

阿霉素处理的肿瘤抗原致敏树突状细胞的 抗肿瘤免疫研究

黄永红¹ 王红梅^{1*} 曾小平² 周晓燕¹ 蔡振宇¹ 徐方云¹

(¹南昌大学基础医学院病理生理学教研室, 南昌 330006; ²南昌大学基础医学院免疫学教研室, 南昌 330006)

摘要 研究表明化疗药物作用于肿瘤细胞后可有效激发免疫应答, 这与肿瘤细胞的性质和化疗药物有关。该研究主要探讨阿霉素(adriamycin, ADM)处理小鼠宫颈癌U14细胞获得的肿瘤抗原致敏树突状细胞(dendritic cells, DCs)的免疫应答及对肿瘤的杀伤效应。分别应用ADM和反复冻融法处理小鼠宫颈癌U14细胞, 取其离心上清液, 致敏小鼠骨髓来源的DC, 观察DC诱导的淋巴细胞增殖反应和细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)对宫颈癌细胞的细胞毒效应。结果显示: ADM处理的U14细胞抗原致敏后的DC组所激发和扩增的T细胞数及对宫颈癌细胞的杀伤效果显著高于对照组($P < 0.05$)。因而提示ADM处理的肿瘤抗原能有效地致敏DC并产生抗肿瘤免疫效应。

关键词 树突状细胞; 阿霉素; 抗肿瘤免疫; 子宫颈癌

DCs最初是由Steinman等^[1]从小鼠的脾组织中分离发现的。因其形态具有树突样或伪足样突起而命名, 是目前所知功能最强、唯一能激活初始性T细胞的专职抗原提呈细胞, 具有强大的激活CD8⁺ CTL和CD4⁺ T辅助细胞的能力, 在免疫应答中处于中心地位, 对机体克服肿瘤的免疫逃逸和增强机体对肿瘤的免疫清除作用具有十分重要的价值^[2]。在探讨化疗诱发免疫原性肿瘤细胞凋亡时, 发现葱环类抗生药在体内和体外均能引起免疫原性细胞死亡, ADM处理的肿瘤细胞激发细胞毒性免疫应答特别有效, 这种应答是由DC介导的^[3]。因而, 我们应用ADM和树突状细胞结合治疗宫颈癌, 观察ADM处理肿瘤细胞后, 对DC抗肿瘤免疫应答是否具有增强作用。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

昆明种(Km)小鼠购自南昌大学医学院实验动物部。小鼠宫颈癌U14细胞为本实验室长期保存; RPMI1640培养基、胎牛血清购自Hyclone公司, rmGM-CSF、rmIL-4和rmTNF- γ 购自Pepro Tech公司, PE标记抗鼠CD11c单克隆抗体和FITC标记抗鼠CD80单克隆抗体购自BioLegend公司, MTT、胰蛋白酶和丝裂霉素C购自Sigma公司, 阿霉素购自浙江海正药业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DCs的体外分离、培养 在无菌条件下, 从

Km小鼠股骨和胫骨冲洗骨髓腔收集骨髓细胞, 过200目钢网, 离心(1 000 r/min, 5 min), 弃上清, 以Tris-NH₄Cl处理2~3 min去除红细胞, 用PBS洗涤2次, 将细胞悬于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中, 37 °C、5% CO₂培养箱培养2 h, 轻轻洗去未贴壁细胞, 贴壁细胞置于含GM-CSF(100 U/mL)和IL-4(100 U/mL)的完全培养液(RPMI+10%热灭活FBS)中(10^6 /mL)培养。第6 d时, 将DC用200 U/mL TNF- γ 培养24 h, 获得成熟DCs(mDCs)。倒置显微镜每日观察细胞形态。取成熟DC做透射电镜观察。

1.2.2 阿霉素处理肿瘤细胞及肿瘤抗原制备 6孔培养板加入U14细胞(2×10^5 /孔), 在含10% FBS的RPMI-1640培养液中培养24 h后, U14细胞用含40 μ mol/L ADM的新鲜培养液培养24 h后, 收集培养液上清, 离心(15 000 r/min, 45 min)以获得ADM处理诱导的含有非贴壁细胞、细胞碎片和肿瘤细胞分泌的高分子因子和细胞成分。将离心沉淀物再悬浮于RPMI-1640完全培养液中, 与成熟DC一起培养24 h。另收集U14细胞, 经液氮迅速冷冻后, 立即放入37 °C水浴中至刚刚融化, 即再次放入液氮迅速冷冻, 反复5次冻融循环获得肿瘤细胞冻融裂解物, 10 000 r/min低

收稿日期: 2011-07-11 接受日期: 2011-10-08

江西省教育厅基金(No.GJJ08086)和江西省卫生厅基金(No.20072015)

资助项目

*通讯作者。Tel: 0791-8608348, E-mail: wanghongmay@hotmail.com

温离心20 min, 上清用0.22 μm 针头滤器过滤, 加入成熟DC作为对照。24 h收集肿瘤抗原致敏的DCs。未致敏(PBS处理)DCs为空白对照。分别将上述各组DC用流式细胞仪测定成熟表型的表达。

1.2.3 同种混合淋巴细胞反应 无菌分离Km小鼠脾脏淋巴细胞作为反应细胞, 阿霉素处理的肿瘤抗原致敏的DCs和肿瘤冻融抗原致敏的DCs经丝裂霉素C处理后作为刺激细胞, 取96孔培养板, 刺激细胞与反应细胞以1:10的比例共同培养6 d, 每组设3个平行孔, MTT比色法测定淋巴细胞增殖, 酶标仪测570 nm波长处吸光度(D)值。计算刺激指数(SI)。刺激指数(SI)=实验组 D_{570} /对照组 D_{570} 。

1.2.4 致敏DCs诱导CTL对肿瘤细胞的细胞毒作用 取对数生长期的U14细胞为靶细胞, 分别以阿霉素处理的肿瘤抗原和肿瘤冻融抗原致敏的DCs以1:10的比例与淋巴细胞混合培养6 d作为效应细胞, 每孔加入靶细胞 1×10^4 , 分别以效靶比20:1和40:1加入效应细胞。设单独靶细胞为空白对照组。每组设3个

平行孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养24 h, MTT比色法测各孔570 nm波长处吸光度(D)值。按下列公式计算各组细胞杀伤率: 细胞杀伤率=[1-(实验孔 D 均值-效应细胞孔 D 均值)/靶细胞孔 D 均值] $\times 100\%$

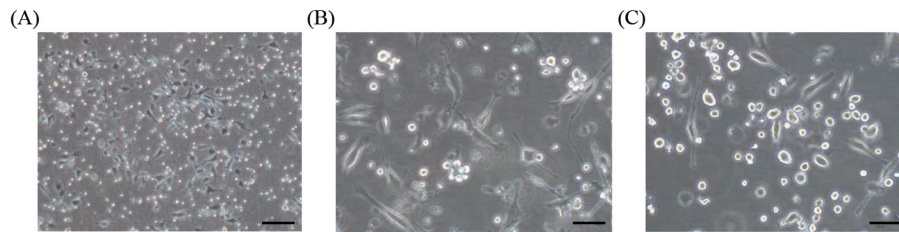
1.3 统计学处理

用SPSS统计软件对数据作统计分析和处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 t 检验比较两样本均数间差异, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 DCs的形态学观察

小鼠骨髓细胞孵育2 h后倒置显微镜镜下可见部分贴壁细胞和悬浮细胞。吸弃非贴壁细胞。第3 d可见部分细胞形态出现不规则, 细胞体积增大、悬浮细胞增多; 随着培养时间的延长, 悬浮细胞逐渐增多, 细胞体积逐渐增大, 表面毛刺状突起明显, 细胞集落逐渐增大, 集落数亦逐渐增多, 逐渐形成典型的DCs形态特征(图1)。



A: 培养3 d的DCs细胞; B: 培养5 d的DCs细胞; C: 培养7 d的DCs细胞。标尺=100 μm 。

A: DCs cultured for 3 d; B: DCs cultured for 5 d; DCs cultured for 7 d. Bar=100 μm .

图1 倒置显微镜下DCs形态

Fig.1 Morphology of the DCs under inverted microscope

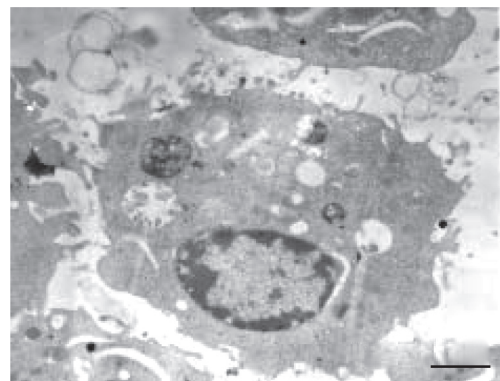
透射电镜分析: 经过7 d培养后的悬浮细胞经戊二醛和锇酸固定、梯度脱水及染色后作透射电镜观察。透射电镜可见悬浮细胞表面具有典型的DCs形态学特征: 由胞膜伸出长短不一的突起, 细胞核染色较深、形状不规则、多偏于一侧, 胞浆富含线粒体、较多吞饮小泡及大泡、较少溶酶体(图2)。

2.3 DC表型测定

应用流式细胞仪分别检测ADM处理的肿瘤抗原致敏的DC组和冻融抗原致敏的DC组, 表达 CD11c^+ 和 CD80^+ 的DCs分别为 $74.37\% \pm 7.62\%$ 和 $70.25\% \pm 8.54\%$, 两组DC免疫表型分子表达无显著差异($P > 0.05$)。

2.4 同种混合淋巴细胞反应

分别用不同抗原冲击致敏DC, 丝裂霉素处理后,



标尺=1 μm 。

Bar=1 μm .

图2 透射电镜下DCs超微结构

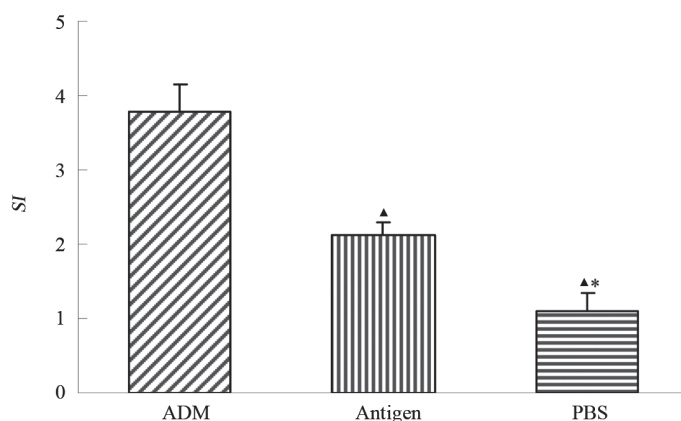
Fig.2 Morphology of the DCs under transmission electron microscope

MTT比色法测定淋巴细胞增殖, 其刺激指数阿霉素组(ADM)>冻融组(antigen)>对照组(PBS)($P<0.05$)(图3)。

2.4 致敏DCs诱导CTL对肿瘤细胞的细胞毒作用

不同方法处理的肿瘤细胞抗原修饰DCs, 以

1:10的比例与淋巴细胞混合培养6 d, 以不同比例加入肿瘤细胞培养过夜, MTT比色法测定T淋巴细胞的细胞毒作用; 其杀伤率阿霉素组(ADM)>冻融组(antigen)>对照组(PBS)($P<0.05$)(图4)。

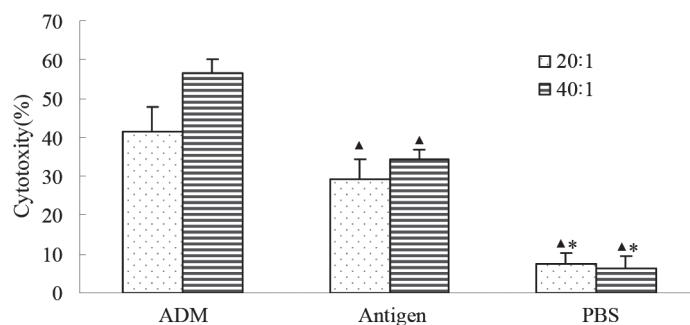


▲ $P<0.05$, 与ADM组比较; * $P<0.05$, 与冻融抗原组比较。

▲ $P<0.05$ vs ADM group; * $P<0.05$ vs antigen group.

图3 不同抗原致敏DCs的淋巴细胞刺激指数

Fig.3 The stimulating index of lymphocytes in different DCs



▲ $P<0.05$, 与ADM组比较; * $P<0.05$, 与冻融抗原组比较。

▲ $P<0.05$ vs ADM group; * $P<0.05$ vs antigen group.

图4 致敏DCs诱导CTL对U14细胞的细胞毒作用

Fig.4 The cytotoxicity of CTL induced by different DCs on U14

3 讨论

DCs是一类具有独特形态的细胞群体, 具有较强的抗原摄取、加工能力。DCs通过酶解抗原, 并以抗原肽-MHC复合物的形式表达于细胞表面, 该复合物能被T细胞所识别, 并能够刺激初始T细胞增殖, 激发特异性的细胞毒性作用。而肿瘤患者体内, 由于受肿瘤免疫抑制作用的影响, DCs处于失能状态, 难以激发机体有效的抗肿瘤免疫反应^[4]。为此, 如何提高肿瘤的免疫原性, 如何产生足够数量和质量的APC以提高DCs的抗原递呈能力, 这是目前肿瘤免

疫治疗面临的主要问题。

近年来, 众多学者通过各种方法培养、激活和致敏DCs, 研制DCs疫苗, 使其在诱导特异性免疫应答时发挥重要作用, 试图达到控制肿瘤的目的^[5]。化疗药物是抗肿瘤治疗的重要手段之一, 化疗药物可引起肿瘤细胞的死亡, 其死亡方式包括坏死或凋亡。这些死亡的细胞或其产物可向DCs提供抗原。研究表明ADM在体内外都能诱导免疫原性瘤细胞死亡, 而不影响DCs疫苗的免疫原性且能增强其抗肿瘤作用^[3]。本研究应用ADM处理肿瘤细胞以制备肿瘤抗

原致敏的DCs疫苗, 研究DCs诱导的淋巴细胞增殖反应和介导的细胞毒性T淋巴细胞对宫颈癌细胞的杀伤效应。结果显示ADM处理的U14细胞抗原致敏后的DCs组所激发和扩增的T细胞数及对宫颈癌细胞的杀伤效果显著高于对照组。

肿瘤本身虽是最丰富的肿瘤相关抗原的来源, 但DCs只存在于肿瘤邻近并不足以诱发抗肿瘤反应。DCs具有独特的途径吞噬、处理和递呈来自凋亡细胞的抗原, 并能诱发有力的免疫应答。对于来自肿瘤细胞的抗原的最适递呈, 不仅需要尚未成熟的DCs对凋亡细胞的吞噬, 而且需要DCs通过与凋亡肿瘤细胞或其产物接触从而活化和成熟^[6]。这些新发现提出了一种治疗可能性: DCs与凋亡体接触后, 提供肿瘤相关抗原及活化/成熟的环境。凋亡诱导治疗和DCs输注联合治疗还可排除基于MHC I类亚型对病人的选择, 有利于临床应用的进一步开展。同样, 他可排除根据确定的肿瘤相关抗原表达的病例标准和减少肿瘤处理过程中抗原丢失的问题。近来报道, DCs注入到高自发凋亡率的肿瘤后或DCs注入结合凋亡诱导治疗后, 可诱导抗肿瘤应答的产生^[7]。这些实验证实了体外生成的自身DCs的瘤内注入与凋亡治疗(化疗或放疗)结合诱导全身性抗癌免疫应答的设想。

虽确有理由认为APC可从凋亡肿瘤细胞有效地获得抗原并将其递呈给T细胞, 但其免疫作用尚有争论。巨噬细胞和DCs通过受体介导途径吞噬凋亡肿瘤细胞, 导致肿瘤抗原进入胞质, 并在APC的MHC I类分子上交叉递呈。因此, 化疗或放疗诱导的凋亡肿瘤细胞在理论上可能是抗肿瘤应答刺激的一种适当的抗原来源。据报道, 复发性或化疗难治性惰性和侵袭性淋巴瘤患者的低剂量受侵区域放疗可引起高度反应的细胞杀伤。

在探讨化疗诱发免疫原性瘤细胞凋亡时, 发现蒽环类抗生素在体内和体外均能引起免疫原性细胞死亡。ADM处理的瘤细胞激发细胞毒性免疫应答特别有效, 这种应答是由DCs介导的。ADM处理的

凋亡细胞为髓细胞样的和浆细胞样的DCs高效率吞噬, 可有效诱导抗肿瘤免疫应答必需的抗原特异性CTL。研究表明, ADM可增加胃癌细胞HSP70的表达以及DCs对肿瘤细胞组分的摄取从而上调IL-12^[8]。ADM处理的肿瘤细胞冲击的DCs对T细胞刺激后, IFN- γ 释放增加。实验证明, 早期凋亡的肿瘤细胞产物不能有效地交叉活化MHC I类限制的抗肿瘤淋巴细胞, 即使在DC成熟的条件存在的情况下亦然; 而凋亡(继发性坏死)与高度T细胞反应有关。据报道, 瘤苗接种前一次或反复给予ADM不会阻碍肽冲击DCs和可溶性抗原疫苗的免疫原性, 这种结合疗法可诱导有效的T细胞反应^[3]。提示ADM化疗和抗原特异性疫苗接种的结合可作为癌症患者的辅助治疗。

参考文献 (References)

- 1 Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-96.
- 2 Giboa E. DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* 2007; 117: 1195-203.
- 3 Casati A, Zimmermann VS, Benigni F, Bertilaccio MT, Bellone M, Mondino A. The immunogenicity of dendritic cell-based vaccines is not hampered by doxorubicin and melphalan administration. *J Immunol* 2005; 174(6): 3317-25.
- 4 梅林航, 刘小孙, 于吉人. 浆细胞样树突状细胞与实体肿瘤免疫逃逸. *现代免疫学* 2011; 31(3): 262-5.
- 5 袁婷婷, 刘艳荣. 树突状细胞生物学研究进展. *中国实验血液学杂志* 2010; 18(4): 1074-8.
- 6 Feng H, Zeng Y, Graner MW, Likhacheva A, Katsanis E. Exogenous stress proteins enhance the immunogenicity of apoptotic tumor cells and stimulate antitumor immunity. *Blood* 2003; 101(1): 245-52.
- 7 Choi GS, Lee MH, Kim SK, Kim CS, Lee HS, Im MW, *et al.* Combined treatment of an intratumoral injection of dendritic cells and systemic chemotherapy (Paclitaxel) for murine fibrosarcoma. *Yonsei Med J* 2005; 46(6): 835-42.
- 8 Zheng H, Li Z. Cutting edge: Cross-presentation of cell-associated antigens to MHC class I molecule is regulated by a major transcription factor for heat shock proteins. *J Immunol* 2004; 173(10): 5929-33.

Efficient Induction of a U14-specific Anti-tumor Response by Dendritic Cells Sensitized with ADM-U14 Antigen

Huang Yonghong¹, Wang Hongmei^{1*}, Zeng Xiaoping², Cai Zhenyu¹, Xu Fangyun¹

(¹Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Science, Nanchang University, Nanchang 330006, China;

²Department of Immunology, College of Basic Medical Science, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract Studies have shown that tumor cells treated with chemotherapy drugs can effectively stimulate the immune response, which is dependent on the nature of the tumor cells and chemotherapy drugs. We reported bone marrow derived-DCs were sensitized with the culture supernatants from mice ADM-U14 after centrifugation. Then, the lymphocyte proliferation and the cytotoxic effects induced by the sensitized DCs were evaluated using MTT assays. We found the number of lymphocyte proliferation and the killing effects on mice U14 cells in the sensitized DCs group were much higher than those in the control group. Thus our results suggest mice ADM-U14 antigen can effectively sensitize DCs, and activate T lymphocytes proliferation and produce cytotoxic T lymphocytes (CTLs) to kill tumor cells *in vitro*.

Key words dendritic cell; adriamycin; tumor immunotherapy; cervical carcinoma

Received: July 11, 2011 Accepted: October 8, 2011

This work was supported by the Foundation of the Education Department of Jiangxi Province (No.GJJ08086) and the Foundation of the Health Department of Jiangxi Province (No.20072015)

*Corresponding author. Tel: 86-791-8608348, E-mail: wanghongmay@hotmail.com