ5183 菌株内实现同源重组、重组质粒线性化后在 293T 细胞包装;反复感染裂解 293T 细胞扩增得到实验用的高滴度(2.5×10^{11} pfu/L)重组腺病毒 Ad-DeltaNp73α。采用含有 EGFP 的 Ad-ctrl 作为研究对照。

1.3 DCs、T 细胞以及 LAK 的分离培养

经产妇同意后,剖宫产时取新生儿脐带血,经人淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离出单个核细胞,37 ℃、5% CO_2 孵箱孵育。2 h 后转移未贴壁细胞至另一离心管供分离 T 细胞,贴壁细胞更换含有细胞因子 IL-4(1 000 IU/ml)、GM-CSF(1 000 IU/ml)的培养基继续培养。间隔 1 d 半量更换培养基,补充细胞因子 IL-4、GM-CSF。第 6 天收获未成熟 DCs(immature dendritic cells, iDCs);或者第 5 天换液时加入 TNF-α(50 ng/ml),刺激 48 h 后,即第 7 天收获成熟 DCs(mature dendritic cells, mDCs)。上述未贴壁的细胞,经尼龙毛柱法分离获得 T 淋巴细胞,在 10% FCS RPMI1640 培养基培养;淋巴因子活化杀伤细胞(lymphokine-activated killer, LAK)由分离的 T 细胞加入 IL-2 细胞因子(100 U/ml)刺激培养 3 d 获得。

1.4 腺病毒转染 DCs

根据文献[5]的报道采用离心法增强腺病毒转染 DCs,即收集 1×10^6 DCs,重悬于含有 1% FCM 的 PBS 500 μl;混合于 200 MOI 腺病毒的 500 μl 1% FCS PBS;然后将上述细胞及病毒混合液于 2 000 × *g*、37 ℃离心孵育 2 h。离心后的 DCs 用 PBS 洗涤 2 遍后,重悬于 10% FCS RPMI1640 培养基继续培养。

1.5 流式细胞术检测 DCs 表面标志物

收集 DCs,PBS 洗涤细胞后,分别加入待检测的抗体及其同行对照;4 ℃避光孵育 30 min 后,PBS 液洗涤 2 次后上机检测。采用的抗体主要有 PE-anti-CD1α、PE-anti-CD83、PE-anti-HLA-DR 及其同型对照(BioLegend,US)。

1.6 实时定量 PCR 和普通 RT-PCR

收集 DCs、腺病毒转染 48 h 的 DCs/Ad-ctrl 及 DCs/Ad-DeltaNp73α,和各种肿瘤细胞包括 A549/DeltaNp73α、K-562 和 MCF-7。Tripure Reagent 一步法提取上述细胞的总 RNA。反转录采用 500 ng 总 RNA。常规 RT-PCR 分析转染前后 DCs 中 DeltaNp73α mRNA 的表达;实时定量 PCR 检测各肿瘤细胞株中 DeltaNp73α mRNA 的水平。DeltaNp73α cDNA 的特异引物:上游引物 5′-ACCTCGCCACGGCCCAGTTC-3′,下游引物 5′-GGTGGAGCTGGGTTGTGCGTAG-3′。内参 β-actin 引物为:上游引物 5′-ATTGCCGACAGGATGCAGA-3′,下游引物 5′-GAGTACTTGCGCTCAGGAGGA-3′。

1.7 Western blot 分析 DeltaNp73α 蛋白的表达

收集 DCs、腺病毒转染 48 h 的 DCs/Ad-DeltaNp73α,含多种蛋白酶抑制剂的细胞裂解液直接于冰上裂解细胞后,4 ℃、15 000 × *g* 离心 20 min。收集上清,BCA 法检测总蛋白浓度。10% SDS-PAGE 胶电泳,电转 NC 膜,封闭后加 anti-HA-tag 抗体及对应的二抗免疫印迹检测 DeltaNp73α 蛋白的表达。

1.8 Annexin V/PI 染色法检测 DCs 凋亡

转染 7 d 收集 DeltaNp73α 腺病毒感染的 DCs(对照组采用正常培养 DCs、Ad-EGFP 转染的 DCs);将细胞悬浮在 1 × 结合缓冲液中,浓度调整为(2 ~ 5) × 10^5/ml;将细胞悬液和 PE 标记 Annexin V 混合,室温孵育 10 min;离心,PBS 洗涤细胞;使用1 × 结合缓冲液重悬细胞;用 PI 染色细胞(终浓度为 1 μg/ml);使用流式细胞仪分析。

1.9 CTL 反应

DeltaNp73α 特异性 CTL 反应的靶细胞分 3 组:高表达 DeltaNp73α 的 A549/DeltaNp73α 细胞、阳性表达 DeltaNp73α 的 K-562 细胞及 DeltaNp73α 阴性表达的 MCF-7 细胞。为了进一步检测 CTL 反应的特异性,我们对照分析了 3 组效应细胞针对 A549/DeltaNp73α、K-562 和 MCF-7 的细胞毒性,包括:DeltaNp73α 特异的 CTL、LAK、正常 T 细胞。CTL 的检测严格按 CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay 说明书进行分析。

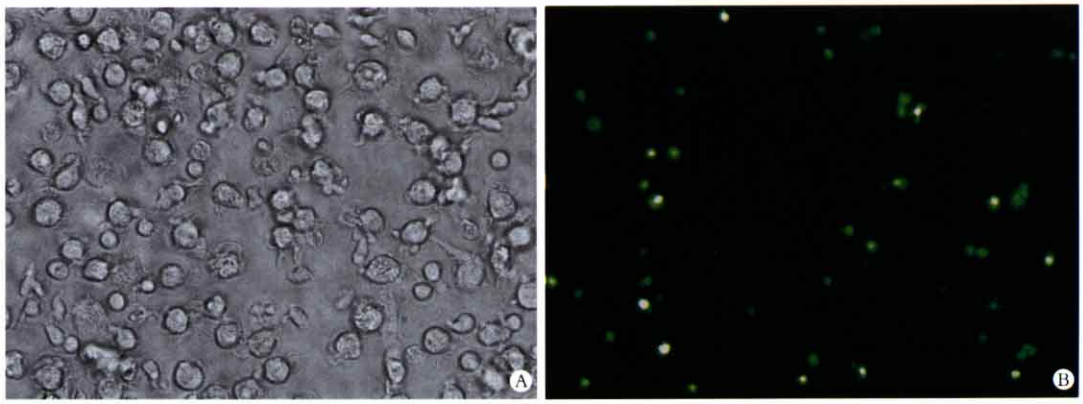
1.10 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,对于正态分布数据,交组间比较采用 χ^2 检验,两组间比较采用 t 检验。

2 结果

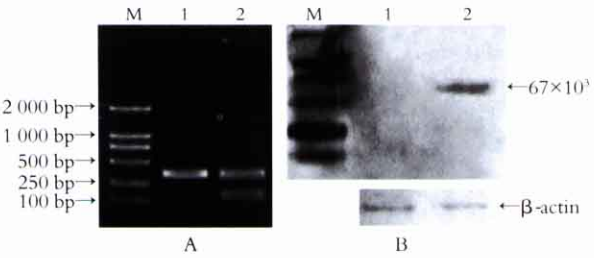
2.1 DCs 的分离培养鉴定以及重组腺病毒的转染

通过梯度离心法和 IL-4、GM-CSF 及 TNF-α 细胞因子的诱导,成功培养人 DCs(图 1);流式细胞检测可以观察到未成熟 DCs 以及成熟 DCs 的典型表型。采用 200 MOI 重组 DeltaNp73α 腺病毒有效(近 90%)转染 iDCs。进一步的 RT-PCR 以及 Western blot 分别分析了 DeltaNp73α mRNA 以及其蛋白表达的情况,结果证实通过 200 MOI 重组腺病毒转染 DCs 后,可以观察到 DeltaNp73α mRNA 及其蛋白在 DCs 中的表达(图 2)。



A：正常 DCs，可见特征性的长突起　（LM×400）；B：重组腺病毒感染 DCs，可见绝大部分细胞出现绿色荧光表达　（倒置荧光显微镜×100）

图 1　正常 DCs 和重组腺病毒转染后 DCs 镜下特征



A：RT-PCR 分析 DeltaNp73α mRNA 的表达；B：Western blot 分析带 HA 标签的 DeltaNp73α 蛋白的表达

M：标准；1：Ad-ctrl 组；2：Ad-DeltaNp73α 组

图 2　MOI 200 的 DeltaNp73α 重组腺病毒转染 DCs 后 DeltaNp73α 的表达

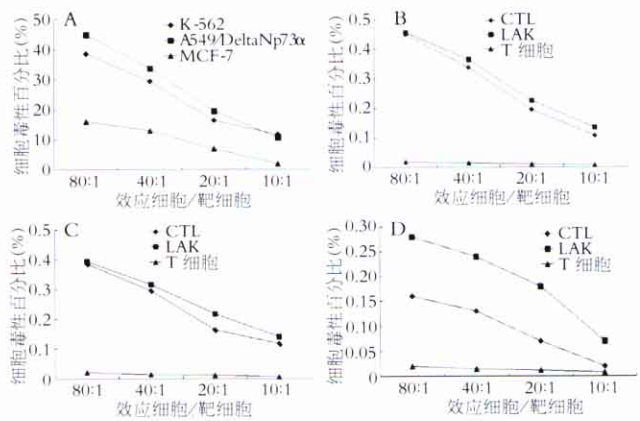
2.2　重组腺病毒以及 DeltaNp73α 对 DCs 分化成熟、DCs 凋亡的影响

对比分析重组腺病毒转染后的 DCs 以及正常 iDC、mDC 表面分子表达情况，显示转染后的 DCs 表面分子 CD83、HLA-DR 均较 iDC 表达水平增加，接近 mDC 水平（图 2）。此外，CD83、HLA-DR 表达的上调在 Ad-DeltaNp73α 和 Ad-ctrl 组间没有差异（$P>0.05$），提示 DeltaNp73α 对 DCs 表面分子的表达没有明显作用。进一步分析重组腺病毒转染 DCs 7 d 后，各组 DCs 的存活率：DeltaNp73α 组的存活率达（71.00 ± 2.83）%，显著高于另外两组（$P<0.01$）；而正常培养 DCs 以及空腺病毒载体转染组之间没有显著差异，分别为（53.52 ± 0.71）%、（45.50 ± 3.54）%（$P>0.05$）。

2.3　DeltaNp73α 修饰 DCs 诱导针对肺癌细胞特异性的 CTL 反应

本研究中我们选择了 A549/DeltaNp73α 细胞、K-562 细胞和 MCF-7 细胞 3 种肿瘤细胞株作为效应靶细胞。实时定量 PCR 分析各肿瘤细胞 DeltaNp73α mRNA 水平显示：A549/DeltaNp73α 高表达 DeltaNp73α，约为 K-562 细胞的 12 倍；MCF-7 细胞则缺失 DeltaNp73α 表达。

针对上述 3 种肿瘤细胞的细胞毒性作用（图 3A）显示，DeltaNp73α 特异性 CTL 能有效裂解 DeltaNp73α 高表达的 A549/DeltaNp73α 细胞、K-562 细胞；DeltaNp73α 缺失表达的 FCM-7 细胞仅少部分裂解。同时这种特异性 CTL 杀伤 A549/DeltaNp73α 细胞的水平高于 K-562 细胞。DeltaNp73α 特异性的 CTL 针对 A549/DeltaNp73α 细胞、K-562 细胞的杀伤效应接近 LAK 的能力；LAK 同样可以有效的杀伤 MCF-7 细胞，而 DeltaNp73α 特异性的 CTL 仅少量裂解 MCF-7（图 3B、C、D）。



A：CTL；B：A549/DeltaNp73α；C：K-562；D：MCF-7

图 3　针对 A549/DeltaNp73α、K-562 和 MCF-7 细胞 CTL 的细胞毒性分析

3　讨论

目前采用含有编码肿瘤相关抗原基因的重组腺病毒修饰 DCs 为目前最为常用的手段。尽管 DCs 不表达 CAR（库克萨基病毒和腺病毒受体），使得常规的重组腺病毒感染 DCs 的方法应用受限；但本研究应用增强离心方法显著提高重组腺病毒感染 DCs 的能力、DeltaNp73α 在 DCs 中表达水平。此外，重组腺病毒转

染 DCs，可以刺激 DCs 的进一步成熟活化。本研究显示，相比较未转染 DCs，Ad-DCs 中 CD83、HLA-DR 的表达上调，提示 Ad-DCs 具有更强的免疫刺激能力。

已有研究表明 DeltaNp73α 同家族的同源基因 p53 修饰的 DCs 在肿瘤的免疫治疗中有良好的抑瘤效果[6]。但其抑瘤效果受肿瘤中 p53 基因的表达状态影响，对野生型 p53 基因肿瘤没有杀伤效果，容易出现免疫耐受和诱发自身免疫反应[7]。而 DeltaNp73α 仅在肿瘤细胞中高表达，其表达和作用也不受 p53 基因状态的影响，提示 DeltaNp73α 修饰的 DCs 也能产生靶向肿瘤细胞的特异性 CTL 而不会存在 p53 修饰的 DCs 的治疗局限。我们通过上述方法成功构建了 DeltaNp73α 修饰的 DCs 疫苗，并研究了其针对 DeltaNp73α 高表达肿瘤细胞的免疫杀伤效力。结果证实 DeltaNp73α 修饰的 DCs 疫苗能有效的诱导细胞毒性 T 淋巴细胞，从而诱导特异的免疫学抗瘤效应。而进一步分析其针对不同 DeltaNp73α 表达水平肿瘤细胞的杀伤效应时，我们观察到其杀伤效应似乎与靶细胞 DeltaNp73α 的水平相关。

目前认为肿瘤相关抗原全长基因修饰的 DCs 疫苗，增强特异抗瘤作用的机制为：上述经修饰的 DCs 可以同时持续产生 MHC Ⅰ类和 MHC Ⅱ类的各种表位，即同时激活 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞免疫[6]。而在本研究中，除了上述机制外，DeltaNp73α 抑制 DCs 的凋亡，延长 DCs 的生存以及作用时间有可能进一步强化其特异性的杀伤作用。研究显示乳腺癌患者 DCs 细胞表型以及功能的严重受损，且相比与正常人，乳腺癌患者体内 DCs 细胞的自发凋亡率较高[8]。与正常前列腺组织或者良性前列腺增生组织相比，前列腺癌组织缺乏 DCs 细胞[9]。这些证据表明 DCs 的凋亡，包括 DCs 的自发性凋亡以及 T 细胞、肿瘤细胞介导的 DCs 凋亡，可能是肿瘤免疫逃避的重要机制之一。活化或成熟诱导信号，如 MHC Ⅱ类分子，可以诱导 DCs 的死亡，提示 DCs 的最佳免疫学效应活性可能局限于活化后相对较窄的时间窗。DCs 与 $CD4^+$ T 细胞发生抗原特异性作用后，DCs 立即进入凋亡过程；此外肿瘤细胞产生的免疫抑制因子，也可以抑制 DCs 的成熟以及功能[8]。DCs 的生存期显著影响着在体 DCs 诱导 T 细胞聚集增殖能力以及维持有效抑瘤免疫学效应的能力[7]。已有报道通过 TNF 受体修饰 DCs，可以显著抑制 DCs 的自发性凋亡，使其生存期长于正常对照 DCs 以及空病毒载体转染的 DCs[10]。本研究中具有抑制细胞凋亡作用的 DeltaNp73α 修饰 DCs，可以观察到 DCs 的生存率明显高于正常对照 DCs 以及含 EGFP 病毒转染的 DCs，亦即 DeltaNp73α 可以抑制 DCs 细胞的自发性或诱导性凋亡；这将进一步提高 DeltaNp73α 修饰 DCs 疫苗针对 DeltaNp73α 高表达肿瘤细胞的免疫杀伤作用。

总之，我们用含全长 DeltaNp73α cDNA 的重组腺病毒转染 DCs，构建 DCs 疫苗，诱导了针对 DeltaNp73α 特异性的 CTL，证实了 DeltaNp73α 基因修饰 DCs 疫苗治疗肺癌的可行性和有效性；同时由于 DeltaNp73α 具有抑制细胞凋亡的作用，上述策略将抑制 DCs 的细胞凋亡，从而促进 DeltaNp73α 在 DCs 的长期持续表达以及有效抗原呈递，为进一步的动物实验以及临床研究提供了依据。

参考文献：

[1] Rosenberg S A, Yang J C, Restifo N P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines[J]. Nat Med, 2004, 10(9): 909-915.

[2] Wu Q, Xia D, Carlsen S, *et al*. Adenovirus-mediated transgene-engineered dendritic cell vaccine of cancer[J]. Curr Gene Ther, 2005, 5(2): 237-247.

[3] 何 勇，范士志，蒋耀光，等. △Np73 基因对不同 p53 基因状态肺癌细胞系体外生长的影响[J]. 重庆医学，2004，33(11)：1649-1651.

[4] 胡义杰，范士志，蒋耀光，等. 人 DeltaNp73α 基因重组腺病毒载体的构建及其鉴定[J]. 第三军医大学学报，2007，29(9)：759-762.

[5] Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T, *et al*. Novel centrifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence protein gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells[J]. J Immunol Methods, 2001, 253(1-2): 113-124.

[6] Murakami T, Tokunaga N, Waku T, *et al*. Antitumor effect of intratumoral administration of bone marrow-derived dendritic cells transduced with wild-type p53 gene[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(11): 3871-3880.

[7] Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, *et al*. Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2001, 61(20): 7563-7567.

[8] Pinzon-Charry A, Maxwell T, McGuckin M A, *et al*. Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2006, 8(1): R5.

[9] Pirtskhalaishvili G, Shurin G V, Gambotto A, *et al*. Transduction of dendritic cells with Bcl-xL increases their resistance to prostate cancer-induced apoptosis and antitumor effect in mice[J]. J Immunol, 2000, 165(4): 1956-1964.

[10] Yurkovetsky Z R, Shurin G V, Barry D A, *et al*. Comparative analysis of antitumor activity of CD40L, RANKL, and 4-1BBL *in vivo* following intratumoral administration of viral vectors or transduced dendritic cells[J]. J Gene Med, 2006, 8(2): 129-137.

（编辑 邓强庭）