

· 论 著 ·

## CpG-ODN 加强树突状细胞疫苗治疗小鼠膀胱肿瘤的实验研究

聂志林, 梁培禾, 霍文谦, 张克勤, 靳风烁<sup>△</sup>

(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 探讨含 CpG 序列的寡脱氧核糖核苷酸(CpG-ODN)对树突状细胞(DC)疫苗治疗小鼠膀胱肿瘤作用的影响。方法 应用 CpG-ODN 作为 DC 成熟的刺激信号,体外诱导 DC 成熟,BTT739 膀胱肿瘤细胞抗原提取物致敏 DC 制备 DC 疫苗,建立 BTT 739 荷瘤小鼠动物模型,随机分为磷酸盐缓冲液(PBS)对照组、DC 疫苗组、CpG-ODN 组、DC+CpG-ODN 联合治疗组,于肿瘤细胞接种后第 7、14 天给予治疗,每组分 2 个亚组,分别用于测量瘤重、体积及用于观察荷瘤小鼠存活情况。流式细胞仪检测肿瘤组织中浸润性树突状细胞(TIDC)表面共刺激分子 CD80、CD86 的表达。结果 第 2 次治疗 7 d 后,联合治疗组平均瘤重及平均肿瘤体积均显著低于其余 3 个组( $P < 0.01$ ),荷瘤小鼠生存期显著长于其余 3 个组( $P < 0.05$ )。肿瘤组织中 TIDC 表面 CD80、CD86 表达水平,联合治疗组略高于 CpG-ODN 组,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但均显著高于 PBS 对照组和 DC 疫苗组( $P < 0.05$ )。结论 CpG-ODN 可增强负载肿瘤抗原的 DC 疫苗对膀胱肿瘤荷瘤小鼠的抑瘤效应和生存期延长作用,其机制主要是通过诱导 DC 成熟。

**关键词:**寡脱氧核糖核苷酸;膀胱肿瘤;树突状细胞;疫苗

中图分类号:R737.14

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)06-648-03

## Study on enhancement of DC vaccine to murine bladder carcinoma by CpG oligodeoxynucleotide

NIE Zhi-lin, LIANG Pei-he, HUO Wen-qian, et al.

(Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital,

Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To investigate whether CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) can affect the immunotherapeutic effects of DC vaccine on murine bladder carcinoma. **Methods** CpG-ODN was used to promote maturation of DCs in vitro. DCs were plused with BTT739 cell antigen and DC vaccine was prepared. After the BTT739 bladder tumor model in 48 T739 mice were successfully established, phosphate buffered saline, DC vaccine, CpG-ODN and DC+CpG-ODN were injected respectively into the margins of the tumor(peritumoral) on 7 d and 14 d after tumor cells inoculation. Tumor weight, volume and the life span of mice were recorded. The expression levels of CD80 and CD86 on TIDC of tumor tissues were detected by flow cytometry. **Results** On 7 d after the second injection, average tumor weight and average tumor volume in DC+CpG-ODN group was lower than those in control group, DC group and CpG-ODN group ( $P < 0.01$ ). The life span of mice in DC+CpG-ODN group was significantly longer than that in the other three groups ( $P < 0.05$ ). The expression levels of CD80 and CD86 on TIDC in DC+CpG-ODN group and CpG-ODN group were higher than that in control group and DC group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CpG-ODN can enhance the immunotherapeutic effects of DC vaccine on inhibiting tumor growth and prolonging the living time of T739 mice with BTT739 bladder tumor via inducing the maturation of DC.

**Key words:** oligodeoxynucleotide; bladder carcinoma; dendritic cell; vaccine

尽管树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗在肿瘤治疗中显示出令人憧憬的前景,但真正为临床所用,还存在构建方法和质量控制等问题,在 DC 的分化过程中,其成熟度与功能直接相关。研究证明,含未甲基化 CpG 基序的细菌 DNA 或人工合成的寡聚脱氧核糖核苷酸(oligodeoxynucleotides, ODN)具有强大的促 DC 成熟功能<sup>[1-2]</sup>。本研究利用 CpG 序列的寡脱氧核糖核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide, CpG-ODN)作为骨髓来源 DC 的成熟刺激信号,体外诱导 DC 充分成熟,并将膀胱肿瘤抗原负载于 DC,制备 DC 疫苗,探讨 CpG-ODN 对 DC 疫苗治疗小鼠膀胱肿瘤模型作用的影响。

## 1 材料与方

**1.1 细胞株及实验动物** BTT739 小鼠膀胱肿瘤细胞株,本室保存, T739 近交系小鼠 48 只,中国医学科学院肿瘤研究所实验动物中心提供,雌雄各半, 5 周龄,体质量 20~25 g。

**1.2 主要试剂** CpG-ODN: ATA ATC GAC GTT CAA GCA AG<sup>[3]</sup>,上海生工生物技术公司合成,两端均用磷硫酰修饰。FITC-大鼠抗小鼠 CD80 单克隆抗体、FITC-大鼠抗小鼠 CD86 单克隆抗体及 FITC 标记的同型 IgG 购自美国 Pro-mega。

**1.3 荷瘤小鼠模型的建立** BTT 739 小鼠膀胱肿瘤细胞株常规培养,细胞生长至 80%~90%时,台盼蓝染色计数细胞,检测活细胞比例大于 95%,调整细胞数为  $1 \times 10^6$ /mL。将细胞悬液注射于 T739 小鼠右前腋皮下,每只 0.2 mL( $2 \times 10^5$  个)。

**1.4 负载肿瘤抗原的 DC 疫苗的制备** 参照文献[4-5],制备 BTT739 肿瘤细胞冻融粗提全抗原,体外冲击致敏法:收获培养第 7 天的 DC<sup>[2]</sup>,调整浓度为  $1 \times 10^6$ /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

<sup>△</sup> 通讯作者,电话:(023)68757946;E-mail:jinf550@163.com。

表 1 不同治疗组荷瘤小鼠皮下肿瘤体积变化情况 (cm<sup>3</sup>)

组别	7 d	10 d	14 d	17 d	21 d	24 d	28 d
A 组	0.19±0.04	0.55±0.13	1.46±0.14	2.97±0.37	4.98±0.65	8.71±1.03	11.66±0.90
B 组	0.21±0.05	0.47±0.16	1.29±0.31	2.31±0.37 <sup>b</sup>	3.49±0.60 <sup>b</sup>	6.16±1.57 <sup>b</sup>	9.01±2.20 <sup>a</sup>
C 组	0.20±0.04	0.50±0.12	1.26±0.29	2.22±0.57 <sup>a</sup>	3.64±1.09 <sup>a</sup>	5.14±1.18 <sup>b</sup>	7.37±1.53 <sup>b</sup>
D 组	0.20±0.04	0.37±0.17 <sup>a</sup>	0.87±0.36 <sup>bce</sup>	1.18±0.81 <sup>bde</sup>	1.44±1.07 <sup>bdf</sup>	1.54±1.36 <sup>bdf</sup>	1.79±1.55 <sup>bdf</sup>

与 A 组比较, <sup>a</sup>: P<0.05, <sup>b</sup>: P<0.01; 与 B 组比较, <sup>c</sup>: P<0.05, <sup>d</sup>: P<0.01; 与 C 组比较, <sup>e</sup>: P<0.05, <sup>f</sup>: P<0.01。

抗原。加入 rmGM-CSF、rmIL-4 使其终浓度分别为 500 u/mL、200 u/mL, 继续置于 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度孵箱中培养 48 h, 加入 CpG-ODN 使其终浓度分别为 2 μmol/L, 继续培养 48 h 后收获 DC 细胞即得 DC 疫苗。

**1.5 实验分组** T739 小鼠 48 只, 接种肿瘤细胞 7 d 后, 随机分为 4 个组, 12 只/组。分别为: (1) 磷酸盐缓冲液 (PBS) 对照组 (A 组); (2) DC 疫苗组 (B 组); (3) CpG-ODN 组 (C 组); (4) DC+CpG-ODN 联合治疗组 (D 组)。每组又随机分 2 个亚组, 每个亚组 6 只。亚组 1: 用于观察肿瘤生长及荷瘤小鼠存活情况。卡尺测定肿瘤的长径 a 和短径 b, 按  $v=1/2ab^2$  算出体积。2 次/周, 绘制肿瘤体积变化曲线, 继续观察小鼠死亡情况, 直至其中 1 组小鼠死亡达到 50% 时停止体积测量。亚组 2: 用于测量瘤重、体积: 接种肿瘤细胞第 21 天颈椎脱臼法处死全部亚组 6 只小鼠, 称取瘤重, 按上法计算肿瘤体积, 根据公式计算瘤重和体积抑制率, 移植瘤重抑制率 (%) = (空白对照组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重) / 空白对照组平均瘤重 × 100%, 移植瘤体积抑制率 (%) = (空白对照组平均体积 - 治疗组平均体积) / 空白对照组平均体积 × 100%。肿瘤组织用于检测浸润性树突状细胞 (tumor infiltrating dendritic cell, TIDC) 表面 CD80、CD86 表达。

**1.6 治疗时相点设置及治疗方案** 调整 DC 疫苗细胞浓度至  $1 \times 10^6$  /mL, 各组实验动物分别于接种肿瘤细胞后第 7、14 天给予相应治疗, PBS 对照组注射 PBS 0.2 mL, DC 疫苗组注射 DC 疫苗 0.1 mL + PBS 1 mL, CpG-ODN 治疗组注射浓度为 500 μg/mL 的 CpG-ODN 溶液 0.2 mL, DC 疫苗 + CpG-ODN 治疗组注射 DC 疫苗 0.1 mL + CpG-ODN 溶液 0.1 mL, 治疗方法采用肿瘤周围多点注射。

**1.7 肿瘤组织 TIDC 表面共刺激分子 CD80、CD86 的表达** 提取肿瘤组织浸润淋巴细胞悬液, 调整细胞浓度到  $5 \times 10^5$  /mL, 分别加入荧光 FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD80 单克隆抗体、CD86 单克隆抗体, FITC 标记的同型 IgG 作为相应的阴性对照, 行流式细胞仪检测。

**1.8 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 荷瘤鼠肿瘤生长的一般情况** 接种肿瘤细胞后第 7 天, 小鼠肿瘤平均直径可达 0.5~1.0 cm, 此时给予第 1 次治疗。接种肿瘤细胞后第 14 天 (即第 1 次治疗 7 d 后) D 组平均体积明显小于 A (P<0.01)、B 和 C (P<0.05) 组, 此时各组小鼠给予第 2 次相应治疗。于接种肿瘤细胞第 17 天时, B、C 组肿瘤体积也明显小于 A 组 (P<0.01, P<0.05), 但 B、C 组之间肿瘤体积无明显差异, D 组平均体积小于 A、B、C 组 (P<0.01) (表 1)。于接种肿瘤细胞后第 22、26、29 天, PBS 组各有 1 只小鼠死亡 (肿瘤直径均大于 3 cm), 终止体积测量观察, 此时其他 3 个

组小鼠也相继出现死亡。

**2.2 DC 疫苗联合 CpG-ODN 对膀胱肿瘤荷瘤鼠的抑瘤效应**

各治疗组亚组 2 荷瘤小鼠, 于接种肿瘤第 21 天解剖, 联合治疗组平均瘤重及平均体积均显著小于其它各组 (P<0.01)。DC 疫苗组及 CpG-ODN 组平均瘤重及平均体积均显著小于 PBS 对照组 (P<0.01), 见表 2。

表 2 BTT739 荷瘤小鼠不同治疗组的抑瘤效应

组别	n	平均瘤重 (g)	瘤重抑制率 (%)	平均体积 (cm <sup>3</sup> )	体积抑制率 (%)
A 组	6	4.50±0.47	—	4.84±0.58	—
B 组	6	3.18±0.41 <sup>b</sup>	29.33%	3.44±0.48 <sup>b</sup>	28.91
C 组	6	3.30±0.81 <sup>b</sup>	26.67%	3.57±0.84 <sup>b</sup>	26.24
D 组	6	1.33±0.99 <sup>a</sup>	70.44%	1.41±1.04 <sup>a</sup>	70.87

<sup>a</sup>: 与 A、B、C 组比较, P<0.01; <sup>b</sup>: 与 A 组比较, P<0.01; — 表示此项无数据。

**2.3 DC 疫苗联合 CpG-ODN 对膀胱肿瘤荷瘤鼠的存活延长效应** DC 疫苗联合 CpG-ODN 治疗组的荷瘤鼠生存期长于 DC 组、CpG-ODN 组及 PBS 对照组, DC 组、CpG-ODN 组荷瘤小鼠生存期长于 PBS 对照组 (P<0.05), 见图 1。

**2.4 肿瘤组织 TIDC 表面分子 CD80 及 CD86 的表达** DC+CpG-ODN 组肿瘤组织中 TIDC 表面共刺激分子 CD80、CD86 表达水平高于 DC 组及 PBS 对照组 (P<0.01), 虽略高于 CpG-ODN 组, 但差异无统计学意义 (P>0.05)。CpG-ODN 组肿瘤组织中 TIDC 表面 CD80、CD86 表达水平高于 DC 组及 PBS 对照组 (P<0.05), 在 DC 组中二者表达虽略高于 PBS 对照组, 但差异无统计学意义 (P>0.05), 见表 3。

表 3 小鼠肿瘤组织中 TIDC 表面 CD80、CD86 的表达 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	CD80	CD86
A 组	11.32±1.18	12.65±1.22
B 组	13.02±2.64	14.63±3.08
C 组	17.75±3.13 <sup>a</sup>	18.72±2.79 <sup>b,c</sup>
D 组	19.82±3.36 <sup>a</sup>	21.85±4.31 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: 与 A、B 组比较, P<0.01; <sup>b</sup>: 与 A 组比较, P<0.01; <sup>c</sup>: 与 D 组比较, P<0.05。

**3 讨 论**

肿瘤细胞可通过下调肿瘤相关抗原、低表达或不表达主要组织相容性复合物 (MHC) 分子和共刺激分子, 使抗原不能被有效递呈给 T 细胞以产生特异性的抗瘤效应, 因此激发有效的 T 细胞介导的抗瘤免疫反应是提高肿瘤免疫治疗效果的关键。单纯的抗原不能活化 T 淋巴细胞, 必须经过抗原递呈细胞 (APC) 递呈, 因为 T 淋巴细胞活化需要抗原和辅助分子双

信号才能有效地诱导细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)形成,发挥抗肿瘤效应。负载肿瘤抗原的 DC 疫苗由于可通过 DC 表面 MHC 类分子、共刺激分子将各种已知或未知的肿瘤相关抗原信息得到有效递呈,因此作为理想的肿瘤疫苗在实验和临床研究受到广泛重视。

CpG 基序(CpG motifs)是一个含胞嘧啶(cytosine,C)和鸟嘌呤核苷酸(guanine,G)的二核苷酸。人工合成的 CpG-ODN 作为一种新型免疫佐剂,多项动物实验研究表明单独应用可有效治疗肿瘤<sup>[6-7]</sup>。CpG-ODN 通过诱导 DC 的成熟和迁移,从而增强对抗原反应性 T 细胞刺激能力而间接发挥作用。肿瘤局部注射 CpG-ODN 后可活化 APC,促进其成熟并迁移至局部淋巴结激活肿瘤特异性 T 细胞,T 淋巴细胞活化后从淋巴结到达肿瘤部位而发挥效应。目前 CpG-ODN 联合抗体、细胞因子治疗肿瘤的研究已逐渐开展,体外实验已显示出了良好效果,但 CpG-ODN 能否增强 DC 疫苗的抗肿瘤效应,其机制如何等问题研究的甚少,为此本研究观察了 CpG-ODN 对 DC 疫苗治疗小鼠膀胱肿瘤作用的影响。

本研究的实验结果显示,21 d 时 DC 疫苗联合 CpG-ODN 治疗组的荷瘤鼠平均瘤重和平均体积均显著低于 DC 疫苗组、CpG-ODN 组、PBS 对照组,而荷瘤生存期显著长于其它各组,结果说明 DC 疫苗联合 CpG-ODN 对膀胱肿瘤荷瘤鼠具有较强的抑瘤效应和延长生存期作用,而且这种作用强于单独应用 CpG-ODN、DC 疫苗治疗,显示了 CpG-ODN 增强 DC 疫苗抗肿瘤效应。DC 疫苗联合 CpG-ODN 治疗组及 CpG-ODN 组肿瘤组织中 TIDC 表面共刺激分子 CD80、CD86 的表达明显高于 PBS 对照组及 DC 疫苗组,CD80、CD86 为成熟 DC 表面特异性标志,这些表面分子的参与是 DC 完成其抗原递呈功能所必须,表明 CpG-ODN 肿瘤周围注射后可增强肿瘤微环境中 DC 的成熟和活化,从而发挥免疫学效应,与 Heckelsmiller 等<sup>[8]</sup>报道的结果相似。

本研究的实验结果发现,CpG-ODN 可增强负载肿瘤抗原的 DC 疫苗的免疫治疗作用,提示其激发了机体强而有效的抗肿瘤免疫应答。结合前期实验结果<sup>[2]</sup>,本研究认为其作用机制可能与以下几个方面有关:(1)CpG-ODN 具有极强的诱导 DC 成熟、促进 Th1 型细胞因子分泌、诱导免疫应答向 Th1 型转化的作用,成熟的 DC 具有强大的刺激 T 淋巴细胞增殖的能力;(2)DC 高表达 MHC-I、II 类分子和 CD80/CD86 等共刺激分子,为 T 淋巴细胞充分活化提供信号刺激;(3)CpG-ODN 可增强 DC 疫苗诱导的 CTL 免疫杀伤活性,提高细胞因子干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )分泌,从而诱导肿瘤细胞凋亡及抑制肿瘤细胞增殖。CpG-ODN 可维持长期的肿瘤特异性免疫反应,有研究表明 CpG-ODN 可以抑制 DC 的凋亡,延长 DC 的生存期<sup>[9]</sup>,这对于

逆转肿瘤微环境导致的 DC 数量减少、功能受抑制具有重要意义,同时肿瘤局部 CpG-ODN 可引起 T 淋巴细胞向肿瘤部位浸润,促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞毒性反应的启动。CpG-ODN 无免疫原性,不会导致自身免疫反应,因此是一种理想的 DC 激活剂,可望应用于体内免疫调节。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Baines J, Celis E. Immune-mediated tumor regression induced by CpG-containing oligodeoxynucleotides[J]. Clin Cancer Res, 2003,9(7):2693.
- [7] Heckelsmiller K, Rall K, Beck S, et al. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model[J]. J Immunol, 2002, 169(7):3892.
- [8] Heckelsmiller K, Beck S, Rall K, et al. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy[J]. Eur J Immunol, 2002,32:3235.
- [9] 杜宇琛,林苹,张洁,等. CpG-ODN 加强树突状细胞疫苗抗 Lewis 肺癌的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2005,27(1):1.

(收稿日期:2009-07-21 修回日期:2009-08-11)

## 启 事

接中国学术期刊评价委员会通知,《重庆医学》杂志在《中国学术期刊评价研究报告》(2009—2010)中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊”。

特此公告

《重庆医学》编辑部