

*p53*转染黑色素瘤细胞修饰的树突状细胞疫苗体外抗肿瘤作用的研究

王冰^{1,2} 王红梅^{1*} 刘燕玲¹ 周晓燕¹ 周慧容¹ 徐方云¹ 闵卫平³

(¹南昌大学医学院病理生理学教研室, 南昌 330006; ²浙江省立同德医院, 杭州 310012;

³江西省医学科学研究院, 南昌 330006)

摘要 利用野生型*p53*质粒转染黑色素瘤B16细胞, 反复冻融法提取*p53*修饰的肿瘤抗原(*p53*-Ag), 将抗原体外冲击同基因小鼠骨髓来源的树突状细胞(dendritic cells, DC)制备特异性DC肿瘤疫苗; 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 lymphocytes, CTL)对黑色素瘤细胞的细胞毒效应, 分析其诱导肿瘤抗原特异性免疫应答的机制。结果显示, *p53*-肿瘤抗原冲击的DC可显著刺激淋巴细胞增殖, 其诱导的CTL效应对肿瘤细胞也有很好的杀伤效果。

关键词 树突状细胞; *p53*; 肿瘤抗原; 疫苗

Study of Anti-tumor Immunity *In Vitro* Induced by DC Vaccines Loaded by *p53*-modified Tumor Antigens

Wang Bing^{1,2}, Wang Hongmei^{1*}, Liu Yanling¹, Zhou Xiaoyan¹, Zhou Huirong¹, Xu Fangyun¹, Min Weiping³

(¹Department of Pathophysiology, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China; ²Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China; ³Jiangxi Academy of Medical Sciences, Nanchang 330006, China)

Abstract Tumor antigen (*p53*-Ag) was extracted from mouse B16 melanoma cells transfected with the wild-*p53* plasmid by freeze-thaw method. Then it was loaded onto dendritic cells (DC) harvested from the bone marrow to obtain DC tumor vaccine. The antigen-specific killing effect of cytotoxic T lymphocytes (CTL) activated by DC vaccine on cancer cells *in vitro* and the ability to induce proliferation of T cells were detected by MTT assay. The experiment results showed that *p53*-modified DC vaccine significantly up-regulated the proliferation of T lymphocytes and the killing rate by CTL on cancer cells.

Key words DC; *p53*; tumor antigens; vaccines

树突状细胞(dendritic cells, DC)作为体内功能最强的专职抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APC), 可高效地启动机体的初次免疫应答, 已成为近年肿瘤免疫研究的一个热点。DC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。DC可以清除化疗失败的恶性肿瘤甚至是肿瘤干细胞^[1], 大多数的免疫治疗体系

都是通过DC来实现的^[2-3]。因此, DC来源的肿瘤疫苗研究对肿瘤免疫治疗的发展和具有重要的意义。

*p53*是迄今为止发现与人类肿瘤相关性最为密切的基因之一^[4], 50%以上的各种人类恶性肿瘤中都可以观察到*p53*基因的突变^[5], 其后突变型*p53*发生过度表达。过度表达的P53蛋白肽由MHC I类分子

收稿日期: 2014-03-26 接受日期: 2014-10-02

江西省科技支撑计划(批准号: 2009BSD09600)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0791-86360562, E-mail: wanghongmay@hotmail.com

Received: March 26, 2014 Accepted: October 2, 2014

This work was supported by the Science and Technology Support Program of Jiangxi Province (Grant No.2009BSD09600)

*Corresponding author. Tel: +86-791-86360562, E-mail: wanghongmay@hotmail.com

网络出版时间: 2014-12-01 16:59 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.12.0092.html>

递呈,以肿瘤相关表位发挥作用。因此,*p53*基因成为人们关注的肿瘤免疫治疗的重要靶标。本研究采用野生型*p53*序列的免疫原性肽作为广谱的*p53*靶向肿瘤疫苗,同时联合树突状细胞,分析其诱导肿瘤抗原特异性免疫应答机制,以期为肿瘤的临床治疗寻找新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8周龄昆明(Km)小鼠(由南昌大学医学院动物科部提供);小鼠黑色素瘤(B16)细胞(由江西省医学科学院肿瘤研究室惠赠并在本研究室培养传代及保存);野生型*p53*质粒(78级美国校友罗志军教授惠赠);质粒小提试剂盒(美国Omega公司);脂质体Lipofectamine 2000(美国Gibco/Invitrogen公司);逆转录试剂盒、Real-time PCR试剂盒(日本TaKaRa公司);ECL化学发光液(美国Thermo公司);重组小鼠粒细胞集落刺激因子(GM-CSF,英国Peprotech公司);重组小鼠白介素-4(IL-4,英国Peprotech公司);PE标记的CD40抗体和FITC标记的CD80、CD86、CD11c抗体(美国BD公司)。

1.2 *p53*转染的黑色素瘤(B16)抗原的制备

1.2.1 *p53*质粒提取 常规方法培养大肠杆菌以扩增质粒。按Omega质粒小提试剂盒说明书提取质粒,分装于4℃保存。

1.2.2 脂质体转染B16细胞 转染前24 h,在2 mL无血清培养基中接种 5×10^5 细胞于6孔板,转染时细胞融合度为80%~90%,按Lipofectamine 2000产品说明书进行转染,设同条件培养的未转染细胞为对照。将细胞板置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,24 h后收集细胞,提取RNA做Real-time PCR检测,48 h收集细胞进行Western blot检测和提取抗原。转染4~6 h后可换新鲜培养基。

1.2.3 Real-time PCR和Western blot检测*p53*转染效率 收集转染24 h的细胞,用Trizol一步法提取细胞总RNA,检测其完整性和浓度,逆转录按照试剂盒要求进行,用SYBR Premix Ex Taq I kit检测目的产物,按照如下条件进行实时PCR反应:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,40个循环;95℃ 15 s;60℃ 1 min;95℃ 15 s。计算相对表达值,*p53*基因引物由Invitrogen公司设计合成,上游引物序列为5'-ACG CTT CTC CGA AGA CTG G-3',下游引物序列为5'-AGG GAG

CTC GAG GCT GAT A-3';转染后48 h收集细胞提取蛋白,BCA法测定蛋白浓度,加上样缓冲液于100℃恒温金属浴10 min至蛋白变性,-20℃保存备用。按上样、电泳、转膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗、曝光的步骤进行Western blot检测。

1.2.4 反复冻融法提取肿瘤抗原 分别将处于对数生长期的转染和未转染的B16细胞,用PBS调整密度为 2×10^7 /mL,在液氮中放置10 min后迅速置37℃水浴中至刚刚融化,再次放入液氮迅速冷冻,如此反复冻融5次。600 ×g离心20 min后收集细胞上清,再13 000 ×g离心1 h。经0.22 μm微孔滤膜过滤,分装后于-20℃保存备用。

1.3 肿瘤特异性DC疫苗的制备

取健康的6~8周龄Km小鼠,无菌取出股骨和胫骨,剪去骨两端,用5 mL灭菌注射器抽取PBS,分别从骨两端插入骨髓腔,反复冲洗出骨髓,直至骨变白,过200目钢网,收集骨髓细胞,Tris-NH₄Cl处理2~3 min去除红细胞,用PBS洗涤2次,0.2%台盼蓝拒染试验测细胞活力(>95%)。置于含GM-CSF(10 ng/mL)和IL-4(10 ng/mL)的RPMI-1640完全培养液(含100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺、1 mmol/L丙酮酸钠、体积分数10%的小牛血清), 10^6 细胞/mL培养于6孔板,每2 d半量换液一次。第5 d,加入经*p53*修饰的肿瘤抗原(100 μg/mL)共培养(未经*p53*转染的肿瘤细胞抗原做对照)。第6 d,加入LPS(100 ng/mL)培养48 h刺激其成熟。第8 d,收集悬浮和轻微贴壁的细胞即为培养成熟的DC。于倒置显微镜下观察其形态,流式细胞仪检测DC表面标志CD11c、CD40、CD80、CD86进行表型鉴定。

1.4 DC疫苗的体外活性观察

1.4.1 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,*p53*转染及未转染的B16肿瘤抗原致敏的DC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分别以1:20、1:40、1:80三个比例共同培养4 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*)值并计算刺激指数(stimulation index)。刺激指数(SI)=加刺激细胞组的*D*值/未加刺激细胞组的*D*值。

1.4.2 CTL的肿瘤特异性杀伤活性 同上法铺板,刺激细胞与反应细胞混合培养4 d作为效应细胞,分别为DC组、B16-DC组和*p53*-DC组,另取对数生长

期的B16细胞为靶细胞,以效靶比为1:20和1:40将靶细胞加入效应细胞中混合培养,每组3个平行孔,另设肿瘤细胞组、DC细胞组、淋巴细胞组做对照。放入培养箱内温育24 h,MTT比色法测CTL杀伤活性。用酶联免疫检测仪570 nm波长测吸光度(*D*)值。按下列公式计算细胞杀伤率:

$$\text{杀伤率}(\%) = [1 - (\text{实验孔}D\text{值} - \text{效应细胞孔}D\text{值}) / \text{靶细胞孔}D\text{值}] \times 100\%$$

1.5 统计学方法

所有细胞学实验均重复3次,计量数据以均数±标准差表示,组间差异的两两比较用*t*检验法,多组间差异的比较用方差分析法。用SPSS 10.0软件进行数据运算分析, $P \leq 0.05$ 为差异显著, $P \leq 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 RNA鉴定

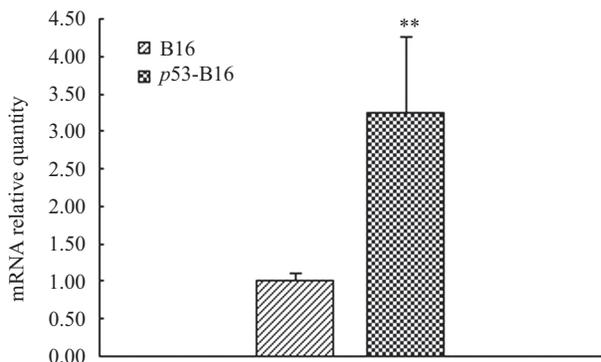
B16细胞转染*p53*前后分别提取细胞总RNA,经分光光度法测定其 D_{260}/D_{280} 在1.8~2.0之间。细胞总RNA做2%琼脂糖凝胶电泳分析:28S、18S条带清晰可见。

2.2 Real-time PCR检测转染前后P53的表达

转染后24 h提取细胞总RNA检测结果显示,转染后较转染前*p53*含量有了显著提高($P < 0.01$)(结果见图1)。

2.3 Western blot检测转染前后P53的表达

转染后48 h提取细胞总蛋白检测结果显示,转染后较转染前P53蛋白表达量有了显著提高($P < 0.01$)(结果见图2)。



** $P < 0.01$, 与B16组比较。

** $P < 0.01$ compared with B16 group.

图1 Real-time PCR检测转染前后*p53*的表达

Fig.1 Expression of *p53* before and after transfection tested by Real-time PCR

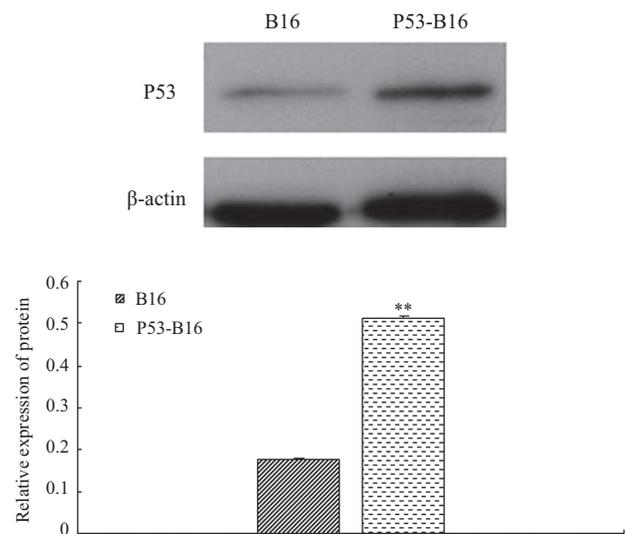
2.4 DC培养鉴定

2.4.1 DC光镜下形态 用小鼠重组GM-CSF和IL-4联合诱导培养DC的过程中发现,第2 d细胞较均匀地贴附于培养板底,有的呈簇状生长;第4 d增殖性细胞集落增多增大;第6 d有部分DC从集落上脱落,毛刺状突起出现;第8 d大量DC脱落,出现较多低密度的体积较大的悬浮细胞,细胞呈圆形或不规则形,表面有较多毛刺样突起(结果见图3)。

2.4.2 成熟DC表型分析 用流式细胞仪检测培养至第8 d的DC,成熟DC表面高表达CD80(83.8%)、CD86(84.8%)、CD40(85.6%)、CD11c(82.2%)(结果见图4)。

2.5 同种混合淋巴细胞反应

MTT测定结果显示,各组在刺激细胞:反应细胞比例为1:20时的刺激指数最高,DC组、B16-DC组、*p53*-DC组刺激指数分别为3.72、3.82和3.93,且对该比值中的三组之间作两两比较并无显著性差异($P > 0.05$);在1:40比值时,三组的刺激指数分别为1.49、2.49和2.93。B16-DC组与DC组之间存在极显著差异($P < 0.01$),而*p53*-DC组与DC组之间、*p53*-DC组与B16-DC组之间也都存在显著性差异($P < 0.05$);在1:80比值时,三组刺激指数分别为1.06、1.53和1.93。B16-DC组、*p53*-DC组与DC组比较均有显著差异($P < 0.05$),而*p53*-DC组与B16-DC组比较存在极

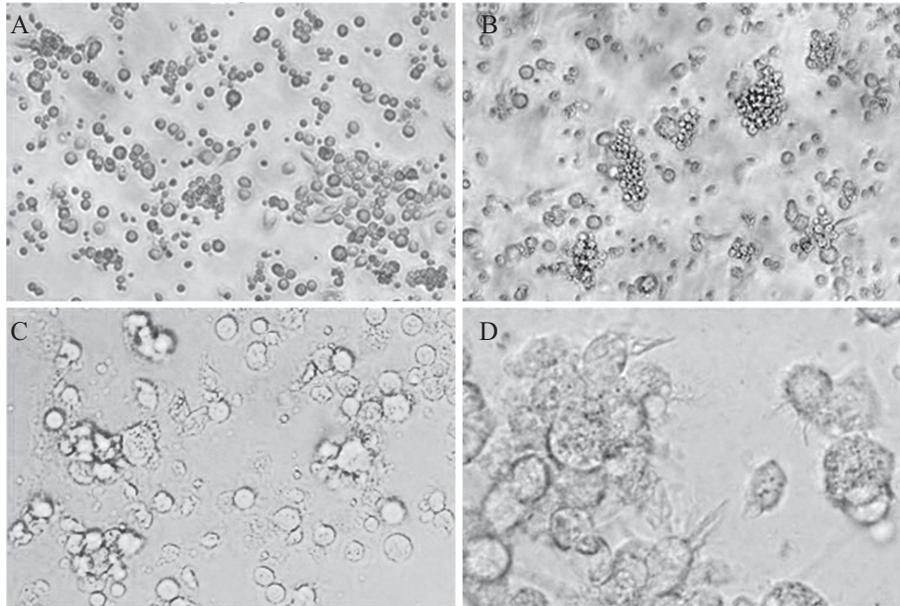


** $P < 0.01$, 与B16组比较。

** $P < 0.01$ compared with B16 group.

图2 Western blot检测转染前后P53的表达

Fig.2 Expression of P53 before and after transfection tested by Western blot



A、B: 培养第2, 4 d的DC(100×); C: 培养第6 d的DC(200×); D: 培养第8 d的DC(400×)。
A,B: DC on the 2th and 4th day (100×); C: DC on the 6th day (200×); D: DC on the 8th day (400×).

图3 DC在光镜下的形态变化

Fig.3 The changes of DC's morphology observed by optical microscopy

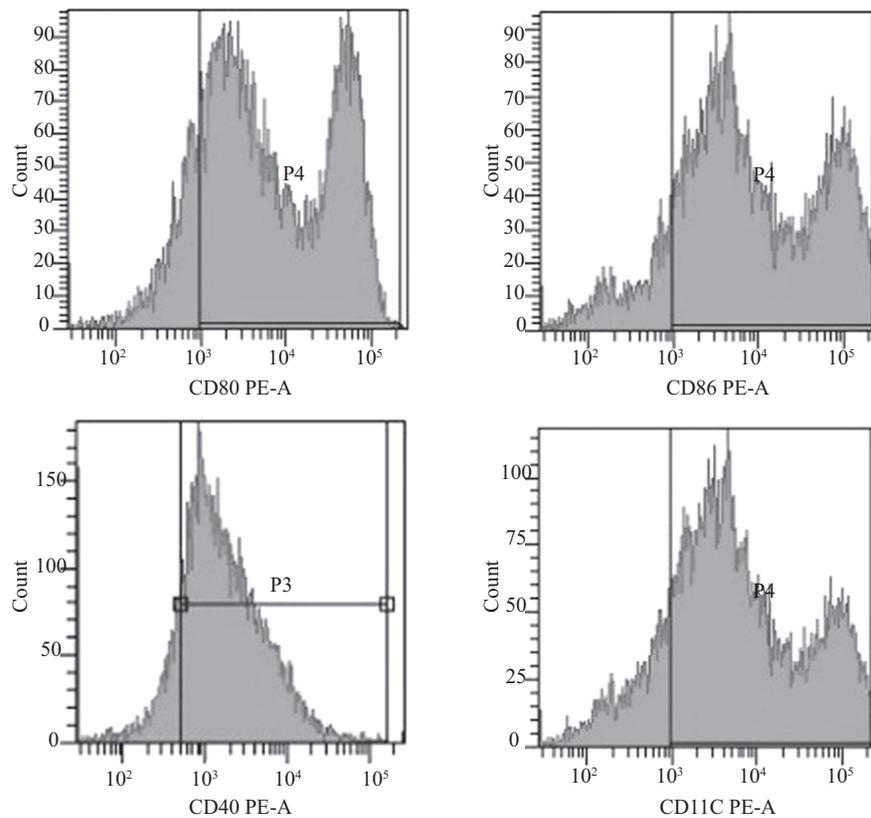


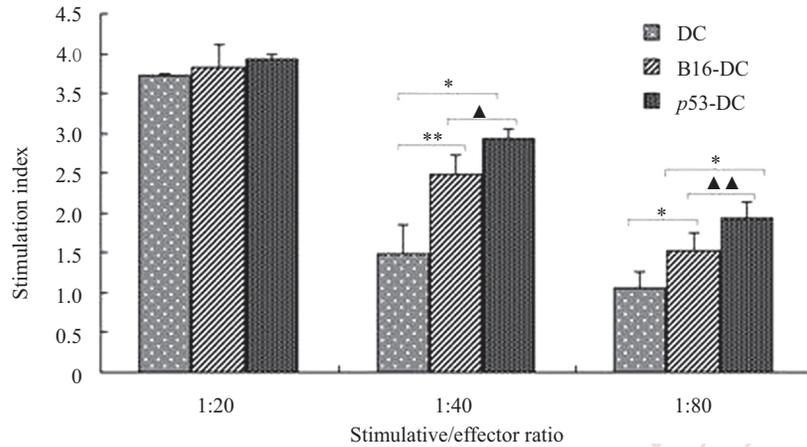
图4 成熟DC表型分析

Fig.4 Analysis for phenotype of mature DC

显著差异 ($P < 0.01$)。显示经过 *p53* 基因修饰抗原或未修饰抗原的冲击, 都能使 DC 发挥更强的刺激淋巴细胞增殖的能力(结果见图5)。

2.6 CTL的肿瘤特异性杀伤活性

MTT结果显示, 在效靶比为1:20时, 三组杀伤率分别为26.23%、33.35%和54.04%; 在效靶比为1:40

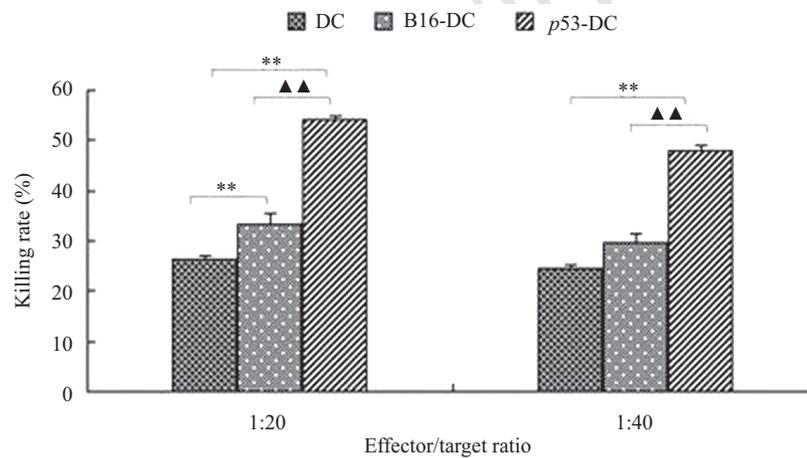


刺激细胞与反应细胞的比值为1:20、1:40和1:80时, DC组、B16-DC组和p53-DC组的刺激指数结果。*t*检验, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ 。

Stimulation index of group DC, B16-DC and p53-DC when ratios of stimulated cells and effector cells were 1:20, 1:40 and 1:80. *t* test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$.

图5 DC疫苗对淋巴细胞的增殖实验结果

Fig.5 The proliferation experimental results of DC vaccine on lymphocytes



效靶比为1:20和1:40时DC组、B16-DC组和p53-DC组对肿瘤细胞的杀伤率。*t*检验, ** $P < 0.01$, ▲▲ $P < 0.01$ 。

Killing rates of group DC, B16-DC and p53-DC when the ratios of effector cells to target cells were 1:20, 1:40 and 1:80. *t* test, ** $P < 0.01$, ▲▲ $P < 0.01$.

图6 DC疫苗对肿瘤细胞的杀伤实验结果

Fig.6 The killing experimental results of DC vaccine on tumor cells

时, 三组杀伤率分别为24.33%、29.54%和48.09%。比较发现, 以效靶比为1:20时的杀伤率更高。在效靶比为1:20时, B16-DC组和p53-DC组都比DC组显示了更高的杀伤率, 两组间比较均有极显著性差异($P < 0.01$), p53-DC组与B16-DC组比较, 也有极显著差异($P < 0.01$)。在效靶比为1:40时, p53-DC组的杀伤率与DC组、B16-DC组相比, 差异均有极显著意义($P < 0.01$), 但B16-DC组与DC组相比差异不明显($P > 0.05$)。提示p53转染修饰肿瘤抗原进一步提高了DC的CTL对肿瘤细胞的特异性杀伤活性。结果见图6。

3 讨论

肿瘤免疫治疗在于激发和增强机体的免疫功能, 提高肿瘤微环境抗肿瘤免疫力, 从而控制和杀伤肿瘤细胞。肿瘤免疫学治疗的方法种类繁多, 经与现代生物技术结合, 发展成为继手术、化疗和放疗之后的第四种肿瘤治疗模式。DC作为肿瘤免疫治疗体系中最关键的抗原提呈细胞, 以其为来源的DC疫苗更是成为近年研究的热点。目前国内外学者应用各种方法将DC进行处理, 在体外扩增活化, 并予以相应的抗原刺激以制成DC疫苗, 然后回输患者体内进行免疫治疗。DC疫苗正在被广泛地应用于动

物实验和临床试验,尤其在对黑色素瘤^[6]、宫颈癌^[7]、卵巢癌^[8]和乳腺癌^[9]等的实验性治疗中更是取得了显著的成果。*p53*突变可发生于分子内的不同位点,治疗前需鉴定每个病人的*p53*突变;再者,并非所有突变都发生于MHC结合表位内,病人的原发癌和转移灶也可表达不同的*p53*突变,从而限制了突变特异性*p53*基础上的免疫治疗。然而,这些突变可导致在非突变蛋白中正常看不到的有关P53蛋白处理水平和野生型*p53*表位递呈水平的增加。因此,将野生型*p53*序列制成可作为抗原的完整的*p53*序列而用于肿瘤的免疫治疗,可导致识别*p53*过度表达肿瘤的野生型P53肽特异性CTL及抗体的产生。目前用于肿瘤特异性主动免疫治疗的DC疫苗大致可分为DC多肽疫苗和DC基因疫苗^[10]。本研究正是利用野生型*p53*基因转染的黑色素瘤细胞,制备修饰的肿瘤全抗原*p53*-Ag,用于体外冲击树突状细胞制得DC疫苗。

我们的研究发现,*p53*修饰的DC疫苗在体外能够有效提高淋巴细胞的增殖能力和CTL对肿瘤细胞的杀伤能力。体外混合淋巴细胞培养的结果证实,当刺激细胞:反应细胞比例分别为1:40和1:80时,*p53*修饰的DC疫苗刺激淋巴细胞增殖的能力更强,其刺激指数比单纯DC和未修饰的肿瘤抗原刺激的DC疫苗更高。本研究采用MTT法检测DC诱导的肿瘤特异性杀伤活性后发现,各实验组在效靶比为1:20时的杀伤率均最高,无论是未修饰的B16-DC疫苗,还是*p53*修饰的*p53*-DC疫苗都显示出良好的杀伤活性,与未加抗原刺激的单纯DC相比,差异均十分显著,且经修饰的*p53*-DC疫苗的杀伤率也明显高于未修饰的B16-DC疫苗;虽然在效靶比为1:40时各组杀伤率有所降低,但*p53*修饰的DC疫苗的杀伤率仍显著高于未修饰的DC疫苗。

本研究结果显示,*p53*-肿瘤抗原冲击树突状细胞制得的DC疫苗对黑色素瘤细胞有较好的抑瘤效果,为肿瘤免疫治疗开辟了新的途径。然而,如何提高转染和表达效率以及安全有效地应用于临床治疗还有待深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006; 355(12): 1253-61.
- 2 Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, Schuler G. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* 2001; 106(3): 271-4.
- 3 Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2003; 15(2): 138-49.
- 4 Clegg H, Itahana K, Zhang Y. Unlocking the Mdm2-p53 loop: Ubiquitin is the key. *Cell Cycle* 2008; 7(3): 287-92.
- 5 Soussi t, Beroud C. Assessing Tp53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(3): 233-40.
- 6 Komita H, Zhao X, Katakam AK, Kumar P, Kawabe M, Okada H, *et al.* Conditional interleukin-12 gene therapy promotes safe and effective antitumor immunity. *Cancer Gene Ther* 2009; 16(12): 883-91.
- 7 Santin AD, Bellone S, Palmieri M, Zanolini A, Ravaggi A, Siegel ER, *et al.* Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage I B or II A cervical cancer patients: A phase I escalating-dose trial. *J Virol* 2008; 82(4): 1968-79.
- 8 Chiang CL, Ledermann JA, Aitkens E, Benjamin E, Katz DR, Chain BM. Oxidation of ovarian epithelial cancer cells by hypochlorous acid enhances immunogenicity and stimulates T cells that recognize autologous primary tumor. *Clin Cancer Res* 2008; 14(15): 4898-907.
- 9 Yang BB, Lum P, Chen A, Arends R, Roskos L, Smith B, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives on the clinical drug development of panitumumab. *Clin Pharmacokinet* 2010; 49(11): 729-40.
- 10 代国知, 袁红霞, 陈虹亮. 基于树突状细胞的肿瘤免疫治疗研究进展. *现代肿瘤医学* (Dai Guozhi, Yuan Hongxia, Chen Hongliang. Progress in dendritic cells cell-based immunotherapy of tumor. *Journal of Modern Oncology*) 2012; 20(2): 409-11.