



含hTERT片段的重组逆转录病毒感染对树突状细胞功能的影响

端粒酶在决定端粒长度、控制细胞分裂增殖等方面起重要作用。人端粒酶由三个部分组成：人端粒酶RNA、人端粒酶相关蛋白和人端粒酶逆转录酶(hTERT)。85%以上的肿瘤细胞表达端粒酶活性，而正常组织的细胞则很少表达，hTERT作为端粒酶催化亚基在肿瘤细胞中广泛表达，使得人们对把hTERT作为肿瘤相关抗原用于肿瘤的免疫治疗产生了浓厚的兴趣[1][2]。树突状细胞(DCs)是目前发现的唯一能激活初始型T细胞(naive T cell)增殖并建立初级免疫反应的抗原呈递细胞(APC)，在启动机体抗感染和抗肿瘤的免疫反应中起关键作用。利用载体将hTERT基因导入DCs，hTERT的表达产物经过DCs的加工处理后，通过MHC I途径呈递给T淋巴细胞，从而激发hTERT特异性免疫反应已成为肿瘤的免疫治疗的新策略。但是，在这种新策略实施之前，有必要了解hTERT基因在DCs中表达是否会影响DCs本身的功能。有鉴于此，本研究观察了含hTERT基因片段的重组逆转录病毒感染对人外周血单核细胞来源DCs功能的影响，旨在为hTERT抗原用于基于DCs的肿瘤免疫治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

含hTERT基因片段(1 590~2 540 bp)的重组逆转录病毒由我们先前构建，滴度为： 2.85×10^5 PFU/ml；Raji细胞和293细胞由南方医科大学流行病教研室保存；粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和肿瘤坏死因子 α (TNF α)购自深圳晶美公司；白介素-2(IL-2)、白介素-4(IL-4)和白介素-12(IL-12, p70亚单位)检测试剂盒购自PIERCE公司；DMEM、RPMI 1640细胞培养基、胎牛血清(FBS)为HyClone公司产品；CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒为Promega公司产品；丝裂霉素C为Sigma公司产品；T细胞尼龙毛柱为Gibco产品；淋巴细胞分离液为上海生化试剂二厂产品。

1.2 人外周血DCs的分离、培养和重组病毒感染

综合参照文献[3][4]。取健康志愿者外周抗凝静脉血50 ml，加入淋巴细胞分离液梯度离心，轻取上层单个核细胞，Hank's液洗3次，悬浮于RPMI 1640中，计数，调整细胞浓度为 4×10^6 /ml，接种于6孔板中(1 ml/孔)，37℃，5%CO₂静置培养2h，吸取非贴壁细胞，经T细胞尼龙毛柱吸附分离出淋巴细胞，RPMI 1640培养液轻轻冲洗贴壁细胞后立即加入0.5ml含hTERT基因片段的重组逆转录病毒，3 h后弃去各孔液体，加入含GM-CSF(1 000 U/ml)、IL-4(400 U/ml)和体积分数为15%FBS的RPMI 1640培养液3 ml继续培养。每隔24 h半量换液，从第5天开始在培养液中加入TNF α (300 U/ml)，第8天收集悬浮细胞为含hTERT基因片段的重组逆转录病毒感染的DCs(hTERT-DCs)，未加重组病毒孔收集的细胞为未感染的DCs(N-DCs)。

1.3 培养DCs上清中IL-12含量检测

按试剂盒说明书提供的方法于培养后2、4、6、8 d检测hTERT-DCs和N-DCs上清中IL-12(p70亚单位)的含量。

1.4 流式细胞仪检测DCs的表型

第8天收集的悬浮细胞用PBS制成细胞悬液。取0.5 ml细胞悬液用PE或FITC标记的抗体孵育30 min, PBS洗2遍, 流式细胞仪(Becton Dickinson)检测DCs表面标记。

1.5 混合白细胞反应(MLR)检测DC刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力

MLR中的T淋巴细胞与DC分别来自不同的献血者, 分别取培养8 d的hTERT-DCs、N-DCs用25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的丝裂霉素C在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中作用30 min, 1 000 r/min, 10 min, 弃上清, 沉淀细胞用PBS洗三次, 悬浮于RPMI 1640中。分别以 $1\times 10^5/\text{孔}$ 、 $2\times 10^4/\text{孔}$ 、 $1\times 10^4/\text{孔}$ 、 $2\times 10^3/\text{孔}$ 和 $1\times 10^3/\text{孔}$ 将DC加入96孔板中, 以T淋巴细胞供者自身的PBMC为对照组, 每组三个复孔。每孔均加入 1×10^5 的T淋巴细胞, 刺激应答比(S/R)分别为1:1、1:5、1:10、1:50和1:100, 终体积200 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养96 h。终止培养前6 h加入MTT200 μl (5 mg/ml), 培养终止后加酸化异丙醇100 μl , 充分混匀, 静置数分钟后在波长为570 nm处测D(λ)值, 刺激指数(SI)=实验孔D(λ)均值/对照孔D(λ)均值。

1.6 细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应

1.6.1 靶细胞的制备 复苏的Raji细胞和293细胞分别培养于含10%的FBS的RPMI1640和DMEM中, 在对数生长期取细胞作为靶细胞。

1.6.2 效应细胞的制备 取培养8 d的hTERT-DCs、N-DCs作为刺激细胞, 以经T细胞尼龙毛柱分离的自体T淋巴细胞为效应细胞。将二者按1:10的比例(刺激细胞比效应细胞, S/E)共孵育7d, 同时以不与DC共孵育的自体淋巴细胞为对照, 每组设3复孔。

1.6.3 CTL的测定 以E/T(效应细胞比靶细胞)为20:1和50:1, 按CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒说明书测定CTL反应, 以对靶细胞的杀伤率表示CTL活性。

1.7 统计学处理

本实验所得计量资料用SPSS10.0软件进行方差分析或t检验。

2 结果

2.1 培养DCs上清中IL-12(p70亚单位)的含量

hTERT-DCs和N-DCs上清中IL-12的含量在各时相点均无明显差异, 随着培养时间的延长, hTERT-DCs和N-DCs逐渐成熟, 其IL-12的分泌水平呈逐渐升高的趋势, 在第6天和第8天明显高于第2天($P<0.05$) (图1)。

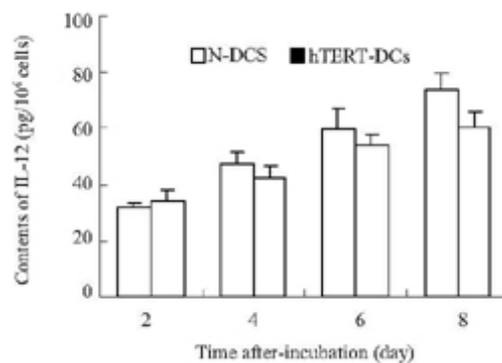


图1 N-DCs和hTERT-DCs培养液中IL-12的含量

Fig.1 Contents of IL-12 in culture solutions of N-DCs and hTERT-DCs

2.2 DCs表型检测

流式细胞仪分析显示(图2), 2组均高水平表达CD86和HLA-DR, hTERT-DCs组 CD80表达水平高于N-DCs组, 但成熟DC的标记-CD83表达水平低于N-DCs组。

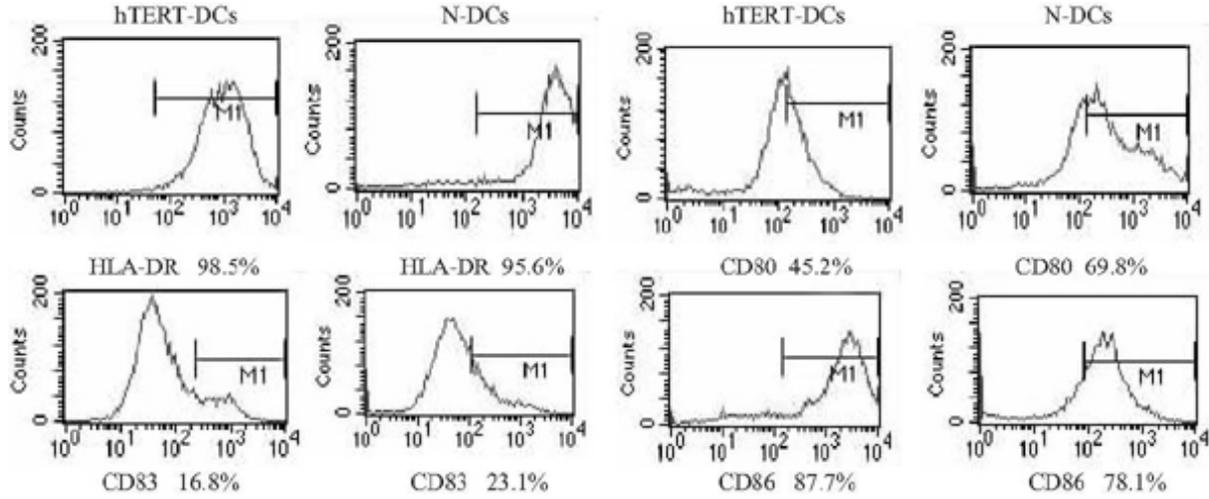


图2 N-DCs和hTERT-DCs的表型分析
Fig.2 Phenotypic analysis of N-DCs and hTERT-DCs

2.3 DC刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力检测

在不同的S/R比值，hTERT-DCs和N-DCs均可刺激同种异体淋巴细胞增殖，但两组DC刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力并无显著差异($P>0.05$)，图3)。

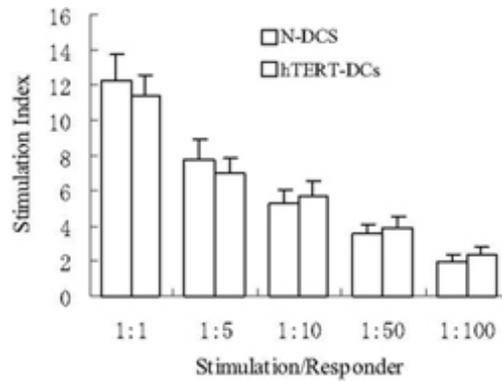


图3 hTERT-DCs刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力
Fig.3 The ability of hTERT-DCs to stimulate allogeneic lymphocyte proliferation

2.4 DCs激发的CTL活性

如表1所示，在E/T为20:1和50:1时，hTERT-DCs所激发针对Raji细胞的CTL活性显著高于N-DCs ($P<0.05$)，但两种DCs激发的针对293细胞的杀伤活性无明显差异($P>0.05$)；相同E/T时，hTERT-DCs激发的针对Raji细胞的CTL活性高于293细胞($P<0.05$)。

表1 hTERT-DCs诱导的特异性CTL活性

Tab.1 Induction of specific CTL activities using hTERT-DCs

Priming cells	E:T	Cytotoxicity(%)	
		Raji cells	293 cells
hTERT-DCs	1:50	54.18±12.40*#	23.52±6.83
	1:20	32.36±8.95*#	14.37±5.62
N-DCs	1:50	15.32±5.43	16.36±6.78
	1:20	8.61±4.21	9.31±3.79

* $P<0.05$ vs 293 cells; # $P<0.05$ vs N-DCs

3 讨论

T细胞介导的细胞免疫是人体抗肿瘤的主要机制，但是由于肿瘤细胞具有肿瘤抗原免疫原性弱或抗原调变，共刺激分子、粘附分子、MHC I/II表达减弱/缺失等特点，往往能从机体的免疫监视系统“逃逸”，因此，诱导和调节T细胞介导的细胞免疫已成为抗肿瘤的中心环节，如何将抗原有效呈递给T细胞又是诱导和调节T细胞介导的细胞免疫的关键步骤。目前，越来越多的学者认识到通过调节肿瘤抗原的呈递以增强抗肿瘤免疫应答已成为肿瘤免疫治疗的一项重要策略，其中对DCs等抗原呈递细胞进行修饰以增强其抗原呈递能力，就是一种应用于恶性肿瘤免疫治疗的行之有效的方案。

然而，是否可寻找到区别于正常细胞、又具有较强免疫原性的肿瘤相关抗原又决定了免疫治疗的成败。现有的研究证实[5][6][7]，来源于hTERT的多肽能被MHC I类和MHC II类分子加工呈递，激发特异性CTL反应，特异性杀伤端粒酶阳性的肿瘤细胞而对端粒酶阴性无明显影响，从而抑制肿瘤的生长。因此hTERT作为肿瘤相关抗原在免疫治疗中有其潜在的应用价值。但由于在机体绝大部分细胞均为端粒酶阴性，hTERT基因在正常细胞中表达的产物是否会影响细胞本身的功能不得而知，本研究为此探讨了含hTERT基因片段的重组逆转录病毒感染对人外周血单核细胞来源DCs免疫刺激功能的影响，为hTERT抗原用于基于DCs的肿瘤免疫治疗提供了可行性分析。

IL-12又称CTL成熟因子，其独特的、最重要的生物学活性是调节Th1与Th2细胞之间的平衡及诱导内源性IFN γ 的产生。而IFN γ 又可促进IL-12的产生，二者形成正反馈途径，共同调节T细胞亚群的分化，使CD4+Th0向Th1分化，刺激细胞分化增殖，从而促进细胞免疫应答[8]。本研究结果显示，含hTERT基因片段的重组逆转录病毒感染的DCs(hTERT-DCs)和未用重组病毒感染的DCs(N-DCs)分泌IL-12的水平、刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力方面均无明显差异，表明hTERT-DCs活化淋巴细胞，促使其扩增的能力并没发生明显改变。

CD83是成熟DC重要标志，主要由DC和胸腺上皮细胞表达，在T细胞的分化和发育过程中以及维持DC的抗原呈递功能等方面起重要作用[9]。在本研究当中，hTERT-DCs CD83的表达水平低于N-DCs，提示含hTERT基因片段的重组逆转录病毒感染似乎可以阻止DCs的成熟，而只有成熟的DCs才能充分发挥其抗原呈递功能，因此，在后续的研究工作中有必要采取如在DCs培养后期添加LPS、增加培养液中TNF α 的浓度或采用与表达细胞因子的重组病毒共感染等策略促进DCs的成熟。

理论上，内源性表达hTERT产物的DCs经过自身加工处理后，会通过MHC I途径呈递给CD8+T细胞，激发hTERT特异性CTL。为了证实这一点，我们进行了细胞毒实验，杀伤实验结果显示，hTERT-DCs激发的CTL对端粒酶阳性的靶细胞(Raji细胞)杀伤率明显高于端粒酶阴性的靶细胞(293细胞)($P < 0.05$)，并且hTERT-DCs激发的CTL对Raji细胞的杀伤率也明显高于N-DCs激发的CTL。表明hTERT-DCs激发的CTL是hTERT特异性的，只能特异性杀伤端粒酶阳性的靶细胞。

总而言之，hTERT-DCs尽管有可能阻止DCs自身的成熟，但在活化淋巴细胞、刺激淋巴细胞分化增殖的能力方面并没发生明显改变，并且还能激发hTERT特异性的CTL，如能采取一定的策略促进DCs的成熟，利用携带hTERT基因的逆转录病毒感染DCs在基于DCs的恶性肿瘤免疫治疗研究中具有潜在的应用价值，值得进一步研究。

(责任编辑：段咏慧)

参考文献：

- [1] Jerry W, Shay BN, Ying Z, et al. Telomerase and cancer[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(7): 677-85.
- [2] Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, et al. Inhibition of telomerase limits the growth

of human cancer cells[J]. Nat Med, 1999, 5(10):1164-70.

[3]Romani N, Reider D, Heuer M, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability[J]. J Immunol Methods, 1996, 196: 137-51.

[4]胡贵方, 吴小兵, 俞守义, 等. 来源于人外周血单核细胞的树突状细胞感染rAAV-HBsAg后的功能改变[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(7): 696-8.

Hu GF, Wu XB, Yu SY, et al. Functional change of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells after recombinant adeno-associated virus type 2-mediated HBsAg gene infection[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 696-8.

[5]Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, et al. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(3):828-39.

[6]Schroers R, Shen L, Rollins L, et al. Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(13): 4743-55.

[7]Su Z, Dannull J, Yang BK, et al. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer[J]. J Immunol, 2005, 174(6): 3798-807.

[8]Huang LY, Krieg AM, Eller N, et al. Induction and regulation of Th 1-inducing cytokines by bacterial DNA, LPS, and heat-inactivated bacterial[J]. Infect Immun, 1999, 67(12): 6257-63.

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