维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0777-03

肾癌-树突状细胞融合瘤苗的制备及生物学特性

胡 志,胡自力

(重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:制备肾癌-树突状细胞(Dendritic cells,DC)融合瘤苗并观察其生物学特性,为融合瘤苗后续研究及应用提供实验依据。方法:用聚乙二醇(Polyethylene glycol,PEG)法诱导肾癌(Renal cell carcinoma,RCC)786-O 细胞与 DC 融合,对融合瘤苗体外生长曲线、形态特征、共刺激分子表达水平、刺激淋巴细胞增殖能力和致瘤性进行检测。结果:用 PEG 法可有效诱导细胞融合,融合瘤苗体外增殖能力弱,在联合免疫缺陷小鼠(Severe combined immunodeficiency disease mice,SCID mice)体内不生成肿瘤,但表达共刺激分子 CD86,HLA-DR 水平显著增强,刺激淋巴细胞增殖能力明显高于亲代 DC 细胞,差异具有显著性($P<0.05$)。结论:肾癌 786-O-DC 融合瘤苗具有体内不成瘤特性和强大的刺激淋巴细胞增殖能力,是一种有效的肿瘤免疫治疗策略。

【关键词】树突状细胞;瘤苗;细胞融合;肾癌

【中国图书分类法分类号】R730.51 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-19

Preparation and biological characteristics of renal cell carcinoma-dendritic cell fusion vaccine

HU Zhi, et al

(*Department of Urinary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare renal cell carcinoma-dendritic cell fusion vaccines, and observe the biological characteristics of the fusion cells, to provide theoretical basis and experimental data for further research of DC based cancer vaccines. *Methods*: The renal cell carcinoma and dendritic cells were fused by using polyethylene glycol (PEG). The growth curve of fusion cells, morphological characteristics, expression of costimulation molecules, abilities to amplify T lymphocytes and grow into new tumors were detected. *Results*: Renal cell carcinoma and dendritic cells could be fused effectively by PEG. The fusion cells had weak proliferation abilities and were unable to grow into new tumors in immunol-deficiency animals, but the costimulation molecules expression such as CD86 and HLA-DR and the abilities to irritate the proliferation of T lymphocytes were remarkably increased than that of parental control groups ($P<0.05$). *Conclusions*: Renal cell carcinoma-dendritic cell fusion vaccine keeps strong abilities to amplify T lymphocytes while is unable to grow into new tumors in mice with severe combined immunodeficiency disease (SCID), which represent a promising immunotherapeutic strategy for inducing antitumor immunity.

【Key words】 Dendritic cell; Cancer vaccine; Cell fusion; Renal cell carcinoma

DC 是目前已知功能最为强大的抗原提呈细胞,人们一直致力于用不同的方法致敏和修饰 DC,使其更有效地激活在抗肿瘤免疫中起主导作用的 T 淋巴细胞,从而诱导机体抗肿瘤免疫[1]。RCC 是一种免疫原性极强的肿瘤,在基于 DC 的肿瘤生物治疗中有独特优势。本实验我们应用肾癌与健康人来源 DC 通过 PEG 诱导融合制备肾癌-DC 融合瘤苗,探讨融合瘤苗表面分子的表达水平、刺激 T 淋巴细胞增殖能力和在免疫缺陷鼠体内应用的致瘤性,为融合瘤苗的后续研究和应用提供理论基础及实验依据。

作者介绍:胡 志(1980-),男,硕士,研究方向:泌尿男生殖系肿瘤。

通讯作者:胡自力,男,主任医师,E-mail:huzili6767@163.com。

基金项目:重庆市卫生局资助项目(05-2-024)。

1 材料与方法

1.1 主要试剂,实验动物和细胞株

细胞因子 GM-CSF,IL-4,TNF-α,IL-2(美国 PeproTech 公司)。单抗 PE-CD86,PE-HLA-DR(美国 eBioscience 公司)。淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司)。聚乙二醇(polyethy-

维普资讯 http://www.cqvip.com

lene glycol,PEG 分子量 1000,进口分装)购于天津天泰化学品有限公司。SCID 鼠购于北京维通利华实验动物公司。肾癌 786-O 细胞株购于重庆医科大学超声研究所。

1.2 肾癌-DC 融合瘤苗制备

1.2.1 DC 体外诱导培养 按淋巴细胞分离液说明书步骤操作,采用密度梯度离心法,从健康成人外周血分离单个核细胞,加入含 20%标准胎牛血清 1640 培养液,6 孔板中静置培养 2h。1640 完全培养基轻轻洗涤 3 次,收集悬浮细胞备用,贴壁细胞用含 20%标胎 1640 培养液培养,按 GM-CSF 100ng/ml,IL-4 50ng/ml 终浓度加入细胞因子。隔天换液并添加细胞因子。第 5d 加入 TNF-α 100ng/ml,第 7d 收获悬浮 DC。

1.2.2 肾癌 786-O 细胞准备 肾癌 786-O 细胞株用含 10%标胎 1640 培养液培养,收集传代培养第 3、4d 处于对数生长期的细胞用于实验。

1.2.3 DC 与肾癌 786-O 融合 按文献操作略有改进[2]。将肾癌 786-O 细胞与培养第 7d 悬浮生长 DC 按 5∶1 比例混合,置于 50ml 离心管内。1 500r/min,离心 6min,用不含血清 1640 洗涤 2 次,离心,使沉淀尽量少含水份。轻弹管底使细胞团松散呈糊状。缓缓滴加 1ml 预热的 50%PEG 溶液(PEG 高温灭菌后用 1640 完全基配置,含 5%DMSO),边加边搅拌,1min 内加完。静置 1min 后,在第 1min 内加入 1640 完全培养液 1ml,第 2min 内 2ml,第 3min 内 3ml,逐渐加快速度,直至总液量达 40ml 终止融合反应。1 000r/min,离心 6min,弃上清。含 20%标胎的 1640 培养液重悬,调细胞密度 1×10^6 个/ml,并按 GM-CSF 100ng/ml、IL-4 50ng/ml 浓度加入细胞因子,培养。24h 后吸弃培养基,培养液洗涤 1 次,以除去悬浮细胞(主要为未融合 DC 和少许淋巴细胞),贴壁细胞用含 20%胎牛血清、相同浓度细胞因子的 1640 液继续培养,第 5d 收集悬浮融合细胞。

1.3 肾癌-DC 融合瘤苗生物学特性

1.3.1 透射电镜形态 收集融合后第 5d 悬浮生长融合细胞,PBS 洗涤,重悬后加入 1mlEP 管内。2 000r/min,离心 20min,弃上清。沿管壁轻轻加入 4℃预冷的 2.5%戊二醛溶液 600μl 固定 2h,送检,后期处理并摄片由重庆医科大学基研所电镜室完成。

1.3.2 体外生长特性 收集融合后第 5d 悬浮生长融合细胞,调密度 1×10^5 个/ml,接种于 24 孔板内,每孔 0.5ml。每天取 3 孔计数,绘制融合瘤苗生长曲线,同法绘制 786-O 肾癌细胞生长曲线。

1.3.3 细胞表面分子表达 分别收集悬浮生长 DC-786-O 融合细胞、亲代 DC、亲代肿瘤细胞悬液各 3 支,PBS 洗 2 次,50μl PBS 重悬于 1.5ml EP 管,分别加入 4μl PE-CD86,PE-HLA-DR,1 支不加作空白对照。4℃避光孵育 40min,含 1%胎牛血清的 PBS 洗 2 次,流式细胞仪分析。

1.3.4 刺激淋巴细胞增殖能力 取同种异体健康人外周血分离单个核细胞,培养 2h 后收集悬浮细胞,过尼龙毛柱,关闭阀门置孵箱内孵育 1h,1640 完全培养液冲洗毛柱 2 次,所得液即富含 T 淋巴细胞,每孔 1×10^5 个细胞数加于 96 孔板内并加入 IL-2 40ng/ml 作为反应细胞。取 DC-786-O 融合细胞、与肾癌 786-O 混合培养 DC、诱导培养 DC 3 种细胞作为刺激细胞。分别与 T 细胞按 1∶1,1∶10 和 1∶100 比例加入 96 孔板中设为反应组,另设单纯刺激细胞对照组、单纯 T 细胞对照组和培养液空白对照组,每组 5 复孔。培养 72h 后,加 0.5% MTT 20μl/孔,继续孵育 4h。离心,弃上清,每孔加 DMSO 150μl,震荡 10min,酶标仪 570nm 波长处测吸光度 OD 值。

1.3.5 致瘤性检测 取 4~6 周龄,雌雄不拘,无免疫渗漏(IgG<5μg/ml)SCID 鼠 10 只,随机分成 A、B 2 组。于 A 组背部皮下注射肾癌 786-O 细胞 1×10^7 个/只、B 组注射相同数量肾癌—DC 融合瘤苗,SPF 级环境饲养。观察有无肿瘤生长,60d 后处死全部 SCID 鼠,观察体内成瘤情况。

1.4 统计方法

所得数据取平均值,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 SPSS12.0 软件进行统计分析。均数的比较采用 t 检验和单因素方差分析。确定 $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结 果

2.1 透射电镜形态

融合后第 5d 透射电镜(图 1),两细胞相互融合,其中肾癌 786-O 细胞胞膜平滑,DC 胞膜较多突起,胞核大,两细胞间部分胞质胞膜已融合,融合部分胞膜完整连续,可见 1 个提示胞膜受损的髓样结构,核靠拢,尚未发现核融合征象。

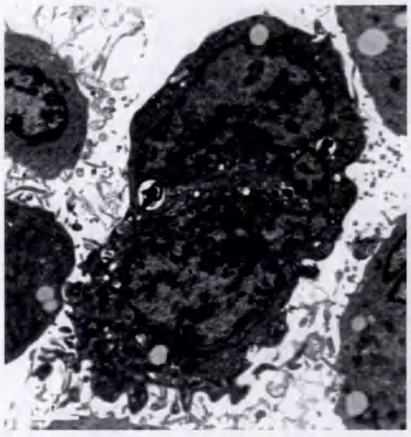


图 1 融合瘤苗透射电镜(×7 000)

2.2 体外生长特性观察

融合细胞始呈圆形或类圆形贴壁,培养 5d 后大部分悬浮或半悬浮生长。悬浮融合细胞体外生长曲线平缓(图 2),无明显细胞倍增期。肾癌 786-O 细胞经短暂潜伏期后随即进入快速增长期,细胞数显著增加。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同比例 3 种刺激细胞诱导 T 淋巴细胞增殖能力(OD 值)

组别	刺激细胞:T 淋巴细胞		
	1∶1	1∶10	1∶100
DC-786-O	2.155 6 ± 0.035 0	1.805 8 ± 0.020 1	1.063 4 ± 0.032 9
DC+786-O	1.492 6 ± 0.026 1	1.238 4 ± 0.030 9	0.885 2 ± 0.034 5
DC	1.480 4 ± 0.030 9	1.211 4 ± 0.023 3	0.871 2 ± 0.041 2

注:DC-786-O 表示融合细胞,DC+786-O 表示与 786-O 混合培养的 DC。

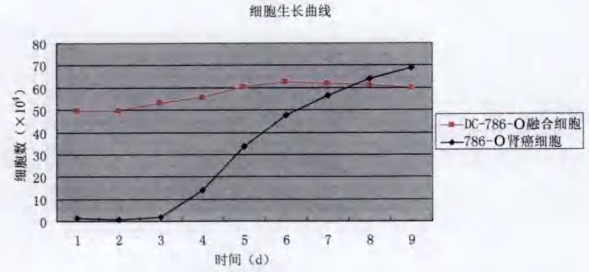


图 2 融合细胞生长曲线

2.3 表面分子表达

流式细胞仪检测 DC 表达 CD86,HLA-DR 分别为 63.82%和 66.85%;肾癌 786-O 几乎不表达该类分子;DC-786-O 融合细胞中二者表达率则分别为 80.65%和 80.61%,明显高于单纯 DC 表达水平。

2.4 刺激淋巴细胞增殖能力

结果如表 1 示:融合细胞(DC-786-O)、混合培养 DC(DC+786-O)和 DC 均能刺激同种异体 T 淋巴细胞明显增殖,与 T 细胞对照孔相比差异显著($P<0.05$);融合细胞刺激 T 细胞增殖能力与混合培养 DC 及单纯亲代 DC 相比差异显著($P<0.05$);刺激细胞与反应细胞比例在 1∶1 混合时刺激 T 细胞增殖的能力最大,与 1∶10 及 1∶100 比例相比差异均有显著性($P<0.05$)。

2.5 致瘤性观察

A 组注射 786-O 肾癌细胞 SCID 小鼠第 10d 时即可在皮下扪及肿瘤小结节,随后开始出现食欲下降、对外界反应差、运动少、体重减轻现象。结节逐渐增大并突出皮面,部分表面破溃,在 1 个月内先后死亡。解剖发现肿瘤结节基底宽厚,与周围组织粘连紧密,有少许血性腹水。B 组注射肾癌—DC 融合瘤苗组 SCID 小鼠皮下均未扪及结节, 于第 60d 牺牲该组小鼠,解剖发现注射部位皮下光滑,与背部肌肉游离无粘连。腹腔内脏器未见明显异常。

3 讨 论

目前研究表明肿瘤细胞在正常机体内发生免疫逃逸,免于被宿主免疫系统识别和杀灭,主要与其生物特点有关:(1)主要组织相容性复合物(MHC)分子表达异常;(2)缺乏激活宿主免疫系统所必须的第二信号或粘附分子;(3)抗原性弱;(4)可产生影响宿主免疫系统的多种细胞因子[3]。DC 是目前已知功能最为强大的抗原提呈细胞, 高表达 MHC 和 CD80、CD86 等共刺激分子,并能唯一激活初始型 T 细胞[4]。融合瘤苗的制备就是试图通过对肿瘤细胞的人为改造,设想通过肿瘤细胞与 DC 的融合,一方面直接提供肿瘤全部抗原,通过 DC 表面高水平的 MHC 分子提取丰富的抗原肽[5];另外,利用 DC 表面高表达的共刺激分子提供第二信号,充分活化 T 细胞,从而诱导有效的抗肿瘤免疫[6]。

本实验我们用 PEG 诱导细胞融合制备融合瘤苗,参照文献方法略有改进[2],将肾癌 786-O 细胞与 DC 的比例设为 5∶1。因 DC 产量有限而 786-O 细胞较易获得,增加 786-O 细胞比例可以相应增加 DC与 786-O 接触的机率,提高融合率,可最高效率利用 DC 细胞;且融合细胞第 5d 即呈悬浮或半悬浮状,未融合 786-O 细胞始终贴壁生长,较易从中去除,相对增加 786-O 细胞比例并不会降低融合细胞纯度。

DC-786-O 融合细胞呈圆形或类圆形,初期贴壁,培养 5d 后大部分悬浮或半悬浮生长,体外培养增殖较慢,生长曲线平缓,无明显细胞倍增期,均与 DC 体外生长特性类似;DC-786-O 融合瘤苗在 SCID 小鼠体内不形成肿瘤,不具成瘤活性,表明融合瘤苗主要继承了亲代 DC 的生物学特性,融合后亲代肾癌 786-O 细胞的致瘤性大大减弱。初步反应出瘤苗体内应用的安全性。细胞功能方面,DC 表面较高表达 CD86,HLA-DR 等共刺激分子,786-O 几乎不表达, 而 DC-786-O 融合瘤苗表达则显著高于单纯 DC 表达水平,达 80.65%和 80.61%。显示融合瘤苗有较 DC 更强的激活 T 细胞的潜能。混合淋巴

(下转第 783 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

内接种小鼠 8 周后发现小鼠血清 IgE 水平在疫苗接种后 8 周显著升高,在疫苗免疫和原头节攻击后 18 周显著降低,与上述结果不同。推测升高的 IgE 可通过激活小鼠体内的肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和血小板,释放主要碱性蛋白、阳离子蛋白和过氧化氢等生物活性物质,发挥非特异性杀伤 Em 原头节的效应;IgE 还可通过抗体依赖的补体介导的细胞毒作用,发挥特异性杀伤 Em 原头节的效应,但 IgE 可通过肥大细胞介导的 I 型变态反应对宿主组织造成损伤作用。

参 考 文 献

[1] 王昌源,陈雅棠,余登高,等.多房棘球绦虫 ELP 重组蛋白疫苗免疫 BALB/c 小鼠引起的免疫应答[J].免疫学杂志,2003;19(4):285-288,292.

[2] Siles-Lucas M,Felleisen RS,Hemphill A,et al. Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in *Echinococcus multiloculris*[J]. Mol Biochem Parasitol,1998;91(2):281-293.

[3] Cirillo JD,Stover CK,Bloom BR,et al. Bacterial vaccine vectors and *Bacillus calmette-Guerin*[J]. Clin Infect Dis,1995;20(4):1001-1009.

[4] Matsuo K,Yamaguchi R,Yamazaki A,et al. Establishment of a foreign antigen secretion system in Mycobacteria[J]. Infect Immun,1990;58(12):4049-4054.

[5] 李文桂,王 鸿,朱佑明.多房棘球绦虫重组 BCG-Em Ⅱ/3 疫苗构建及其表达效率[J]. 中国地方病学杂志,2006;25(5):490-493.

[6] 李文桂,王 鸿,朱佑明. 多房棘球绦虫 pBCG-Em14-3-3 重组质粒的构建及其在 BCG 中的表达[J]. 中国人兽共患病学报,2006;22(12):1125-1128.

[7] 王 鸿,李文桂.多房棘球绦虫 Em14-3-3 抗原编码基因在 BCG 中的表达[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(3):299-301.

[8] Reuben JM,Tanner CE,Rau ME. Immunoprophylaxis with BCG of experimental Echinococcus multilocularis infections[J]. Infect Immun,1978;21(1):135-139.

[9] Reuben JM,Tanner CE,Portelance V. Protection of cotton rats against experimental Echinococcus multilocularis infections with BCG cell walls[J]. Infect Immun,1979;23(3):582-586.

[10] Wen H,Craig PS. Immunoglobulin G,subclasses in human cystic and alveolar Echinococcosis[J]. Am J Trop Med Hyg,1994;51(6):741-748.

[11] Gottstein B,Wunderlin E,Tanner I. Echinococcus multilocularis:parasite-specific humoral and cellular immune response subsets in mouse strains susceptible(AKR,C57BL/6j) or resistant(C57B1/10) to secondary alveolar echinococcosis[J]. Clin Exp Immunol,1994;96(2):245-252.

[12] Gottstein B,Muller N,Cryz SJJ,et al. Humoral and cellular immune response in mice and dogs induced by a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen produced by a Salmonella typhimurium vaccine strain[J]. Parasite Immunol,1990;12(2):163-174.

[13] Vuitton DA,Bresson-Hadni S,Lenys D,et al. IgE-dependent humoral immune response in *Echinococcus multilocularis* infection:circulating and basophil-bound specific IgE against echinococcus antigens with alveolar echinococcosis[J]. Clin Exp Immunol,1988;71(2):247-252.

[14] 李富荣,石佑恩,史大中,等.阿苯哒唑治疗泡球蚴病患者血清中 Th1/Th2 型细胞因子的变化及临床意义[J]. 中国人兽共患病杂志,2003;19(2):71-73.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 779 页)

细胞反应显示融合细胞刺激 T 细胞增殖能力明显高于仅与肾癌 786-O 细胞混合培养的 DC 组和单纯 DC 组,进一步证明了融合细胞强大的刺激 T 淋巴细胞增殖能力。融合瘤苗高表达共刺激分子、强烈刺激 T 细胞增殖能力,和在联合免疫缺陷鼠体内不成瘤的这些特点,使其在基于 DC 的抗肿瘤免疫策略中具有重要的研究价值。

参 考 文 献

[1] Takeda A,Homma S,Okamoto T,et al.Immature dendritic cell/tumor cell fusions induce potent antitumour immunity[J]. Eur J Clin Invest,2003;33(10):897-904.

[2] Koido S,Hara E,Homma S,et al. Dendritic cells fused with allogeneic colorectal cancer cell line present multiple colorectal cancer-specific antigens and induce antitumor immunity against autologous tumor cells[J]. Clin Cancer Res,2005;11(21):7891-7900.

[3] You Z,Hester J,Rollins L,et al. A retrogen strategy for presentation of an intracellular tumor antigen as an exogenous antigen by dendritic cells induces potent antitumor T helper and CTL responses[J]. Cancer Res,2001;61(1):197-205.

[4] Groux H,Fournier N,Cottrez F. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells[J]. Semin Immunol,2004;16(2):99-106.

[5] Koido S,Ohana M,Liu C,et al. Dendritic cells fused with human cancer cells:morphology, antigen expression, and T cell stimulation[J]. Clin Immunol,2004;113(3):261-269.

[6] Kim GY,Chae HJ,Kim KH,et al. Dendritic cell-tumor fusion vaccine prevents tumor growth in vivo[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2007;71(1):215-221.

(责任编辑:关蕴良)