

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

徐蕾, 罗荣城, 尤长宣, 李荣, 郑航(南方医科大学南方医院肿瘤科, 广东广州 510515)

摘要:目的 Her2/neu 基因重组腺相关病毒(rAAV-Her2/neu)转染人外周血树突状细胞(DC),并检测其免疫功能。方法 采用 Ficoll 分离健康人外周血中的单个核细胞。将其分成两组,给其中一组加入病毒。应用含 10%人 AB 血清的 RPMI-1640 培养基及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,白细胞介-4、肿瘤坏死因子- α 培养。第 7 天收获成熟 DC。流式细胞仪检测 DC 表型。 $^3\text{H-TdR}$ 检测同种混合淋巴细胞反应。MTT 法检测 DC 诱导 T 细胞的杀伤活性。结果 加病毒组 CD1a、CD86 和 CD83 分别为:98.10%、99.42%、84.59%;无病毒组为:92.69%、98.07%、82.72%,组差别不明显。加病毒组 CD40、CD80 分别为:61.02%、97.61%;无病毒组为:36.19%、55.5%,加病毒组高于无病毒组。两组均能刺激 T 淋巴细胞增殖。加病毒组 DC 可诱导特异性杀伤,最高杀伤率(39.7 \pm 7.2)%。结论 rAAV-Her2/neu 转染的 DC 有更强的免疫功能。

关键词:树突状细胞;腺相关病毒;免疫功能;Her2/neu 基因

中图分类号:R373.51 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2005)09-1181-04

Immunostimulatory effect of human peripheral blood dendritic cells transfected by adeno-associated virus containing Her2/neu gene

XU Lei, LUO Rong-cheng, YOU Chang-xuan, LI Rong, ZHENG Hang

Department of Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To observe the immunostimulatory effect of human peripheral blood dendritic cells (DCs) transfected by Her2/neu gene delivered by adeno-associated virus. **Methods** The mononuclear cells in healthy donors were isolated by Ficol-Hypaque density gradient separation and divided into transfection group and control group without transfection by the recombinant virus. The cells were initially cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% AB human serum, followed by addition of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin (IL)-4 and tumor necrosis factor (TNF)- α into the medium. The surface markers of DC were detected by flow cytometry, allogeneic mixed lymphocyte reaction assayed by $^3\text{H-TdR}$ incorporation and the specific killing activity of T cells evaluated by MTT assay. **Results** The expression rates of CD1a, CD86 and CD83 of the transfected DCs were 98.10%, 99.42%, and 84.59%, and those of the non-transfected DCs were 92.69%, 98.07%, and 82.72%, respectively, showing no obvious differences between the two groups. The rates of CD4 and CD80 expression were 61.02% and 97.61%, respectively, in the transfected DCs, significantly higher than those in the non-transfected cells (36.19% and 55.5%). Both groups of DCs stimulated a strong T cell proliferation response. The transfected DCs were capable of inducing specific killing of the target tumor cells, with the highest killing rate of (39.7 \pm 7.2)%. **Conclusion** The immunostimulatory effect of human peripheral blood DCs can be enhanced by Her2/neu gene transfection mediated by adeno-associated virus.

Key words: dendritic cells; adeno-associated virus; immunostimulatory effect; Her2/neu gene

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

收稿日期:2005-05-19

作者简介:徐蕾(1976-),女,1999年毕业于滨州医学院,现为南方医科大学在读硕士研究生,医师,电话:13711146578

通讯作者:罗荣城,电话:13902251269

-CD40、PE-CD80、FITC-CD86、APC-Her2 购自晶美公司。放射性同位素 $^3\text{H-TdR}$ 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 °C, 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 10⁸/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 $\mu\text{g/ml}$ 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 \times 10⁶ 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 $^3\text{H-TdR}$ /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 \times 10⁴ 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 μl MTT/孔,继续孵育 6 h 后,加 100 μl 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。

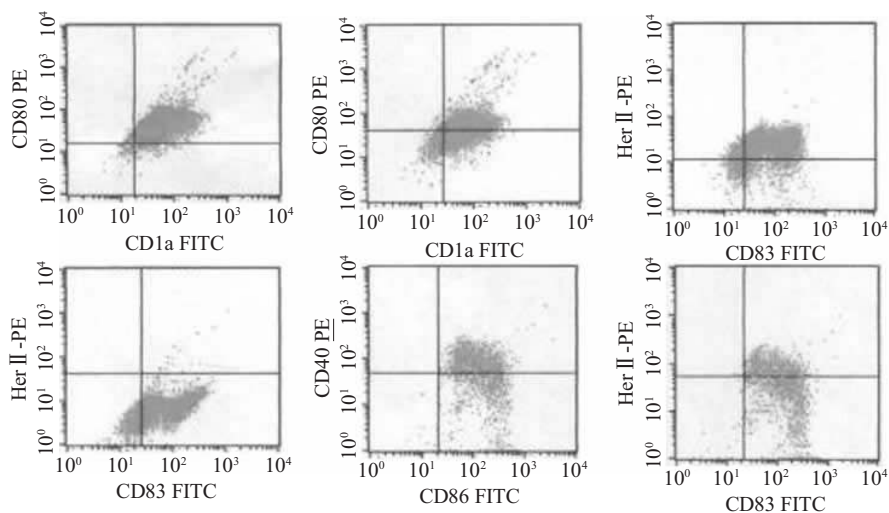


图 1 DC 细胞表型分析及 Her2 的表达

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。

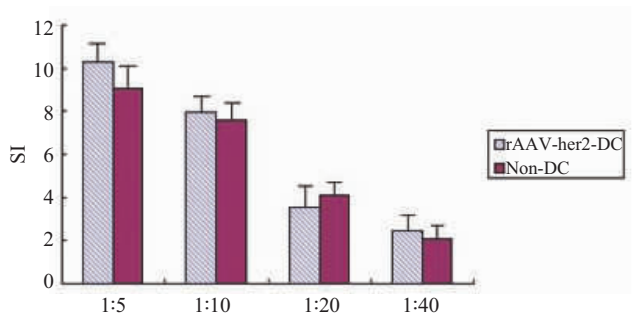


图 2 同种混和淋巴细胞反应

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 \pm SD)

Group	CTL killing (%)			
	80:1	40:1	20:1	10:1
SK-BR-3+rAAV-DC	39.7 \pm 7.2*	26.5 \pm 4.1*	19.3 \pm 1.8*	9.9 \pm 2.9
SK-BR-3+Non-DC	13.0 \pm 4.5	7.9 \pm 1.5	10.3 \pm 2.4	8.9 \pm 3.0
MCF7+rAAV-DC	11.7 \pm 5.1	7.7 \pm 2.3	3.8 \pm 1.8	8.3 \pm 3.3
MCF7+Non-DC	12.4 \pm 3.5	9.0 \pm 3.5	5.9 \pm 2.0	6.5 \pm 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 疫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: Part I [J]. *Princ Pract Oncol*, 1999, 13: 1-9.
- [2] Quene N, Wafflart J, Bergonie F. The prognostic value of Her-2 in primary breast cancer: 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, Chrystidis 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.

注射用铃兰欣细菌内毒素动态浊度法的研究

郑俊猛, 卢荣枝(中山市人民医院心胸外科, 广东 中山 528403)

摘要:目的 应用动态比浊法鲎试验定量测定注射用铃兰欣中的细菌内毒素含量。方法 应用动态比浊法鲎试验, 通过对样品中定量添加标准内毒素的干扰试验, 计算其回收率是否在有效范围。结果 标准内毒素使用 5.00、0.500、0.050 EU/ml, 注射用铃兰欣溶液为 5 mg/ml 无干扰作用, 可用于有效的日常检查。结论 动态比浊法鲎试验可以高效地测定注射用铃兰欣的细菌内毒素含量。

关键词: 动态比浊法鲎试验; 铃兰欣; 细菌内毒素; 干扰试验

中图分类号: R927.12 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)09-1184-02

注射用铃兰欣(头孢哌酮 0.5 g + 舒巴坦 0.5 g)为第三代头孢菌素与不可逆性竞争型 - 内酰胺酶抑制剂的联合制剂, 杀菌力强, 抗菌谱广, 对大多 G+ 菌 G- 菌和厌氧菌有很好的抗菌作用。国内文献未见对其细菌内毒素定量检查的报道。本文通过采用动态浊度法, 对注射用铃兰欣进行添加内毒素回收试验以建立注射用铃兰欣中内毒素定量分析方法。为临床提供快速有效的热原检测方法。

1 试验材料及仪器

细菌内毒素检查用水 Lot. No. 0106010 规格 30 ml/Amp 湛江安度斯生物有限公司; 动态比浊法鲎试剂 Lot. No.0107161 $\lambda=0.03$ EU/ml 1.2 ml/Amp 湛江安度斯生物有限公司; 细菌内毒素国家参考标准品 Lot. No.981 9 000 EU/Amp 中国药品生物制品检定所; 注射用铃兰欣 20001101、20001107、20001109 哈药集团制药总厂; EDS-99 细菌内毒素检测仪 北京金山川科技发展有限公司; 反应试管、吸管均经 250 °C 至少 2 h 干热除热原。

2 方法与结果

收稿日期: 2005-05-16

作者简介: 郑俊猛(1968-), 硕士, 副主任医师

2.1 本试验按“供试品干扰试验”方法进行^[1]

各试验参数如下^[2]:

查《美国药典》23 版, 头孢哌酮内毒素限值 $L=0.2$ EU/mg; 注射用铃兰欣采用内毒素限值 $L=0.2$ EU/mg; MVD: 最大的有效稀释倍数 $MVD=LC/\lambda=400$ 倍(动态比浊法鲎试验: λ 为标准曲线最低点浓度, 本试验中 $\lambda=0.05$ EU/ml, C: 样品溶液 500 mg/5 ml)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准曲线制作及可靠性^[1] 用细菌内毒素检查用水对细菌内毒素国家参考标准品 Lot. No981 进行稀释, 使其细菌内毒素最终浓度分别 0.05、0.5、5.0 EU/ml, 各取 0.100 ml 分别加到预先加有 0.100 ml 鲎试剂反应管内, 混合均匀, 插入 EDS-99 细菌内毒素检测仪内进行检测, 其中每一浓度重复 3 管, 并同时作阴性对照 3 管。实验数据按最小二乘法进行统计分析, 其标准曲线为: $\text{Log}T=2.932-0.280 \text{Log}C$, $r=-0.999$, 反应时间在 554 ~ 2 046 s, 而阴性对照管反应时间 (>3 700 s) 不超过最低浓度, 故标准曲线成立。

2.2.2 干扰预试验 铃兰欣最大的有效稀释倍数为 400。本试验中, 仅对其在较小的范围进行一系列稀释, 以筛选到最好的检查浓度。将铃兰欣制备成 20 mg/ml(1/5 稀释)、5 mg/ml(1/20 稀释)、2 mg/ml(1/50 稀释)3 个浓度系列, 每个浓度下分别取 0.100 ml 样品