·基础研究·

DC-HASL 对体外肺癌细胞杀伤作用的研究

尹小川[1]，杨达宽[2]，洪志鹏[1]
(1 昆明医学院第一附属医院，云南昆明 650032；2 昆明医学院第二附属医院)

[摘要] 将树突状细胞(DC)用人肺癌细胞系 GLC-82 的可溶性抗原致敏，并用 TNF-α和 PGE_2 促进其抗原递呈能力。培养 10 d 后将其与经或未经高聚金葡素(HAS)刺激的淋巴细胞(称 HASL)混合培养 4 h(分别称为 DC-HASL 和 DC-L)。HASL 中 $CD_3^+CD_{56}^+$ 细胞的比例大幅度增加。将 DC-HASL、HASL 及 DC-L 作为效应细胞，肿瘤细胞作为靶细胞，用 MTT 法检测效应细胞对靶细胞的杀伤率。结果 DC-HASL 对 GLC-82 细胞的杀伤率为 98.2%，对 A549 细胞的杀伤率达 94.2%，明显高于 HASL 及 DC-L，亦明显高于大肠癌细胞 moser 和乳腺癌细胞 MCF-7 的杀伤率。提示 DC-HASL 对肺癌细胞有高效特异性的杀伤作用；可作为同种异体效应细胞用于恶性肿瘤的继承性免疫治疗。

[关键词] 树突状细胞；高聚金葡素；肺癌，细胞
[中图分类号] R655.3 [文献标识码] B [文章编号] 1002-266X(2007)05-0022-02

以 LAK、CIK 和 CD3AK 等为代表的继承性细胞免疫疗法是恶性肿瘤免疫治疗的主要方法，但其无特异性，对肿瘤的杀伤作用有限。以树突状细胞(DC)为基础的免疫疗法是近年来的研究热点。但 DC 扩增困难，且恶性肿瘤患者一般免疫力低下，回输抗原致敏的 DC 能否激发高效特异性 T 细胞免疫尚有争议。高聚金葡素(HAS)是一种超抗原性的抗癌生物制剂，具有刺激 T 细胞增殖、增强免疫功能等生物学活性。2005 年 9 月～2006 年 5 月，我们观察了 DC-HASL 对肺癌细胞的体外杀伤作用，现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 基因重组人 IL-4、TNF-α、GM-CSF(Promega 公司)，HAS(沈阳协和集团馈赠)，PGE_2(Sigma 公司)，淋巴细胞分离液(上海医学试剂厂)，抗 CD_1a-FITC 和抗 CD_{83}-FITC(Ancell 公司)，抗 HLA-Ⅰ，HLA-Ⅱ单抗及羊抗鼠＞ IgG_1-FITC(北京邦定公司)，酶联免疫检测仪(Labsystem 公司)，抗 CD_{14}/抗 CD_{45}、抗 CD_3/抗 CD_{56} 双色荧光标记抗体(北京邦定公司)。肺癌细胞(A549)、乳腺癌细胞(MCF-7)、大肠癌细胞(moser)、肺癌细胞(GLC-82)(军事医学科学院提供，各细胞系均用含 50 ml/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液，于 37 ℃、5%CO_2 环境下常规培养)。健康献血者枸橼酸钠抗凝静脉血中富含白细胞的白膜层(昆明医学院第一附属医院输血科提供)。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤可溶性抗原的提取 收集肿瘤细胞于低渗条件下反复冻融 4 次，以 5 000 r/min 离心 30 min。取上清，考马斯亮蓝染料结合法测定蛋白含量，过滤除菌后冻存备用。

1.2.2 DC-HASL 的制备 常规分离人外周血单个核细胞(PMBCs)，用含 100 ml/L FCS 的 RPMI1640 悬浮，以每孔 5×10^6 个细胞加入 6 孔板中，置 37 ℃、5%CO_2 环境下贴壁 2 h，用预热的培养液轻轻洗出非贴壁细胞，调整细胞密度至 1×10^9/L，加 200 U/ml 的 HAS 1 ml，于 37 ℃、5%CO_2 条件下培养，每 4 d 换液 1 次，即为 HASL。贴壁细胞加完全 RPMI1640 培养液 10 ml，用 100 ng/ml 的 GM-CSF 1 ml 及 500 U /ml 的 IL-4 1 ml 联合刺激诱导 DC 分化。DC 培养第 2 天即有细胞悬浮，并可见到细胞聚集现象；培养至第 4 天，加入 100 ng/ml 的 GLC-82 细胞可溶性抗原 1 ml，细胞多呈悬浮生长并聚集成团，细胞有毛刺状突起；第 6 天加 1 000 U/ml 的 TNF-α 1 ml 和 10 nmol/ml 的 PGE_2 1 ml，细胞逐渐从聚集状态变为分散状态，相差显微镜下可见到细胞表面有大量毛刺状突起，呈典型的 DC 形态。DC 培养至第 7 天，收集细胞，用抗体直接(抗 CD_{14}/抗 CD_{45}，抗 CD_1a 和抗 CD_{83})或间接(抗 HLA-I、抗 HLA-B)免疫荧光染色，流式细胞仪分析示 CD_1a 的阳性率为 71%，CD_{83} 阳性率为 50%，CD_{14} 的阳性率＜10%，并高表达 HLA-Ⅰ、HLA-Ⅱ分子和 CD_{45}。HASL 于培养的第 0 天和第 10 天，用抗 CD_3/抗 CD_{56} 双色荧光标记抗体染色，流式细胞仪分析示第 10 天 HASL 中 $CD_3^+CD_{56}^+$ 双阳性细胞的比例大幅度增加，由第 0 天的 2.00%增加至 21.30%。第 10 天时将 DC 与经或未经 HAS

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

刺激的淋巴细胞混合培养 4 h，分别称混合培养细胞为 DC-HASL 和 DC-L。

1.2.3 效应细胞对靶细胞的杀伤率测定 采用 MTT 法。分别以 HASL、DC-HASL 和 DC-L 为效应细胞，以 A549、GLC-82、maser 和 MCF-7 为靶细胞，以 10∶1(效应细胞每孔 10^5 个，靶细胞 10^4 个)效靶比放入 96 孔板中。另设单独效应细胞和单独靶细胞组，每组 3 个复孔，置 37 ℃、5%CO_2 孵箱中培养 16 h；MTT 显色后测定各孔 490 nm 的吸光度(A 值)。按以下公式计算效应细胞对靶细胞的杀伤率。杀伤率(%)＝试验孔 A 值－效应细胞 A 值/靶细胞 A 值 ×100%

1.3 统计学方法 采用 SPSS 11.0 软件。杀伤率比较采用 χ^2 检验，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

效应细胞对靶细胞的杀伤率见表 1。

表 1 效应细胞对靶细胞系的杀伤率(%，$\bar{x}\pm s$)

效应细胞	GLC-82	A549	moser	MCF-7
DC-HASL	98.2±1.64$^{\Delta *}$	94.2±2.37$^{\Delta *}$	73.5±1.82$^{\Delta}$	71.2±2.61$^{\Delta *}$
HASL	63.1±2.43	48.2±1.67	60.3±2.32	45.3±1.45
DC-L	46.4±1.66	42.1±1.85	39.6±1.25	25.6±2.11

注：与 DC-L 比较，$^{\Delta}P<0.01$；与 HASL 比较，$^{*}P<0.05$

3 讨论

DC 是目前已知抗原提呈能力最强的专职抗原提呈细胞，以 DC 为基础的免疫疗法是肿瘤生物治疗研究的热点。一般采用直接注射肿瘤抗原致敏的 DC 以诱导机体产生特异性抗肿瘤免疫应答[1~5]，但需要足够数量的 DC；且单独的 DC 和单独的淋巴细胞均无杀瘤活性[5]。大量研究证明，骨髓或脐血中的 CD_3^+ 细胞及外周血中贴壁的单个核细胞均可作为 DC 的来源[2,3]。国外一般采用血细胞分离机富集 PBMC，再于体外分离去除不贴壁的淋巴细胞，诱导贴壁的单个核细胞分化发育成 DC。但其成本高、费时费力，且造成淋巴细胞的浪费，另外，恶化肿瘤患者免疫力低下，部分患者 DC 回输后并不能激发高效特异性的 T 细胞抗肿瘤免疫。DC 在未成熟时具有很强的吞噬加工处理外源性抗原的能力，成熟 DC 吞噬能力减弱，抗原提呈能力增强，TNF-α和 PGE_2 可促进 DC 成熟并增强其抗原提呈能力。本研究采用 GM-CSF 和 IL-4 联合刺激诱导 PBMC 分化为 DC。在其未成熟时，用可溶性肿瘤抗原致敏，随后用 TNF-α和 PGE_2 促进其成熟。经此方法培养的 DC 光镜下具有典型的 DC 形态，细胞表型分析表明，DC 特异性 CD1a 抗原表达的阳性率高，并高表达 HLA-Ⅰ和 HLA-Ⅱ类抗原，与文献报道一致[1~5]。

HAS 是 C 型葡萄球菌肠毒素，为我国自行研制开发的超抗原性抗癌生物制剂。其对 T 细胞具有强大的刺激功能，并能增强 NK 细胞的活性[6]。$CD_3^+CD_{56}^+$ 双阳性细胞属于 T 细胞，但可表达 NK 细胞的标志，且具有非 MHC 限制性细胞毒性，其杀伤肿瘤细胞的机制尚不十分明确[6~8]，实验中我们将外周血淋巴细胞经 HAS 刺激后，$CD_3^+CD_{56}^+$ 双阳性细胞的比例大幅度增加，且具有一定的肿瘤杀伤作用。推测 $CD_3^+CD_{56}^+$ 双阳性细胞可能为 HASL 中的主要杀瘤效应细胞。将 HASL 与肿瘤抗原致敏的 DC 共培养后，体外可产生特异性的肿瘤杀伤作用；DC-HASL 对具有特异性抗原的 GLC-82 细胞显示出强大的杀伤力，对同为肺癌的另一细胞系 A549 的杀伤力明显增强，对其他肿瘤细胞的杀伤力亦有不同程度的增加，推测系 DC 将特异性抗原提呈给 HASL，使之产生特异性的杀伤作用所致。但 DC 如何提呈抗原，并使 HASL 的杀伤活性显著增强；经 DC 刺激后 HASL 的表型有无明显变化；DC-HASL 中的主要杀瘤效应细胞是否仍为 $CD_3^+CD_{56}^+$ 双阳性细胞均有待进一步探讨。

综上所述，DC-HASL 有高效特异性的抗肿瘤免疫作用；本研究为同种异体效应细胞在肿瘤继承性免疫治疗中的应用提供了依据。

[参考文献]

[1] Zitvogel BL, Mayordomo JI, Tjandrawan T, et al. Therapy of murine tumor peptide-pulsed dendritic cells : dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell associated cytokines [J]. Exp Med, 1996,183(3):87-97.

[2] Martin T, Christine P, Reinhold R, et al. In vitro generation of CD_{83}^+ human blood dendritic cells for active tumor immunotherapy [J]. Exp Hematol, 2005,25(10):232-237.

[3] Chen BG, Shi YJ, Jeffrey D, et al. The role of tumor necrosis factor in modulating the quantity of peripheral blood-derived, cytokine-driven human dendritic cells and its role in enhancing the quality of dendritic cell function in presenting soluble antigens to $CD4^+$ T cell in vitro[J]. Blood, 2005,12(8):4652-4661.

[4] Gliboa E. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines[J]. Cancer Immunol Immunother, 2004,46(3):82-87.

[5] 李明松，袁爱力，刘思德，等. 树突状细胞诱导的抗大肠癌免疫预防裸鼠移植瘤发生并抑制其生长[J]. 肿瘤，1999,19(4):279-285.

[6] 韩从辉，郑宝钟. 超抗原抗肿瘤研究进展[J]. 肿瘤，1999,19(6):377-380.

[7] Schmidt W, Lefrerov P, Johnson V, et al. Population of large numbers of T cells with natural killer cell markers[J]. Br J Haematol, 2005,87(6):453-460.

[8] Yoshiaki F, Youichi F, Ryuichi K, et al. In vitro interleukin 12 activation of peripheral blood $CD_3^+CD_{56}^+$ cells from glioblastoma patients[J]. Clin Cancer Res, 2004,3(7):633-643.

(收稿日期：2006-12-01)

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net