



## 树突状细胞感染Her2/neu膜外及跨膜区蛋白基因重组腺病毒后的免疫功能变化

树突状细胞(DC)作为抗原提呈细胞在体内对机体免疫反应起着重要的调节作用, B淋巴细胞和T淋巴细胞是免疫反应的重要介导者, 但它们的功能受DC的严密调控。在抗肿瘤免疫中, DC是目前已知体内最强的抗原提呈细胞, 可以通过介导抗原特异性细胞毒T淋巴细胞(CTL)和激活 $CD^{4+}$  T细胞分泌大量的细胞因子, 如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、(IL-12)等, 反馈调节DC和维持 $CD^{8+}$  T细胞的数量而介导肿瘤杀伤[1]。因此, 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。研究表明, 由于抗原结合受MHC限制、抗原与受体亲和力低、抗原表达持续性差等原因, 在一定程度上限制了外源性抗原脉冲DC的激活方式介导肿瘤特异性CTL杀伤, 运用抗原转基因技术可以克服以上缺点[2], [3]。因此, 我们应用编码Her2/neu基因膜外第一受体区(Her2-ECDs)、全长膜外区(Her2-ECD)和膜外跨膜区(Her2-TM)蛋白三种重组腺病毒(rAdHer2-ECDs、rAdHer2-ECD、rAdHer2-TM)分别感染外周血单核细胞来源的DC, 观察转染后目的抗原在DC中的表达、转染DC的表型、诱导的体外抗肿瘤活性的变化, 为以DC为基础的免疫治疗进一步提供理论基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 细胞株和载体

SK-BR-3(Her2高表达)乳腺癌细胞株由本科室生物治疗中心保存; SK-OV-3(Her2高表达)卵巢癌细胞株由我校丁振华教授惠赠。MCF7(Her2表达阴性)乳腺癌细胞株购自中山大学医学院。表达Her2/neu膜外及跨膜区蛋白的5型重组腺病毒由我科构建。

#### 1.2 主要试剂

AIM-V细胞培养基(Gibco BRL); McCoy's 5A细胞培养基(Sigma); 胎牛血清(FBS, Hyclone); 丝裂霉素C(Kyowa Hakko Kogyoco. Ltd); Ficoll(H&Y产品); 粒巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素-2(IL-2)、白介素-4(IL-4)、白介素-7(IL-7)、TNF- $\alpha$ 均购自解放军军事医学科学院; 抗Her2-ECD的MoAb20(Neo-marker); HRP-羊抗小鼠的IgG(Pierce); IFN- $\gamma$ 和IL-12 ELISA检测试剂盒(晶美公司); ECL发光试剂盒(Pierce)。

#### 1.3 DC的分离、诱导分化和病毒转染

参考文献[4], [5]。DC培养5 h后, 病毒感染组和SK-OV-3细胞修饰组则加入完全培养基0.5 ml, 加入病毒液(感染复数 $MOI=3.75 \times 10^4$ )或SK-OV-3细胞碎片; 培养2 h后, 加入含GM-CSF 1000 U/ml的AIM-V培养基2.5 ml。非修饰组则直接加入培养液3 ml。24 h后清洗换液一次; 第2天, 清洗换液并加入IL-4至终浓度800 U/ml; 第3~5天, 半量换液; 第6天, 换液并加入TNF- $\alpha$ 至终浓度20 ng/ml; 第7天, 收获DC。

#### 1.4 感染DC目的蛋白表达的检测

用Western blot检测Her2-ECDs、ECD、TM蛋白在DC中的表达。

### 1.5 DC培养上清中IL-12的含量检测

在培养的第1、3、5、7天检测转染rAdHer2- ECDs、ECD、TM和未转染DC培养上清中IL-12的含量，按试剂盒说明书操作。

### 1.6 同种混合淋巴细胞反应(MLR)

分离与DC不同源的健康人T淋巴细胞，取培养7 d的rAdHer2-ECDs、ECD、TM感染的DC，SK-0V-3细胞修饰DC和未修饰DC，用30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  MMC，37  $^{\circ}\text{C}$ 作用30 min，PBS洗3次，重悬于AIM-V培养基中。紫外线处理后的96孔板中，每孔分别加入 $1\times 10^4$ 、 $5\times 10^3$ 、 $2\times 10^3$ 、 $1\times 10^3$ 细胞，以自身T淋巴细胞为对照。每组设3个复孔。每孔加入 $1\times 10^5$  T淋巴细胞，终体积为200  $\mu\text{l}$ 。MTT法在酶标仪上测570 nm波长的D( $\lambda$ )值。刺激指数(SI)=实验孔D( $\lambda$ )平均值/对照孔D( $\lambda$ )平均值。

### 1.7 转染和未转染DC刺激淋巴细胞后上清中IFN- $\gamma$ 含量检测

将培养7 d的经MOI为 $3.75\times 10^4$ 的rAdHer2 -ECDs、ECD、TM感染的DC和未感染的DC与自体淋巴细胞按1 : 20混合后，加入800 U/ml GM-CSF、100 U/ml IL-2和20 ng/ml IL-7的AIM-V培养液培养。以自体淋巴细胞为对照。每组3复孔，于培养第2、4、6天按试剂盒说明书检测培养上清中的IFN- $\gamma$ 含量。

### 1.8 DC诱导的CTL反应检测

1.8.1 效应细胞的制备 分离与DC同源的健康人T淋巴细胞，加入800 U/ml GM-CSF和100 U/ml IL-2的10%FBS RPMI1640完全培养液，培养48 h后作为效应细胞。将培养7 d的病毒感染DC，SK-0V-3修饰DC(SK-0V-3 DC)和非修饰DC作为刺激细胞，按效应细胞:刺激细胞=20 : 1的比例混合。以不予DC刺激的自体淋巴细胞为对照。加入800 U/ml GM-CSF、100 U/ml IL-2和20 ng/ml IL-7的10%FBS RPMI1640完全培养液，培养5 d。

1.8.2 靶细胞的制备 以高表达Her2的SK-BR-3、SK-0V-3和不表达Her2的MCF7乳腺癌细胞株为靶细胞，调细胞浓度为 $2\times 10^5/\text{ml}$ 。

1.8.3 CTL活性检测 以效应细胞:靶细胞(E/T)为100 : 1和50 : 1加入经紫外线处理的96孔板中，每组设24个复孔。设不同相应数量梯度未经DC刺激的T细胞和靶细胞混合的对照孔。培养12 h后MTT法在酶标仪上测570 nm波长的D( $\lambda$ )值。杀伤率%=(1-实验孔D( $\lambda$ )值/对照孔D( $\lambda$ )值) $\times 100$ 。

### 1.9 统计学处理

采用单因素方差分析，两两比较用LSD法。

## 2 结果

### 2.1 DC体外培养

从外周血获取的PBMC，贴壁培养2 h后，加入GM-CSF、IL-4 培养48 h后，可见贴壁的单核细胞聚集成散布的细胞集落；培养4 d后，集落明显增多、变大且培养孔中即可见少量悬浮细胞；培养第6天加入TNF- $\alpha$ ，再培养24 h，可见集落散开，大部分细胞呈悬浮状，体积较大且形态不规则。

### 2.2 Her2-ECDs、ECD、TM蛋白在DC中的表达

Her2-ECDs、ECD、TM蛋白在DC中获得表达(图1)。

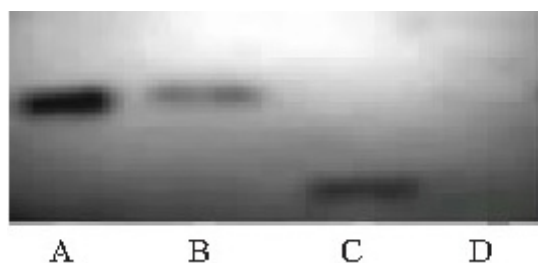


图1 目的蛋白在DC中的表达

Fig.1 Expression of the target proteins in the DCs

### 2.3 感染和非感染的DC培养上清中IL-12含量检测

在培养的第5天, 感染rAd-Her2-ECDs、ECD、TM的DC培养上清中IL-12的含量比非感染DC含量高 ( $P=0.045$ ), 但3个不同重组病毒感染的DC则无明显差异 ( $P>0.05$ ), 见图2。

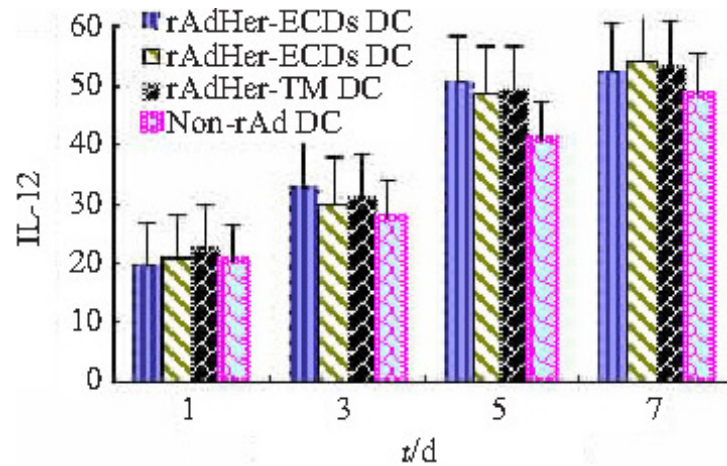


图2 感染DC和非感染DC培养上清中IL-12含量  
Fig.2 IL-12 level in the supernatant of cultured DCs

### 2.4 MLR

在1:10和1:20的两种DC:T细胞的混合比例中, rAdHer2-ECDs、rAdHer2-ECD、rAdHer2-TM感染的DC, SK-OV-3细胞修饰的DC和未修饰的DC均能刺激同种T淋巴细胞的增殖, 但rAdHer2-TM感染的DC刺激T细胞增殖的能力明显高于rAdHer2-ECDs、rAdHer2-ECD感染的DC, SK-OV-3细胞修饰的DC和未修饰的DC ( $F=8.30、4.52; P=0.001、0.014$ ). 但后4者刺激T细胞增殖的能力无明显差异, 见图3。

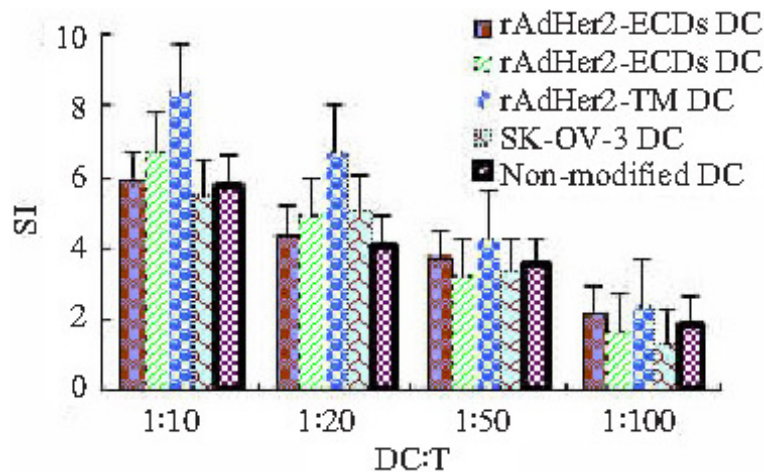


图3 同种混合淋巴细胞反应  
Fig.3 Mixed lymphocyte reaction

### 2.5 感染和非感染的DC刺激淋巴细胞后上清中IFN- $\gamma$ 的含量检测

在第2、4、6天3个时相中, 随着时间的延长, 培养上清中的IFN- $\gamma$ 含量逐步增高, 在第4、6天, 病毒感染DC明显高于非感染DC ( $F=5.0、7.19; P=0.018、0.005$ ), 见图4。

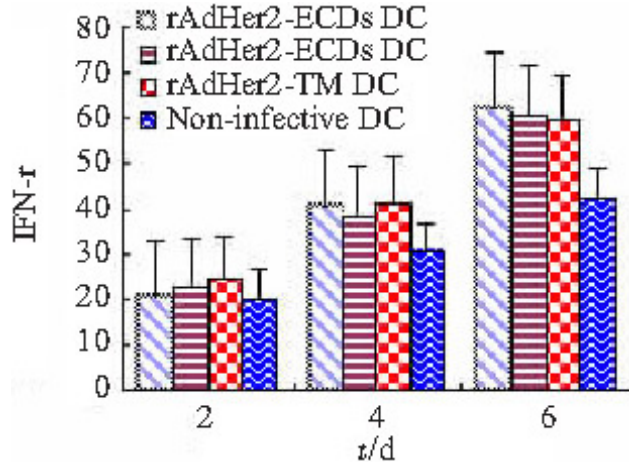


图4 DC和淋巴细胞共培养上清中IFN-γ的含量

Fig.4 IFN-γ level in the supernatant of the lymphocyte populations co-cultured with DCs

### 2.6 DC诱导的CTL反应检测

病毒感染DC诱导CTL活性明显增强，在显微镜下可见肿瘤细胞周围聚集许多淋巴细胞，对其进行杀伤(图5)。病毒感染DC诱导CTL对Her2/neu高表达的SK-OV-3和SK-BR-3的杀伤率明显高于SK-OV-3修饰和非修饰DC，而SK-OV-3修饰DC又高于非修饰DC杀伤率(P<0.05)。在病毒感染DC中，以rAdHer2-TM转染DC为最强；但对不表达Her2/neu的MCF7细胞，它们所诱导的CTL活性无差别(P>0.05，表1)。

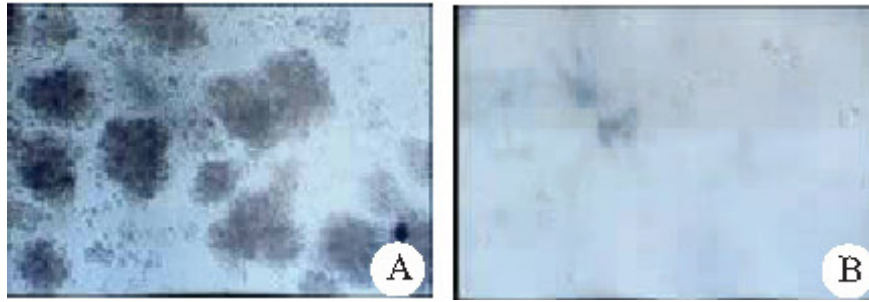


图5 感染DC诱导CTL对Her2高表达肿瘤细胞的杀伤

Fig.5 Killing of breast cancer cell line with Her2 overexpression via CTL induced by infected DCs

A: Killing to breast cancer cell line by CTL (Original magnification: ×100); B: Growth of T lymphocytes without DCs (Original magnification: ×250)

表1 病毒转染、SK-OV-3修饰和非修饰DC诱导的CTL活性  
Tab.1 CTL activities induced by infected DCs, uninfected DCs and modified DCs with SK-OV-3 cell fragment (% , Mean±SD)

Target cell	E:T	rAdHer2-ECDs DC	rAdHer2-ECDs DC	rAdHer2-TM DC	SK-OV-3 DC	DC	P value
SK-OV-3	100:1	37.3±8.4	39.1±5.7	46.4±2.8	26.9±5.1	18.7±3.2	0.000
	50:1	25.6±3.5	26.7±6.1	33.2±2.5	18.8±3.9	12.4±4.3	0.000
SK-BR-3	100:1	36.5±4.8	38.6±3.7	50.7±5.1	24.0±2.5	17.9±3.1	0.000
	50:1	27.6±6.5	22.3±7.3	38.6±4.4	16.4±4.6	12.5±6.2	0.000
MCF7	100:1	20.2±5.4	17.3±2.9	18.8±0.6	19.5±1.9	17.9±2.8	0.698
	50:1	12.3±3.1	12.7±2.2	11.9±1.5	14.4±4.7	10.5±2.9	0.519
P value	100:1	0.006	0.000	0.000	0.041	0.913	
	50:1	0.002	0.018	0.000	0.407	0.797	

### 3 讨论

DC具有极强的抗原加工处理能力, 由于其缺乏特异性抗原受体, 非成熟DC通过巨噬细胞胞饮、受体介导的内吞、吞噬三种方式摄取外来刺激抗原而成熟, 再迁移到外周淋巴器官, 可有效激发T淋巴细胞免疫应答。在体内, DC通过局部分泌IL-12诱导Th0向Th1分化, 产生细胞介导的免疫应答反应。IL-12是Th1产生必需的细胞因子, 它可刺激静止的或激活的淋巴细胞产生Th1型细胞因子IFN- $\gamma$  [6]。我们检测了转染DC和非转染DC中上清的IL-12和刺激淋巴细胞后产生IFN- $\gamma$ 的能力, 结果显示病毒感染后提高了DC分泌IL-12的水平, 感染后DC刺激淋巴细胞分泌IFN- $\gamma$ 的能力更强, 提示转染后的DC能诱导淋巴细胞向Th1分化, 从而激发抗原特异性的CTL活性。

重组腺病毒转染DC使其表达内源性抗原。实验证明, 经病毒转染DC刺激的T淋巴细胞对Her2高表达的SK-OV-3和SK-BR-3具有明显的杀伤活性, 而对不表达Her2的MCF7的杀伤率较低; 也高于用SK-OV-3修饰的DC所诱导的杀伤活性, 表明转基因DC能诱导更强烈的CTL活性, 而且这种活性是特异性的。在3种病毒转染DC所诱导的CTL活性中, 又以rAdHer2-TM的杀伤率最高。对SK-BR-3靶效比=100:1时, 杀伤率高达50%以上, 提示在以Her2为靶抗原的DC腺病毒载体疫苗中, Her2-TM具有明显的优势。研究表明, 能表达IL-12、GM-CSF的基因工程DC通过多种方式增强对细胞的抗原提呈, 并强烈催化诱导肿瘤特异性的CD<sup>4+</sup> Th 细胞和CD8<sup>+</sup> CTL [7]。最近, 有更多的报道表明表达肿瘤抗原的DC与细胞因子共转染能极大地提高DC疫苗的抗肿瘤效应 [8], 因此, 将腺病毒DC载体疫苗与细胞因子共转染, 有可能其抗肿瘤效果获得极大地提高。

#### 参考文献:

- [1]Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, et al. Tumor-specific CD4<sup>+</sup> T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity[J]. J Immunol, 2000, 165(11): 6047-55.
- [2]Reinhard G, Marten A, Kiske SM, et al. Generation of dendritic cell-based vaccines for cancer therapy[J]. Br J Cancer, 2002, 86(10): 1529-33.
- [3]Tatsumi T, Gambotto A, Robbins PD, et al. Interleukin 18 gene transfer expands the repertoire of antitumor Th1-type immunity elicited by dendritic cell-based vaccines in association with enhanced therapeutic efficacy[J]. Cancer Res, 2002, 62(20): 5853-8.
- [4]Liu Y, Chiriva-Internati M, Grizzi F, et al. Rapid induction of cytotoxic T-cell response against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(12): 948-57.
- [5]Chiriva-Internati M, Liu Y, Salati E, et al. Efficient generation of cytotoxic T lymphocytes against cervical cancer cells by adeno-associated virus/human papillomavirus type 16 E7 antigen gene transduction into dendritic cells[J]. Eur J Immunol, 2002, 32(1): 30-8.
- [6]Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity[J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 251-76.
- [7]Nishioka Y, Hirao M, Robbins PD, et al. Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12[J]. Cancer Res, 1999, 59(16): 4035-41.

[8]Chen Z, Huang H, Chang T, et al. Enhanced HER-2/neu-specific antitumor immunity by cotransduction of mouse dendritic cells with two genes encoding HER-2/neu and alpha tumor necrosis factor[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(9): 778-86.

---

[回结果列表](#)