消化系统疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000994

人 ASPH 基因修饰树突状细胞介导 CTLs 对肝癌细胞系 SMMC-7721 的体外杀伤作用

李成敏，刘飞飞，伍春霞，董　琳，罗　旗，袁　琴，郑　洁，周玉娇，曾爱中
（重庆医科大学附属第一医院感染科、重庆市传染病寄生虫病学重点实验室，重庆　400016）

【摘　要】目的：探索人天冬氨酸-β-羟化酶（aspartate β-hydroxylase，ASPH）基因修饰的树突状细胞（dendritic cells，DCs）诱导细胞毒性 T 淋巴细胞（cytotoxic T lymphocytes，CTLs）对肝癌细胞系 SMMC-7721 的体外杀伤效应。**方法**：重组腺病毒（Ad-ASPH-IRES2-GFP）感染 C57BL/6 小鼠骨髓未成熟树突状细胞（immature DCs，imDCs）制备 DCs 疫苗，分为 3 组：含人 ASPH 基因的重组腺病毒感染 imDCs 组（DCs-ASPH 组）、空腺病毒感染 imDCs 组（DCs-GFP 组）和 imDCs 组，Western blot 和 qRT-PCR 检测 ASPH 蛋白和 mRNA 在各组 DCs 中的表达，流式细胞术（flow cytometry，FCM）检测感染前后小鼠 DCs 表面标志物 CD80、主要组织相容性复合物（major histocompatibility complex-Ⅱ，MHC-Ⅱ）和 CD11c 表达量。DCs 疫苗诱导产生 CTLs 后与肝癌细胞系 SMMC-7721 共培养，采用 CCK-8 法和 FCM 分别检测其对 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的影响。ELISA 检测 CTLs 上清液中 IFN-γ 含量。**结果**：成功培养出 DCs 并制备 DCs 疫苗，人 ASPH 基因修饰的 DCs 表面标志物 CD80、MHC-Ⅱ和 CD11c 显著高于 DCs-GFP 组（P=0.000）和 imDCs 组（P=0.000）。人 ASPH 基因修饰的 DCs 诱导的 CTLs 组 SMMC-7721 细胞的增殖能力显著低于 DCs-GFP 组和 imDCs 组（P=0.000）、凋亡率明显高于 DCs-GFP 组和 imDCs 组（P=0.000），DCs-ASPH 组诱导的 CTLs 上清液中 IFN-γ 显著高于 DCs-GFP 组和 imDCs 组（P=0.000）。**结论**：人 ASPH 基因修饰的 DCs 疫苗体外诱导产生的 CTLs 能够明显抑制肝癌细胞SMMC-7721 增殖并促进其凋亡。

【关键词】天冬氨酸-β-羟化酶；树突状细胞；SMMC-7721 细胞；共培养
【中图法分类号】R392.11；R735.7　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-01-07

Killing effect of cytotoxic T lymphocytes induced by dendritic cells transfected with human aspartate-β-hydroxylase gene on hepatocellular carcinoma cells line SMMC-7721 *in vitro*

Li Chengmin, Liu Feifei, Wu Chunxia, Dong Lin, Luo Qi, Yuan Qin, Zheng Jie, Zhou Yujiao, Zeng Aizhong
(Department of Infections Disease, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Key Laboratory of Infectious and Parasitic Diseases)

【Abstract】*Objective*: To investigate the killing effect of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) on hepatocellular carcinoma cells line SMMC-7721 after being induced by dendritic cells (DCs) transfected with human aspartate-β-hydroxylase gene *in vitro*. ***Methods***: Immature dendritic cells, from the bone marrow of the mice C57BL/6, loaded with human aspartate-β-hydroxylase recombinant adenovirus were used to prepare for DCs vaccine. They were classified as immature dendritic cells infected by recombinant adenovirus loaded with human aspartate-β-hydroxylase (DCs-ASPH group), immature dendritic cells infected by recombinant adenovirus (DCs-GFP group) and immature dendritic cells group (imDCs group). The expressions of ASPH protein and mRNA in each DCs were detected by Western blot and qRT-PCR, and the surface expression of CD80, MHC-Ⅱ and CD11c were examined by flow cytometry (FCM) in both uninfected and infected dendritic cells. The specific CTLs induced by DCs vaccine were subsequently co-cultured with hepatocellular carcinoma cells line SMMC-7721. The proliferation and apoptosis rate of SMMC-7721 cells were detected by cell counting kit 8 (CCK-8) and flow cytometry. The level of IFN-γ was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ***Results***: DCs was successfully cultured and DCs vaccine was constructed. The DCs loaded with human aspartate-β-hydroxylase recombinant adenovirus expressed significantly higher level of CD80 (P=0.000), MHC-Ⅱ (P=0.000) and CD11c (P=0.000) than those in DCs-

作者介绍：李成敏，Email：lcmdc212@163.com，
研究方向：病毒性肝炎的治疗及预防。
通信作者：曾爱中，Email：aizhong9@sina.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30972587）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160601.1553.012.html（2016-06-01）

GFP group and imDCs group. The proliferation of SMMC-7721 cells co-cultured with CTLs induced by human aspartate-β-hydroxylase recombinant adenovirus was lower while the apoptosis rate was higher than those in DCs-GFP group and imDCs group(P=0.000). The secretion level of IFN-γ in CTLs induced by DCs-ASPH was also significantly higher than that in DCs-GFP group and imDCs group(P=0.000). ***Conclusion***: CTLs induced by DCs transfected with human aspartate-β-hydroxylase recombinant adenovirus can apparently inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells line SMMC-7721, and induce cells apoptosis *in vitro*.

【Key words】aspartate-β-hydroxylase; dendritic cells; SMMC-7721 cell; co-culture

肝细胞肝癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是全球最常见的恶性肿瘤之一[1]。病死率在恶性肿瘤中居第 3 位[2]，每年新确诊病例数约 75 万人，其中约 70 万人死于 HCC[3]。尽管随着检测技术和治疗方法的不断提高，但 HCC 患者的 5 年生存率仅为 15%，且 80%~90%患者发生早期肝内播散及远处转移[4]，就诊时往往已失去最佳手术时机，而且术后肝癌复发率高，因此探索新的治疗方法依然十分紧急与迫切。

天冬氨酸-β-羟化酶（aspartate-β-hydroxylase，ASPH）是一种Ⅱ型跨膜蛋白，分子量约 86 kD，属依耐 α-酮戊二酸脱氧酶系中的一员[5]。ASPH 在人恶性肿瘤中高表达，包括肝细胞肝癌、肝内胆管细胞癌、胰腺癌、肾癌、乳腺癌及宫颈癌等。相反，在正常组织中，ASPH 低表达或不表达[6]。Wang 等[7]对 233 名 HCC 术后患者肝癌及癌周组织采用 cDNA 芯片研究发现，5 760 个基因中有 1 052 个基因表达量上调，其中 ASPH mRNA 显著表达（12.4 倍）。因此同其他肿瘤抗原一样，ASPH 抗原有希望打破 HCC 免疫耐受，成为其免疫治疗的抗原之一。

树突状细胞（dendritic cells，DCs）是专职抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC）。DCs 能够捕获并分解蛋白为免疫原性多肽，形成抗原肽-主要组织相容性复合物（major histocompatibility complex，MHC）被 T 细胞识别，激活 T 细胞，产生细胞毒性 T 淋巴细胞（cytotoxic T lymphocytes，CTLs）。本研究将 ASPH 重组腺病毒（Ad-ASPH-IRES2-EGFP）转染小鼠未成熟树突状细胞（immature dendritic cells，imDCs），制备 DCs 疫苗，体外诱导 CTLs，研究其对 SMMC-7721 细胞的抑制作用，为 ASPH 相关的肿瘤基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 SMMC-7721 购自中国科学院上海生命科学研究院；人正常肝细胞 LO2 由重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心馈赠；胎牛血清及 RPMI1640 培养基购自美国 Gbico 公司；重组小鼠粒-巨噬细胞集落刺激因子（recombinant murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor，rmGM-CSF）、重组小鼠白细胞介素-4（recombinant murine interleukin-4，rmIL-4）和重组小鼠肿瘤坏死因子-α（recombinant murine tumor necrosis factor-α，rmTNF-α）购自美国 Peprotech 公司；PE 标记抗小鼠 CD80、APC 标记抗小鼠主要组织相容性复合体-Ⅱ（*major histocompatibility complex*-Ⅱ，MHC-Ⅱ）（IA/IE）、PerCP-Cy5.5 标记抗小鼠 CD11c、PE 标记抗小鼠 CD3、FITC 标记抗小鼠 CD4、CD8 单克隆抗体购自美国 eBioscience 公司；兔抗 ASPH 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司；辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的山羊抗兔二抗购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司；ECL 显色液、SDS-PAGE 试剂盒及 IP 细胞裂解液购自碧云天公司；qRT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa试剂公司；CCK-8（cell counting kit-8）试剂盒购自日本同仁化学研究所；小鼠淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物科技有限公司；小鼠干扰素-γ（murine interferon-γ，mIFN-γ）ELISA 试剂盒购于武汉博士得生物工程有限公司；带有 ASPH 基因的重组腺病毒、空腺病毒由本课题组构建；雌性健康 C57 BL/6 小鼠，5~6 周龄，体质量（18 ± 2）g，购于重庆医科大学实验动物中心。证书合格证号 SCXK（渝）2012-0001。

1.2 方法

1.2.1 小鼠骨髓未成熟 DCs 的分离培养 颈椎脱臼处死 C57BL/6 小鼠，于 75%乙醇溶液中浸泡 5 min，无菌取小鼠股骨和胫骨并剪去两端骨骺，PBS 反复冲洗骨髓腔，红细胞裂解液作用 2 *min* 去除红细胞，PBS 清洗 2 次，1 000 r/min 离心 5 min，用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 完全培养液调整细胞密度为 3×10^9 个/ml 接种至 6 孔板中，加入细胞因子 rmGM-CSF 和 rmIL-4 并调整其终浓度为 10 ng/ml，置于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后半量换液，并补足相同细胞因子浓度，每日在显微镜下观察 DCs 形态。

1.2.2 ASPH 特异性 DCs 疫苗的制备 收集培养至第 6 天的 imDCs 于 6 孔板中，分别用感染复数（multiplicity of infection，MOI）为 200 的重组腺病毒 Ad-ASPH-IRES2-EGFP 及空腺病毒 Ad-IRES2-EGFP 感染 DCs，2 h 后再加入细胞因子 rmGM-CSF、rmIL-4、rmTNF-α 和 10%FBS 的 RPMI1640 培养液，调整细胞因子浓度为 5 ng/ml，在培养 24 h 和 36 h，

于荧光倒置显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白表达。

1.2.3 qRT-PCR 和 Western blot 检测 ASPH 在 DCs 疫苗中的表达 收集培养 36 h 的上述 DCs，分别提取 Ad-ASPH-IRES2-EGFP 感染的 DCs、Ad-IRES2-EGFP 感染的 DCs 及未做任何处理的 DCs 的总蛋白和总 RNA。取 40 μg/孔蛋白进行 8% SDS-PAGE 电泳，转移至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉室温封闭 2 h，1:200 稀释的兔抗 ASPH 多克隆抗体于 4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，1:5 000 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗，室温孵育 2 h，ECL 显色，检测目的蛋白ASPH 的表达。取 500 ng 总 RNA 进行逆转录为 cDNA，加入 SYBR 按 10 μl 体系进行 qRT- PCR 反应，检测 ASPH mRNA 在DCs 中的表达。

1.2.4 成熟 DCs 表型鉴定 分别收集培养第 7 天的 imDCs、Ad-ASPH-IRES2-EGFP 和 Ad-IRES2-EGFP 分别感染 36 h 的 DCs，PBS 清洗 2 次，1 000 r/min，离心 5 min，调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml，每管 200 μl，分别加入 PE-CD80、PerCP-Cy5.5-CD11c 及 APC-MHC-Ⅱ 1.0 μl，4 ℃避光反应 30 min，洗涤后采用流式细胞术（flow cytometry，FCM）检测其表面分子表达。

1.2.5 效应 T 淋巴细胞的制备 颈椎脱臼处死 C57 BL/6 小鼠，无菌条件下取出脾脏，研磨成单细胞，经 200 目细胞筛过滤制成单细胞悬液，加入 4 ml 小鼠脾脏淋巴细胞分离液，1 500 r/min，离心 20 min，轻轻吸取淋巴细胞层，用淋巴细胞清洗液洗涤 2 次，PBS 重悬细胞，每管 200 μl，调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml，FCM 检测 T 淋巴细胞表面分子 CD3、CD4 和 CD8 的表达。将 T 淋巴细胞以 1×10^6 个/孔接种至 6 孔板，收集重组腺病毒 Ad-ASPH-IRES2-EGFP 感染的 DCs、空腺病毒 Ad-IRES2-EGFP 感染的 DCs 及未做任何处理的 DCs，分别与淋巴细胞以 1:20 的比例混合培养 72 h，诱导产生 DCs-ASPH-CTLs、DCs-GFP-CTLs 和 DCs-CTLs 作为效应细胞。

1.2.6 CCK-8 法检测 DCs 疫苗诱导的 CTLs 对 SMMC-7721 细胞和 LO2 细胞增殖的影响 收集 SMMC-7721 细胞和人正常肝细胞 LO2，调整细胞浓度为 3×10^4 个/ml，每孔取 100 μl 分别接种于 96 孔板作为靶细胞，待细胞完全贴壁后，将上述所得效应细胞 CTLs 以效靶比为 40:1、20:1、10:1 及 5:1 分别与 SMMC-7721 细胞共培养，DCs-ASPH-CTLs 按效靶比为 40:1、20:1、10:1 及 5:1 与靶细胞 LO2 共培养，观察其对人正常肝细胞 LO2 增殖能力的影响，未做任何处理的 SMMC-7721 孔设为空白对照，每组设 3 个复孔，共培养 24 h，PBS 轻轻洗去残留 CTLs，450 nm 波长测定吸光度值。

1.2.7 FCM 检测 DCs 疫苗诱导的 CTLs 对 SMMC-7721 细胞和 LO2 细胞凋亡的影响 取 1×10^5 个/孔 SMMC-7721 细胞和 LO2 细胞分别接种于 6 孔板作为靶细胞，待细胞完全贴壁后，SMMC-7721 细胞分别按效靶比为 40:1 加入上述效应细胞 CTLs，LO2 细胞按效靶比为 40:1 加入 DCs-ASPH-CTLs，未经任何处理的 SMMC-7721 作为空白对照，共同培养 24 h，PBS 轻轻洗 6 孔板一次去掉残留 CTLs，收集 SMMC-7721 细胞和 LO2 细胞，加入 Annexin V-FITC 结合液和 PI 染色液，行 FCM 检测 CTLs 对 SMMC-7721 细胞和 LO2 细胞凋亡的影响。

1.2.8 ELISA 检测 IFN-γ 含量 收集 CTLs 各组上清液，按 ELISA 试剂盒操作说明，绘制标准曲线，检测各组上清液中 IFN-γ 表达量。

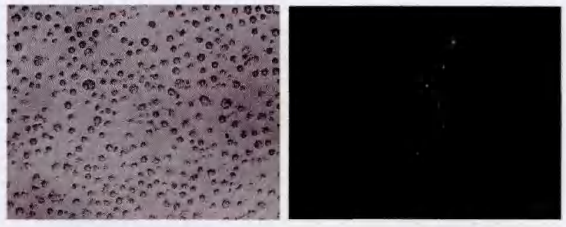
1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，各组均数差异性比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 小鼠骨髓未成熟 DCs 及 DCs 疫苗形态学观察

在 rmGM-CSF 和 rmIL-4 诱导下，3 d 可见疏松贴壁的细胞数量增多；5 d 可见较多悬浮细胞成簇、呈集落状生长；7 d 可见大量细胞悬浮，表面可见较长不规则突起（图 1A）。重组腺病毒感染 DCs 24 h 后，在荧光显微镜下观察到 DCs 内有少量绿色荧光表达，36 h 后荧光表达明显增加，感染效率约为 40%~50%，成功构建 ASPH 特异性 DCs 疫苗（图 1B）。



A. 未成熟 DCs　　B. DCs 疫苗

图 1 倒置显微镜观察小鼠第 7 天荧光表达（100×）

Fig.1 Morphology of mice on the 7th day by inverted microscope（100×）

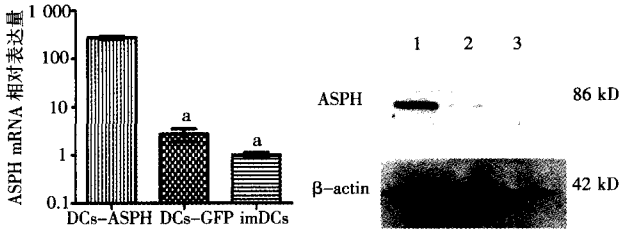
2.2 DCs 疫苗中 ASPH 蛋白和 mRNA 表达

收集重组腺病毒和空腺病毒感染 36 h 的 DCs 及未做任何处理的 DCs，qRT-PCR 结果显示 DCs-ASPH 组 ASPH mRNA 表达量为（274.470 ± 20.438），DCs-GFP 组（2.717 ± 0.824），imDCs 组（1.000 ± 0.131），DCs-ASPH 组 ASPH mRNA 表达量明显高于 DCs-GFP 组（F=532.876，P=0.004）和 imDCs 组（F=532.876，P=0.004），差异具有统计学意义，DCs-GFP 组和 imDCs 组（F=532.876，P=0.137）ASPH mRNA 表达量差异无统计学意义（图 2A）。Western blot 检测到 DCs-ASPH 组细胞中 ASPH 蛋白表达，DCs-GFP 组和 imDCs 组无表达（图 2B），与 qRT-PCR 结果一致。

2.3 DCs 表型分析

重组腺病毒感染 DCs（DCs-ASPH）组细胞表面分子

CD11c 表达率为(64.603 ± 5.282)%，明显高于 DCs-GFP 组(19.950 ± 2.178)(F=192.512，P=0.000)和 imDCs 组(10.457 ± 2.536)(F=192.512，P=0.000)，差异具有统计学意义；DCs-ASPH 组细胞表面分子 MHC-Ⅱ表达率为(84.363 ± 3.297)%，与 DCs-GFP 组(60.957 ± 3.810)(F=79.218，P=0.000)和 imDCs 组(52.543 ± 2.346)(F=79.218，P=0.000)相比，差异具有统计学意义；DCs-ASPH 组细胞表面分子 CD80 表达率为(99.520 ± 0.541)%，相比 DCs-GFP 组(94.513 ± 1.886)(F=1003.413，P=0.007)和 imDCs 组(48.457 ± 1.805)(F=1003.413，P=0.000)，差异具有统计学意义(图 3A~C)。



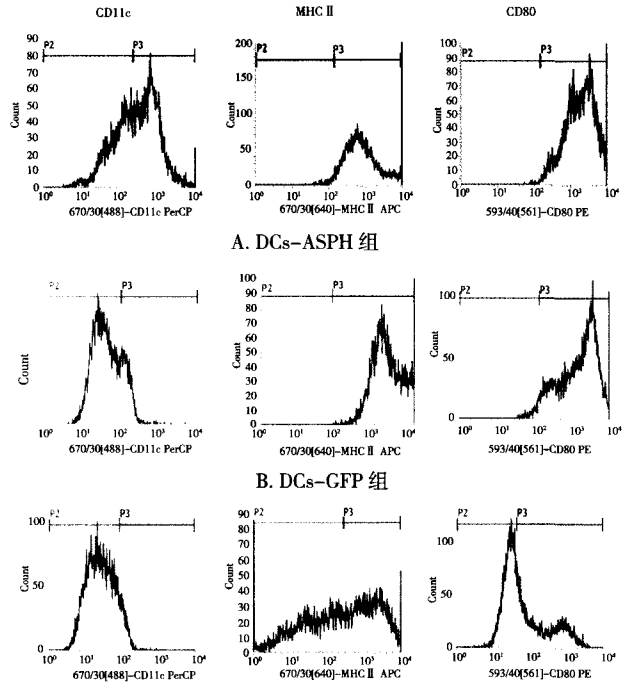
A. qRT-PCR 检测结果($\bar{x} \pm s$，n=3)　　B. Western blot 检测结果

a. 与 DCs-GFP 组和 imDCs 组比较，P<0.05；

1. DCs-ASPH 组；2. DCs-GFP 组；3. imDCs 组

图 2　qRT-PCR 和 Western blot 检测 DCs 疫苗中 ASPH 的表达

Fig.2　Expression of ASPH gene in DCs vaccine by qRT-PCR and Western blot



A. DCs-ASPH 组

B. DCs-GFP 组

C. imDCs 组

图 3　流式细胞术检测各组 DCs 表型标志物

Fig.3　Typical phenotypes of different DCs by flow cytometry

2.4　T 淋巴细胞纯度测定

收集分离获得的小鼠脾脏淋巴细胞，流式细胞仪检测 T 淋巴细胞 CD3、CD4 和 CD8 的表达率，结果显示总 T 淋巴细胞纯度 CD3 为 79.240%，CD4 为 43.230%，CD8 为 28.930%，如图4。

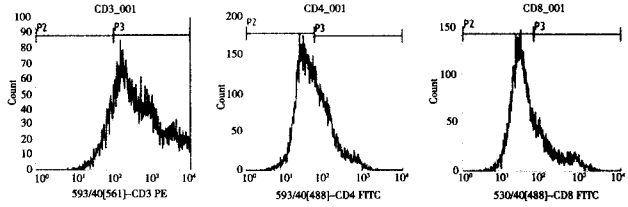


图 4　流式细胞术检测 T 淋巴细胞纯度

Fig.4　Purity of T lymphocyte by flow cytometry

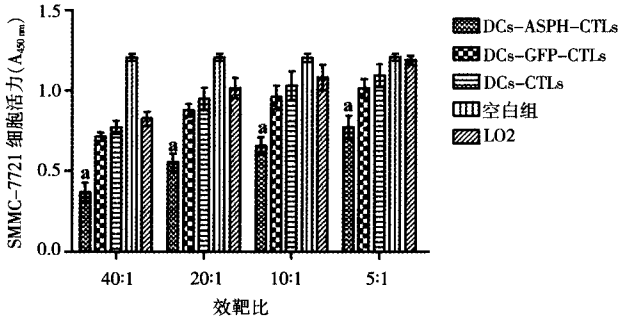
2.5　DCs 疫苗诱导 CTLs 对 SMMC-7721 细胞和 LO2 细胞增殖和凋亡的作用

CCK-8 检测 DCs 疫苗诱导 CTLs 对 SMMC-7721 细胞和 LO2 细胞增殖影响的结果显示，SMMC-7721 细胞增殖能力随效应细胞比例增加而降低，相对于空白组和对照组，经 DCs-ASPH 诱导的 CTLs 组 SMMC-7721 细胞在效靶比为 40:1 时增殖能力最低 $A_{450\,nm}$ 值为(0.369 ± 0.059)，且增殖能力明显低于空白组(1.205 ± 0.021)(F=166.205，P=0.000)、DCs-CTLs 组(0.770 ± 0.041)(F=166.205，P=0.000)和 DCs-GFP-CTLs 组(0.713 ± 0.025)(F=166.205，P=0.000)，差异具有统计学意义，DCs-GFP-CTLs 组和 DCs-CTLs 组 SMMC-7721 细胞 $A_{450\,nm}$ 值差异无统计学意义(F=166.205，P=0.112)，人正常肝细胞 LO2 增殖能力随效应细胞比例增加而降低，在效靶比为 40:1 时增殖能力最低 $A_{450\,nm}$ 值为(0.824 ± 0.043)，增殖能力明显高于 DCs-ASPH-CTLs 组 SMMC-7721 细胞(F=166.205，P=0.000)，差异具有统计学意义，如图 5A。FCM 检测 DCs 疫苗诱导的 CTLs 对 SMMC-7721 细胞和 LO2 细胞凋亡结果显示，DCs-ASPH 诱导的 CTLs 组 SMMC-7721 细胞的凋亡率为(17.610 ± 2.000)%，明显高于空白组(2.880 ± 1.211)%(F=17.692，P=0.000)、DCs-CTLs 组(6.800 ± 3.139)%(F=17.692，P=0.000)和 DCs-GFP-CTLs 组(10.333 ± 3.068)%(F=17.692，P=0.003)，差异具有统计学意义，DCs-GFP-CTLs 组与 DCs-CTLs 组(F=17.692，P=0.086)、DCs-CTLs 组与空白组(F=17.692，P=0.061)SMMC-7721 细胞凋亡率差异无统计学意义，DCs-ASPH 诱导的 CTLs 引起 LO2 细胞凋亡率为(7.067 ± 1.075)%，明显低于 SMMC-7721 细胞，差异具有统计学意义(F=17.692，P=0.000)，如图 5B。

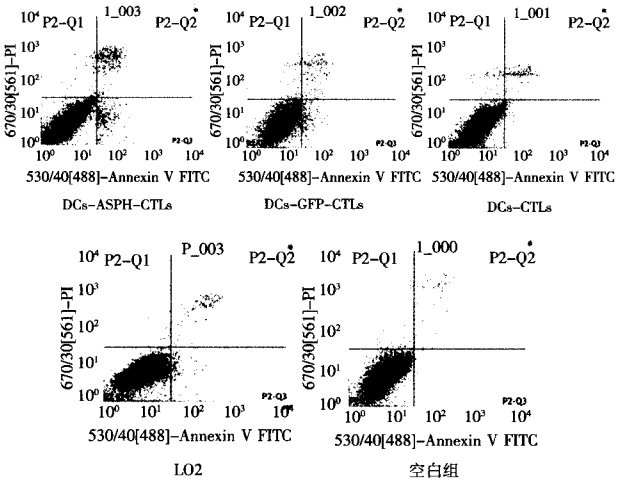
2.6　CTLs 上清液 IFN-γ 分泌量

ELISA 检测各组 IFN-γ 的分泌量，结果表明，经 DCs-ASPH 诱导产生的 CTLs 细胞 IFN-γ 分泌量为(1526.510 ± 120.361) pg/ml，明显高于 DCs-GFP-CTLs 组细胞 IFN-γ 分泌量(567.387 ± 81.199)和 DCs-CTLs 组细胞 IFN-γ 分泌量(397.700 ± 101.480)，与 DCs-GFP-CTLs 组(F=106.264，P=0.000)和 DCs-CTLs 组(F=106.264，P=0.000)相比，差异具有

统计学意义。DCs-GFP 组和 DCs 组 CTLs 细胞 IFN-γ 分泌量无统计学差异（F=106.264，P=0.088），如图 6。



A. CCK-8 检测结果（$\bar{x} \pm s$，n=3）

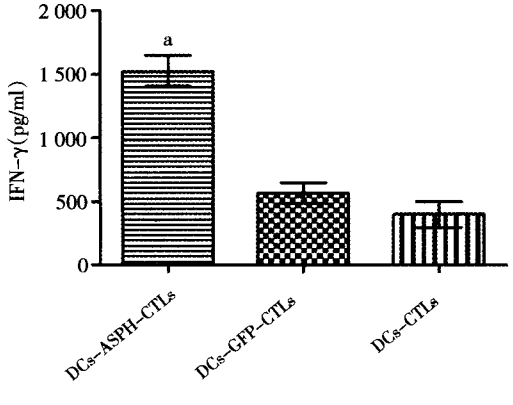


B. 流式细胞术检测结果

a，与空白组、DCs-GFP-CTLs 组、DCs-CTLs 组和 LO2 组比较，P<0.05

图 5 CTLs 对 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的作用

Fig.5 Effect of CTLs on SMMC-7721 cell proliferation and apoptosis



a，与 DCs-GFP-CTLs 组和 DCs-CTLs 组比较，P<0.05

图 6 ELISA 检测各组 CTLs 细胞的 IFN-γ 分泌量（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Fig.6 Secretion of IFN-γ in different CTLs by ELISA（$\bar{x} \pm s$，n=3）

3 讨 论

手术、化疗和放疗是肿瘤治疗的常规方法，随着生物治疗的不断发展，肿瘤免疫治疗已被越来越多的运用于肿瘤常规治疗中。其主要治疗方式如下：一种是将体外扩增产生针对患者自体抗原的特异性 T 细胞回输体内；另一种是通过疫苗的方式，即使用肿瘤种抗原与 DCs 一起诱导的治疗性 T 细胞，能产生免疫记忆，达到抑制肿瘤复发的作用[8]。ASPH 作为近年新发现的用于治疗肝细胞肝癌的跨膜蛋白，通过羟化表皮生长因子样结构域中特定天冬氨酸残基上 β 碳原子进而调控恶性肿瘤的浸润和转移性生长而备受关注，更为重要的是：受 ASPH 羟化的保守序列也存在于 Notch 信号传导路径表皮生长因子样结构域中和致癌性 Notch 类似物中[7,9-10]。且人肝癌细胞系 SMMC-7721 中 ASPH 蛋白表达量比正常组织高 6 倍，ASPH mRNA 表达量比正常组织高 14.3 倍[11]。将外源基因转入细胞内最常使用的载体是腺病毒载体，相比非病毒和其他病毒系统，腺病毒具有强烈的嗜肝性，且能高效转导增殖期及静止期细胞。重组腺病毒能诱导机体产生细胞免疫反应和体液免疫反应，安全性较高，仅短时表达于基因组外，不会插入基因组引起突变，体外转染效率高，并可稳定表达活性蛋白于细胞内[12]。基于以上特点，本实验小组将人肝癌细胞 ASPH 基因重组到腺病毒载体中，用于原发性 HCC 的免疫治疗。

DCs 是体内功能最强大的 APC，imDCs 摄取、处理抗原能力强，但提呈抗原能力较弱，低表达 MHC 类分子、协同刺激分子和粘附分子。成熟 DCs 表面高表达 MHC 类分子、协同刺激分子（CD40、CD80和 CD86）和粘附分子（CD11c 和 CD11a），加工提呈抗原能力强。本实验从小鼠骨髓分离培养 DCs，用含有目的基因 ASPH 的重组腺病毒和空腺病毒感染 imDCs，结果表明本实验中 MOI 为 200、感染时间为 36 h 时，腺病毒感染 DCs 的感染效率和细胞状态最佳。FCM 检测到经 ASPH 基因感染的 DCs 表面 CD80、CD11c 和 MHC Ⅱ 分子表达率均高于 DCs-GFP 组和 imDCs 组，符合成熟树突状细胞特征，含目的基因的腺病毒能够刺激 DCs 的分化和成熟。Western blot 和 qRT-PCR 均能检测到 ASPH 蛋白和

mRNA在 DCs 中稳定表达，成功制备含有目的基因 ASPH 的 DCs 疫苗。成熟 DCs 通过其膜表面抗原肽-MHC Ⅱ类分子复合物和抗原肽-MHC Ⅰ类分子复合物，能有效促进初始 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞增殖、分化，分别产生 Th 细胞和 CTLs，此外，还通过高表达 CD40、CD80、CD86 等协同刺激分子，为 T 细胞活化提供第二信号，启动人体特异性免疫反应，在抗肿瘤免疫反应中显示出强大作用[13]。IFN-γ 主要由 $CD4^+$ Th1 细胞、$CD8^+$CTLs 细胞及 NK 细胞产生，IFN-γ 还可以通过上调 MHC Ⅰ、Ⅱ类分子及粘附分子的表达而促进 CTLs 的活化，可以有效介导细胞免疫，在抗病毒和抗肿瘤中发挥重要作用。本实验分离培养同种异体小鼠脾脏淋巴细胞，FCM 检测 T 淋巴细胞纯度 CD3 为 79.240%，CD4 为 43.230%，CD8 为 28.930%，按 DCs:T 为 1:20 比例与各组 DCs 共培养，诱导产生 CTLs。经 DCs-ASPH 诱导的 CTLs 组上清液中 IFN-γ 分泌量明显高于 DCs-GFP-CTLs 组和 DCs-CTLs 组，说明经 DCs-ASPH 刺激的T 淋巴细胞能够增殖分化为 CTLs，分泌 IFN-γ，产生显著的抗肿瘤效应。增殖和凋亡是细胞的两个重要特性，肿瘤细胞的增殖和凋亡与肿瘤的生长、浸润、转移、复发和预后密切相关，本研究中 CTLs 对SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的作用分别用 CCK-8 实验和 FCM 检测。在效靶比为 40:1 时，DCs-ASPH 诱导的 CTLs 与 SMMC-7721 细胞共培养后，SMMC-7721 细胞 $A_{450\,nm}$ 值最小，表明随效靶比比例的增加，SMMC-7721 细胞增殖能力逐渐减弱，且在效靶比为 40:1 时，增殖能力最弱，而 LO2 细胞增殖能力明显强于 SMMC-7721 细胞。FCM 检测显示，SMMC-7721 细胞经 DCs-ASPH 诱导的 CTLs 作用后，凋亡率明显增加，且高于 LO2 细胞，表明 DCs-ASPH 诱导的 CTLs 在体外对 SMMC-7721 有明显的杀伤作用，对人正常肝细胞 LO2 杀伤作用明显弱于SMMC-7721 细胞，说明 DCs-ASPH-CTLs 的选择性强，对正常细胞的毒副作用小。

既往研究通过含人 ASPH 基因的 DCs 疫苗在体内外对小鼠肝内胆管细胞癌 BDEneu 产生抑制作用[14]，本研究通过含目的基因 ASPH 的腺病毒感染 DCs，与小鼠脾脏淋巴细胞共培养，诱导产生 CTLs，体外证明 DCs-ASPH 介导的 CTLs 对人肝癌细胞系 SMMC-7721 有抑制细胞增殖和促进细胞凋亡的作用，为后续的体内研究提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2011, 365(12): 1118-1127.

[2] Wong R, Frenette C. Updates in the management of hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterol Hepatol(NY), 2011, 7(1): 16-24.

[3] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[4] Aihara A, Huang CK, Olsen MJ, et al. A cell surface β-hydroxylase is a biomarker and therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2014, 60(4): 1302-1313.

[5] Hanauske-Abel HM, Popowicz AM. The HAG mechanism: a molecular rationale for the therapeutic application of iron chelators in human diseases involving the 2-oxoacid utilizing dioxygenases[J]. Curr Med Chem, 2003, 10(12): 1005-1019.

[6] 宋 凯，薛小平，王 伟，等. ASPH 在肿瘤细胞和肿瘤组织中的分布及检测[J].细胞与分子免疫学杂志，2010，26(2)：141-144.

[7] Wang K, Liu J, Yan ZL, et al. Overexpression of aspartyl-(asparaginyl)-β-hydroxylase in hepatocellular carcinoma is associated with worse surgical outcome[J]. Hepatology, 2010, 52(1): 164-173.

[8] 巴俊慧，吴本权，王艳红，等. MUC1 mRNA 体外负载树突状细胞诱导细胞毒性 T 细胞对非小细胞肺癌的杀伤作用[J]. 中国病理生理杂志，2014，30(9)：1574-1579.

[9] Silbermann E, Moskal P, Bowling N, et al. Role of aspartyl-(asparaginyl)-β-hydroxylase mediated notch signaling in cerebellar development and function[J]. Behav Brain Funct, 2010, 6(1): 1-13.

[10] Lawton M, Tong M, Gundogan F, et al. Aspartyl-(asparaginyl)?-hydroxylase, hypoxia-inducible factor-1α and Notch cross-talk in regulating neuronal motility[J]. Oxid Med Cell Longev, 2010, 3(5): 347-356.

[11] Yang H, Song K, Xue T, et al. The distribution and expression profiles of human Aspartyl/Asparaginyl beta-hydroxylase in tumor cell lines and human tissues[J]. Oncology Reports, 2010, 24(5): 1257-1264.

[12] Choi EW, Seen DS, Song YB, et al. AdHTS: a high-throughput system for generating recombinant adenoviruses[J]. J Biotechnol, 2012, 162(2-3): 246-252.

[13] 符少月，焦庆昉，黄启彬，等. 带有 HPV-16E6/E7 CaSki 基因的树突状细胞疫苗对裸鼠人宫颈癌细胞移植瘤的抗肿瘤作用[J]. 重庆医科大学学报，2013，38(5)：512-516.

[14] Noda T, Shimoda M, Ortiz V, et al. Immunization with aspartate-β-hydroxylase-loaded dendritic cells produces antitumor effects in a rat model of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Hepatology, 2012, 55(1): 86-97.

（责任编辑：张辉洁）