

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)12-1116-03

尤文肉瘤细胞总 RNA 修饰的树突状细胞的体外培养及其鉴定

王 剑, 桑宏勋, 王 臻, 郭 征 (第四军医大学西京医院骨科研究所, 陕西 西安 710033)

***In vitro* cultivation and identification of dendritic cells transfected with total RNA from Ewing sarcoma cells**

WANG Jian, SANG Hong-Xun, WANG Zhen, GUO Zheng

Chinese PLA Institute of Orthopedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate RNA expression of dendritic cells(DC) pulsed with total RNA from Ewing sarcoma cells. **METHODS:** DC was generated from the peripheral blood mononuclear cells(PBMC) of Ewing sarcoma patients. Surface markers of matured DCs was detected by flow cytometer(FCM). Total RNA was isolated from Ewing sarcoma by Trizol. DC were transfected with total tumor cell RNA. The expression of DC transfected with total RNA was measured by RT-PCR method. **RESULTS:** Surface markers of DC pulsed with total RNA changed apparently. CD40 increased from 32.24% to 72.32%. CD83 increased from 17.39% to 30.97%, while monocyte CD14 declined from 26.37% to 10.46%. This indicated the significant reinforcement of antigen presentation of DC. RT-PCR showed the specific sequence EWS-FLI1 of Ewing sarcoma can be combined with the primer specifically at the best temperature of 54°C. **CONCLUSION:** DC pulsed with total RNA of Ewing sarcoma cells can present tumor specific antigen and express its characteristic sequence EWS-FLI1 specifically.

【Keywords】 dendritic cells; sarcoma, Ewing's; total RNA; reverse transcriptase polymerase chain reaction; cancer vaccines

【摘要】目的:探讨树突状细胞(DC)经尤文肉瘤细胞总 RNA 加载后的体外 RNA 表达情况。方法:采用分离尤文肉瘤患者外周血单核细胞体外诱导 DC, 用流式细胞仪检测 DC 成熟后的表面标志, Trizol 法提取患者尤文肉瘤组织总 RNA, 用总 RNA 转染 DC, 用 RT-PCR 方法检测肿瘤总 RNA 加载的 DC 的表达。结果:经尤文肉瘤总 RNA 加载的 DC 表面标记

发生明显变化, DC 的特异性表面标志如 CD40 由 32.24% 增高至 72.32%, CD83 由 17.39% 增高至 30.97%, 而代表单核细胞的 CD14 则由 26.37% 下降至 10.46%, 标志其抗原呈递功能显著增强。RT-PCR 测定显示尤文肉瘤中的特异性序列 EWS-FLI1 可以和引物特异性结合, 并且最佳结合温度为 54°C。结论:尤文肉瘤细胞总 RNA 转染的 DC 可以呈递肿瘤特异性抗原, 并特异性的表达其特有序列 EWS-FLI1。

【关键词】 树突状细胞; 肉瘤; Ewing; 总 RNA; 逆转录聚合酶链反应; 癌症疫苗

【中图分类号】 R392.12 **【文献标识码】** A

0 引言

细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)能够介导特异性免疫应答, 引导特异性肿瘤细胞杀伤效应。CTL 的特异性免疫应答依赖于肿瘤抗原的存在, 肿瘤抗原被抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)识别吞噬后, 在抗原递呈细胞内加工处理形成特定的多肽片段, 与 MHC I 类分子完全匹配后递呈到细胞表面, 被相应 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)识别, 形成肿瘤抗原多肽-MHC-TCR 复合物, 在协同刺激因子的共同作用下, 激活特异性细胞毒性 T 淋巴细胞, 产生免疫反应、清除肿瘤细胞^[1]。树突状细胞(dendritic cells, DC)是体内最重要的专职抗原递呈细胞^[2], 可由骨髓干细胞、外周血干细胞及外周血单个核细胞在细胞因子作用下诱导扩增。95% 的尤文肉瘤家族具有特异的染色体异位, 从而形成的 EWS-FLI1 融合基因是尤文肉瘤家族发生、进展的主要原因^[3]。本研究从尤文肉瘤患者外周血中分离单个核细胞在 IL-4 和 GM-CSF 诱导下分化扩增 DC, 从患者尤文肉瘤组织中提取肿瘤总 RNA 加载 DC, 并对经总 RNA 加载后的 DC 进行鉴定, 确定经肿瘤 RNA 加载的 DC 持续表达相应特异性肿瘤抗原, 为 DC 在尤文肉瘤生物学免疫治疗中的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI-1640 (美国 GIBCO 公司, 14.1 g/包) 胎牛血清(杭州四季青, 250 mL/瓶); IL-4 (美国 R&D 公司, lot# AG131091, 14.45 × 10⁵ U/5 ug/mL

收稿日期 2005-11-21; 接受日期 2006-01-10

基金项目 国家自然科学基金项目(39770749)

通讯作者:王 臻. Tel: (029)84775281 Email: wangzhen@fmmu.edu.cn

作者简介:王 剑. 硕士生(导师王 臻). Tel: (029)82554005

Email: wangjian@hotmail.com

stock);rhGM-CSF(海南通用同盟药业有限公司,150 ug/支);Trizol(美国GIBCO公司);OligodT(美国GIBCO公司);血细胞分离机(瑞典GAMBRO.BCT)梯度PCR仪(德国Eppendorff公司)流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司);尤文肉瘤瘤体标本由第四军医大学西京医院骨科2005年收治患者自愿提供(已签知情同意书);PCR引物由北京三博生物技术公司合成正向序列为5'-CCACTAGTTAC-CCACCCCAAAGT-3',反向序列为3'-GTGATA-CAGCTGGCGTTGGCG-5'.

1.2 方法

1.2.1 尤文肉瘤细胞总RNA提取 手术无菌切除活力好的尤文肉瘤组织,将其平均切成1 mm³大小的组织块,研磨后加Trizol 2 mL消化2 h,将消化好的细胞裂解液吸入2 mL装的离心管中,加氯仿0.2 mL,静置2 min,然后进行离心,离心设定为:8160 g,4℃,15 min,取上清无色水相0.8 mL,装入新的2 mL装的离心管中,加0.5 mL异丙醇,静置10 min,然后再次离心,离心设定为8160 g,4℃,10 min,观察总RNA为管底的白色沉淀,用DEPC水溶RNA,并测RNA浓度为4 μg/μL.

1.2.2 DC的体外培养 利用血细胞分离机(分离管道:去除白细胞装置管路;分离程序:MNC程序)采集尤文肉瘤患者外周血中的单个核细胞.将获得的单核细胞移入6孔培养板内进行贴壁培养,密度为:1×10⁸/孔,培养液为:RPMI-1640(10 g/L L-谷氨酰胺,10 g/L非必需氨基酸,10 g/L丙酮酸钠,100 mL/L胎牛血清),37℃,50 mL/L CO₂ 孵箱贴壁2 h,后用PBS洗涤液洗去未贴壁的细胞(大部分为小的淋巴细胞),然后加新鲜培养液:RPMI-1640 + IL-4(800 U/mL) + GM-CSF(800 U/mL),37℃,50 mL/L CO₂ 孵箱中继续培养6 d,第2日和4日更换新鲜培养液 RPMI-1640 + IL-4(800 U/mL) + GM-CSF(800 U/mL).

1.2.3 总RNA加载DC 在DC培养的第5日,在实验组中以10 mg/L的比例加入总RNA,放入孵箱中培养过夜.在DC培养的第6日,在对照组中不加入总RNA进行加载.

1.2.4 DC的成熟诱导 预先在两个100 mm Petri培养皿中分别接种5×10⁷的单个核细胞,2 h后吸弃其中的非黏附细胞,37℃,50 mL/L CO₂ 继续培养24 h,收集上清即为成熟DC条件培养液(preparation of monocyte conditioned medium, MCM),在实验组中加入MCM,放入孵箱继续培养36 h,在对照组中部分加入MCM,部分则不加MCM.

1.2.5 总RNA加载DC的鉴定

1.2.5.1 培养前后DC表面标记的测定 收集实验组和对照组两组细胞各分成5小组,每小组再分成6等份,用PBS调成5×10⁵/10 μL,加入FITC标记的mAb(CD14, CD40, CD83, CD86, HLA-DR) 4℃避光染色1 h,续加二抗,4℃避光染色1 h,洗涤后用10 mL/L多聚甲醛固定,流式细胞仪分析.

1.2.5.2 总RNA加载DC的RT-PCR测定 RT-PCR检测分为3组:取3个PCR小管,设为a, b, c,各加入2 μL Oligo dT,然后在3个小管中分别加入2 μL. a:经肿瘤总RNA加载的DC总RNA; b:未经肿瘤总RNA加载的DC总RNA; c:肿瘤组织的总RNA.紧接着3管均补水至11 μL,70℃,5 min,快速入冰中5 min,室温离心8160 g.继续在3管中各加入5×buffer 5 μL, dNTP(10 mm/mL) 2.5 μL, AMV RT(10 u/n) 1.5 μL, DEPC水 5 μL.使总体系达到25 μL,然后将3个小管置于42℃ 1 h,即成cDNA.将以上三种cDNA置于梯度PCR仪上进行PCR检测,设定:退火温度94℃,解链温度56.5℃,延伸温度:72℃.共35个循环.最后对RT-PCR产物再进行琼脂糖凝胶电泳.

统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS8.0统计软件采用t检验进行数据分析, P<0.05为有统计学意义.

2 结果

2.1 培养前后DC表面标记 流式细胞仪分析结果显示加载了总RNA的DC与不加载总RNA的DC表面标志有差别. DC的特异性表面标志如CD40, CD83在加载了总RNA后表达增高,HLA-DR,共刺激分子CD86表达也增高,而代表单核细胞的CD14表达则下调(P<0.05,表1).

表1 总RNA转染DC后对DC表面标记的影响

细胞表面标记	(n=6, %, $\bar{x} \pm s$)	
	加载总RNA, DC	未加载总RNA, DC
CD14	10.46 ± 7.52*	26.37 ± 6.63
CD40	72.32 ± 13.48*	32.24 ± 10.96
CD86	87.69 ± 7.56*	31.35 ± 9.11
CD83	30.97 ± 6.57*	17.39 ± 5.22
HLA-DR	93.62 ± 4.83*	67.65 ± 2.36

*P<0.05 vs 未加载总RNA, DC.

2.2 外周血单核细胞来源成熟DC的形态 在倒置光学显微镜下,单核细胞培养至7 d时,大部分悬浮生

长,可见较多细胞胞体变大且外形不规则,细胞膜呈“树枝状”突起,胞质丰富,具有典型 DC 形态(图 1)。

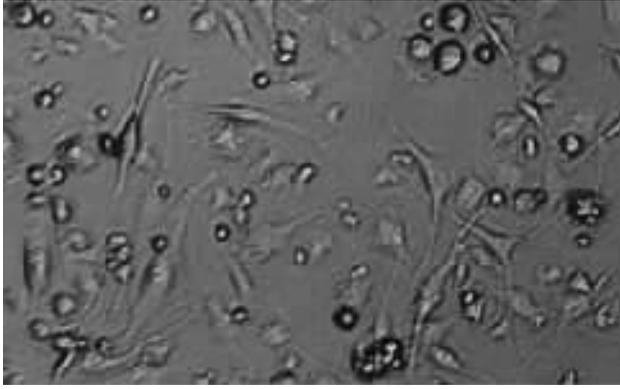
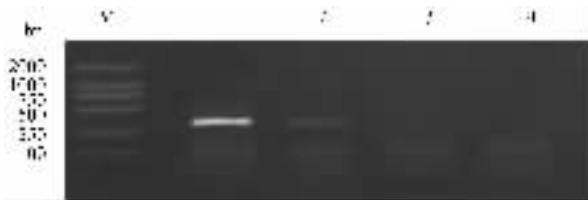


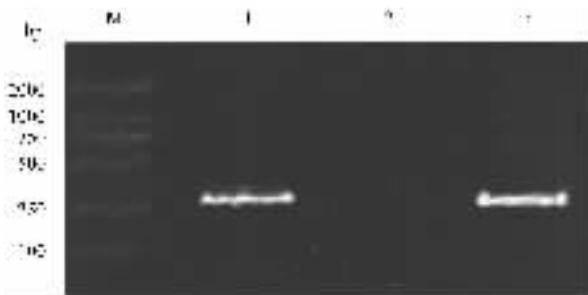
图 1 成熟 DC 形态 ×40

2.3 总 RNA 加载 DC 的 RT-PCR 测定 尤文肉瘤中的特异性序列 EWS-FLI1 可以和引物特异性结合,并且最佳结合温度为 54℃(图 2)。经肿瘤总 RNA 加载后的 DC 和肿瘤细胞一样可以和引物特异性结合的序列,而未经肿瘤总 RNA 加载的 DC 则无显示。经尤文肉瘤总 RNA 加载的 DC 可以特异性表达尤文肉瘤的特异性序列 EWS-FLI1(图 3)。



M: DL2000 marker; 1: 54℃; 2: 55℃; 3: 56℃; 4: 对照组。

图 2 Ewing 肉瘤细胞 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳



M: DL2000 marker; 1: Ewing 肉瘤细胞; 2: 未加载肿瘤总 RNA; 3: 加载了肿瘤总 RNA。

图 3 加载肿瘤总 RNA 和未加载肿瘤总 RNA 的 DC RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

3 讨论

尤文肉瘤家族是一种原发性的神经外胚层肿瘤,包括起源于骨及软组织的尤文肉瘤、胸壁的 Askin 瘤及骨软组织外周的原发性的神经外胚层肿瘤^[4]。

95% 的尤文肉瘤家族具有特异的染色体异位 t(11; 22)(q24; q12),从而形成的 EWS-FLI1 融合基因是尤文肉瘤家族发生、进展的主要原因,也是尤文肉瘤家族诊断、治疗及预后的标志物^[5-6]。

DC 是专职抗原呈递细胞,其独特功能表现在识别和吞噬病原体,将大分子抗原加工成肽段,刺激未致敏 T 细胞产生特异性免疫应答。本研究将尤文肉瘤总 RNA 作为肿瘤抗原加载在 DC 上,以激发 CTL 产生抗肿瘤免疫。因为 95% 的尤文肉瘤家族均含有特定的 EWS-FLI1 融合基因,因此用含 EWS-FLI1 融合基因的总 RNA 去诱导抗肿瘤免疫具有极好的靶向性。

应用尤文肉瘤具有特异的 EWS-FLI1 融合基因,可以表达特异性的抗原的特点,我们将尤文肉瘤的总 RNA 加载 DC,以诱导抗原特异性 CTL。为了给出其靶向性治疗的实验依据,我们用 RT-PCR 法去检测 EWS-FLI1 mRNA 的表达。在以往的类似试验中,多采用抗原肽脉冲 DC,要求对患者的 HLA 表型、抗原肽的抗原表位有清楚的认识,不能进行很好的靶向性治疗。我们利用总 RNA 冲击 DC 可以包含多种肿瘤抗原的编码信息,包括尚未识别的肿瘤抗原,使肿瘤细胞逃避免疫反应的可能性减小,能诱导广泛的免疫反应^[7]。我们将尤文肉瘤总 RNA 加载 DC,表达 EWS-FLI1 融合基因特异性抗原,并应用 RT-PCR 方法证实了加载的确定性,为成熟 DC 实验如加载后的 DC 诱导激活 CTL 反应提供了实验依据。

【参考文献】

- [1] 李用国,梁增伟,蔡大川. 树突状细胞体外激活的 CTL 杀伤效应[J]. 重庆医科大学学报, 2003, 27(2): 203-205.
- [2] Ike H, Shimada H, Yamaguchi S, et al. Outcome of total pelvic exenteration for primary rectal cancer[J]. Dis Colon Rectum, 2003, 46(4): 474-479.
- [3] 郭卫,童春容. 恶性肿瘤的免疫治疗进展[J]. 中华骨科杂志, 2000, 23(S1): 51-54.
- [4] West. Ewing sarcoma family of tumors[J]. Curr Opin Oncol, 2000, 12(4): 323-327.
- [5] Folpe A L, Hill C E, Parham D M, et al. Immunohistochemical detection of FLI1 protein expression: A study of 132 round cell tumors[J]. Am J Surg Pathol, 2000, 24(12): 1657-1668.
- [6] Vicha A, Sumerauer D, Eckschlagler T, et al. Detection of minimal residual disease in Ewing's sarcoma using RT-PCR[J]. Cas Lek Cesk, 2001, 139(22): 685-693.
- [7] Kocature S, Yilmazer D, Onal B, et al. Do micro metastases detected with cytokeratin immunoperoxidase reactivity affect the treatment approach to neck in supraglottic cancers[J]. Otolaryngol-Head Neck Surg, 2003, 128(3): 407-413.