论著

文章编号:1000-5404(2009)13-1246-04

负载肿瘤抗原的DC疫苗对小鼠体内膀胱肿瘤的抑制作用

张 尧,兰卫华,聂志林,靳风烁 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

摘 要:目的 研究负载肿瘤抗原的DC疫苗对T739小鼠体内膀胱肿瘤的免疫学效应。**方法** 建立BTT 739荷瘤小鼠动物模型,随机分为实验组和实验对照组和空白对照组,于肿瘤细胞接种后第7、14天给予相应DC疫苗治疗,每组分2亚组,分别用于测量瘤质量、体积及用于观察荷瘤小鼠存活情况。**结果** 负载肿瘤抗原的DC疫苗实验组荷瘤鼠肿瘤平均体积和平均瘤质量均显著低于对照组($P<0.01$),生存期长于对照组,并且有2只小鼠无瘤长期存活。经DC疫苗实验组治愈的2只小鼠30 d后无肿瘤生长,再次皮下接种BTT739细胞观察30 d仍无肿瘤发生。**结论** 负载肿瘤抗原的DC疫苗对膀胱肿瘤荷瘤小鼠具有抑瘤效应和生存期延长作用。

关键词: 膀胱肿瘤;树突状细胞;COX-2抑制剂;寡脱氧核糖核苷酸
中图法分类号: R392.7; R73-362; R737.14 **文献标识码:** A

Inhibitory effect of dendritic cell vaccine plus tumor antigen on murine bladder tumor *in vivo*

ZHANG Yao, LAN Wei-hua, NIE Zhi-lin, JIN Feng-shuo (Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine plus tumor antigen on bladder tumor in T739 mice. Methods After establishment of the BTT739 bladder tumor model, 36 T739 mice were randomly divided into experiment group, control group, and empty control group. Peritumoral injection of dendritic cell (DC) vaccine was performed on day 7 and day 14 after inoculation of tumor cells. Tumor weight and volume were measured. The life span of mice was also observed. Results The inhibitory effect of DC vaccine on the tumor weight and volume in the experiment group was significantly higher than that in the control group ($P<0.01$). The survival time of the mice in the experiment group was significantly longer than that in the control group. Two mice treated with DC vaccine were tumor-free 30 days after being rechallenged with BTT739 cells. Conclusion DC vaccine plus with tumor antigen can inhibit tumor growth and prolong the survival time of T739 mice with BTT739 bladder tumor.

Key words: bladder cancer; dendritic cell; COX-2 inhibition; oligodeoxyribonucleotide

膀胱肿瘤是我国泌尿系统最常见的肿瘤,其中多数为非肌层浸润性膀胱癌。膀胱肿瘤的主要特点是复发率高,可能的原因是膀胱肿瘤患者膀胱黏膜局部免疫功能低下,使得残存肿瘤容易逃避免疫监视,得以生存和形成复发[1]。因此,非肌层浸润性膀胱肿瘤术后常辅以膀胱灌注化疗或免疫疗法以预防肿瘤复发和进展。卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin,BCG)膀胱灌注是目前投入临床应用最有效的免疫治疗方法,有效激活膀胱黏膜局部免疫应答是其抗肿瘤作用的主要机制,但BCG膀胱灌注等治疗仍不能完全预防肿瘤的复发和进展。预防膀胱肿瘤复发和进展仍是尚未完全解决的难题。本实验组近年来在环氧化酶2(Cyclooxygenase 2, COX-2)与膀胱肿瘤的相关研究以及CpG-ODN联合树突状细胞(Dendritic cell, DC)疫苗的研究都进行了大量的工作[2],本课题建立以DC为基础,以选择性COX-2抑制剂塞莱昔布(Celecoxib)和免疫佐剂CpG-ODN刺激诱导其成熟并发挥免疫功能的膀胱肿瘤疫苗,通过研究其对小鼠体内膀胱肿瘤的生物学效应,为寻找一种新的治疗膀胱癌和预防其复发的方

作者简介:张 尧,男,广东省梅州市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事泌尿系统肿瘤方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68757946,E-mail: zy921-1@163.com
通信作者:靳风烁,电话:(023)68757940
收稿日期:2009-02-12;修回日期:2009-03-16

法奠定实验基础。

1　材料与方法

1.1　细胞株及实验动物

BTT739 小鼠膀胱肿瘤细胞株,由上海市第一人民医院病理科夏书阶教授惠赠, T739 近交系小鼠 40 只(4 只用于分离 DC,36 只用于实验),中国医学科学院肿瘤研究所实验动物中心提供,雌雄各半,5 周龄,体质量 20 ~ 25 g,于我院实验动物中心常规饲养。

1.2　主要试剂

PMP1640 培养基和进口胎牛血清购自美国 HyClone,鼠淋巴细胞分离液购自天津 TBD 生物技术发展中心;CpG-ODN: ATA ATC GAC GTT CAA GCA AG,上海生工生物技术公司合成,两端均用磷硫酰修饰;celecoxib 由礼来制药公司提供原药,自行配制至浓度 100 μmol/L。

1.3　T739 小鼠骨髓来源的 DC 的分离、培养

参照文献[3]采用骨髓分离法并稍作改进。取 T739 近交系小鼠颈椎脱臼法处死;浸入 75% 的乙醇中 5 ~ 10 min,无菌手术取出股骨;剪去长骨骨端,冲洗骨髓腔,直至骨髓腔变白;收集骨髓细胞,去除其中红细胞,用洗涤离心后用 RPMI1640 培养液重悬细胞,冲洗后按 500 U/ml 鼠 GM-CSF 和 200 U/ml 鼠 IL-4 的终浓度加入培养体系,37 ℃、5% CO_2 培养备用。

1.4　负载肿瘤抗原的 DC 疫苗的制备

取 BTT739 细胞反复冻融获得[4-6]肿瘤冻融粗提全抗原,于 -20℃保存备用。应用 BTT739 细胞冻融抗原对 DC 的体外冲击致敏[4,5]后,分为 2 组,BCG 组:加入 DMSO(1 ml/L) + BCG(1 mg/L);实验组:加入 celecoxib(100 μmol/L) + CpG-ODN(2 μmol/L),继续置于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中培养,培养 48 h 后收获 DC 细胞即为负载 BTT739 细胞冻融抗原的 DC 疫苗。

1.5　荷瘤小鼠模型的建立

冻存 BTT739 鼠膀胱肿瘤细胞株常规复苏培养并传代,细胞生长至 80% ~90% 时,倾去培养液,D-Hanks 液漂洗。2.5 g/L 胰蛋白酶 37 ℃消化至细胞皱缩变圆。倾去胰酶,加入无血清培养基轻柔吹打形成细胞悬液,离心 800 r/min,3 min。弃上清,再次加入无血清培养基重悬细胞。台盼蓝染色计数细胞,检测活细胞比例大于 95%,并调整细胞数为 1×10^6/ml。将细胞悬液注射于 T 739 小鼠右前腋下皮下,每只 0.2 ml(2×10^5 个)。

1.6　负载 BTT739 细胞冻融抗原的 DC 疫苗对小鼠膀胱肿瘤的免疫治疗作用

1.6.1　实验分组　　T739 小鼠 36 只,接种肿瘤细胞 7 d 后,随机分为 3 组,12 只/组,A 组:空白对照组(加入 PBS 0.2 ml);B 组:实验对照组(加入 BCG 组 DC 疫苗 0.2 ml);C 组:实验组(实验组 DC 疫苗 0.2 ml),每组又随机分 2 亚组,每亚组 6 只:

1.6.1.1　亚组 1　　用于观察肿瘤生长及荷瘤小鼠存活情况:卡尺测定肿瘤的长径 a 和短径 b,按 $V = 1/2ab^2$ 算出体积,2 次/周,继续观察小鼠死亡情况,绘制小鼠生存曲线,直至其中 1 组小鼠死亡达到 50% 时停止测量。

1.6.1.2　亚组 2　　用于测量瘤质量、体积:接种肿瘤细胞第 21 天颈椎脱臼法处死全部亚组 6 只小鼠,称取瘤质量,按上法计算肿瘤体积,根据公式计算瘤质量和体积抑制率。

$$\text{移植瘤瘤质量抑制率}(\%) = \frac{\text{空白对照组平均瘤质量} - \text{实验(对照)组平均质量}}{\text{空白对照组平均瘤质量}} \times 100\%$$

$$\text{移植瘤体积抑制率}(\%) = \frac{\text{空白对照组平均体积} - \text{实验(对照)组平均体积}}{\text{空白对照组平均体积}} \times 100\%$$

1.6.2　干预时相点设置及治疗方案　　调整 DC 疫苗细胞浓度至 1×10^6/ml,各组实验动物分别于接种肿瘤细胞后第 7、14 天给予相应干预。干预方法采用肿瘤周围多点注射。

1.7　负载 BTT739 细胞冻融抗原的 DC 疫苗对小鼠的膀胱肿瘤细胞免疫再攻击的保护作用

经 DC 疫苗治愈的 2 只小鼠观察 30 d 后,于皮下再次接种等量 BTT739 小鼠膀胱肿瘤细胞,观察肿瘤生长情况。

1.8　统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用非配对 t 检验。

2　结果

2.1　BTT739 细胞和制备的 DC 疫苗培养过程中的光镜观察

按照上述方法复苏,获得了小而圆的漂浮的 BTT739 细胞,经培养 2 ~ 3 d,光镜观察可见贴壁生长的 BTT739 细胞。

实验组和实验对照组 DC 在培养过程中光镜观察无明显差异。骨髓单个核细胞培养 2 h 后获得的贴壁细胞,加入 rmGM-CSF 及 rmIL-4 共培养 24 h 后即可见贴壁细胞减少,在贴壁细胞表面可见少数悬浮细胞形成细胞集落,培养至第 3 天,可见贴壁细胞明显减少,在贴壁细胞表面形成的集落明显增大,增多,并可见多数悬浮细胞具有树突样突起,细胞表面有多个毛刺。培养到第 7 天并加入预定试剂后培养至第 10 天观察,细胞逐渐由聚集状态变为分散状态,悬浮细胞体积变大,细胞表面的毛刺样结构更为明显,为典型的树突状细胞形态,但仍有少数呈巨噬细胞样的贴壁细胞,细胞体积较大,负载 BTT739 细胞冻融抗原后仍无形态的明显变化。

2.2　荷瘤鼠肿瘤生长的一般情况

T739 小鼠皮下接种肿瘤细胞后第 3 ~ 5 天,所有小鼠均于接种部位出现直径 0.2 ~ 0.4 cm 大小的结节。接种肿瘤细胞后第 7 天,小鼠肿瘤平均直径可达 0.5 ~ 1.0 cm,此时给予第 1 次干预。接种瘤细胞后第 14 天(即第 1 次干预 7 d 后),空白对照组(A 组)肿瘤平均体积为 1.52 cm^3, BCG 对照组(B 组)为 1.00 cm^3,而 DC 疫苗组(C 组)平均体积为 0.41 cm^3,其中有 2 只小鼠肿瘤体积较治疗前有所减小,另外 4 只小鼠肿瘤较其他各组生长也明显缓慢,C 组平均体积明显小于 A、B($P < 0.01$)组,B 组体积也明显小于 A 组($P < 0.01$)。此时各组小鼠给予了第 2 次相应治疗。此后 C 组 2 只对 DC 疫苗反应良好的小鼠肿瘤体积进一步减小,其他小鼠肿瘤体积增长缓慢甚至停滞,平均体积小于 A、B 组($P < 0.01$)。于接种瘤细胞后第 22、24、28 天,PBS 组各有 1 只小鼠死亡,(肿瘤直径均大于 3 cm),终止体积测量观察,此时其他 3 组小鼠也相继出现死亡。C 组 2 只小鼠分别于接种肿瘤 30、32 d 时未能扪及肿瘤,继续观察 30 d仍无肿瘤出现。具体体积变化见表 1。荷瘤小鼠肿瘤生长情况见图 1 ~ 4。

表1 各组荷瘤小鼠皮下肿瘤不同时间体积变化情况(cm^3)

组别	7 d	10 d	14 d	17 d	21 d	24 d	28 d
A	0.15±0.03	0.56±0.07	1.52±0.11	3.34±0.19	4.82±0.40	8.66±0.34	13.12±0.45
B	0.13±0.05	0.41±0.08	1.00±0.06[a]	2.05±0.12[a]	3.20±0.18[a]	5.04±0.18[a]	8.44±0.21[a]
C	0.12±0.04	0.23±0.14[a]	0.41±0.30[ab]	0.54±0.41[ab]	0.65±0.52[ab]	0.75±0.66[ab]	0.97±0.83[ab]

a: $P<0.01$,与A组比较;b: $P<0.01$,与B组比较

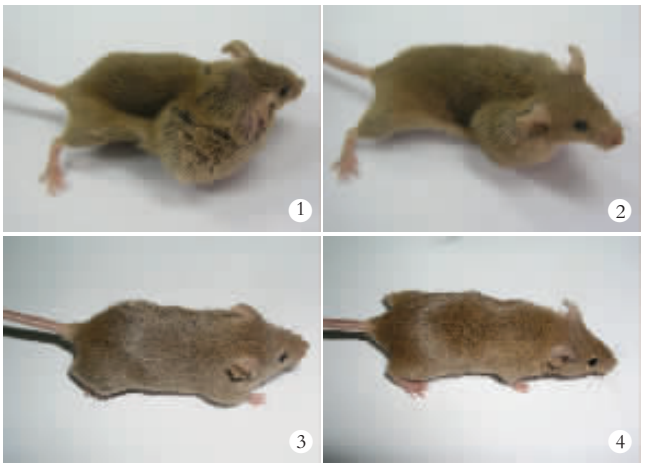


图1 空白对照组T739小鼠荷瘤情况

图2 实验对照组T739小鼠荷瘤情况

图3 实验组T739小鼠荷瘤情况

图4 实验组被治愈的T739小鼠无移植瘤存在

2.3 负载BTT739细胞冻融抗原的DC疫苗对膀胱肿瘤荷瘤鼠的存活延长效应

负载BTT739细胞冻融抗原的DC疫苗实验组的荷瘤生存期明显长于BCG对照组及PBS对照组,并且有2只小鼠相继于第2次治疗后2~3周肿瘤逐渐消失,继续观察1个月未见肿瘤生长,表明经干预治疗肿瘤已治愈。实验对照组荷瘤小鼠生存期亦显著长于PBS空白对照组(图5)。

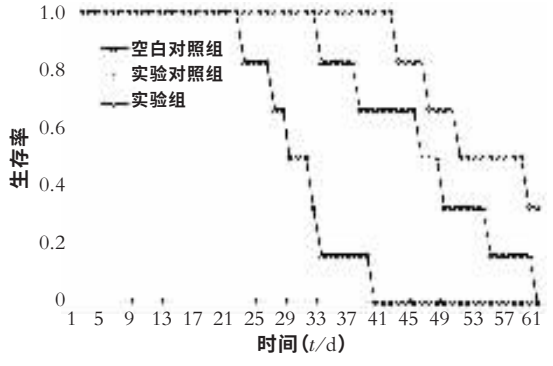


图5 各组荷瘤小鼠生存时间

2.4 负载BTT739细胞冻融抗原的DC疫苗对膀胱肿瘤荷瘤鼠的抑瘤效应

各治疗组亚组2荷瘤小鼠,于接种肿瘤第21天解剖,肿瘤外观呈圆形或椭圆形,表面有结节状突起,瘤外有不完整细胞膜,质韧,实性,实验组和实验对照组可见肿瘤内有出血、坏死,空白对照组可见部分肿瘤侵及肌肉。实验组平均瘤质量及平均体积均显著小于其他各组($P<0.01$)(表2)。

表2 BTT739荷瘤小鼠各组的抑瘤效应($n=6$)

组别	平均质量(g)	移植瘤质量抑制率(%)	平均体积(cm^3)	移植瘤体积抑制率(%)
A	4.67±0.31	--	5.02±0.31	--
B	3.00±0.15[a]	35.76%	3.25±0.16[a]	35.26%
C	1.02±0.48[ab]	78.16%	0.80±0.58[ab]	84.06%

a: $P<0.01$,与A组比较;b: $P<0.01$,与B组比较

2.5 负载BTT739细胞冻融抗原的DC疫苗对BTT739细胞再攻击的免疫保护作用

经负载BTT739细胞冻融抗原的DC疫苗(C组)治愈的2只小鼠观察30 d后,仍无肿瘤形成,为观察负载BTT739细胞冻融抗原的DC疫苗对BTT739细胞再攻击的免疫保护作用,于皮下再次接种等量BTT739细胞,2只小鼠继续观察30 d无肿瘤形成。

3 讨论

树突状细胞(DC)是目前发现的体内功能最强,也是唯一能激活初始型T淋巴细胞的抗原递呈细胞(APC)。DC在肿瘤免疫中的功能强大,但肿瘤组织及外周血中DC的数目、成熟及功能受到抑制[7]。DC在肿瘤免疫治疗中的作用越来越引起人们的重视,人们将DC进行处理后制成肿瘤疫苗,再输入体内,从而激发机体特异性的抗肿瘤免疫应答[8,9]。随着体外大量扩增DC和制备DC疫苗技术的日趋成熟,采用DC疫苗进行抗肿瘤治疗,包括抗膀胱肿瘤治疗已成为当今肿瘤生物治疗领域倍受关注的焦点之一。

COX-2是一种诱导型酶,在正常组织中几乎无表达,仅当受到细胞内外刺激时迅速合成,表达显著升高。研究表明,COX-2不仅参与炎症、疼痛、细胞的修复与增殖等过程,而且与多种肿瘤的发生和发展有关,对肿瘤的分化、凋亡、血管生成等生物学行为产生影响[10,11]。选择性抑制COX-2,可以起到既能抗炎止痛、预防肿瘤发生和进展,又不产生抑制COX-1所导致的副作用,因此COX-2可作为临床防治肿瘤的新靶标。

CpG,从卡介苗(BCG)中提取的 DNA 片段,以未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤(CpG)二核苷酸为核心的六碱基序列为基础,具有与细菌相同的强大的免疫刺激活性。多项研究证实,人工合成的 CpG-ODN 通过对各种免疫细胞和细胞因子的作用以及通过调节多种凋亡相关基因增强免疫刺激作用,作为一种新型免疫佐剂,具有相当的实用价值[12,13]。同时,CpG-ODN 可以代替 BCG 激活 DC 并避免 BCG 的副作用。因此本研究中将选择性 COX-2 抑制剂 celecoxib 和 CpG-ODN 作为刺激 DC 疫苗的佐剂,希望获取的 DC 疫苗具有更强的诱导免疫和抗原递呈能力。

单纯的抗原不能活化 T 淋巴细胞,必须经过 APC 递呈,因为 T 淋巴细胞活化需要抗原和辅助分子双信号才能有效地诱导 CTL 形成,发挥抗瘤效应。而肿瘤细胞可通过下调肿瘤相关抗原、低表达或不表达 MHC 分子和共刺激分子,使抗原不能被有效递呈给 T 细胞以产生特异性的抗瘤效应,因此激发有效的 T 细胞介导的抗瘤免疫反应是提高肿瘤免疫治疗效果的关键。负载肿瘤抗原的 DC 疫苗由于可通过 DC 表面 MHC 类分子、共刺激分子将各种已知或未知的肿瘤相关抗原信息得到有效递呈,因此作为理想的肿瘤疫苗在实验和临床研究受到广泛重视。

国外相关研究和我们实验组的前期研究证实:COX-2 抑制剂和 CpG-ODN 肿瘤周围注射后均可增强肿瘤微环境中 DC 的成熟和活化,从而发挥免疫学效应[14,15]。本研究中,我们联合应用 COX-2 抑制剂和 CpG-ODN 刺激成熟的 DC 疫苗进行小鼠移植瘤周围注射,结果显示,21 d 时实验组 DC 疫苗的荷瘤鼠平均瘤质量和平均体积均显著低于实验对照组和空白对照组,而荷瘤生存期显著长于其它各组,结果说明我们构建的 DC 疫苗对膀胱肿瘤荷瘤鼠具有较强的抑瘤效应和延长生存期作用,显示了负载肿瘤抗原的 DC 疫苗治疗膀胱肿瘤的优势。另外,经负载 BTT739 细胞冻融抗原的 DC 疫苗治愈的 2 只小鼠观察 30 d 后,仍无肿瘤形成,于皮下再次接种等量 BTT739 细胞,2 只小鼠继续观察 30 d 仍无肿瘤形成。说明负载 BTT739 细胞冻融抗原的 DC 疫苗对 BTT739 细胞再攻击的免疫保护作用,

我们的研究结果表明负载肿瘤抗原的 DC 疫苗可能是一种治疗膀胱肿瘤的有效方法,并可诱导机体产生并维持长期的肿瘤记忆性细胞免疫反应,在预防膀胱肿瘤复发中具有良好应用前景。

参考文献:

[1] Herr H W, Pinsky C M, Whitmore W F Jr., *et al*. Effect of intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG) on carcinoma in situ of the bladder[J]. Cancer, 1983, 51(7): 1323 – 1326.

[2] 聂志林,靳风烁,张克勤,等. CpG-ODN 治疗小鼠膀胱肿瘤的实验研究[J]. 免疫学杂志,2008,24(3):318 – 321.

[3] Inaba K, Inaba M, Romani N, *et al*. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[J]. J Exp Med, 1992, 176(6):1693 – 1702.

[4] 唐　华,银平章,孔令非, 等. 冻融抗原冲击致敏的树突状细胞对结肠癌小鼠的治疗作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2000,7(3): 199 – 202.

[5] 高维实,闵　军,褚忠华,等. 肝癌细胞冻融抗原负载树突状细胞瘤苗的制备与活化[J]. 中国病理生理杂志,2003,19(9):1279 – 1282.

[6] Gronau S, Schmitt M, Riechelmann H. Dendritic cells pulsed with tumor-derived lysate augment T cell mediated tumor cell lysis[J]. Otolaryngol Head Neck Surg,2004,131(2):176 – 177.

[7] Kikuchi T, Ohno N, Ohno T. Maturation of dendritic cells induced by Candida beta-D-glucan[J]. Int Immunopharmacol, 2002, 2(10): 1503 – 1508.

[8] Kumamoto T, Morita A, Takashima A. Recent advances in dendritic cell vaccines for cancer treatment[J]. J Dermatol,2001,28(11):658 – 662.

[9] Schott M, Seissler J. Dendritic cell vaccination: new hope for the treatment of metastasized endocrine malignancies[J]. Trends Endocrinol Metab, 2003,14(4):156 – 162.

[10] Mohammed S I, Knapp D W, Bostwick D G, *et al*. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder[J]. Cancer Res,1999, 59(22): 5647 – 5650.

[11] 卓文利,靳风烁,李黔生,等. 膀胱移行细胞癌中树突状细胞浸润及其表面分子表达变化的临床意义[J]. 医学临床研究,2004, 21(11): 1235 – 1237.

[12] Chace J H, Hooker N A, Mildenstein K L, *et al*. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12[J]. Clin Immunnol Immunopathol, 1997,84(2): 185 – 193.

[13] Ballas Z K, Rasmussen W L, Krieg A M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA[J]. J Immumol, 1996, 157(5): 1840 – 1845.

[14] 聂志林,靳风烁,王洛夫,等. CpG-ODN 预防膀胱肿瘤复发的可行性研究[J]. 第三军医大学学报, 2006,28(10):1054 – 1056.

[15] Heckelsmiller K, Beck S, Rall K, *et al*. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy[J]. Eur J Immunol, 2002,32(11): 3235 – 3245.

(编辑　王　红)