

· 论 著 ·

树突状细胞疫苗联合 CpG-ODN 对膀胱肿瘤细胞的免疫学效应研究

聂志林, 靳风烁, 张克勤, 梁培禾, 叶 锦

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨负载肿瘤抗原的树突状细胞(DC)疫苗联合含未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤(CpG)序列的寡脱氧核糖核苷酸(CpG-ODN)对膀胱肿瘤细胞的免疫学效应。**方法** 用小鼠 BTT739 细胞反复冻融抗原致敏培养第 7 天的 DC, 48h 后分别加入 CpG-ODN 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导 DC 成熟, 制备负载肿瘤抗原的 DC 疫苗, 灭活后用于刺激 T 淋巴细胞制备效应细胞(CTL), 乳酸脱氢酶释放实验测定各组 CTL 对 BTT739 细胞的杀伤活性, ELISA 法测定效应细胞培养上清液的干扰素- γ (IFN- γ)水平, 同时检测了 CTL 对自体淋巴细胞的杀伤活性。**结果** 负载肿瘤抗原的 DC 诱导的效应细胞分泌较高水平的 IFN- γ , 并对 BTT739 细胞具有较高的杀伤效应, CpG-ODN 活化的 DC 疫苗诱导的效应细胞分泌 IFN- γ 水平及对肿瘤细胞的杀伤活性均高于 TNF- α 活化的 DC 疫苗诱导的效应细胞($P < 0.01$)。DC 疫苗对自体淋巴细胞无明显免疫杀伤活性。**结论** CpG-ODN 可增强负载肿瘤抗原的 DC 疫苗对膀胱肿瘤细胞的免疫杀伤效应, 并且对自体淋巴细胞无免疫杀伤活性, 为膀胱癌的免疫治疗提供了实验基础。

关键词:膀胱肿瘤; 树突状细胞; 疫苗; 寡脱氧核糖核苷酸

中图分类号: R737.14; R730.51

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)24-3122-03

Immunological effects of dendritic cells plused with tumor antigen in combination with CpG oligodeoxynucleotide on bladder tumor cells in vitro

NIE Zhi-lin, JIN Feng-shuo, ZHANG Ke-qin, et al.

(Department of Urology, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the immunological effects of dendritic cells plus tumor antigen in combination with CpG oligodeoxynucleotide on bladder tumor cells in vitro. **Methods** After 7d culture, DCs were plused with BTT739 cell antigen and CpG-ODN, TNF- α were added. The antitumor immune responses of DCs plused with BTT739 cell antigen against BTT739 cells was assessed by determining the potent effect of cytotoxic T lymphocytes(CTL) response in vitro. The production of interferon- γ (IFN- γ) by CTL was assessed by ELISA assay. CTL-mediated cell lysis to autologous lymphocytes was also assayed. **Results** The production of IFN- γ and specific lysis of BTT739 by effector cells stimulated by DC vaccine generated with CpG-ODN were higher than that generated with TNF- α ($P < 0.01$), whereas DC vaccine had no killing effects to autologous lymphocytes. **Conclusion** CpG-ODN can enhance the cytotoxicity of DC vaccine on bladder tumor cells. DC vaccine has no killing effects to autologous lymphocytes. This founding shows that the DC vaccine has characteristics of high effects and good safety and provides the experimental foundation of immunotherapy for bladder tumor.

Key words: bladder tumor; dendritic cell; vaccine; oligodeoxynucleotide

细菌 DNA 具有强大的免疫刺激活性, 其基础是以未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤(CpG)二核苷酸为核心的 6 碱基序列^[1], 已有研究表明人工合成的含 CpG 序列的寡脱氧核糖核苷酸(CpG Oligodeoxynucleotide, CpG-ODN)可诱导 DC 成熟^[2-3]。为探讨 CpG-ODN 对负载肿瘤抗原的 DC 疫苗的抗肿瘤细胞杀伤作用的影响, 本试验制备了负载 BTT739 膀胱肿瘤细胞抗原的 DC 疫苗, 并用 CpG-ODN 诱导成熟, 观察了该疫苗刺激的效应细胞 IFN- γ 释放水平及其体外对 BTT739 肿瘤细胞的免疫杀伤效应。

1 材料与方 法

1.1 材料 BTT739 小鼠膀胱肿瘤细胞株本科实验室保存。T739 近交系小鼠, 5 周龄, 体质量 20~25g, 雌雄不拘, 中国医学科学院肿瘤研究所实验动物中心提供; 重组小鼠 GM-CSF、IL-4、TNF- α 及乳酸脱氢酶释放试验试剂盒购于美国 Promega 公司; 鼠 IFN- γ ELISA 检测试剂盒购于深圳晶美公司; 参照文献^[4] CpG-ODN(ATA ATC GAC GTT CAA GCA AG)及 non-CpG-ODN(ATA ATG CAG CTT CAA GCA AG)由上海生工生物技术公司合成, 两端均用磷硫酰修饰。

1.2 BTT739 细胞冻融全抗原的制备 参照文献^[5-6]方法, 制备 BTT739 肿瘤细胞冻融粗提全抗原, 于-20℃保存备用。

1.3 负载肿瘤抗原的 DC 疫苗的制备 参照文献^[5-6]方法, 采用体外冲击致敏法: 收获培养第 7 天的 DC^[3], 调整浓度为 1×10^6 cells/mL, 常规台盼蓝试验示活细胞数大于 90%; 每孔按 DC 与抗原细胞的比例 1:10(抗原的量以冻融前肿瘤细胞的量计)加入 BTT739 肿瘤细胞冻融抗原。加入 rmGM-CSF、rmIL-4, 使其终浓度分别为 500u/mL、200u/mL, 继续置于 37℃, 5%CO₂ 饱和湿度孵箱中培养, 培养 48h, 分别加入 CpG-ODN、TNF- α 使其终浓度分别为 2 μ mol/L、20ng/mL, 继续培养 48h 后收获 DC 细胞即为负载 BTT739 肿瘤细胞冻融抗原的 DC 疫苗。设未加入 BTT739 肿瘤细胞冻融抗原、CpG-ODN 活化的 DC 为对照组。

1.3 负载肿瘤抗原的 DC 疫苗的体外免疫学效应

1.3.1 效应细胞准备 分离 T739 小鼠脾淋巴细胞, RPMI1640-10%FCS 培养基重悬为 5×10^6 cells/mL。将上述负载 BTT739 细胞冻融抗原和未负载抗原的 DC 用 RPMI1640 培养基重悬为 1×10^6 cells/mL, 加入 25 μ g/mL 丝裂霉素 C, 37℃温

育 45min, 灭活, 把经灭活的 DC 按每孔 1mL (1×10^6 cells/mL) 接种于 6 孔板, 按照 1:5 的比例分别与分离的 T 淋巴细胞共培养, 即每孔各加入 1mL T 淋巴细胞, 在含有 IL-2 200u/mL 的 RPMI1640-10%FCS 完全培养基中 37°C、5%CO₂ 饱和湿度细胞培养箱中培养, 第 3 天补加一次 IL-2 (200u/mL)。第 7 天收集悬浮的细胞即为 DC 刺激的效应细胞即 CTL, 收集上清液 ELISA 法检测 INF- γ 水平。设 IL-2 刺激的 T 淋巴细胞为对照组。

1.3.2 靶细胞准备 收集处于对数生长期的 BTT739 细胞, 用 D-Hank's 液漂洗 3 次, 弃上清, 沉淀细胞用含 RPMI1640-10%FBS 培养基重悬, 调整靶细胞浓度为 2×10^5 cells/mL 培养基。

1.3.3 靶细胞杀伤测定 采用 non-radioactive cytotoxicity Assay 法测定在效应细胞作用下, 靶细胞裂解后乳酸脱氢酶的释放(乳酸脱氢酶释放试验), 进一步得出靶细胞被杀伤的情况。按照说明书进行操作。培养 BTT739 细胞调整浓度为 2×10^5 /mL。96 孔细胞培养板, 各孔设置如下。(1) 实验孔: 含靶细胞和含不同数量效应细胞(效/靶比, E/T, 分别为 40:1、20:1、10:1、5:1)的培养基各 50 μ L。(2) 效应细胞自发释放对照孔: 与实验孔效应细胞加样相同。(3) 靶细胞自发释放对照孔: 与实验孔靶细胞加样相同。(2)、(3)用 50 μ L 无细胞培养液补足 100 μ L。(4) 靶细胞最大释放对照孔: 与靶细胞自发释放对照相同。(5) 培养液背景对照孔: 无细胞培养基 100 μ L; (6) 体积校正对照孔: 无细胞培养基 100 μ L 及 10 \times 细胞裂解液 10 μ L。以上均为三复孔。加样后离心 (250g, $\times 4$ min), 37°C 孵育 3h 15min 时靶细胞最大释放孔加入 10 \times 裂解液 10 μ L, 至 4h 时离心后取上清液 50 μ L 进行测定。另设 LDH 阳性对照孔, 加入 50 μ L 1:5 000 稀释的 LDH 阳性对照原液。测定缓冲液重新溶解底物, 每孔中加入 50 μ L, 室温避光孵育 30min, 每孔加入 50 μ L 终止液。490nm 波长测定各孔 OD 值后, 取三复孔平均值, 计算以下各数值: (1) 实验孔校正值 (experimental) = 实验孔值 - 培养液背景对照值; (2) 效应细胞自发释放对照校正值 (effector spontaneous) = 效应细胞自发释放对照值 - 培养液背景对照值; (3) 靶细胞自发释放对照校正值 (target Spontaneous) = 靶细胞自发释放对照值 - 培养液背景对照值; (4) 靶细胞最大释放对照校正值 (target maximum) = 靶细胞最大释放对照值 - 体积校正对照值。然后按以下公式计算靶细胞杀伤率: cytotoxicity (%) = [(experimental - effector spontaneous - target spontaneous) / (target maximum - target spontaneous)] $\times 100$ 。

1.4 效应细胞对自体淋巴细胞的免疫杀伤活性 采用乳酸脱氢酶释放试验, 方法同前。以自体淋巴细胞为靶细胞, 与负载肿瘤抗原的 DC 共培养的淋巴细胞为效应细胞。设置 40:1、20:1、10:1、5:1 不同的效/靶比 (E/T)。

1.5 统计学方法 采用 SPSS10.0 软件进行, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用非配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 负载肿瘤抗原的 DC 疫苗联合 CpG-ODN 对膀胱肿瘤细胞的免疫学效应

2.1.1 负载肿瘤抗原 DC 刺激的效应细胞释放 INF- γ 水平 负载 BTT739 细胞抗原的 DC 刺激的效应细胞 (C、D 组) 可释放 INF- γ , 其释放水平高于未负载肿瘤抗原的 DC 刺激的效应细胞及 IL-2 刺激的 T 淋巴细胞对照组 (A、B 组) ($P < 0.01$),

CpG-ODN 活化的 DC 疫苗刺激的效应细胞 (D 组) 释放 INF- γ 水平显著高于 TNF- α 活化的 DC 疫苗刺激的效应细胞 (C 组) ($P < 0.01$), 两对照组 (A、B 组) 之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 负载 T739 冻融抗原的 DC 致敏的效应细胞分泌 INF- γ 水平 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	INF- γ 水平
A	338.14 \pm 40.55
B	376.64 \pm 44.03
C	1 731.58 \pm 189.22 ^a
D	2 601.65 \pm 262.28 ^{ab}

与 A、B 组比较, ^a: $P < 0.01$; 与 C 组比较, ^b: $P < 0.01$ 。

2.1.2 负载肿瘤抗原的 DC 诱导的 CTL 对 BTT739 细胞免疫杀伤效应 在不同效/靶比, 负载肿瘤抗原 DC 疫苗诱导的 CTL 效应细胞 (C、D 组) 对 BTT739 细胞的杀伤率均明显高于对照组 (A、B 组), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。CpG-ODN 活化的 DC 疫苗刺激的效应细胞 (D 组) 的杀伤活性显著高于 TNF- α 活化的 DC 疫苗刺激的效应细胞 (C 组), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。随着效/靶比提高, 效应细胞对 BTT739 细胞的杀伤率亦相应加强, 但两对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 负载 BTT739 抗原的 DC 诱导的 CTL 在不同效/靶比对 BTT739 细胞的杀伤活性 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	40:1	20:1	10:1	5:1
A	9.48 \pm 1.52	8.83 \pm 1.84	7.24 \pm 2.10	5.80 \pm 1.76
B	11.63 \pm 2.53	9.69 \pm 1.68	7.91 \pm 1.16	7.26 \pm 1.24
C	46.96 \pm 2.77 ^a	36.36 \pm 2.33 ^a	20.12 \pm 2.28 ^a	16.33 \pm 1.56 ^a
D	74.41 \pm 3.18 ^{ab}	58.73 \pm 3.13 ^{ab}	32.93 \pm 2.15 ^{ab}	22.15 \pm 2.35 ^{ab}

与 A、B 组比较, ^a: $P < 0.01$; 与 C 组比较, ^b: $P < 0.01$ 。

2.2 负载肿瘤抗原的 DC 疫苗活化的效应细胞对自体淋巴细胞的杀伤活性 见图 1。在各效/靶比时, IL-2 刺激的 T 淋巴细胞组 (A 组)、未负载肿瘤抗原 CpG-ODN 活化的 DC 组 (B 组)、负载肿瘤抗原后 TNF- α 活化的 DC 组 (C 组)、负载肿瘤抗原后 CpG-ODN 活化的 DC 组 (D 组) 对自体淋巴细胞无明显的杀伤活性。

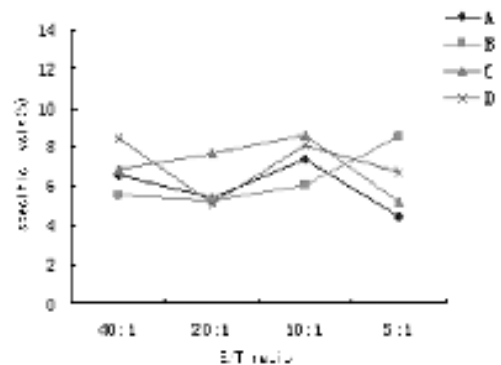


图 1 DC 疫苗特异性 CTL 细胞对自体淋巴细胞的杀伤活性

3 讨 论

DC 是目前发现的体内功能最强, 也是惟一能激活初始型

T 淋巴细胞的抗原递呈细胞。随着对 DC 的深入了解,以 DC 为基础的肿瘤疫苗研究已成为热点。DC 疫苗主要有三大类:肿瘤抗原肽修饰的 DC;细胞性肿瘤抗原修饰的 DC、肿瘤抗原或细胞因子基因修饰的 DC^[7-8]。由于目前肿瘤特异性抗原或相关性抗原得到明确鉴定的为数甚少,尤其是在膀胱肿瘤中,因而予以瘤细胞全部抗原信息(如肿瘤细胞降解物、肿瘤细胞提取物、肿瘤细胞的总 RNA 或经过灭活的完整的肿瘤细胞)修饰 DC 不失为一种简便而有实效的方法。本研究采用反复冻融法提取膀胱肿瘤细胞全抗原,体外冲击致敏 DC,制备了负载肿瘤抗原的 DC 疫苗。

CpG-ODN 作为免疫佐剂,可明显促进 Th1 型免疫应答的产生^[9],并且可促进 DC、巨噬细胞等抗原递呈细胞的成熟和分化。目前 CpG-ODN 联合抗体、细胞因子治疗肿瘤的研究已逐步展开,但联合 DC 疫苗的研究国内外较少,尤其是在膀胱肿瘤的研究未见报道。

本实验结果显示,负载肿瘤抗原的 DC 疫苗刺激的效应细胞释放 IFN- γ 水平显著高于未负载肿瘤抗原的 DC 刺激的效应细胞和 IL-2 刺激的 T 淋巴细胞,CpG-ODN 活化的 DC 疫苗刺激的效应细胞分泌 IFN- γ 水平显著高于传统方法 TNF- α 活化的 DC 疫苗刺激的效应细胞,而 IFN- γ 作为 Th1 型细胞因子的重要一员,主要由活化的 CD4⁺ T 细胞、NK 细胞和几乎所有的 CD8⁺ T 细胞分泌,具有较强的抗肿瘤的免疫调节作用,测定负载肿瘤抗原的 DC 疫苗致敏的效应细胞分泌 IFN- γ 的水平,可以反映其对 Th1 型细胞免疫的诱导能力。该结果表明,负载肿瘤抗原的 DC 疫苗可通过刺激效应细胞 IFN- γ 的分泌,激发机体的抗肿瘤能力,CpG-ODN 可通过提高 DC 疫苗刺激的效应细胞分泌 IFN- γ 水平,进一步增加负载肿瘤抗原的 DC 疫苗的抗肿瘤效应。

为进一步观察负载小鼠 BTT739 细胞抗原的 DC 致敏的效应细胞(CTL)对 BTT739 细胞的杀伤作用,作者采用乳酸脱氢酶释放试验对 CTL 活性进行了检测。结果显示,在不同效/靶比,负载 BTT739 细胞抗原的 DC 刺激的效应细胞对 BTT739 肿瘤细胞的杀伤活性显著大于实验对照组(未负载肿瘤抗原的 DC 刺激的效应细胞和 IL-2 刺激的 T 淋巴细胞),而两对照组间无显著差异,随着效/靶比的增高,其杀伤活性增强。并且 CpG-ODN 活化的 DC 疫苗刺激的效应细胞对肿瘤细胞的杀伤活性高于传统的 TNF- α 活化 DC 疫苗的方法,表明 CpG-ODN 可通过提高 DC 疫苗刺激的效应细胞对肿瘤细胞的杀伤活性,增加 DC 疫苗的抗肿瘤效应。

CD8⁺ 细胞毒 T 细胞是杀伤肿瘤细胞的主要效应细胞,它的激活是受 MHC-I 类分子限制的,增强 MHC-I 类分子的抗原递呈途径,对肿瘤细胞的杀伤无疑起到至关重要的作用。作者的结果表明,DC 可有效捕获、递呈膀胱癌抗原并诱导膀胱癌特异性 CTL,启动广泛的 Th1 和 CTL 的免疫应答,对膀胱癌细胞产生高效的免疫杀伤效应,CpG-ODN 可增强 DC 疫苗的这种免疫学效应。

由于肿瘤细胞裂解物中可能含有机体的正常抗原,那么负载肿瘤抗原的 DC 疫苗活化 CTL 是否会成为自身反应性 T 淋巴细胞,能否自体淋巴细胞或白细胞的破坏,引发自体免疫性疾病的产生?作者检测了负载肿瘤抗原的 DC 疫苗刺激的效应细胞对自体淋巴细胞的免疫活性,发现该疫苗对自体淋巴细

胞无明显杀伤活性,表明负载肿瘤抗原 DC 疫苗是安全的,不会诱发自身反应性淋巴细胞的过度增加和自体淋巴细胞的破坏。相关的临床实验也未发现与之相关的自身免疫性疾病^[10]。

本实验成功制备了负载 BTT739 抗原的 DC 疫苗,该疫苗诱导的效应细胞分泌高水平的 IFN- γ ,并可高效杀伤 BTT739 细胞,CpG-ODN 可增强该疫苗的免疫效应,并且对自体淋巴细胞无免疫杀伤活性,说明该疫苗具备高效、安全的特点。

参考文献:

- [1] Krieg AM, Love-Homan L, Yi AK, et al. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to listeria monocytogenes challenge[J]. *J Immunol*, 1998, 161(5):2428.
- [2] Pilon TS, Li W, Briggs JJ, et al. Immunostimulatory effects of CpG-ODN upon dendritic cell-based immunotherapy in a murine melanoma model[J]. *J Immunother*, 2006, 29(4):381.
- [3] 聂志林, 靳风烁, 梁培禾, 等. CpG-ODN 促进小鼠骨髓来源的树突状细胞成熟作用的实验研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(2):136.
- [4] Actins H, Davis BR, Kirby JA, et al. Polarisation of a T-helper cell immune response by activation of dendritic cells with CpG-containing oligonucleotides: a potential therapeutic regime for bladder cancer immunotherapy[J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(12):2312.
- [5] 高维实, 闵军, 褚忠华, 等. 肝癌细胞冻融抗原负载树突状细胞疫苗的制备与活化[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(9):1279.
- [6] Silke G, Michael S, Herbert R. Dendritic cells pulsed with tumor-derived lysate augment T cell mediated tumor cell lysis[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004, 131(2):176.
- [7] Kono K, Takasha A, Sugai H, et al. Dendritic cells pulsed with HER-2/neu derived peptides can induce specific cell responses in patient with gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(11):3394.
- [8] Nair SK, Morse M, Boczkowski D, et al. Induction of tumor specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA transfected dendritic cells[J]. *Ann Surg*, 2002, 235(4):540.
- [9] Krieg AM. Mechanism and application of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1489(1):107.
- [10] Caux C, Massacrier C, Dubois B, et al. Respective involvement of TGF- β and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34⁺ progenitors[J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 66(5):781.

(收稿日期:2009-04-23 修回日期:2009-06-15)