维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)03-0361-05

树突状细胞与胃癌细胞融合诱导抗肿瘤免疫反应的体外实验研究

宁敏曼，王　立，叶序卷

（重庆医科大学附属第一医院消化内科，重庆　400016）

【摘　要】目的：利用杂交瘤技术将脐血来源 DCs 和 SGC7901 胃癌细胞融合，以研究融合细胞的生物学特性及其抗肿瘤的功能。方法：利用聚乙二醇（PEG）化学融合技术将 DCs 和胃癌 SGC7901 细胞融合，SP 免疫组化方法鉴定细胞表型；MTT 法测定融合细胞刺激同源异体 T 淋巴细胞增殖效应；细胞毒性试验检测融合细胞诱导的细胞毒 T 淋巴细胞（CTL）对 SGC7901 的杀伤作用。结果：DCs 和 SGC7901 胃癌细胞在 PEG 的作用下成功融合，其融合细胞即表达肿瘤标记物 CEA，又表达 DCs 标记物 HLA-DR，融合细胞刺激 T 淋巴细胞增殖能力显著高于 DCs、DCs + SGC7901 及 SGC7901。融合细胞活化的 CTL 对胃癌细胞杀伤率为 21.4% ± 0.0165%，明显高于 DCs 组（16.3% ± 0.0015%）、混合细胞（15.3% ± 0.0044%）及胃癌组（11.2% ± 0.0156%）。结论：脐血来源的 DCs 在 PEG 作用下能成功与胃癌细胞融合，且融合细胞可有效诱导 T 淋巴细胞产生强大抗肿瘤免疫作用。

【关键词】树突状细胞；胃癌；细胞融合

【中国图书分类法分类号】R735.2　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005-12-07

Research on the experiment of eliciting specific antitumor immunity by fusion of dendritic cell with gastric cancer cells in vitro

NING Minman, et al

(*Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: By hybrid technology, to study the biological characteristics and antitumor function of gastric cancer-dendritic fusion cells through the fusion of dendritic cells from cord blood with gastric cancer cells SGC7901.*Method*: DCs from cord blood were fused with SGC7901 in the presence of 50% polyethylene glycol. The morphology and phenotype of DCs,SGC7901 and DCs/SGC7901 were respectively observed by SP immunocytechemical staining. The ability of DCs/SGC7901 which stimulated proliferation of autologous T lymphocytes was assessed by MTT, and the kill rate of cytotoxic T lymphocytes (CTL) to SGC7901 induced by FCs (fusion cells) was evaluated through cytotoxic test. *Result*: DCs were successfully fused with SGC7901 in the presence of PEG, FCs expressed CEA and HLA-DR two phenotypes. Moreover, fusion cells had greater ability to stimulate proliferation of T lymphocytes than DCs、DCs + SGC7901,SGC7901, and the kill rate of FCs (21.4% ± 0.0165%) was greatty high than that of DCs (16.3% ± 0.0015%), DCs + SGC7901 (15.3% ± 0.0044%), SGC7901 (11.2% ± 0.0156%). *Conclusion*: DCs from cord blood can be successfully fused with SGC7901 in the presence of PEG, and FCs can effectively stimulate T lymphocytes to elicit antitumor immunity effect.

【Key words】Dendritic cells; Gastric cancer; Cell fusion

DCs是体内最强的抗原提呈细胞，能刺激幼稚 T 淋巴细胞产生强烈的抗肿瘤免疫反应。近几年以 DCs 为基础的肿瘤免疫已经取得了瞩目的成就[1]。人们应用肿瘤抗原肽、肿瘤细胞裂解产物、胞外小体以及基因修饰等多种手段修饰 DCs 制备的 DCs 疫苗，已经成功用于基础研究和临床试验[2,3]。但是由于胃癌细胞缺乏特异性较强的表面抗原，限制了肿瘤免疫治疗的开展。本研究将来源广泛、且 HLA 限制性低的脐血来源的 DCs 和胃癌系 SGC7901 细胞融合，以期探讨其抗胃癌细胞的特异性细胞毒性作用。

作者介绍：宁敏曼（1978-　），女，硕士，
主要研究方向：消化道肿瘤免疫治疗。

1　材料和方法

1.1　实验材料

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.1 新鲜足月健康婴儿脐带血 重庆医科大学附属第一医院妇产科提供。

1.1.2 细胞系 胃癌 SGC7901 由重庆医科大学病理科提供。

1.1.3 试验试剂 RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;聚乙二醇(PEG-1000)购自上海生物技术服务有限公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Sigma 公司;重组人粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)购自美国 PEPROTECH 公司;重组人白介素-4(rhIL-4)购自美国 PEPROTECH 公司;重组人白介素-2(rhIL-2)购自美国 PEPROTECH 公司;鼠抗人 CEA、HLA-DR 购自北京中山公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脐血 DCs 体外分离扩增 参照 Baldev Vasir[4]的方法加以改进,无菌取足月健康脐带血抗凝(25u/ml),PBS(pH 7.2~7.4)等比例稀释,吸取淋巴细胞分离液(每 10ml 稀释血加 5ml 分离液)到 15ml 离心管中,稀释后脐血沿离心管壁缓慢加到淋巴细胞分离液上,以 2000r/min 离心 20min,吸取白膜层单核细胞,单个核细胞以 PBS 离心洗涤 2 次(1000r/min,5min),弃上清夜,用含 10%胎牛血清 RPMI-1640 完全培养基重悬于 6 孔培养板内,在 37℃,5% CO_2 孵箱贴壁 2 h,收集非贴壁细胞备用。在贴壁细胞内加入细胞因子 rhGM-CSF(100ng/ml)和 rhIL-4(50ng/ml),在培养第 5 天加入肿瘤坏死因子 TNF-α (20ng/ml),3 天半量换液及细胞因子,第 7~8 天收集悬浮细胞。

1.2.2 胃癌细胞培养 胃癌 SGC7901 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液内。

1.2.3 细胞融合 按照 Gong 等[5]的方法,选择第 7 天生长良好的 DCs 细胞 1×10^6 1ml 和灭活胃癌细胞 (以丝裂霉素 C 30ug/ml 37℃孵育 45min 灭活) 2×10^5 1ml (5∶1) 混匀,1000r/min离心 5min,弃上清夜,使沉淀混匀,外观如糊状,缓慢加入 1ml PEG (50%37℃预温的),1min 内滴完,边加边摇,在 37℃水浴中继续摇 1min,再在室温下继续摇 1min,在 5min 内逐滴加入预温的无血清 RPMI-1640 培养液 20ml,边加边摇,通过稀释终止 PEG 作用,放入培养箱内,37℃,5% CO2 孵育 1~2h,1000r/min 离心 5min,弃上清,融合细胞重悬于含 10%的 FCS 的 RPMI-1640 培养液中,加入细胞因子 rhGM-CSF(100ng/ml)和 rhIL-4(50ng/ml),置于 24 孔培养板,在 37℃,5% CO_2 孵箱培养过夜,次日将非贴壁细胞去掉,收集第 3~4 天半贴壁细胞。

1.2.4 SP 免疫组化对细胞表型的测定 将 DCs、SGC7901 细胞、DCs/SGC7901 融合细胞涂片,再按照说明书操作,光镜下观察结果,呈棕黄色为阳性反应。

1.2.5 混合淋巴细胞反应 取人脐血,以尼龙毛柱法获得同源 T 淋巴细胞 (效应细胞)。DCs/SGC7901 融合细胞、DCs、SGC-7901、以及等量 DCs 和 SGC-7901 的混合细胞为刺激细胞(预先以丝裂霉素 C(25ug/ml)37℃孵育 45min 灭活),每组刺激细胞分别以 5×10^5 细胞/孔、1×10^6 细胞/孔、2×10^6 细胞/孔加入 96 孔平底培养板,每组设三个复孔,每孔再加同种异体 T 细胞 1×10^5,每孔终体积 200ul,37℃、5% CO_2 孵箱培养 72h,在培养最后 4h,加入 50μl/孔 MTT,离心培养板,弃上清液,每孔加入 150μl DMSO,用酶联免疫检测仪,在波长为 570nm 测定各孔光密度值(OD 值)。

1.2.6 T 淋巴细胞的活化以及细胞毒活性测定

分组:一组为 DCs/SGC7901 融合细胞;二组为 DCs;三组为等量 DCs 和胃癌细胞混合细胞;四组为 SGC7901。将 3~4 天的 DCs/SGC7901、SGC7901、7~9 天脐血 DCs 分别收集。如前 1.2.1 方法收集非粘附 PBMC。将四组细胞分别与 PBMC 按 1∶10 的比例混合,悬于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基中,加入 IL-2 20μl/ml,37℃、5%CO2 孵箱培养,每组在第 8~10 天收获悬浮细胞 (效应细胞)。胃癌 SGC-7901 作为靶细胞,效靶比 10∶1,每组设三个复孔。并设置靶细胞和效应细胞对照孔。培养 72h,在最后 4h 加入 MTT 50ul/孔,离心培养板,弃上清液,加入 150μl/孔 DMSO,用酶联免疫检测仪,在波长为 570nm 下,测定各孔光密度值(OD 值)。计算其杀伤率,其公式为:细胞毒活性(杀伤率)=[靶细胞对照组 OD 值-(反应孔 OD 值-效应细胞对照孔 OD 值)]/靶细胞对照孔 OD 值×100%[6]。

1.2.7 统计学处理 结果采用单向方差分析及两样本均数的比较,应用 SAS8.0 统计软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 脐血 DCs 和融合细胞形态

脐血来源 DCs 在培养第 2~3 天聚集生长,悬浮半贴壁,第 3~5 天细胞分散生长,呈圆形、椭圆或不规则形,可以看到树突状突起,突起单个或多个,短小,有树突状分支,第 6~8 天突起变得细长,密集(见图 1)。

融合细胞呈半贴壁生长,细胞形态比较均一,圆形、椭圆或不规则形,倒置显微镜下可以看到两个或多个细胞膜接触融合,也可见体积较大细胞,其内含有两个核,部分还可以见到已经融合的体积比较大的核(见图 2)。在显微镜下发现融合细胞随着生存期的延长,生物学特性无明显改变,可惜由于观察时间有限,没有对融合细胞的生存时间做进一步分析。

2.2 DCs、胃癌细胞、融合细胞的表型

SP 免疫细胞化学染色显示分离的脐血来源 DCs 的 HLA-DR 表达呈阳性,棕黄色阳性产物主要分布于细胞质和细胞膜,而 CEA 表达呈阴性(见图 3)。胃癌 SGC7901 细胞的 HLA-DR 反应呈阴性,仅

维普资讯 http://www.cqvip.com

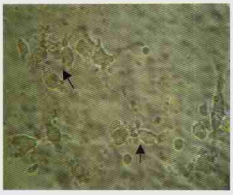


图 1 光镜下 DCs 细胞，箭头所指为典型 DCs 形态（×200 倍）

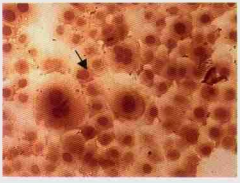


图 4 SGC-7901 细胞的 CEA 分子表达，呈棕色反应为阳性产物，如箭头所指，免疫组化 DAB 染色(×200)



图 2 光镜下 DCs 和胃癌融合细胞，箭头所指为典型融合细胞形态（×200 倍）



图 5 DCs-胃癌融合细胞的 HLA-DR 分子阳性表达，呈棕色反应为阳性产物，箭头所指为两个 DCs 和胃癌融合细胞。免疫组化 DAB 染色(×200)。

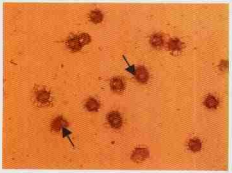


图 3 DCs 的 HLA-DR 分子阳性表达，呈棕色反应为阳性产物，如箭头所指，免疫组化 DAB 染色(×200)

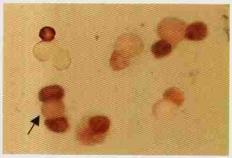


图 6 DCs-胃癌融合细胞 CEA 分子阳性表达，呈棕色反应为阳性产物，如箭头所指两个胃癌和一个 DCs 的融合细胞。免疫组化 DAB 染色(×200)。

能见到淡绿色浅染的细胞核，而 CEA 表达呈阳性，棕黄色阳性产物主要分布于细胞质和细胞膜（见图 4）。DCs/SGC7901 融合细胞的细胞膜和胞质内 HLA-DR，CEA 均呈阳性反应，细胞核呈阴性（见图 5、图 6）。

2.3 混合淋巴细胞反应

结果如下图，DCs/SGC7901 融合细胞组有比其它三组更强的刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖能力（$P<0.05$），而混合细胞和 DCs 组也有刺激 T 淋巴细胞增殖能力，但两组之间无明显差异（$P>0.05$）。且各组随着刺激细胞与效应细胞的比例增加其刺激 T 淋巴细胞的增殖效应也升高（见表 1）。

2.4 特异性抗胃癌 CTL 细胞毒效应

将脐血 DCs、融合细胞、DCs 和胃癌细胞混合细胞、胃癌细胞分别于同种异体的 T 淋巴细胞共培养，获得的 CTL 细胞对胃癌细胞进行 MTT 细胞毒试验，结果见表 2，根据 1.2.6 公式得出融合细胞组的杀伤率平均为 $21.4\pm0.0165\%$，明显高于 DCs 组

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 各组细胞刺激 T 淋巴细胞增殖效应情况($\bar{x}\pm s$)

刺激细胞	吸光度值(OD 值)		
	5∶1	10∶1	20∶1
DCs/SGC7901 融合细胞组	0.51 ± 0.0013	0.69 ± 0.0036	0.88 ± 0.0057
DCs细胞组	0.39 ± 0.0021	0.52 ± 0.0043	0.64 ± 0.0030
DCs + SGC7901 混合细胞组	0.29 ± 0.0028	0.4 ± 0.0079	0.49 ± 0.0036
SGC7901 细胞组	0.103 ± 0.0004	0.16 ± 0.0009	0.22 ± 0.0014

注：融合细胞组和 DCs 组比较有差异 $P<0.05$，与混合细胞组比较也有差异 $P<0.01$，而 DCs 组和混合细胞组比较无统计学意义 $P>0.05$。

(16.3% ± 0.0015%)、混合细胞(15.3% ± 0.0044%)及胃癌组(11.2% ± 0.0156%)。融合细胞和其它组比较有差异 P 值均小于 0.05，具有统计学意义。

表 2 各组 CTL 细胞对 SCG7901 细胞毒效应($\bar{x}\pm s$)

效应细胞组	靶效比1:10 时吸光光度值(OD值)		
融合细胞组	1.26	1.263	1.27
DCs细胞组	1.283	1.286	1.285
DCs/SGC7901混合细胞组	1.29	1.291	1.286
SGC7901 细胞组	1.31	1.30	1.305
靶细胞对照组	0.415	0.39	0.395
效应细胞对照组	0.95	0.94	0.96

3 讨 论

机体的抗肿瘤免疫是以 CTL 为主的细胞免疫反应，而 CTL 的活化需要抗原提呈细胞提供多信号的抗原刺激，而肿瘤患者虽然肿瘤细胞本身包含有多种肿瘤抗原，但由于其免疫原性低且自身具有抗原调变能力，MHC 分子表达异常和缺乏共刺激信号，使 T 细胞识别受阻自身肿瘤抗原不能被有效提呈，DCs 是体内功能最强的抗原提呈细胞，在抗原的识别、加工、提呈及 T 细胞的致敏、激活和扩增中处于主导地位。DCs 独特的生物学特性正好弥补了这一缺陷。实验已经证明，以肿瘤抗原或抗原肽脉冲 DCs 或转染编码肿瘤抗原的基因，能激活 T 细胞反应并诱发特异的抗肿瘤免疫。但是人类肿瘤的进展是由多个基因变化累积的结果，其肿瘤抗原在这过程当中发生了结构的变化或停止表达，而且机体对肿瘤抗原还存在无性繁殖和免疫耐受，除了已知的肿瘤抗原外，还有一些未确定的肿瘤抗原，甚至个别肿瘤病人由于基因突变，可能存在有其独有的肿瘤抗原。因此，肿瘤抗原的单一性限制了 CTL 作用，从而导致肿瘤免疫逃逸现象的发生。针对这一因素，以肿瘤为基础的疫苗通过诱发抗肿瘤的多价免疫反应而呈现出特殊的优势[7]。随着 70 年代发展起来的融合技术，1997 年 Duke 的研究小组首先开展了 DCs 与肿瘤细胞融合的研究[8]，随着融合技术的发展，以 DCs 为基础的融合疫苗取得了瞩目的成就。在动物和人类前期临床试验以及一期临床试验中，融合细胞表现出强大的刺激肿瘤特异免疫反应的能力，并且副作用小，这在多种恶性肿瘤中已经得到证实，如乳腺癌、肾癌和黑色素瘤等恶性肿瘤[9,10]。但是在胃癌方面却少有报道。

由于胃癌细胞的免疫原性很弱，而且胃癌还没有特异性很强的肿瘤蛋白抗原，所以 DCs/ 胃癌融合疫苗在胃癌免疫治疗方面应该有很大潜能。Homma[11]首先展开了这方面的研究，他将 DC- 胃癌细胞融合疫苗治疗 1 例 75 岁进展型胃癌患者，该患者的临床症状得到很大程度的改善，尽管在实验的第 5 个月症状复发，但也表现出融合疫苗在胃癌免疫治疗的潜力。遗憾的是 Homma 只选择了一例病人，因此也没有得到更多关于融合疫苗抗肿瘤免疫的数据。近来 Matsumoto[12]在体外实验中也进一步证实融合细胞具有抗原提呈功能以及杀伤肿瘤的作用。

本实验将来源丰富，HLA 限制性低的脐血 DCs 和胃癌细胞融合，在体外研究其生物学特性以及抗肿瘤免疫效应，以期为融合疫苗的临床应用奠定理论基础。结果在光镜下发现脐血来源的 DCs，表现出典型的成熟树突状形态，在 PEG 作用下成功与胃癌细胞融合，且融合细胞能表达 HLA-DR 和 CEA 两种标记，显示出 DCs 和胃癌的双重特性，即有 DCs 的抗原提呈功能，而且还可将已知和未知的胃癌肿瘤抗原通过 MHC-I 和 MHC-II 两种途径被

维普资讯 http://www.cqvip.com

DCs提呈，刺激 CD_8^+ 和 CD_4^+ 两种受体细胞，从而提高抗肿瘤的细胞免疫效应，与装载肿瘤抗原肽的疫苗相比，融合细胞可以提供比较持久和稳定的肿瘤相关抗原。本实验提示，在混合淋巴细胞反应及细胞毒试验中，融合细胞具有一些特殊的优势，DCs/SGC7901 刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖能力显著高于 DCs、DCs + SGC7901 及 SGC7901。并且随着刺激细胞与效应细胞的比例增加而升高。在细胞毒试验中，DCs/SGC-7901 诱导产生的 CTL 对胃癌细胞的杀伤效应为 21.4% ± 0.0165%，显著高出单纯 DCs（163% ± 00015%）和 SGC7901（112% ± 00156%）的刺激效能。本实验结果与 Matsumoto[12]报道的结果相似，同样显示出融合细胞具有强大的抗肿瘤免疫效应。体外试验的成功为融合疫苗在胃癌肿瘤免疫治疗的体内试验和临床应用研究提供了理论依据，有望通过进一步动物和临床应用研究找到一条治疗和预防胃癌的新途径，提高患者的生活质量和生存率。

在本实验采用的融合方法是 PEG 融合法，其和电融合法在功能上、生物学上有无差异；以及融合细胞的纯化分选，融合效率，在临床方面的具体应用，毒副作用以及剂量等诸多问题还有待进一步研究[13]。

参 考 文 献

[1] Nestle FO, Tun Kyi A, Gilliet M, et al. Vaccination therapy of malignant melanoma [J]. Ther Umsch, 1999;56(6):334-337.

[2] Milazzo C, Reichardt V L, Muller M, et al. Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA[J]. Blood, 2003;101(3):977-982.

[3] Kono K, Takahashi A[J], Sugai H, et al. Dendritic cells pulsed with HER-2/neu-derived peptides can induce specific T-cell responses in patients with gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2002;8(11):3394-3400.

[4] Baldev Vasir, Virginia Borges. fusion of dendritic cells with multiple myeloma cells results in maturation and enhanced antigen presentation [J]. British Journal of Haematology, 2005;129(5): 687-700.

[5] Homma S, Toda G, Gong J, et al . Preventive antitumor activity against hepatocellular carcinoma (HCC) induced by immunization with fusions of dendritic cells and HCC cells in mice[j]. J Gastroenterol, 2001;36(11):764-771.

[6] 盛立霞，邱国强，谢晓宝，等. 两种白血病细胞抗原负载 DC 的体外诱导特异性 CTL 应答的比较[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2005;21(2):205-209.

[7] Homma S, Kikuchi T, Ishiji N, et a1. Cancer immunotherapy by fusions of dendritic and tumour cells and rh-IL-12 [J]. European Journal of Clinical Investigation, 2005;35(4):279-286.

[8] Gong J, Chen D, Kashiwaba M, et a1. Induction of antitumor activity by with fusions of dendritic an carcinoma cells[J].Nat Med, 1997;3(5):558-561.

[9] Noopur R, Hideshima T, Davies F, et a1. Tumour cell/dendritic cell fusions as a vaccination strategy for multiple myeloma [J]. British Journal of Haematology, 2004;125(3):343.

[10] 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.

[11] Homma S, Matai K, Irie M, et al. Immunotherapy using fusions of autologous dendritic cells and tumor cells showed effective clinical response in a patient with advanced gastric carcinoma [J]. J Gastroenterol, 2003;38(10):989-994.

[12] Saito H, Matsumoto S, Tsujitani S, et al. Allogeneic gastric cancer cell-dendritic cell hybrids induce tumor antigen (carcinoembryonic antigen) specific CD_8^+ T cells [J]. Journal of Clinical Oncology, 2005;23(16):2545.

[13] Lindner M, Schirrmacher V. Tumour cell dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethylen-glycol versus electro-fusion protocols[J].Eur J Clin Invest, 2002;32(3):207-217.

（上接第 360 页）

[11] Bischof P, Meisser A, Campana A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion-a review[J]. Placenta, 2000; 21(Suppl A): S550-560.

[12] Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, et al. Patterns of metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones [J]. J Clin Invest, 1994;94(3):946-953.

[13] Singer CF, Marbaix E, Kokorine I, et al. The matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression in the human endometrium is inversely regulated by interleukin-1 alpha and sex steroids [J]. Ceska-Gynekol, 2000;65(4):211-215.