维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)04-0421-04

负载宫颈癌肿瘤裂解物的树突状细胞诱导的淋巴细胞反应

贾 英,黄 裕,唐良茜

(重庆医科大学临床学院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:利用树突状细胞(dendritic cell,DC)递呈肿瘤抗原的生物学特性,观察 DC 负载宫颈肿瘤裂解物抗原后能否促进同种异体 T 淋巴细胞增殖,并且活化为细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)。方法:宫颈癌患者外周血单核细胞体外经粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白细胞介素-4(IL-4)诱导产生 DC,肿瘤裂解物和 TNF-α 共同促其成熟,与异体 T 淋巴细胞混合共育,以 MTT 法测定 T 细胞的增殖程度。结果:宫颈癌患者外周血来源 DC 无论负载肿瘤组织裂解物还是传代肿瘤细胞裂解物,均可促进异体 T 细胞大量增殖,二者间无显著差异($P<0.05$)。结论:DC 能递呈宫颈癌肿瘤抗原,诱导产生大量抗原特异性 CTL,提示负载肿瘤裂解物的 DC 具有为宫颈癌患者进行特异性免疫治疗的临床应用前景。

【关键词】宫颈肿瘤;树突状细胞;肿瘤裂解物;T 淋巴细胞

【中国图书分类法分类号】R737.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-11-20

Cervical tumor lysate-loaded dendritic cell induce the generation of lymphcyte

JIA Ying, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To make use of the characteristics of presenting and processing tumor antigen of dendritic cell to enhance generation of isotypical but xenogenous T lymphocyte. *Methods*: Autologous dendritic cells were obtained by culturing peripheral blood monocyte of patients with cervical cancer in the presence of granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) and interleukin-4(IL-4). Dendritic cells were loaded with tumor cell lysate and co-cultured with heterogenous PBMCs from patients to induce generation of tumor specific cytotoxic T cell. The generation rate was measured by MTT. *Results*: Tumor lysate-loaded DC which was isolated from peripheral blood monocyte of patients with cervical cancer could induce the generation of isotypical but xenogenous T lymphcyte. There was no significant difference between tumor tissue lysate and tumor cell strain lysate($P<0.05$). *Conclusion*: These results indicate that DC could process and present tumor lysate antigen to stimulate generation of specific immunotherapy in patients with cervical cancer.

【Key words】Cervical carcinoma; Dendritic cell; Tumor lysate; T lymphcyte

肿瘤细胞是由机体正常细胞突变而来,其表面存在可被免疫系统识别的肿瘤抗原,被机体免疫细胞识别后可产生特异性抗肿瘤免疫。DC 作为已知体内功能最强的抗原递呈细胞(antigen presenting cell,APC),能摄取、加工及递呈抗原,刺激未致敏 T 细胞增殖和活化,是启动、调控、并维持免疫应答的中心环节,在肿瘤特异性免疫应答中具有重要作用。制备 DC 肿瘤疫苗的肿瘤抗原来源主要包括肿瘤相关性抗原(tumor associated antigen, TAA)、肿瘤裂解物、酸洗脱肽细胞蛋白和凋亡的肿瘤细胞/小体、肿瘤抗原核酸修饰的 DC、疫苗 DC 与肿瘤细胞的融合体等[1]。本研究基于 DC 的这一生物学特性,旨在探讨负载人宫颈癌组织裂解物和人宫颈癌 Hela 细胞裂解物的 DC 能否促进同种异体 T 淋巴细胞的增殖和二者间有无负载差异。

1 材料和方法

1.1 研究对象和材料

外周血取自 2002 年 11 月~2003 年 7 月在重庆医科大学临床学院就诊的 12 名确诊为宫颈癌的患者,平均年龄 48 岁(33~70 岁),所有患者术前均未接受任何抗肿瘤治疗。其中 11 例鳞癌,1 例腺癌。人宫颈癌 Hela 细胞株由重庆医科大学病理生理教研室提供。

作者介绍:贾 英(1971-),女,硕士,
主要研究方向:宫颈癌治疗。

基金项目:重庆市卫生局科研项目(编号:01-2-024)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

主要试剂为淋巴细胞分离液（天津 TBD 公司，比重 1.077），重组人 GM－CSF、IL－4、IL－2 和 TNF－α（美国 Pepro 公司），异硫氰酸荧光素（FITC）标记鼠抗人单克隆抗体 CD1a、FITC－HLADR（Ancell 美国），FITC－CD80、FITC—IgG1（EB 美国），RPMI1640 培养液，（Hyclone），新生牛血清（杭州四季青公司），MTT，二甲亚砜，胰酶。

主要仪器为 CO_2 孵箱（Heraeus，德国），倒置显微镜（Olympas，日本），超净工作台（Air－tech），流式细胞仪（BD，美国），酶联免疫吸附仪（Bio－Ekon，意大利）。

1.2 *实验方法*

1.2.1 DC 的诱导培养及其形态、表型测定

无菌抽取宫颈癌患者静脉抗凝血 5ml，肝素钠抗凝（终浓度为 20u/ml），参照文献[2]的方法将等量无钙镁 PBS 稀释重悬，缓慢叠加于含等体积淋巴细胞分离液的离心管中，1500r/min，15min 离心。吸取白色膜状层（PBMC），PBS 离心洗涤 2 次，用完全培养基（含 10% 新生牛血清、青链霉素各 100u/ml 的 RPMI1640）重新悬浮细胞。调整细胞浓度为 6×10^6/ml，加入 20ml 培养瓶于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 3～4h。轻轻吸取非黏附细胞放入另一培养瓶，均再加入完全培养基及细胞因子 GM－CSF1000u/ml、IL－4800u/ml 继续培养。隔天加入 1ml 完全培养基和等量细胞因子，在培养第 6 天开始加入 TNF－α1000u/ml。收集第 7 天细胞，细胞总数不少于 1×10^6，PBS 洗涤离心后用 3% 戊二醛固定，梯度乙醇－丙酮脱水，经 Hu－12A 投射电镜观察并摄片。将培养细胞，PBC 洗涤重悬后，等量分为 4 管，分别加入 FITC 标记的单克隆抗体 IgG1、CD1a、HLA－DR、CD80，4℃ 孵育 30min 后，经流式细胞仪检测分析细胞表型。

1.2.2 肿瘤抗原粗提物的制备

取新鲜的，与外周血同一来源患者的宫颈癌癌组织标本，生理盐水洗涤后，剪成碎片并研磨匀浆，消毒纱布过滤，加入生理盐水重悬浮细胞，在－20℃ 低温冰箱和 37℃ 水浴箱中反复冻融 3 个循环，收集碎片和液体，放入离心管中 2000r/min，10min 后取上清，EP 管 10000r/min×20min。高速离心后取上清并微孔过滤器过滤，保存于 4℃。同时，培养 Hela 细胞（传代），收集细胞，冻融方法同上，制备细胞抗原裂解物。

1.2.3 负载抗原 DC 对 T 细胞的增殖效应

取 5ml 宫颈癌患者抗凝外周血，按上述方法分离 PBMC，在 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 3～4h 后取悬浮细胞，用含 200u/mlIL－2 的 RPMI1640 完全培养基培养 3 天，作为同种异体效应细胞。

1.2.3.1 不同浓度 DC 刺激 T 细胞增殖试验

将培养 7 天的 DC 按 2×10^2/孔、5×10^2/孔、1×10^3/孔、2×10^3/孔、4×10^3/孔加入 96 孔培养板（Corning，美国），再加入 T 细胞 2×10^4/孔为反应组。同时设置对照：5 个浓度 DC 组、TC 组、空白组，每组 3 个复孔，终体积为 200μl。放入 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 3 天后离心，小心吸弃上清，加入 MTT（5mg/ml）20μl 及无血清 RPMI1640 培养基 150μl，继续孵育 4～5h，终止培养去上清，每孔加入二甲亚砜 150μl，震荡混匀 10min，于 490nm 波长酶联免疫吸附仪上测定各孔吸光度，结果用 3 孔均值表示，比较不同浓度 DC 刺激 T 细胞增殖的情况。

1.2.3.2 负载抗原 DC 对 T 细胞的增殖作用

将肿瘤抗原、细胞抗原与 DC 共同培养 3 天后，按 1×10^3/孔加入培养板，再加入 T 细胞 2×10^4/孔作为反应组，设置对照如下：IL－2（200μ）＋T 细胞（TC）组、DC＋TC 组、抗原（Ag）＋DC 组、Ag＋TC 组、DC 组、TC 组、空白组，每组 3 个复孔，共 4 培养板。按上述实验方法，分别在 24h、48h、72h 和 96h 时进行 MTT 检测，绘制生长曲线。

1.2.4 实验数据处理

对不同时间测定的各组值进行 t 检验，采用 SPSS10.0 软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 DC 体外培养过程中形态学观察

外周血分离而来的贴壁单核细胞培养 2～3 天后开始悬浮，并聚集成团；第 4～5 天细胞体积明显增大，呈不规则形，细胞边缘有毛刺样突起；第 6～7 天细胞体积进一步增大，突起增长增多，同时也可见少数细胞中有颗粒出现，发生细胞凋亡或坏死（图 1）。

2.2 *超微结构分析*

收集培养 7 天的细胞进行投射电镜观察，可见由胞膜伸展的长短不一的突起，细胞核常染色质增多。胞质中有丰富的线粒体，溶酶体较少或几乎不可见。胞质中含有一些大小不一的小泡，具有吞噬功能（图 2、3）。

2.3 *细胞表型分析*

收集培养 5 天的细胞进行流式细胞仪分析检测，

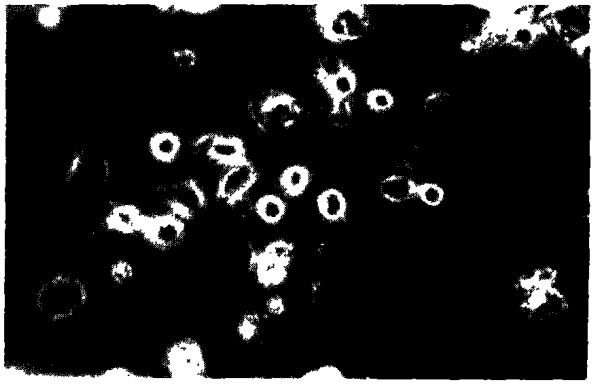


图 1 培养第 7 天倒置显微镜下 DC 形态
（倒置显微镜 ×400）

维普资讯 http://www.cqvip.com

与 DC 相关的特征性抗原 CD1a、HLA－DR、CD80 分别有 30.816%、66.182%、10.022%的表达。

2.4 负载抗原 DC 刺激 T 细胞增殖

表 1 不同比例 DC 刺激 T 细胞增殖反应

Group(DC:T)	$\bar{x} \pm s$	SI
1:100	(73.833±5.696)	5.389
1:40	(76.967±7.174)	5.722
1:20	(108.600±18.979)	9.189
1:10	(85.967±20.218)	6.700
1:5	(84.933±18.739)	6.378

注：反应组分别与 DC 组、T 细胞组行 t 检验，均 $P<0.05$

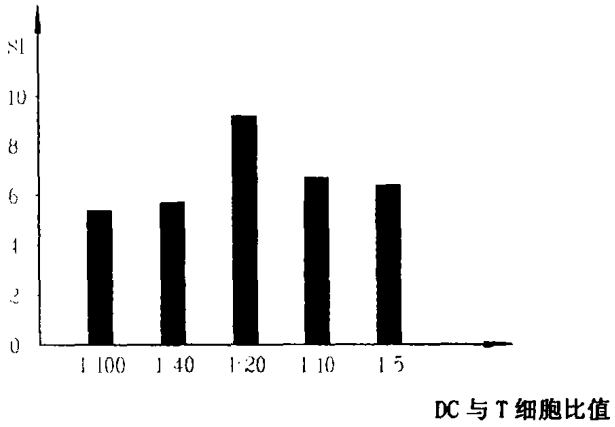


图 2 射电镜可见胞质中含有较多线粒体，较少溶酶体(×8000)



图 3 投射电镜显示 DC 表面突起，胞质内含有丰富小泡(×12 000)

对来源于宫颈癌患者外周血负载两组肿瘤裂解物的 DC，测定四个不同时间段的各组吸光度，绘制 T 细胞增殖生长曲线(图 5)，计算刺激指数 SI[SI＝(反应组 OD－T 细胞组 OD－DC 组 OD)/T 细胞组 OD](表 1，图 4)，并进行组间 t 检验。结果显示：负载肿瘤抗原裂解物的 DC 能有效的促进 T 细胞的增殖生长，少量 DC 即可刺激 T 细胞大量增殖。在 48h 和 96h 时均有较高的增殖率，与对照组中：TC 组、DC 组、Ag＋TC 组相比，均有显著差异($P<0.05$)。但是与 IL－2＋TC 组、DC＋TC 组间没有显著差异意义($P>0.05$)，两种肿瘤裂解物负载 DC 诱导的增殖反应也无明显差别($P>0.05$)。本实验最明显的刺激效应发生在 DC:T 细胞为 1:20 时(图 4)。



DC 与 T 细胞比值

图 4 DC 体外刺激的同种异体 T 细胞增殖反应

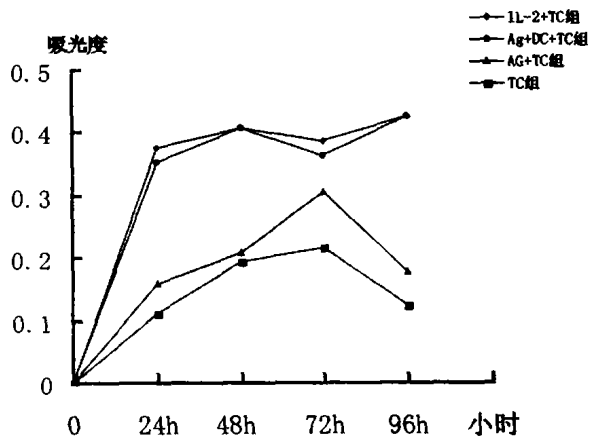


图 5 4 组刺激培养的 T 淋巴细胞增殖曲线

3 讨 论

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，近年来其发病率和病死率均有显著升高。常规手术治疗虽可有效切除肉眼可见肿瘤，但无法保证微小病灶及转移灶的完全清除。放疗和化疗作为选择性辅助治疗手段，有无法避免的毒副反应，且疗效局限。生物免疫治疗因其独特的优势成为肿瘤的第四种治疗模式，肿瘤抗原的递呈是产生有效免疫作用的关键、首要环节。DC 肿瘤疫苗治疗恶性肿瘤就是利用 DC 能高效特异递呈抗原的生物学特性，激活 T 细胞，使其活化为抗原特异的 CTL，诱导患者机体产生持久肿瘤特异性的免疫应答。

维普资讯 http://www.cqvip.com

郭建芬等[3]的研究表明,虽然大部分子宫颈癌的癌细胞表达进行抗原递呈所需的 MHC 抗原,同时表达诱导 T 细胞活化所需的协同刺激分子,肿瘤组织中也有一定量 DC 浸润,但由于抗原递呈后免疫下调,仍使宿主免疫不能排除肿瘤。研究证实子宫颈癌和高危型人乳头瘤状病毒(human papilloma virus,HPV)的关系密切,HPV16E6 及 E7 抗原已被认为是子宫颈癌的排斥抗原,通过 DC 吞噬、处理肿瘤抗原肽可有效递呈抗原,刺激 T 细胞[4]。目前确定的子宫颈癌 T 细胞相关表位尚未证实,制备纯化抗原肽的方法复杂、周期长、花费高,并且在治疗过程中还可能出现突变和丢失,因而获取足量 TAA 的难度很大。同时有研究认为肿瘤细胞冻融裂解物上清(包括原发肿瘤组织和恶性转化的肿瘤细胞株)富含热休克蛋白(heat shock protein,HSP)可以促进 DC 成熟,诱导 DC 成熟标志如 CD83、DC - LAMP、CD86、HLA - DR 和 CD40 上调表达,增强激发抗原特异性 CD4 + 、CD8 + T 细胞能力[5,6]。因而采取以新鲜宫颈癌癌组织细胞冻融裂解物作为抗原提取物负载 DC。

实验结果显示,单独宫颈癌肿瘤裂解物和负载宫颈癌肿瘤裂解物的 DC 刺激 T 细胞增殖的能力存在明显差异,虽然宫颈癌肿瘤裂解物能刺激 T 细胞增殖,但增殖数量有限;负载宫颈癌肿瘤裂解物的 DC 刺激 T 细胞的增殖能力远远强于单纯的宫颈癌肿瘤裂解物刺激。并且,宫颈癌患者外周血来源 DC 无论负载肿瘤组织裂解物还是传代肿瘤细胞裂解物,均可促进异体 T 细胞大量增殖,二者间无显著差异($P<0.05$)。表明单独宫颈癌肿瘤裂解物作为抗原不能递呈给 T 细胞,很少或不能被 T 细胞识别,仅能刺激 T 细胞非特异性反应。而肿瘤裂解物负载于 DC 时,抗原刺激向 DC 提供 3 个信号:抗原特性信号(引起 DC 摄取和加工抗原)、活化成熟信号(诱导 DC 成熟)和分化或极化(polaring)信号。DC 亦向 T 辅助细胞(Th)提供 3 个信号:抗原特性信号(递呈抗原)、协同刺激信号(诱导 Th 充分活化)和分化或极化信号,调节 Th 的分化,使表达 CD4 和 CD8 阳性的细胞增加,提高机体抗肿瘤免疫作用。

目前关于肿瘤裂解物负载 DC 诱导 CTL 治疗恶性肿瘤,还存在一些问题需要解决。通过本实验研究,我们认为宫颈癌肿瘤裂解物上清负载于 DC,不仅使 DC 具有极强的免疫原性,并且能促进 DC 的成熟,而负载抗原的 DC 可显著诱导 T 细胞增殖。这一结果为临床上可获得手术标本的宫颈癌患者开展过继性细胞免疫治疗提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] Banchereau J, Francine B, Christophe C, et al. Immunbiology of dendritic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2000; 18: 767 - 811.

[2] Carole L, An - Lin X, Douglas H, et al. Induction of human tumor - loaded dendritic cells[J]. Int J Cancer, 2001; 91: 438 - 447.

[3] 郭建芬,司履生,王一理,等. 共刺激分子在宫颈癌组织中的表达[J]. 中华医学杂志, 2000; 80(5): 342 - 345.

[4] Santin AD, Bellone S, Palmieri M, et al. Induction of tumor - s pecific cytotoxicity in tumor infiltrating lymphocytes by HPV16 and HPV18 ET - pulsed autologous dendritic cells in patients with cancer of the uterine cervix[J]. Gynecol Oncol, 2003; 89(2): 271 - 280.

[5] Somersan S, Larsson M, Fonteneau JF, et al. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells[J]. J Immunol, 2001; 167(9): 4844 - 4852.

[6] Singh - Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, et al. The heat shock protein gp96 in duces maturation of dendritic cells and down - regulation of its receptor[J]. Eur J Immunol, 2000; 30 (18): 2211 - 2215.