

人肺腺癌 GLC-82 细胞热休克蛋白 70 多肽复合物的提取及对细胞毒性 T 淋巴细胞作用的实验研究

刘志勇¹,董 驹¹,张树波¹,马立人²,李 新³,王国臣¹,陈志全¹,郑毛根¹

Experimental Study on Purification of Heat Shock Protein 70 Antigen Peptide Complex from Human Lung Adenocarcinoma GLC-82 Cell and the Anti-tumor Effect of Cytotoxic T Lymphocyte acted by Heat Shock Protein

LIU Zhi-yong¹, DONG Ju¹, ZHANG Shu-bo¹, MA Li-ren², LI Xin³, WANG Guo-chen¹, CHEN Zhi-quan¹, ZHENG Mao-gen¹

1. Department of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China; 2. Department of Microbiology, North China Coal Medical College; 3. Department of Endoscopic, Affiliated Hospital of North China Coal Medical College

Abstract: Objective To evaluate the purification methods of heat shock protein 70 antigen peptide complex (HAC-70) from human lung adenocarcinoma GLC-82 cell, and to explore the phenotype varieties and anti-tumor function of CTL as well as its suspension induced by HAC-70. **Methods** GLC-82 cells were cultured with 43 for 30 minutes to induce over-expression of HSP. The induced HAC-70 was purified with ion exchange chromatography. The purified HAC-70 was analyzed quantity and quality with SDS-PAGE and ELISA methods. PBMC were activated by HAC-70. CTL phenotypes were determined by lymphocyte subgroup test kit. The anti-tumor effects of CTL and its suspension on GLC-82 were determined with MTT method. **Results** Ion exchange chromatography was successfully applied to purify HAC-70 from GLC-82. HAC-70 from heat-treated GLC-82 were over expressed with a rate of 75 μ g/ml GLC-82. The positive rates of CD3⁺, CD4⁺, and CD4⁺/CD8⁺ T cells induced by heat-treated group were much higher than controls. The best tumor-killer effects of CTL were obtained in HAC-70 group while the target-effect ratio was 50:1. Apoptosis of GLC-82 were induced by suspension of CTL in all groups. **Conclusion** Purification of HAC-70 from lung adenocarcinoma GLC-82 cells by ion exchange chromatography is simple and feasible. CD3⁺ and CD8⁺ T cells are increased and CD4⁺/CD8⁺ ratio is reversed by activated HAC-70. The tumor-killer function of HAC-70-induced CTL and its suspension is confirmed and the results will be of valuable to the preparation of tumor vaccine as well as its clinical application.

Key words: Lung adenocarcinoma; HAC-70; CTL

摘要:目的 探讨 GLC-82 细胞中 HAC-70 的提纯方法及其诱导的 CTL 表型变化和 CTL 及其上清液抗瘤效应。方法 GLC-82 细胞热休克诱导 HSP 表达,离子交换层析提纯 HAC-70,SDS-PAGE 和 ELISA 法进行定量和定性检测,活化 PBMC,T 淋巴细胞亚群试剂盒测定 HAC-70 诱导 CTL 细胞表型变化情况,MTT 法测定 CTL 及上清液杀瘤活性。结果 热休克处理能使 GLC-82 细胞 HAC-70 表达增加,离子交换层析可提纯 GLC-82 细胞中 HAC-70。经热休克处理的 HAC-70 诱导 T 淋巴细胞,其 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞与对照组的 CTL 细胞阳性率明显提高,其诱导的 CTL 杀瘤活性显著提高,且其 CTL 培养上清液肿瘤杀伤活性最高。结论 离子交换层析可提纯 GLC-82 的 HAC-70;HAC-70 可使 CTL 细胞 CD4⁺/CD8⁺ 倒置,活化的 CTL 及上清液有较高的杀瘤活性,为肺癌肿瘤疫苗的制备和临床应用提供了实验依据。

关键词:肺腺癌;热休克蛋白 70 多肽复合物;细胞毒性 T 淋巴细胞

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)03-0141-03

收稿日期:2004-10-09;修回日期:2004-12-30

作者单位:1. 063000 河北唐山,华北煤炭医学院附属医院
心胸外科;2. 华北煤炭医学院微生物教研室;3. 华北煤炭
医学院附属医院内窥镜室

0 引言

为寻找一种治疗肺腺癌的有效方法,我科自 2000 年 9 月~2002 年 3 月,从人肺腺癌 GLC-82 细胞中应用 DEAE-52、Sephdex G-200 等改良方法提纯 HAC-70,并研究 HAC-70 活化 CTL 后细胞表型变化及对肺腺癌细胞杀伤活性,证实 HAC-70 诱导的 CTL 对肺腺癌细胞有良好的杀灭作用,现报道如下:

1 材料和方法

1.1 人肺腺癌 GLC-82 细胞 HAC-70 的提取 将人肺腺癌细胞株 GLC-82 置于 100ml 培养瓶,加入含 10%胎牛血清完全培养基,放入饱和湿度,5% CO₂ 浓度,37 细胞培养箱内培养。经 EDTA-胰蛋白酶复合消化液消化,以 10%的胎牛血清 RPMI-1640 培养基培养传代,当传至第四代,取生长旺盛的细胞,43 热休克处理 30min 后投入同等条件二氧化碳细胞培养箱内培养 12h,用上法进行消化,调整细胞数为 1 × 10⁶/ml,加入 10 倍体积的细胞裂解液(Buffer A),混匀后 4 作用 12~20h,使细胞裂解成絮状,离心、取上清、移入透析袋内,4 Buffer B 透析 12~24h,聚乙二醇法浓缩液体体积至 4ml。低温高速离心,DEAE-52 离子交换色谱和 Sephdex G-200 分子筛过滤和饱和硫酸铵盐析等方法分离,提取 HAC-70。经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶垂直板不连续电泳(SDS-PAGE)及酶联免疫吸附法(ELISA)定量定性检测 HAC-70。

1.2 人肺腺癌 GLC-82 细胞 HAC-70 对 CTL 作用实验方法 以新鲜肝素抗凝外周血 10ml,加入 1 倍 PBS 混匀,加入 10ml 细胞分离液离心吸取 PBMC,放入二氧化碳箱内培养 3 天,加淋巴细胞分离液除去死亡细胞。10%人 AB 血清及 RPMI1640 完全培养基调整细胞数为 1 × 10⁶/ml,加入白细胞介素 2 (IL-2)500U/ml 继续培养、扩增、传代,其中悬浮细胞为 T 淋巴细胞,贴壁细胞为巨嗜细胞。然后在 PBMC10ml 细胞悬液中加入经热休克处理的 GLC-82 细胞 HAC-70(8~10)μg/ml,条件相同的二氧化碳孵箱培养 5~7 天,第 5~7 天补充 IL-2 500U/ml,3 天后加淋巴细胞分离液除去死亡细胞。10%人 AB 血清,RPMI1640 完全培养基调整细胞数为 1 × 10⁶/ml,加入 8~10μg/ml HAC-70,IL-2 1 000 U/ml 继续扩增培养 3~5 天后收获。用相同方法使用未经热休克诱导的 HAC-70 活化 CTL 和不加 HAC-70 直接培养 CTL 进行对照,T 淋巴细胞亚群试剂盒测定 HAC-70 诱导 CTL 细胞表型变化情况,用 MTT 比色法测定经或未经热休克处理的 HAC-70 诱导 CTL 和单纯 CTL 对 GLC-82 细胞的

杀伤活性。其效靶比分别为 E T = 12.5 1,25 1,50 1。用 DG-3022 酶联免疫检测仪,波长 590nm 测定其吸光度(A),同时设空白,靶细胞和效应细胞对照,按下面公式计算:

$$CTL \text{ 细胞毒性}(\%) = (1 - \frac{A_{(E+T)} - A_T}{A_T}) \times 100\%$$

1.3 CTL 培养上清液杀瘤活性测定 将按照不同方法处理后提取的 HAC70 分别加入 T 淋巴细胞培养瓶内,扩增活化 CTL,取上清液与 GLC-82 细胞混合,调整细胞浓度为 1 × 10⁶/ml 细胞悬液,二氧化碳箱内培养 9~12h,以 MTT 法测定细胞活性。

1.4 统计学处理 利用 SAS 软件对以上数据进行方差分析,行 t 检验。

2 结果

2.1 取健康人 PBMC 在 GLC-82 细胞 HAC-70(热休克处理/未处理)诱导培养前后进行 T 淋巴细胞亚群表型测定,见表 1。

表 1 热休克处理/未处理的 HAC-70 诱导培养前、后 T 淋巴细胞表型(%, $\bar{x} \pm s$)

T 细胞亚群	诱导前	诱导后				
		HAC ₁	P ₁	HAC ₂	P ₂	P ₃
CD3 ⁺	57.36 ± 1.78	73.87 ± 2.14	<0.05	85.08 ± 1.66	<0.05	<0.001
CD4 ⁺	34.88 ± 1.43	36.47 ± 0.73	>0.05	41.01 ± 2.39	<0.05	<0.05
CD8 ⁺	22.45 ± 1.22	39.01 ± 1.09	<0.05	48.40 ± 1.13	<0.05	<0.001
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.55	0.94	—	0.85	—	—

注:未经热休克处理、经热休克处理的 GLC-82 提取的 HAC-70 分别命名为 HAC₁、HAC₂。P₁:HAC₁ 诱导后的 T 细胞与诱导前 T 淋巴细胞相比较结果;P₂:HAC₂ 诱导后 T 细胞与 HAC₁ 诱导后的 T 细胞相比较结果;P₃:HAC₂ 诱导后的 T 细胞与诱导前 T 淋巴细胞相比较结果。

2.2 用 MTT 比色法测定热休克处理的 HAC-70 诱导的 CTL (CTL₂)、未经热休克处理的 HAC-70 诱导的 CTL (CTL₁) 及未经 HAC-70 诱导的 CTL (CTL₀) 的细胞毒杀伤活性及效靶比例关系,其杀瘤率,见表 2。

表 2 CTL 杀瘤率

效靶比例	杀伤效应(%)		
	CTL ₀	CTL ₁	CTL ₂
50 1	23.58 ± 1.20	62.33 ± 1.44	83.00 ± 1.15
25 1	18.36 ± 1.07	37.95 ± 0.36	47.02 ± 1.20
12.5 1	8.15 ± 1.05	9.6 ± 0.89	12.38 ± 1.68

2.3 各组 CTL 上清液杀瘤活性,见表 3。

表 3 CTL 上清液杀瘤活性比较

	CTL ₀	CTL ₁	CTL ₂
杀瘤率($\bar{x} \pm s$)	14.56 ± 1.42	34.56 ± 1.01	46.80 ± 1.37

注:P < 0.05

3 讨论

现今恶性肿瘤的发病率和死亡率仍居高不下,尤其是肺腺癌,因其易血行转移,一经发现多为晚期,给其治疗带来极大的困难,成为目前国内外医学界亟待攻克的难题。而肿瘤的生物治疗作为一门新兴技术,得到人们越来越多的关注。近来研究发现,很多肿瘤细胞表面都有抗原表达^[1-3]。从肿瘤细胞中提取的热休克蛋白多肽复合物(HAC-70),含有多种肿瘤的相关抗原,不需分离肿瘤特异性抗原^[4,5],肿瘤抗原活化的多个 CTL 克隆,其杀瘤效应和特异性明显高于其他效应细胞^[6]。HAC-70 免疫机体的生物疗法无疑给肺癌,尤其是肺腺癌的治疗开辟了光明前景。

文献表明,热休克是一种诱导肿瘤细胞 HAC-70 表达的简单有效的方法^[7]。我们根据关伟忠^[8]和 Ichiro Yoshino^[9]采用的热休克处理条件,采用 43 ℃、30min 热休克诱导 HSP70 高表达的 GLC-82 细胞,经过 DEAE-52, Sephadex G-200 离子交换层析可获得 75 μ g/ml HAC-70。HAC-70 可以刺激、活化、扩增健康人 PBMC,其诱导前后的细胞,经 T 细胞亚群试剂盒测定表明:HAC-70 诱导扩增后,CD8⁺ 细胞(杀伤性 T 淋巴细胞)扩增最明显,CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值倒置(0.85)。MTT 比色法测定 CTL 的杀瘤活性结果显示:CTL 与靶细胞间存在显著的比例依赖关系,效靶比以 E:T=50:1 时,杀伤活性最高;比较经热休克处理/未经热休克处理 GLC-82 细胞 HAC-70 诱导的 CTL 以及单纯 CTL 杀瘤率(杀伤 GLC-82 细胞),以经热休克处理细胞的 HAC-70 诱导的 CTL 杀瘤效应最高。

这是因为肿瘤源性 HAC-70 携带了多种肿瘤抗原,在巨噬细胞参与下,通过高尔基体等结构,递呈到细胞膜表面^[5,10]识别、诱导、活化产生对其来源细胞具有杀伤作用的 CD8⁺ T 淋巴细胞,活化体内多个 CTL 克隆诱导肿瘤特异性免疫。由于 HAC-70 同种内不具多态性,它所激起的免疫无 MHC 类抗原限制性,同种内相互免疫可望实现,打破免疫耐受,克服目前肿瘤免疫治疗中难以解决的抗原多样性及细胞异质性等困难,避免了粗制肿瘤提取物免疫机体可能含有抑制免疫的核酸和细胞因子等进入机体,特异性杀伤同一种肿瘤内所有的肿瘤细胞,且不需要佐剂,具有肿瘤疫苗的作用^[4,11]。

将 CTL 培养上清液与 GLC-82 细胞混合培养,发现肿瘤细胞生长缓慢,且逐渐凋亡。其中 HAC-70(HAC₁/HAC₂) 诱导组杀瘤率远高于单独 CTL 组,HAC₂ 组上清液杀瘤率高于 HAC₁ 组上清液杀瘤率。说明在杀灭肿瘤过程中,除 CTL 细胞外,上

清液中的各种成分也起到了重要作用。CTL 生长过程中淋巴细胞会分泌一些比如 IL-2、IL-4、-IFN、TNF 等。尤其是在 HAC-70 活化 CTL 后,不仅 CD8⁺、CTL、T 细胞增殖明显,它们分泌的细胞因子也相应增多,活性增强。经热休克处理后的 HAC-70 刺激作用尤为明显。

由此可见,若从肿瘤自身的细胞中经热休克处理提取热休克蛋白抗原肽复合物作为抗原再回输给机体,可引起持久的抗肿瘤效应,且 HAC-70 本身是良好的佐剂,不需要附加任何人工佐剂,避免了佐剂带来的副作用,因为它不含任何外来的 DNA 或病毒载体,不产生遗传性改变^[12],无害无毒副作用,将为肿瘤尤其是肺腺癌的有效治疗开辟良好的前景。

参考文献:

- [1] Hartl FU, Hayer Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein[J]. Science, 2002, 295(5561): 1852-1858.
- [2] Michils A, Redivo M, Zegers DBV, et al. Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma[J]. Lung Cancer, 2001, 33(1): 59-63.
- [3] 白晓霞,陈亚琼,辛晓燕,等. 热休克蛋白 70、90 在子宫内膜癌中的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(1): 38-40.
- [4] Zhang SHL, Wei SO, Li ST, et al. Immunohistochemical study of heat shock protein 70 in mouse endometrium during early pregnancy[J]. J Anat, 2002, 25(1): 21-24.
- [5] Trimble C. Comparison of the CD8⁺ T cell responses and anti-tumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun biojector and syringe[J]. Vaccine, 2003, 21(25-26): 4036-4039.
- [6] Basu S, Binder RJ, Rammalingam T, et al. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70 and calreticulin[J]. Immunity, 2001, 14(3): 303-313.
- [7] Charles A, Janeway JR. Immunobiology[M]. 4th ed. New York: Current Biology Publications, 1999, 342-351.
- [8] 关伟忠,汤晓雷,刘康达,等. 鼠肝癌细胞的热休克蛋白的诱导及抗肿瘤机理研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1998, 18(4): 272-277.
- [9] Yoshino I, Goedegebuure PS, Peoples G, et al. Human tumor-infiltrating CD4⁺ T cells react to B cell lines expressing heat shock protein 70[J]. The Journal of Immunology, 1994, 153(8): 4149-4158.
- [10] Asea A, Rehli M, Kibingu E, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extra cellular HSP70: role of toll-like receptor(TLR) 2 and TLR4[J]. J Biol Chem, 2002, 277(17): 15028-15034.
- [11] Hoos A, Levey DL. Vaccination with heat shock protein-peptide complexes: from basic science to clinical applications[J]. Expert Rev Vaccines, 2003, 2(3): 369-379.
- [12] Manjili MH, Wang XY, Park J, et al. Immunotherapy of cancer using heat shock proteins[J]. Front Biosci, 2002, 7(2): 43-52.

[编辑校对:刘红武]