维普资讯 http://www.cqvip.com

胃癌-树突状细胞融合细胞疫苗制备及其形态学观察

张 坤[1a], 余佩武[2], 高朋芬[1b], 饶 云[2] (1. 南京军区福州总医院: a. 肝胆外科; b. 眼科, 福建 福州 350025; 2. 第三军医大学附属西南医院普通外科, 重庆 400038)

[摘 要] **目的** 利用细胞融合技术, 获取胃癌细胞-树突状细胞融合细胞疫苗, 并对其形态学特点进行观察, 为基于树突状细胞(DC)的融合疫苗研究及应用提供实验基础。**方法** 利用聚乙二醇(PEG)诱导胃癌细胞、DC融合, 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; 利用光镜、电镜对其形态学特点进行观察。**结果** 胃癌-DC细胞融合后, 体积明显增大, 悬浮生长, 细胞表面树枝状突起较亲代DC明显短小、稀少。**结论** 胃癌-DC融合细胞保持类似于亲代DC的悬浮生长特性, 但数量减少、体积明显增大, 具备与两种亲代细胞均不相同的形态学特性。

[关键词] 胃癌细胞; 树突状细胞; 融合细胞疫苗; 形态学
[中图分类号] R735.2; R730.51 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2005)05-0301-03

Preparation and morphological characteristics of gastric cancer cell-dendritic cell fusion vaccine

ZHANG Kun, YU Pei-wu, GAO Peng-fen, RAO Yun (Department of Hepatobiliary Surgery, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China)

Abstract: Objective To obtain gastric cancer cell-dendritic cell fusion vaccine by using the cell fusion technology and to observe the morphological characteristics of the fusion cells. **Methods** The gastric cancer cells and dendritic cells were fusioned by PEG and selected by the HAT/HT culture systems. The morphological characteristics of the fusion cells were examined under light and electron microscopes. **Results** The fusion cells became much larger than their parental cells, but the cell number decreased remarkably. The fusion cells less in suspended in the culture medium and the protuberances on the surface of the cells became short and sparse. **Conclusion** The gastric cancer cell-dendritic cell fusion cells kept the growth feature of suspension as their parental dendritic cells, but were much larger and less in number. These morphological characteristics are typical and different from their parental cells.

Keywords: gastric cancer cell; dendritic cell; fusion vaccine; morphology

胃癌是严重威胁人类健康的常见消化道恶性肿瘤之一, 近年来生物治疗手段的不断完善与发展为改善胃癌患者的预后带来希望。各国学者利用细胞免疫和基因工程技术, 进行各种肿瘤疫苗的研究, 尤其是基于DC的抗肿瘤疫苗研究, 取得了许多可喜的成就。既往基于树突状细胞(DC)的抗肿瘤疫苗研究主要有: 用癌细胞冻融[1]、超声粉碎[2]等方法获取癌细胞裂解产物, 将其作为粗提抗原刺激DC, 将癌细胞抗原决定簇mRNA转入DC, 将DC与癌细胞混合培养等。上述多种手段虽都能在一定程度上增强DC的功能, 并增强机体的抗肿瘤免疫能力, 但其本身仍存在许多局限性。为此, 本实验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, 并对其形态学变化特点进行观察。希望能为胃癌DC瘤苗的研究提供新的实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基(Gibcol Brl), 淋巴细胞分离液(TDB公司), 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), MEM培养基(Gibcol)。

1.2 实验方法

1.2.1 配制DMEM培养基、MEM培养基。

1.2.2 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。

1.2.3 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。

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

1.2.5 胃癌患者外周血DC分离培养 应用淋巴细胞分离液分离无菌、肝素钠抗凝胃癌患者外周全血中单个核细胞层。加DMEM完全培养基, 37 ℃、饱和湿度、5% CO_2孵箱静置培养。

[作者简介] 张 坤(1973-), 男, 山东省沂水县人, 主治医师, 博士, 主要从事消化道肿瘤的外科治疗与生物治疗方面的研究。电话: (0591) 22859377

[收稿日期] 2005-06-23 [修回日期] 2005-09-19

维普资讯 http://www.cqvip.com

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。

1.2.6 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。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。加 9 ml MEM 培养基终止融合,离心沉淀(800 r/min,8 min),弃上清,加 DMEM 完全培养基,37 ℃、饱和湿度、5%CO_2孵箱静置培养 24 h。更换成 HAT 选择性培养液,静置培养 14 d。更换成 HT 选择性培养液,筛选培养 7 d。收获纯净融合细胞疫苗。

1.2.7 DC及融合细胞疫苗形态学观察 取均匀悬浮生长 DC,倒置显微镜、扫描电镜、透射电镜形态学特点观察。取生长良好、经 HAT/HT 选择培养系统筛选培养的融合细胞,倒置显微镜、扫描电镜、透射电镜形态学观察。

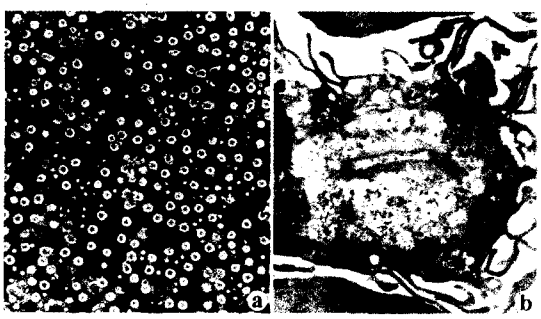
2 结果

2.1 培养 SGC7901 胃癌细胞形态观察

SGC7901 胃癌细胞复苏培养后第 2 天,即恢复良好的贴壁生长,但细胞数量仍较少,表明细胞处于复苏培养后的短暂潜伏适应期。约培养 4 d 后,细胞数量逐渐增多,细胞膜清晰、完整,细胞主要呈椭圆形、短梭形生长。随时间推移,细胞分裂增殖,数量显著增多。复苏培养第 7 天,细胞处于旺盛生长状态,透射电镜观察,可见细胞膜清晰完整,细胞突起短而细小,细胞核大,核浆比例大,胞浆内线粒体丰富,染色质呈棒状或分叶状,表明细胞分裂增殖、生长活跃。扫描电镜观察,可见细胞呈现不同大小的椭圆形或短梭形,表面未见明显突起。

2.2 培养 DC 形态观察

DC 诱导培养第 7 天,细胞数量多,分散悬浮生长,细胞表面有大量细小毛刺样突起形成(图 1a)。培养第 7 天透射电镜观察,可见悬浮生长的细胞表面具有典型的形态学特征—由胞膜伸出长短不一的突起,细胞核形状不规则,多偏于一侧,胞浆中富含线粒体,吞饮小泡及大泡较多,溶酶体较少(图 1b)。扫描电镜观察,细胞表面粗糙,胞体向周围伸出大量树枝状或裙褶状不规则突起,使细胞表面呈现密集的绒毛状。

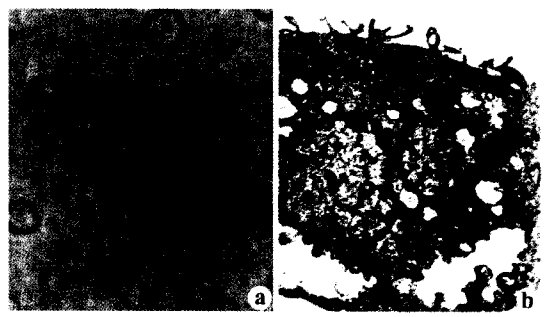


a:倒置显微镜(×200);b:TEM(×4 000)

图 1 DC 诱导培养第 7 天

2.3 融合细胞形态学观察

对数生长期 SGC7901 细胞及 DC 混合悬液,经 PEG 诱导融合后光镜观察,可见大量体积明显增大的融合细胞悬浮生长于培养基中,胞浆透明,形态规则,多呈圆形,细胞边界清晰,胞膜完整,部分融合细胞体积巨大。同时可见呈均匀圆形的未融合亲代细胞悬浮于培养基中,但细胞体积明显小于融合细胞。融合细胞经 HAT 选择培养基筛选培养 2 周、HT 选择培养基筛选培养 1 周后光镜观察,可见细胞数量明显减少,仅剩少量体积较大、胞膜完整、呈均匀圆形悬浮生长的融合细胞存在,细胞表面未见明显的毛刺样突起(图 2a),细胞内有单个存在的较亲代细胞明显增大的细胞核。透射电镜观察,可见由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,胞浆内富含线粒体,吞饮小泡及大泡较 DC 明显增多,溶酶体增多(图 2b),细胞内仅有一个较亲代细胞明显增大的细胞核,核内染色质粗大。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。



a:倒置显微镜(×200);b:TEM(×6 000)

图 2 SGC7901 – DC 经 PEG 诱导融合、HAT/HT 选择培养 21 d 后

3 讨论

3.1 DC 的诱导培养

DC 是机体内重要的专职 APC,捕获、加工处理抗原后将抗原信息进一步递呈,激活后续特异性细胞和体液免疫反应。DC 具有激活 CD8 + CTL 和 CD4 + T 辅助细胞的能力,控制着机体内免疫反应的过程,成为抗肿瘤免疫的中心环节。目前一致认为,DC 是具有典型树枝状突起,膜表面高表达主要组织相容性抗原复合体(MHC)类分子,能移行至淋巴器官和刺激初始型 T 淋巴细胞增殖活化,并具有一些相对特异性表面标志,在分布和功能上表现出很大的异质性。本研究通过将获取的胃癌患者外周血单个核细胞经细胞因子体外诱导分化,获得具有典型光镜、电镜形态特征的 DC,细胞表面毛刺样突起随着细胞的分化成熟而逐渐增多,与既往研究中所发现的体外诱导培养 DC 表面树枝状突起随培养时间推移而增多、变长的形态变化规律相符合[3]。

作为 DC 来源的巨噬-DC 二向分化祖细胞,在不同

维普资讯 http://www.cqvip.com

微环境、不同细胞刺激因子和不同诱导分化途径中，可分化为巨噬细胞或者DC。本研究应用淋巴细胞分离液自胃癌患者抗凝外周全血中获取单个核细胞，培养过程中加入GM-CSF、IL-4诱导单个核细胞向DC方向生长分化，同时抑制粒细胞、巨噬细胞的产生、维持诱导培养DC的强抗原递呈能力[5-6]，加入TNF-α促进DC的成熟[7]，使DC具有强的刺激T淋巴细胞的活性；获得具有典型形态学及细胞表面分子表达特征的DC，且细胞数量较多，可以满足进一步研究的需要。

3.2 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因其强大抗原递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[8]，如肿瘤抗原多肽在体外冲击致敏DC，肿瘤细胞蛋白提取物刺激DC，肿瘤相关抗原(TAA)基因[9]及细胞因子基因导入DC等。将癌细胞冻融、超声粉碎等获取胞裂解产物，作为粗提抗原刺激DC时，在对这些细胞裂解产物中的抗原物质进行分离、纯化的过程中，极易造成抗原的衰减和丢失，而且细胞裂解产物中的抗原物质本身就存在极大的不确定性，造成其激发DC及后续免疫反应的能力非常弱而且极不稳定。为克服这一缺陷，有学者通过将癌细胞抗原决定mRNA转入DC的方法，试图增强DC的抗原递呈及免疫激发能力，但这种方法的前提是必须应用已经明确证实的决定某种癌抗原的基因进行转染，才能取得比较好的效果。上述多种手段虽都能在一定程度上增强DC的功能，并增强机体的有效抗肿瘤免疫能力，但其本身仍存在各种局限性。而肿瘤细胞与DC融合，将肿瘤抗原决定基因与DC基因重组，可以取得更强的DC免疫激活效果[10]。有学者尝试将肿瘤细胞与DC经电穿孔途径融合，观察到DC刺激后续抗肿瘤免疫反应的能力明显增强[11]。

在细胞融合过程中，不仅两类不同细胞间发生融合，两类亲代细胞也可以发生相互融合现象，含有两个不同亲本细胞核的细胞成为“异核体”(heterokaryons)或异核细胞。有同一亲本细胞融合形成的细胞成为“同核体”(homokaryons)或同核细胞。大部分多核细胞会逐渐死亡，只有少数异核细胞尤其是双核细胞存活，并通过有丝分裂使不同亲本细胞的染色体合并在一个细胞核中，形成“合核体”(synkaryons)或合核细胞，即为杂交细胞。HAT/HT选择性培养基即是针对细胞嘌呤和嘧啶生物合成途径设计的分离筛选杂交细胞的特殊培养基。其中氨基喋呤可以阻断核苷酸的主要合成IPM的途径，因此细胞只能通过HGPRT能使次黄嘌呤酸化形成次黄苷酸，再依次转化为AMP和GMP，即通过“应急”通路依赖外源途径来合成核苷酸。

本研究将SGC7901胃癌细胞与DC经PEG诱导融合及HAT/HT选择培养系统筛选培养后，将未融合的亲代细胞及相同亲代细胞融合而形成的“合核体”细胞选择性杀灭筛除，获取了纯净融合细胞即“杂交细胞”。进一步证实应用PEG—HAT—HT诱导及选择培养系统，可以有效诱导两种不同细胞的融合，并可通过选择阻断细胞代谢所必须的某些通路而筛选获取纯净的融合细胞。实验发现，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。

[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 NG, Yamasaki S, et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melonoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologeous antigen presenting cells[J]. Proc Natl Acad Sci, 1995,92(17):8087-8082.

[3] 刘树人,张 雁,彭齐荣,等. 慢性乙型肝炎树突状细胞形态和吞噬功能的测定[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2001,10(3): 261-263.

[4] Jansen JH, Wientjens GJ, Fibbe WE, et al. Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4[J]. J Exp Med, 1989,170(2):577-582.

[5] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells in maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha[J]. J Exp Med, 1994,179(4):1109-1118.

[6] Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? [J]. Trends Immunol, 2002,23(9):445-449.

[7] Morrison RS, Cruse JM, Wang H, et al. Dendritic cell differentiation and proliferation: enhancement by tumor necrosis factor-α[J]. Exp Mol Pathl, 2003,75(3):228-237.

[8] Hiramoto JS, Tsung K, Bedolli M, et al. Antitumor immunity induced by dendritic cell-based vaccination is dependent on interferon-γ and interleukin-12[J]. J Surg Res, 2004,116(1):64-69.

[9] Cao X, Zhang W, Wang J, et al. Therapy of established tumor with a hybrid celluar vaccine generated by using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetically modified dendritic cells[J]. Immunology, 1999,97(4):616-625.

[10] Siders WM, Vergilis KL, 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.

[11] Orentas RJ, Schauer D, Bin Q, et al. Electrofusion of a weakly immunogenic neuroblastoma with dendritic cells produces a tumor vaccine[J]. Cell Immunol, 2001,213(1):4-13.

(编辑:余汇洋)