

## 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

胡贵方<sup>1</sup>, 孙莉莎<sup>2</sup>, 金宏<sup>2</sup>, 欧程山<sup>3</sup>, 蒋毅萍<sup>2</sup>, 庞建新<sup>2</sup> (南方医科大学<sup>1</sup> 流行病学教研室,<sup>2</sup> 药理学教研室,<sup>3</sup> 毒理学教研室, 广东 广州 510515)

**摘要:**目的 观察含人端粒酶逆转录酶(hTERT)片段的重组逆转录病毒感染对树突状细胞(DCs)功能的影响。方法 ELISA 试剂盒检测 DCs 培养液中 IL-12 水平;混合白细胞(MLR)反应检测含 hTERT 片段的重组逆转录病毒感染的 DCs(hTERT-DCs)和未感染的 DCs(N-DCs)刺激同种异体淋巴细胞增殖能力;流式细胞术检测 DCs 表面分子 CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 的变化;CytoTox 96 非放射性细胞毒性检测试剂盒检测细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应。结果 hTERT-DCs 和 N-DCs 在分泌 IL-12 的水平、刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力方面无明显差异;hTERT-DCs 的 CD83 表达水平低于 N-DCs,同时,hTERT-DCs 激发的 CTL 对端粒酶阳性的靶细胞杀伤率明显高于端粒酶阴性的靶细胞( $P<0.05$ )。结论 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 CTL。

**关键词:** hTERT; 逆转录病毒; 树突状细胞; 免疫治疗

中图分类号:R913 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)04-0394-04

## Functional changes of dendritic cells after infection by recombinant retrovirus carrying human telomerase reverse transcriptase gene fragment

HU Gui-fang<sup>1</sup>, SUN Li-sha<sup>2</sup>, JIN Hong<sup>2</sup>, OU Cheng-shan<sup>3</sup>, JIANG Yi-ping<sup>2</sup>, PANG Jian-xin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Epidemiology, <sup>2</sup>Department of Pharmacology, <sup>3</sup>Department of Toxicology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** **Objective** To observe the functional changes of dendritic cells (DCs) after infection by recombinant retrovirus carrying human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene fragment. **Methods** Interleukin-12 (IL-12) levels in DC culture supernatant was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The abilities of DCs infected with recombinant retrovirus carrying hTERT gene (hTERT-DCs) and non-infected DCs (N-DCs) to stimulate allogeneic lymphocyte proliferation were evaluated with mixed leukocytes reaction (MLR), and the surface markers of DCs including CD80, CD83, CD86 and HLA-DR were detected by flow cytometry. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) assay was performed with CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay. **Results** Compared with N-DCs, hTERT-DCs showed no significant changes in IL-12 secretion and capacity to stimulate allogeneic lymphocytes reaction, but had significantly lower CD83 expression. Specific CTLs induced by hTERT-DCs resulted in higher cytotoxicity against telomerase-positive target cells than that against the negative target cells. **Conclusions** Infection with the recombinant retrovirus carrying hTERT fragment may jeopardize the maturation of DCs, which, however, still retain their capacity to activate and stimulate lymphocyte proliferation and to prime autologous T lymphocytes to generate specific CTL against hTERT.

**Key words:** human telomerase reverse transcriptase; recombinant retrovirus; dendritic cells; immunotherapy

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<sup>[1,2]</sup>。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外周血单核细胞来源 DCs

收稿日期:2005-10-12

基金项目:国家自然科学基金(30000208);广东省自然科学基金(32876)

Supported by National Natural Sciences Foundation of China (30000208); Natural Science Foundation of Guangdong Province (32876)

作者简介:胡贵方(1966-),男,博士,讲师,E-mail:guifanghu@hotmail.com

通讯作者:庞建新(1965-),副教授,主要从事抗肿瘤药物研究,电话:020-61648325

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  $2.85 \times 10^5$  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  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 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

综合参考文献 [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  $4 \times 10^6$ /ml, 接种于 6 孔板中 (1 ml/孔), 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 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 $\alpha$  (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

$\mu$ g/ml 的丝裂霉素 C 在 37 °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  $1 \times 10^5$ /孔、 $2 \times 10^4$ /孔、 $1 \times 10^4$ /孔、 $2 \times 10^3$ /孔和  $1 \times 10^3$ /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  $1 \times 10^5$  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  $\mu$ l, 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 培养 96 h。终止培养前 6 h 加入 MTT 200  $\mu$ l (5 mg/ml), 培养终止后加酸化异丙醇 100  $\mu$ l, 充分混匀, 静置数分钟后在波长为 570 nm 处测 D ( $\lambda$ ) 值, 刺激指数 (SI) = 实验孔 D ( $\lambda$ ) 均值 / 对照孔 D ( $\lambda$ ) 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 RPMI 1640 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 SPSS 10.0 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)。

### 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。

### 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)。

### 2.4 DCs 激发的 CTL 活性

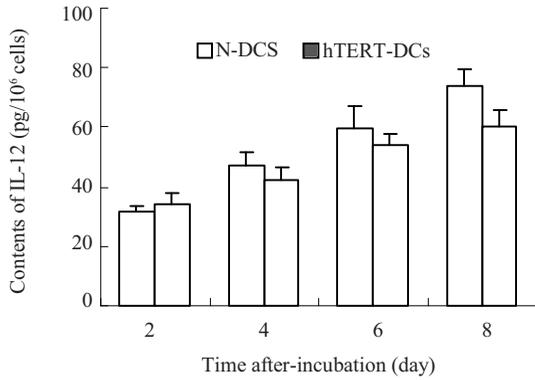


图 1 N-DCs 和 hTERT-DCs 培养液中 IL-12 的含量  
Fig.1 Contents of IL-12 in culture solutions of N-DCs and hTERT-DCs

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 ( $P<0.05$ ).

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

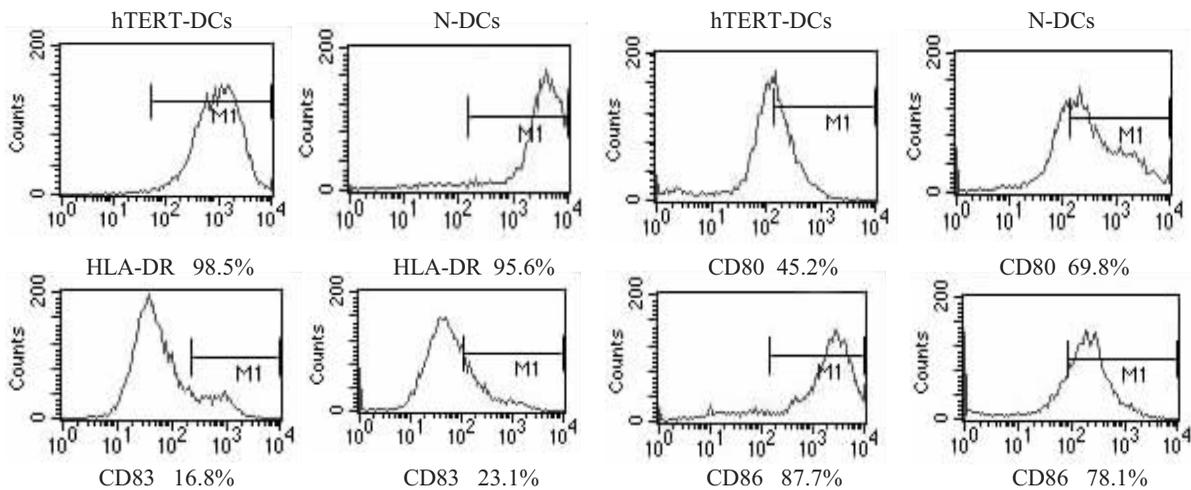


图 2 N-DCs 和 hTERT-DCs 的表型分析  
Fig.2 Phenotypic analysis of N-DCs and hTERT-DCs

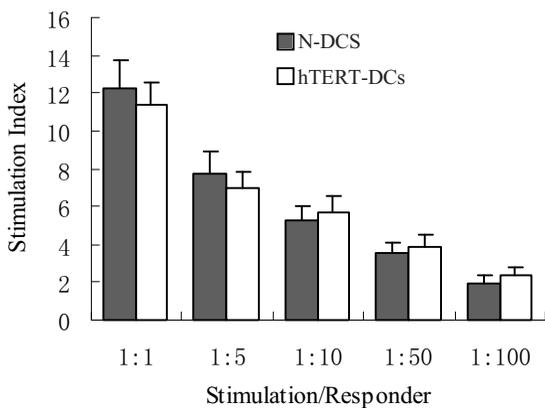


图 3 hTERT-DCs 刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力  
Fig.3 The ability of hTERT-DCs to stimulate allogeneic lymphocyte proliferation

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

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<sup>[5-7]</sup>, 来源于 hTERT 的多肽能被

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

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 $\gamma$ 的产生。而IFN $\gamma$ 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<sup>[8]</sup>。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<sup>[9]</sup>。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 $\alpha$ 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。

#### 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 Th1-inducing cytokines by bacterial DNA, LPS, and heat-inactivated bacteria[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.

(责任编辑:段咏慧)