

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

马树东¹, 罗荣城¹, 丁振华², 鲁峰³, 袁长青²(南方医科大学¹南方医院肿瘤科,²热带医学研究所放射医学教研室,³南方医院整形科, 广东广州 510515)

摘要:目的 观察体外树突状细胞(DC)感染编码 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 3 种重组腺病毒(rAdHer2-ECDs, rAdHer2-ECD 和 rAdHer2-TM)后的免疫功能变化。方法 重组腺病毒感染未成熟 DC 后, Western blot 法检测目的蛋白在 DC 中的表达。ELISA 法检测 DC 感染 3 个重组腺病毒后的白介素-12(IL-12)分泌水平及与淋巴细胞共孵育后上清中干扰素- γ (IFN- γ)的含量。采用混合白细胞反应检测 DC 感染前后刺激同种异体淋巴细胞的增殖能力。MTT 法检测细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)活性。结果 Her2-ECDs、ECD、TM 蛋白在 DC 中获得表达。转染 DC 培养第 5 天, 上清中 IL-12 含量比未转染 DC 含量高($P<0.05$), 但 3 种重组病毒之间无明显差异($P>0.05$)。DC 刺激淋巴细胞增殖后培养上清中 IFN- γ 的含量显示随着时间的延长逐步增高, 但病毒感染 DC 明显高于非感染 DC。DC 明显介导淋巴细胞增殖反应, 除 rAdHer2-TM 感染 DC 外, 另两种转染和非转染 DC 之间无差异($P>0.05$)。在 DC 诱导的 CTL 反应中, 病毒感染 DC 诱导的杀伤率明显高于 SK-OV-3 修饰和非修饰 DC, 而 SK-OV-3 修饰又高于非修饰 DC 杀伤率($P<0.05$)。在病毒感染 DC 中, 以 rAdHer2-TM 转染 DC 激发的 CTL 活性为最强。对高表达 Her2/neu 蛋白的乳腺癌细胞株的杀伤率明显高于对 Her2/neu 表达阴性的杀伤率($P<0.05$)。结论 编码 Her2/neu 膜外及跨膜区蛋白重组腺病毒转染 DC 后, 明显增强 DC 的抗肿瘤免疫功能, 诱导出 Her2/neu 特异性的 CTL 活性。

关键词: 基因, Her2/neu; 树突状细胞; T 淋巴细胞, 细胞毒; 腺病毒, 重组

中图分类号: R394.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)08-1184-04

Changes in immune function of dendritic cells infected by recombinant adenovirus containing Her2/neu gene of extracellular and transmembrane domain proteins

MA Shu-dong¹, LUO Rong-cheng¹, DING Zhen-hua², LU Feng³, YUAN Chang-qing²

¹Department of Oncology, ²Department of Plastic Surgery, Nanfang Hospital, ³Department of Radiation Medicine, Institute of Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 501515, China

Abstract: **Objective** To observe the functional changes of dendritic cells (DCs) infected *in vitro* by 3 recombinant adenoviruses encoding Her2/neu extracellular first-receptor domain (Her2-ECDs), full-length extracellular domain (Her2-ECD), and extracellular and transmembrane domain (Her2-TM) proteins (rAdHer2-ECDs, rAdHer2-ECD and rAdHer2-TM, respectively). **Methods** The expressions of the target proteins were detected with Western blotting. The level of both interleukin (IL)-12 in the supernatant of *in vitro* cultured DCs infected with recombined adenoviruses and interferon γ (IFN- γ) in the supernatant of the lymphocyte populations co-cultured with DCs were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The capacity of the DCs to stimulate allogeneic T lymphocyte proliferation was assessed by mixed lymphocyte reaction, and the activity of cellular toxic T lymphocytes (CTL) were investigated by MTT assay. **Results** Her2-ECDs, ECD and TM proteins were detected in the transfected DCs. Compared with the untransfected DCs, more abundant IL-12 production was detected in the supernatant of the DCs 5 days after transfection, but the IL-12 level showed no significant difference between the DCs infected with the 3 recombinant adenoviruses. IFN- γ production increased gradually with passage of the time following DC-stimulated lymphocyte proliferation irrespective of infection of the DCs, and only the DCs infected with rAdHer2-TM seemed to result in significant difference in DC-mediated allogeneic T lymphocyte proliferation. The killing of breast cancer cell line with Her2 overexpression was more efficient with infected DCs priming autologous T lymphocyte to generate CTL than with uninfected DCs and those modified by SK-OV-3 cell fragment. CTL activity induced by rAdHer2-TM-infected DCs was the strongest, and breast cancer cell-killing activity was more efficient against cell line with Her2/neu-overexpression. **Conclusion** The DCs infected with the recombinant adenovirus encoding Her2/neu extracellular and transmembrane domains show enhanced anti-tumor effect and induce Her2/neu-specific CTL activity.

Key words: gene, Her2/neu; dendritic cells; T lymphocytes, cytotoxic; adenovirus, recombinant

收稿日期: 2005-09-14

作者简介: 马树东(1967-), 男, 现在中山大学从事博士后工作, 主要方向为肿瘤分子标志和基因诊断及治疗研究, 电话: 020-61641655, E-mail: mashudong@yahoo.com.cn

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, 但他们的功能受 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 CD4⁺ T 细胞分泌大量的细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、(IL-12)等,反馈调节 DC 和维持 CD8⁺ 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- α 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- γ 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 10⁴)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- α 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-OV-3 细胞修饰 DC 和未修饰 DC,用 30 μ g/ml MMC,37 $^{\circ}$ 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 10⁴、5 \times 10³、2 \times 10³、1 \times 10³ 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 10⁵ T 淋巴细胞,终体积为 200 μ l。MTT 法在酶标仪上测 570 nm 波长的 D(λ)值。刺激指数(SI)=实验孔 D(λ)平均值 / 对照孔 D(λ)平均值。

1.7 转染和未转染 DC 刺激淋巴细胞后上清中 IFN- γ 含量检测

将培养 7 d 的经 MOI 为 3.75 \times 10⁴ 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- γ 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-OV-3 修饰 DC(SK-OV-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-OV-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 10⁵/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(λ)值。杀伤率%=(1-实验孔 D(λ)值 / 对照孔 D(λ)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-α,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)。

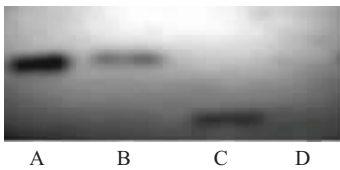


图 1 目的蛋白在 DC 中的表达

Fig.1 Expression of the target proteins in the DCs

A: Her2-ECD, B: Her2-TM, C: Her2-ECDs, D: Negative control

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。

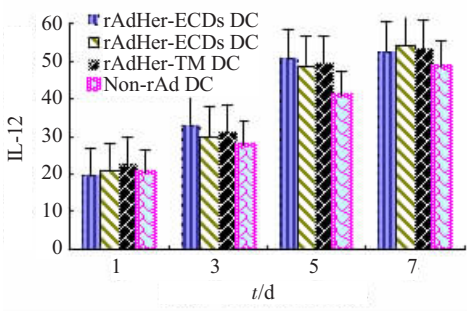


图 2 感染 DC 和非感染 DC 培养上清中 IL-12 含量

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。

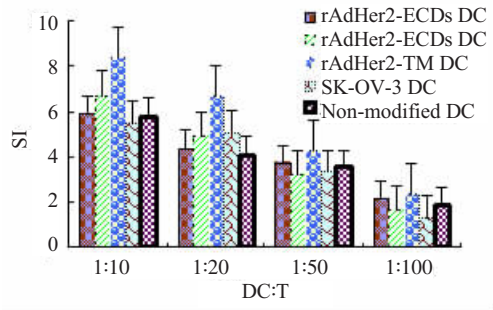


图 3 同种混合淋巴细胞反应

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-γ 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-γ 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。

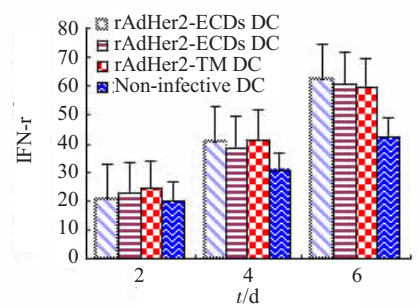


图 4 DC 和淋巴细胞共培养上清中 IFN-γ 的含量

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)。

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

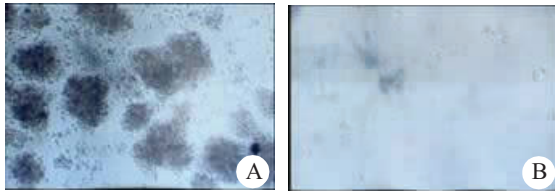


图 5 感染 DC 诱导 CTL 对 Her2 高表达肿瘤细胞的杀伤

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 -ECD 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	

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-γ^[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-γ 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-γ 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 CD4⁺ Th 细胞和 CD8⁺ 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⁺ 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.