维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)02－0138－02

树突状细胞体外激活的 CTL 杀伤效应

李用国，梁增伟，蔡大川，兰英华，周卫平，任　红

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所，重庆　400010)

【摘　要】目的：研究树突状细胞(dendritic cell，DC)激活的肿瘤特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的特异性杀伤效应。方法：从人外周血中分离出外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell，PBMC)，在 GM－CSF 和 IL－4 的作用下培养 7 天诱导出 DC，然后 PBMC 或 DC 为刺激细胞在体外诱导出 HBsAg 特异性 CTL；在调节好一定浓度靶细胞(人肝癌细胞系 HepG2 及人肺腺癌细胞系 A549)中加入效应细胞(DC 或 PBMC)，48h 后瑞氏染色计数残存细胞数，计算杀伤率。结果：DC 激活的 CTL 对 $HepG_2$ 杀伤率为 71.6%，而 PBMC(APC，非 T 细胞)激活的 CTL 杀伤率为 43.8%，两者有显著性差异，$P<0.01$。此外，DC 诱导的肝癌细胞抗原特异性 CTL 对肺癌细胞的杀伤率仅为 23%。结论：DC 诱导的 CTL 比 PBMC 高效，而且具有较高的特异性。

【关键词】树突状细胞；外周血单个核细胞；CTL 杀伤效应

【中国图书分类法分类号】R392.12　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－07－09

CTL killing activity of tumor－specific cytotoxic T lymphocyte activated by dendritic cell

LI Yongguo, et al

(*Institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate CTL killing activity of tumor－specific cytotoxic T lymphocyte activated by dendritic cell. *Methods*: Isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from human peripheral blood and cultured 7days in medium with GM－CSF and IL－4 to get DC. Induced HBsAg－specific CTL by DC or PBMC. Added CTL into some concentration HepG2 or A549. 48 hours later, counted survival cells after Wright's staining to get killing rate. *Results*: The killing rate of CTL activated by DC to HepG2 was 71.6%; however, that of PBMC was 43.8%. There was significant difference between the two groups ($P<0.01$). Moreover, the killing rate of HBsAg－specific CTL activated by DC to A549 was only 23%. *Conclusion*: The killing ability of HBsAg－specific CTL activated by DC was stronger than that of PBMC and it was specific.

【Key words】 Dendritic cell; Peripheral blood mononuclear cell; CTL killing activity

树突状细胞是最有效、功能最强的抗原提呈细胞，在激发免疫反应中起重要作用，在抗肿瘤免疫中的作用研究也越来越受到广大学者的重视。目前，DC 瘤苗用于临床治疗的肿瘤有黑色素瘤、前列腺癌、骨肉瘤、多发性骨髓瘤和肾癌等，而 DC 抗肝癌免疫和抗 HBV 免疫的研究虽然有很大的进展，但尚未进入临床上的应用。我国是乙肝高发区，我国人群 HBV 的携带率在 10%左右，而 90%的肝癌病人与 HBV 的感染有关，因此，研究和开发 DC 疫苗对慢性乙肝和肝癌的治疗具有十分重要的意义。本文就 DC 诱导的肿瘤特异性 CTL 特异性杀伤效应作初步研究。

作者介绍：李用国(1966－　)，男，博士，讲师，

主要研究方向：树突状细胞抗乙肝和肝癌免疫。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

RPMI－1640 细胞培养基、重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM－CSF)、重组人白细胞介素 4(rhIL－4)，购于 TEPROTECH 公司。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠抗人单克隆抗体 CD1a、CD86、CD40、HLA－ABC、HLA－DR、FITC 标记的鼠免疫球蛋白亚型 IgG1、κ 购于 PharMingen 公司，人重组白细胞介素 2(rIL－2)购于北京医科大学免疫系。人肝癌细胞系 HepG2，人肺腺癌细胞系(A549)细胞系购于中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2　DC 的培养扩增与鉴定

维普资讯 http://www.cqvip.com

参照文献[1]。取人抗凝外周血 20ml,常规分离外周血单个核细胞(PBMC)。用 RPMI1640 完全培养基重悬细胞,并以 2×10^6/ml 浓度加到 24 孔培养板中,每孔 1ml,放置 37℃,5%CO_2 孵箱内培养 3h,吸弃细胞悬液,用 pH 7.0 的 RPMI1640 轻洗 3 次,洗去非粘附细胞,获得粘附细胞,按 rhGM-CSF1000U/mL,rhIL-4500U/mL 终浓度加入细胞因子,隔日加细胞因子(首次浓度的 1/2)和培养基(吸弃 30%,加 50%),培养 7 天,收集细胞,台盼蓝染色,记数。进一步通过形态学、透射电镜、特异性表面标记、与功能相关的表面分子及混合淋巴细胞反应进行鉴定[1]。

1.3 肝癌细胞抗原制备

常规培养人肝癌细胞系 HepG2 细胞,收集细胞,PBS 洗 3 次,再用 PBS 重悬细胞,配成最终浓度为 4×10^7 个细胞/ml 的细胞悬液,反复冻溶(-70℃~37℃)3 次,-70℃保存。

1.4 DC 诱导肿瘤抗原特异性 CTL

按文献[2]的方法并略加改动,取正常人抗凝外周血 20ml,常规分离 PBMC,以 10^6 个细胞/ml 浓度加入 24 孔板,并加肝癌细胞抗原 250μl/ml,24h 后换半量完全培养基(含 IL-2 20U/ml),以后隔日半量换液 1 次,培养 7 天,收集细胞并与 DC 以 20:1 的比例混合培养,再加肝癌细胞抗原 250μl/ml,24h 后换半量完全培养基(含 IL-2 100U/ml),隔日 1 次,37℃ 5%CO_2 环境中培养 7 天,收集的细胞为 CTL 细胞。

1.5 外周血 PBMC 中抗原提呈细胞诱导的 CTL

取正常人抗凝外周血 20ml,常规分离 PBMC,以 1×10^6 个细胞/ml 浓度加入 24 孔板,并加肝癌细胞抗原 250μl/ml 24h 后换半量完全培养基,并加 IL-2 20U/ml,培养 7 天,收集细胞作为反应细胞;另取 PBMC,调整细胞浓度为 1×10^6 个细胞/ml,加入丝裂霉素 C,至终浓度 25μg/ml,37℃ 5%CO_2 孵育 30min,完全培养基洗 3 次,与反应细胞以 1:20 的比例混合培养,再加肝癌细胞抗原 250μl/ml,24h 后换半量完全培养基并加 IL-2 100μ/ml,隔日 1 次,37℃ 5% CO_2 环境中培养 7 天,收集的细胞为 CTL 细胞。

1.6 CTL 细胞毒活性检测

按文献[2]的方法。

1.6.1 靶细胞($HepG_2$ 或 A549)在培养瓶内生长成单层后,吸出培养液,用 0.25% 胰酶洗 1 次,以去除死细胞,然后向培养瓶内加胰酶消化细胞数分钟,在消化过程中把培养瓶放在倒置显微镜台上观察,待细胞质回缩,细胞间隙增大后立即停止消化。

1.6.2 加入 RPMI1640 完全培养基,用吸管反复吹打瓶壁形成单细胞悬液,并用完全培养基把靶细胞浓度调到 1000 个细胞/ml。

1.6.3 在 96 孔平底培养板中加 100μl 细胞悬液,37℃,5%CO_2 培养箱内培养 24h,使细胞贴壁。

1.6.4 弃去孔内培养液,实验孔加 1×10^5 个/ml 效应细胞 100μl,再补充 100μl 培养液,对照孔加培养液 200μl,培养 48h。

1.6.5 用 PBS 洗去孔中的淋巴细胞及脱落的靶细胞,甩干。用瑞氏液染色 10min,干燥。

1.6.6 镜检残留的贴壁细胞数,进行结果计算。

$$\text{杀伤百分率}(\%)=\frac{\text{对照孔细胞数}-\text{实验孔细胞数}}{\text{对照孔细胞数}}\times100\%$$

1.7 统计学处理

采用 t 检验,$P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

人外周血单核细胞在 GM-CSF 和 IL-4 的作用下,诱导培养 7 天,经形态学观察、特异性细胞表面标记及功能相关分子 FACS 检测,以及混合淋巴细胞反应(MLR)鉴定为典型的人单核细胞源性树突状细胞[1]。如表 1 所示,DC 激活的 CTL 对 $HepG_2$ 杀伤率为 71.6%,而 PBMC(APC,非 T 细胞)激活的 CTL 杀伤率为 43.8%,两者有显著性差性,$P<0.01$。此外,DC 诱导的肝癌细胞抗原特异性 CTL 对肺癌细胞的杀伤率仅为 23%。

表 1 DC 激活的 CTL 对 $HepG_2$ 细胞的杀伤效应

Group	target cells	surviving cell numbers	CTL activities(%)
DC-$HepG_2$-CTL*	$HepG_2$	38.0±4.2	71.6%
DC-$HepG_2$-CTL	A_{549}	103.0±6.2	23.1%
PBMC-$HepG_2$-CTL	$HepG_2$	75.3±7.0	43.8%
Control group	$HepG_2$	134.0±5.7	—

* $P<0.01$DC-CTL vsPBMC-CTL

3 讨 论

DC 作为功能最强的抗原提呈细胞,目前已广泛应用于抗病毒和抗肿瘤免疫研究,特别是近年来,DC 瘤苗在临床治疗取得的良好的治疗效果,为肿瘤治疗提供了新的有效的措施。然而,DC 在体内含量极低,用直接分离的方法获得的 DC 数量难以满足临床需要。业已证实,用不同细(下转第 165 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

粒酶激活相关基因不同。本研究发现反义寡核苷酸抑制端粒酶活性对 bcl－2 的表达无明显影响。端粒酶与 bcl－2 的关系尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Shang JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. Eur J Cancer, 1997;33:787－791.

[2] Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, et al. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle [J]. J Clin Invest, 1992;90:188－195.

[3] Kim NW. Clinical implications of telomerase in cancer [J]. Eur J Cancer, 1997;33(5):781－786.

[4] Carter G, Lemoine NR. Antisense technology for cancer therapy: does it make sense [J]? Br J Cancer, 1993;67:869－876.

[5] Chiang MY, Chan H, Zounes MS, et al. Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms [J]. J Bio Chem, 1991;266:18162－18171.

[6] Norton JC, Piatyszek MA Wright WE, et al. Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids [J]. Nature Biotech, 1996;14:615－619.

[7] Kanazawa Y, Ohkawa K, Veda K, et al. Hammerhead ribozyme－mediated inhibition of telomerase activity in extracts of human hepatocellular carcinoma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996;225(2):570－574.

[8] 谭端军，王文雯. 以限制端粒扩充为靶点的肿瘤治疗新思路和新策略[J]. 国外医学肿瘤学分册，1998;6:332－335.

[9] Zhu XL, Kumar R, Mandal M, et al. Cell cycle－dependent modulation of telomerase activity in tumor cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996;93:6091－6095.

[10] Holt SE, Wright WE, Shay JW, et al. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines [J]. Mol Cell Biol, 1996;6:2932－2939.

[11] Greenberg RA, O'Hagan RC, Deng H, et al. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c－myc but is not functionally equivalent in cellular transformation [J]. Oncogene, 1999;18(5):1219－1226.

[12] Fujimoto K, Takahashi M. Telomerase activity in human leukemic cell lines is inhibited by antisense pentadecadeoxynucleotides targeted against c－myc mRNA [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997;243(3):775－781.

[13] 孙 英，童坦君. 正常细胞中导入端粒酶可使 c－myc 过表达，出现癌变危险[J]. 生理科学进展，2000;31(4):360.

[14] Mandal M, Kumar K. Bcl－2 modulates telomerase activity[J]. J Biol Chem, 1997;272(22):14183－14187.

[15] 张传山，王文亮，彭玮丹，等. Bcl－2 核酶对 SMMC7721 细胞的促凋亡机制[J]. 世界华人消化杂志，2000;8(4):417－419.

[16] Kunimura C, Kikuchi K, Ahmed N, et al. Telomerase activity in a specific cell subset co－expressing integrin beta 1 EGFR but not p75 NGFR/bcl－2/integrin beta 4 in normal human epithelial cells [J]. Oncogene, 1998;17(16):187－197.

[17] Okayasu I, Mitomi H, Yamashita K, et al. Telomerase activity significantly correlates with cell differentiation, proliferation and lymph node metastasis in colorectal carcinomas [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1998;124:444－449.

[18] Scheid S, Heinzinger M, Waller CF, et al. Bcl－2 mRNA－targeted ribozymes effects on programmed cell death in chronic myelogenous leukemia cell cubes [J]. Ann Hematol, 1998;76:117－125.

(上接第 139 页)胞因子组合可以从脐血、胚肝、骨髓、外周血培养扩增大量 DC，然而胚肝、骨髓来源困难，不适宜临床应用，脐血来源方便，但其抗原提呈功能弱于外周血来源的 DC[3]，王月丹[4]等比较不同来源的树突状细胞，发现外周血单核细胞诱导分化的树突状细胞，其抗原提呈能力最强。因此，本实验从正常人外周血中分离单核细胞，用 GM－GSF 和 IL－4 组合诱导分化树突状细胞，经形态学、功能学及特异标记鉴定为典型的树突状细胞。用模拟体内实验的方法体外诱导出针对肝癌细胞抗原的特异性 CTL。结果表明，DC 诱导的 CTL 对 $HepG_2$ 有较强的杀伤效应，杀伤率为 71.6%，而对肺癌细胞杀伤率仅为 23.1%，这说明 DC 诱导的 CTL 不仅高效，而且具有较高的特异性。

参 考 文 献

[1] 李用国，罗云萍，梁增伟，等. 人外周血树突状细胞的体外培养扩增[J]. 重庆医科大学学报，2001;26(1):1－3.

[2] 巴德年，何 维. 当代免疫学技术与应用[M]. 第 1 版，北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1998;212－216.

[3] 范国昌. 树突状细胞疫苗的制备及其临床应用研究[J]. 国外医学肿瘤学分册，2000;27(2):97－100.

[4] 王月丹，谢 玮，邱玉华，等. 细胞因子诱导不同来源的贴壁型细胞分化为树突状细胞的研究[J]. 上海免疫学杂志，2000;20(3):140－143.