



Her2/neu基因重组腺相关病毒转染人外周血来源树突状细胞的免疫功能

树突状细胞(DC)是体内激发T淋巴细胞介导的免疫反应最强的专职抗原递呈细胞(APC)。以肿瘤相关抗原(TAA)基因转染DC进行肿瘤基因治疗的研究近年来倍受瞩目。以病毒为载体介导基因转移至DC并诱导特异性CTL杀伤,以其高效和良好的靶向性已成为基因治疗中应用最广泛的方法。Her2/neu基因是乳腺癌的重要癌基因;腺相关病毒是目前实验研究最适合DC转导的病毒载体。本研究应用Her2/neu基因重组腺相关病毒(rAAV- Her2/neu)转染人外周血DC,并检测DC表型及Her2的表达,混和淋巴细胞反应及CTL杀伤效应。探讨其在乳腺癌基因治疗方面的应用前景。

1 材料和方法

1.1 病毒、细胞株、试剂和仪器

Her2/neu基因重组腺相关病毒由美国阿肯色大学医学院基因治疗中心提供。SK-BR-3(HLA A11, Her2高表达)、MCF7(HLA A2, Her2表达阴性)人乳腺癌细胞株,本科室生物治疗中心保存。粒细胞-巨噬细胞落群体刺激因子(GM-CSF)购自罗氏公司,白细胞介-4(IL-4)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)购自解放军军事医学科学院;抗体FITC-CD1a、FITC-CD83、PE-CD40、PE-CD80、FITC-CD86、APC-Her2购自晶美公司。放射性同位素 ^3H -TdR购自上海同位素公司。美国BD公司FACS Calibur型流式细胞仪, Bio-Rad 550型酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 DC分离和培养 取HLA A11, A2双表达的健康者外周血用淋巴细胞分离液(1.077 Ficoll)获得单个核细胞。收集细胞于盛有完全培养基(RPMI-1640+ 10%人AB血清)的6孔板中,置于37℃, 5% CO₂培养箱孵育6 h。洗涤收集悬浮淋巴细胞(作为T效应细胞),保留贴壁细胞。贴壁细胞分为两组:第1组为加病毒组,加rAAV-Her-2/neu 10^8 /孔;第2组为不加病毒组。均用含GM-CSF(800 U/ml)的完全培养基培养。病毒作用8 h后清洗换液。第3天用含GM-CSF(800 U/ml)、IL-4(1000 U/ml)的完全培养基换液。第5天用含GM-CSF(800 U/ml)、IL-4(1000 U/ml)、TNF- α (200 U/ml)的完全培养基换液。第7天收集6孔板中悬浮细胞为成熟DC。

1.2.2 T淋巴细胞的制备 尼龙毛加双蒸水煮沸,晾干后梳整,装入注射器内,高压灭菌,制成尼龙毛柱。将上述淋巴细胞悬液加入尼龙毛柱中,静置1 h后,洗脱细胞,得到纯的T细胞。加含GM-CSF(200 U/ml)、IL-2(200 U/ml)的完全培养基,置培养箱中培养。

1.2.3 流式细胞仪检测DC表型及Her2的表达成熟的病毒组DC、无病毒组DC均用PBS洗涤2次,制成单细胞悬液,进行双色标记。抗体为:FITC-CD1a、FITC-CD83、PE-CD40、PE-CD80、FITC-CD86及APC-Her2,并设空白对照。方法依据FCM要求进行。应用FCM检测。

1.2.4 混和淋巴细胞反应的检测 将培养第7天的两组DC均用30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的丝裂霉素作用30 min,为效应细胞。T细胞加入96孔培养板(2×10^6 个/孔),按E/T(效应细胞比靶细胞)1:5, 1:10, 1:20, 1:40分别和两组DC混合。同时设对照组:不加DC的T细胞。每个比例3复孔。培养箱中孵育78 h后加1 μCi ^3H -TdR /

孔，继续孵育18 h后送我院同位素室检测。刺激指数(SI)=试验孔dpm平均值/对照孔dpm平均值。

1.2.5 CTL杀伤效应的测定 Her2高表达的SK-BR-3(HLA A11)和Her2表达阴性MCF7(HLA A2)人乳腺癌细胞株为靶细胞。T淋巴细胞分两组，按20:1分别加入丝裂霉素处理后的两组DC。混合培养4 d作为效应细胞。将两组靶细胞分别接种在96孔培养板(均为 1×10^4 个/孔)。按E/T 80:1, 40:1, 20:1, 10:1分别与两组效应细胞混合，每个比例3复孔。培养箱中孵育12 h后，加10 μ l MTT/孔，继续孵育6 h后，加100 μ l 盐酸化异丙醇/孔。静置 5 min后酶标仪测570 nm波长的D(λ)值。杀伤率%=[1-实验孔D(λ)值/(T细胞D(λ)值+靶细胞D(λ)值)] \times 100%。此过程重复4次，取平均值。

1.3 统计学处理

采用SPSS10.0 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 细胞表型及Her2 的表达

两组均高水平表达CD1a、CD86 和CD83，加病毒组分别为：98.10%、99.42%、84.59%；无病毒组分别为：92.69%、98.07%、82.72%，组间差别不明显(P>0.05)。CD40、CD80在两组之间表达水平不一致，加病毒组分别为：61.02%、97.61%；无病毒组分别为：36.19%、55.5%，加病毒组明显高于无病毒组(P<0.05)。加病毒组Her2表达率88.97%，无病毒组几乎不表达，为0.16%，见图1。

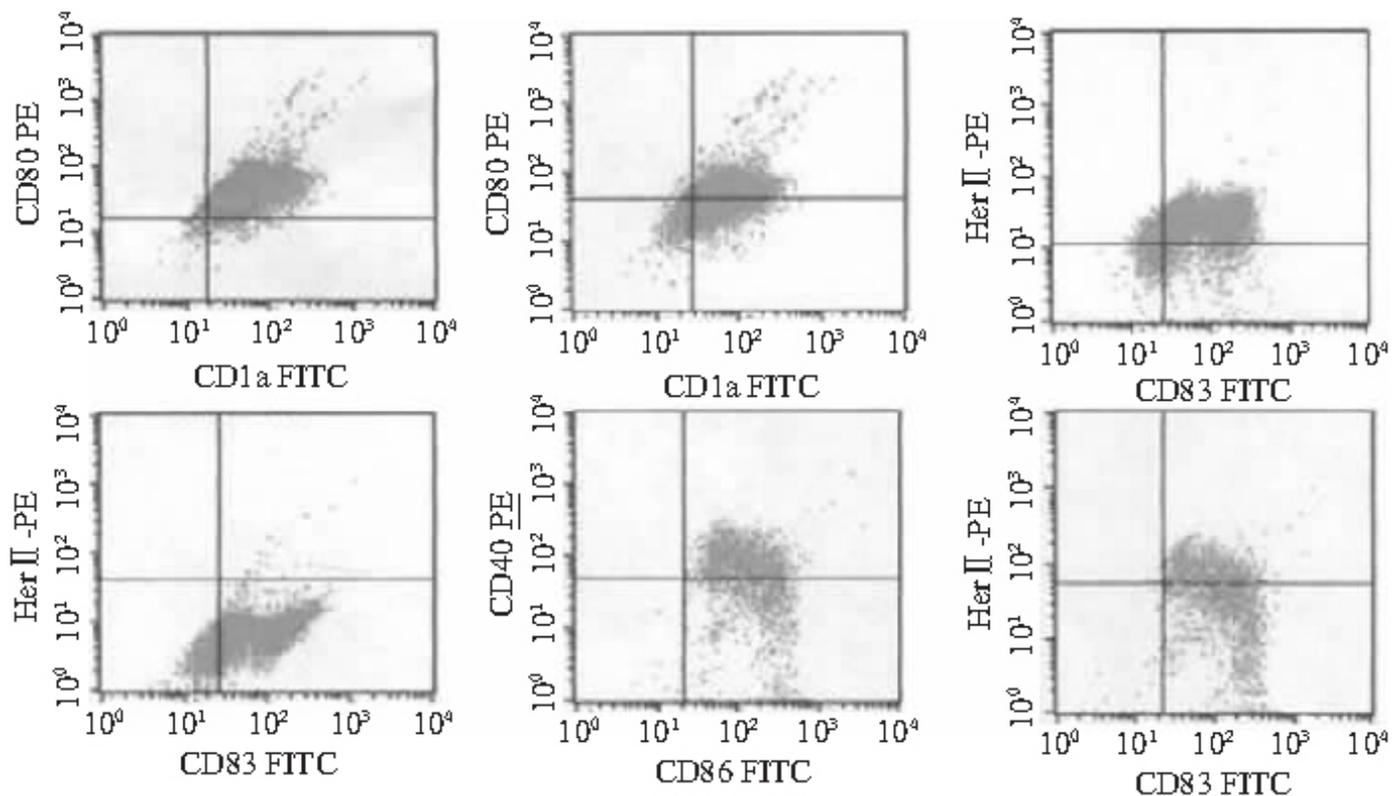


图1 DC细胞表型分析及Her2 的表达

Fig.1 Phenotypic analysis and Her2 expression of the DCs by flow cytometry

2.2 DC 刺激同种混合淋巴细胞反应的能力检测

加病毒组DC和无病毒组DC混合培养后的T淋巴细胞增值能力明显强于不加DC的T淋巴细胞。随着DC细胞和T细胞比例的增加，刺激指数逐步增加。2组之间无显著性差异(P>0.05)。检测结果为一次试验结果，见图2。

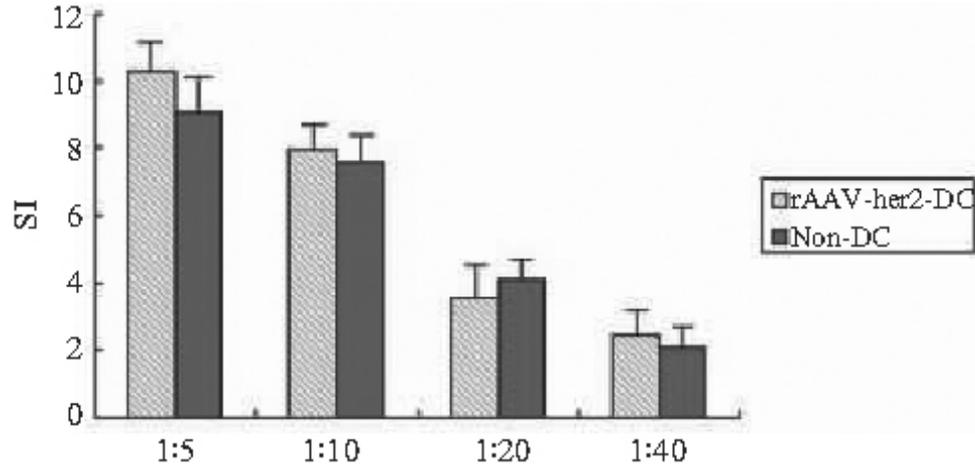


图2 同种混和淋巴细胞反应

Fig.2 Allogeneic mixed lymphocyte reaction induced by the DCs

2.3 DC诱导的CTL活性的检测

4次结果取平均值可见，加病毒组DC诱导CTL对Her2高表达的SK-BR-3的杀伤百分率随着E/T比例的增加逐步增高。E/T为80：1，40：1，20：1时明显高于无病毒组DC ($P < 0.05$)。加病毒组DC与无病毒组DC诱导的CTL对Her2阴性表达的MCF7的杀伤的百分率均低，两组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)，见表1。

表 1 DC 诱导的 CTL 活性

Tab.1 CTL activity induced by the DCs ($n=4$, Mean±SD)

Group	CTL killing (%)			
	80:1	40:1	20:1	10:1
SK-BR-3+rAAV-DC	39.7±7.2*	26.5±4.1*	19.3±1.8*	9.9±2.9
SK-BR-3+Non-DC	13.0±4.5	7.9±1.5	10.3±2.4	8.9±3.0
MCF7+ rAAV-DC	11.7±5.1	7.7±2.3	3.8±1.8	8.3±3.3
MCF7+Non-DC	12.4±3.5	9.0±3.5	5.9±2.0	6.5±3.1

* $P < 0.05$ vs SK-BR-3+Non-DC group

3 讨论

DC是人体内重要的抗原递呈细胞，可以把抗原特异性地递呈给免疫效应细胞，产生抗原特异性的免疫反应。而采用抗原基因转导制备DC瘤苗较传统的抗原肽刺激制备DC具有简单高效，低成本的特点。

Her2/neu基因是乳腺癌的重要癌基因，亦称Neu或C-erbB-2基因，位于17号染色体q21区带上，编码分子量为185 000的跨膜蛋白[1]。该蛋白属表皮生长因子受体家族成员之一，具有酪氨酸激酶活性，在细胞内信号转导中发挥重要作用。Her2/neu基因在正常细胞内不表达或低表达，而在许多人类肿瘤中有过表达。据报道20%~30%的乳腺癌存在Her2/neu基因扩增或过度表达[2]。早在1990年Her2/neu已被认定是乳腺癌免疫治疗的理想靶点。

目前基因转导修饰DC的方法主要有病毒法和非病毒法。而病毒法由于具有较高的转导效率及转导的基因在细胞内不易被降解等优点而越来越多地被采用。作为一种活病毒载体，腺相关病毒具有稳定表达、定点整合、无致病性，且感染率高等优势，因此适合于DC的转导[3]。根据报道重组腺相关病毒介导E6和E7抗原基

因感染的DC 可刺激E6 和E7 特异性的CTL 反应产生, 且感染的DC 免疫刺激功能并未减弱[4][5]。

本研究结果表明, 加病毒组DC Her2 转染率为88.97%。两组均高水平表达CD1a、CD86、和CD83, 组间差别不明显。加病毒组CD40、CD80明显高于无病毒组。目前常用CD1a阳性来反映DC的数量[6]。CD83 是成熟DC的重要标志[7]。结果提示两组DC的数量、成熟度均较高。CD40在激发T细胞免疫活性方面具有重要作用。CD80和CD86是DC表面重要的共刺激分子, 是机体对肿瘤细胞发生主动免疫重要的刺激信号[8]。结果提示加病毒组DC较无病毒组DC在激发免疫功能方面更具优势。DC刺激同种混合淋巴细胞反应的能力检测结果提示: 加病毒组DC与无病毒组DC在不同的DC:T比例中均能刺激T淋巴细胞增殖, 且组间无显著性差异。证明腺相关病毒不会降低DC刺激T淋巴细胞增殖的能力。加病毒组DC诱导的CTL 对Her2高表达的SK-BR-3有明显杀伤作用, 显著高于无病毒组, 在E/T为80:1时杀伤率最高。对Her2阴性表达的MCF7杀伤率低。证明加病毒组DC可提呈Her2/neu抗原, 供T淋巴细胞识别, 诱导特异性CTL, 引起Her2高表达的肿瘤细胞的杀伤。

本实验研究证明rAAV-Her2/neu转染的DC有较强的特异性免疫功能。为进一步临床实验奠定了基础。

参考文献:

[1]Michael PD. Clinical significance of HER2/neu over expression: Part1[J]. Princ Pract Oncol, 1999, 13: 1-9.

[2]Quene N, Wafflart J, Bergonie F. The prognostic value of Her-2 in primary breast cancerinoma: A study on 942 cases[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 3(3): 283-5.

[3]尤长宣, 罗荣城, 苏瑾, 等. 乳腺癌BA46基因腺相关病毒的制备[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(8): 166-8.

[4]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.

[5]Liu Y, Chiriva-Internati M, Salati E, 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.

[6]Coventry BJ, Austyn JM, Chryssidis S, et al. Identification and isolation of CD1a positive putative tumour in filtrating dendritic cells in human breast cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 1997, 417(1): 571-7.

[7]Fujimoto Y, Tu L, Miller A S, et al. CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus[J]. Cell, 2002, 108(6): 755-67.

[8]范萍, 武正炎, 王水, 等. 外周血中树突状细胞的诱导、培养及其表面标记的初步研究[J]. 南京医科大学学报, 2002, 22(1): 25-8.