

# 癌胚抗原重组痘苗病毒转染 树突状细胞诱导 CEA 特异性 T 细胞免疫

吴 军<sup>1</sup>, 杨太成<sup>1</sup>, 赖晃文<sup>1</sup>, 王 捷<sup>1</sup>, 郑文岭<sup>1</sup>, 王晓怀<sup>2</sup>

**摘要:**目的 研究人癌胚抗原重组痘苗病毒(rV-CEA)转染树突状细胞(DC)在体外诱导 CEA 特异性的 T 细胞免疫。方法 将 rV-CEA 转染外周血单个核细胞来源的 DC 后用于激发自体的 T 细胞,通过对 T 细胞的增殖及杀伤功能的检测,与野生型痘苗病毒(V-761)转染的 DC 激发的 T 细胞进行比较。结果 经 rV-CEA 转染的 DC 激活的 T 细胞增殖力强,对 CEA 分泌性肿瘤细胞具特异性杀伤作用。结论 rV-CEA 转染的 DC 可以诱导 CEA 特异性 T 细胞活性。

**关键词:**树突状细胞;癌胚抗原;痘苗病毒;T 淋巴细胞

**中图分类号:**R392-3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2002)05-0353-03

## Induction of CEA -Specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transfected with CEA -recombinant vaccinia virus

WU Jun, YANG Tai -cheng, LAI Huan -gwen, et al

*Institute of Molecular Oncology,*

*General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China*

**Abstract: Objective** To study the in vitro immuneresponse induced by dendritic cells (DCs) transfected with CEA -recombinant vaccinia virus (rV-CEA). **Methods** DCs collected from peripheral blood monocytes were transfected with rV -CEA and then cocultured with autologous T cells. The proliferation of the T cells and their cytotoxic activity against CEA -secreting tumor cells were assessed and compared with those T cells induced by DCs transfected with wild type vaccinia virus (V-761). **Results** DCs transfected with V -CEA are effective stimuli of T lymphocyte proliferation and the T cells can lysis CEA -specific tumor cells. **Conclusion** DCs transfected with V -CEA can elicit activation of CEA -specific T cells.

**Keywords:** Dendritic cell; Carcinoembryonic antigen (CEA); Vaccinia virus; T lymphocyte

树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前发现的功能最强的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)。人癌胚抗原重组痘苗病毒(rV-CEA)是以痘苗病毒天坛株 761 为载体所构建的、表达人癌胚抗原(CEA)的重组减毒疫苗,已被证实能在真核系统高效而准确地表达膜糖蛋白 CEA<sup>[1]</sup>。本文对 rV-CEA 转染的 DC 激发 CEA 特异性的 T 细胞免疫进行了研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要试剂、细胞株和仪器

rV-CEA 为本实验室构建,野生型痘苗病毒天坛株 761 由中国预防医学科学院病毒研究所惠赠,人重

组粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)购自第一军医大学中心实验室,人重组白细胞介素 4(IL-4)、CD83、HLA-DR 单克隆抗体和异硫氰酸荧光素(FITC)为美国 R&D 公司产品,人重组白细胞介素 2(IL-2)为本实验室自制,RPMI1640 培养液和植物血凝素(PHA)均为 Sigma 公司产品,<sup>3</sup>H-TdR 为中国原子能研究所产品。流式细胞仪为 Coulter 公司产品。人大肠癌细胞株 LoVo(高分泌 CEA)及人肝癌细胞株 SMMC-7721(不分泌 CEA)均为我实验室所保存。

#### 1.2 方法

1.2.1 DC 的制备及转染 取正常人(本单位健康志愿者)外周血 100ml,用 Ficoll 分离获得单个核细胞,RPMI1640 洗涤 2 遍,在含 10% 的人 AB 型血清的 RPMI1640 和 5%CO<sub>2</sub>37°C 条件下培养 2h,轻轻洗出悬浮细胞,然后加入含 GM-CSF(800u/ml)、IL-4(500u/ml)及 5% 人 AB 型血清的 RPMI1640,在 5%CO<sub>2</sub>37°C 条件下继续培养,每 2 天半量换液 1 次。显

收稿日期:2001-11-29;修回日期:2001-03-27

作者单位:1.510010 广州军区广州总医院肿瘤分子生物学研究所,2. 肿瘤科

显微镜下观察细胞形态,第 6 天将上述细胞分为 3 组:第 1 组(rV-CEA 组)加入 rV-CEA $10^3$  pfu/ml (plaque formin gunits) 24h, 每 2h 轻轻晃动一次,然后轻轻洗涤细胞祛除未转染的 rV-CEA;第 2 组(V-761 组)加入野生型痘苗病毒天坛株(V-761) $10^3$  pfu/ml (余步骤同上);第 3 组(DC 组)只加入含 5% 人 AB 型血清的 RPMI1640。收集各组细胞用流式细胞仪鉴定细胞表型并经放射线照射灭活( $^{60}\text{Co}$ ,30G y),备用。

1.2.2 各组 DC 对 T 细胞的激发 将上一步获得的非黏附细胞(主要为 T 细胞)用含 IL-2(100u/ml)和 10% 的人 AB 型血清的 RPMI1640 稀释成  $3 \times 10^6$ /ml,分别加入 24 孔培养板(1ml/孔)和 96 孔培养板(100 $\mu$ l/孔),按 T 细胞的 1/10 分别加入 rV-CEA 组 DC、V-761 组 DC 及未转染病毒的 DC,在 5%CO $_2$  37 $^\circ$ C 条件下培养 72h。然后收集 24 孔板中细胞用 RPMI1640 洗涤 2 遍作效应细胞备用。96 孔板中加入  $^3\text{H}$ -TdR(37kBq/孔)继续培养 12h,测定放射性核素每分钟闪烁记数(CPM)值,计算刺激指数(SI),  
SI= 实验组 CPM/ 阴性组 CPM

1.2.3 T 细胞对 CEA $^+$  肿瘤细胞的特异性杀伤 分别以 rV-CEA 组 DC 激活的 T 细胞、V-761 组 DC 激活的 T 细胞及未转染病毒的 DC 激活的 T 细胞为效应细胞,以  $^3\text{H}$ -TdR 标记的对数生长期的 LoVo、SMMC-7721 为靶细胞,按效靶比为 50:1 的比例,效靶共孵育时间 24h,进行细胞毒实验,同时设最大释放组(靶细胞 +1% Triton  $\times 100$ )及自发释放组(靶细胞 + 培养液),测定每组上清 CPM 值。在加入 T 细胞之前,先以 10 倍靶细胞的量加入非标记的 K562 细胞,排除自然杀伤细胞(NK)的活性。T 细胞特异性杀伤活性 = (实验组上清 CPM 值 - 自发释放组上清 CPM 值)  $\div$  (最大释放组上清 CPM 值 - 自发释放组上清 CPM 值)  $\times 100\%$

## 2 结果

2.1 DC 表型分析 流式细胞仪对 DC 表型的分析表明,rV-CEA 组 DC、V-761 组 DC 及未转染病毒的 DC 均表达 DC 特异性分化抗原 CD $_{83}$  [(84.3  $\pm$  10.5) %、(79.6  $\pm$  8.1) %及 (87.7  $\pm$  11.2) %]、HLA-DR [(84.1  $\pm$  5.6) %、(77.8  $\pm$  7.7) %及 (71  $\pm$  7.3) %],3 组差异无显著性。

2.2 T 细胞增殖的结果 采用  $^3\text{H}$ -TdR 法测定 T 细胞对各种刺激的增殖作用,发现 rV-CEA 组 DC 对 T 细胞的刺激增殖作用较 V-761 组及未转染组强(图 1)。

2.3 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性 采用同位素法测定 T 细胞对肿瘤细胞(LoVo 和 SMMC-7721 细胞)的杀伤作用结果表明,rV-CEA 组 DC 激活的 T 细胞

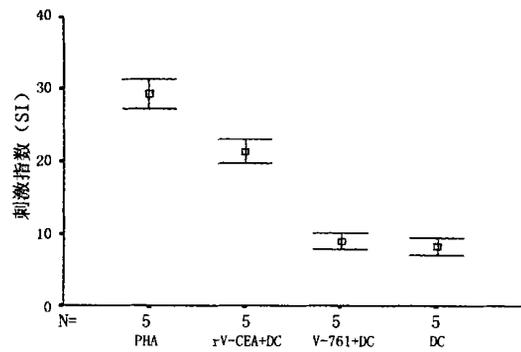


图 1  $^3\text{H}$ -TdR 法测定 T 细胞的增殖

在效靶比为 50:1 时,可以明显杀伤 LoVo 细胞,但对 SMMC-7721 细胞杀伤作用微弱;V-761 组 DC 激活的 T 细胞与未转染病毒的 DC 激活的 T 细胞对两种肿瘤细胞的杀伤作用均非常低,见表 1。

表 1 T 细胞的体外杀伤活性(效靶比为 50:1)

T 细胞	杀伤率 (%)	
	LoVo	SMMC7721
rV-CEA+DC 组	90 $\pm$ 11.8 *	12 $\pm$ 8.1
V-761 +DC 组	10.3 $\pm$ 7.8	8.6 $\pm$ 6.3
DC 组	5.1 $\pm$ 3.3	9 $\pm$ 6.8
对照组	0	0

\*与对照组相比  $P < 0.001$

## 3 讨论

抗肿瘤免疫效应以细胞免疫为主,T 细胞介导的细胞免疫在机体抗肿瘤效应中起重要作用。由外周血单个核细胞在体外经 GM-CSF 及 IL-4 的作用后生成的 DC 可高表达 MHC-I、MHC-II、CD80、CD86 及其他免疫刺激分子,这些免疫分子在活化 T 细胞的双信号中起重要作用,因此,DC 作为重要的 APC 已被广泛用于黑色素瘤、肾癌、多发性骨髓瘤、前列腺癌等恶性疾病的生物治疗中<sup>[2,3]</sup>。

目前用肿瘤抗原体外致敏 DC 的方式有多种,如肿瘤细胞冻融物、基因工程肿瘤蛋白抗原或人工合成的肿瘤抗原多肽在体外冲击致敏 DC<sup>[4-6]</sup>,但上述方案在临床的应用受到一些限制:MHC 限制性、已知的抗原多肽并不一定能诱导最佳的抗肿瘤免疫反应、针对单一抗原决定簇的 CTL 克隆未必能有效诱导抗肿瘤免疫排斥反应等。有学者证明,肿瘤抗原编码基因导入 DC 后能在 DC 内持续表达肿瘤抗原<sup>[7-9]</sup>。我实验室与中山医科大学生化教研室所构建的人癌胚抗原重组痘苗病毒(rV-CEA)已被证实能在真核系统高效而准确地表达细胞膜糖蛋白 CEA,并在动物实验中证实了它的免疫原性及安全性<sup>[1]</sup>。本实验中我们将肿瘤抗原基因 CEA、DNA 通过减毒的痘苗病毒载体转入 DC,拟使 DC 内源性持续性表达 CEA 多个肿

瘤抗原表位,并通过 MHC-I 类分子得到充分提呈。本实验的结果表明,以 rV-CEA 转染的 DC 激活的 T 淋巴细胞比转染野生型痘苗病毒的 DC 及无转染病毒的 DC 激活的 T 淋巴细胞具有更好的增殖力及对 CEA 分泌性肿瘤细胞更强的杀伤力,提示转染了 rV-CEA 的 DC 表面能更好地表达 MHC 分子-CEA 抗原肽复合物,供 T 细胞识别,进而激活 CEA 特异性 T 细胞,为进一步临床实验奠定了基础。

参考文献:

[1] 杨洁,罗超全,卢方安,等.人癌胚抗原-重组痘苗病毒的构建和制备[J].中国生物化学与分子生物学报,1999,15 (1):54-57.  
 [2] Lau R, Wan GF, Jeffer yG, et al. Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma[J]. J Immunother, 2001, 24 (1):66-78.  
 [3] Triozzi PL, Khurram R, Aldrich WA, et al. Intratumoral injection of dendritic cells derived in vitro in patients with metastatic cancer[J]. Cancer, 2000, 89 (12):2646-2654.  
 [4] Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, et al. Dendritic cells capture and present their antigen to elicit tumor-specific immuneresponses[J]. J Immunol, 2000, 165 (7):3797-3803.

[5] Oelke M, Moehrle U, Chen JL, et al. Generation and purification of CD8+ melan-A-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive transfer in tumor immunotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6 (5):1997-2005.  
 [6] Kurokawa T, Oelke M, Mackensen A, et al. Induction and clonal expansion of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from renal cell carcinoma patients after stimulation with autologous dendritic cells loaded with tumor cells[J]. Int J Cancer, 2001, 91 (6):749-756.  
 [7] Kaplan JM, Yu Q, Piraino ST, et al. Induction of anti-tumor immunity with dendritic cell transduced with adenovirus vector encoding endogenous tumor-associated antigens[J]. J Immunol, 1999, 163 (2):699-707.  
 [8] Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, et al. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T cell responses against antigen-expressing primary and metastatic tumors[J]. Cancer Res, 2001, 61 (8):3388-3393.  
 [9] Butterfield LH, Jilani SM, Chakraborty NG, et al. Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cell transduction with MART-1 adenovirus[J]. J Immunol, 1998, 161 (10):5607-5613.

(贺文校对)

## 转化生长因子 受体在膀胱移行细胞癌中表达与组织学分级的关系

谢续标<sup>1</sup>, 黄循<sup>1</sup>, 杨罗艳<sup>1</sup>, 杨竹林<sup>2</sup>

关键词:膀胱移行细胞癌;受体;转化生长因子;肿瘤分级;免疫组织化学  
 中图分类号:R737.14 文献标识码:D  
 文章编号:1000-8578(2002)05-0355-01

转化生长因子(TGF)受体是存在于细胞表面的一种跨膜糖蛋白,在多种肿瘤中有基因缺失或突变并与肿瘤发生发展相关。为探讨 TGF $\alpha$ 、 $\beta$ 型受体(T $\alpha$ R 和 T $\beta$ R)与膀胱移行细胞癌组织学分级的关系及其意义,对二者在膀胱移行细胞癌中的表达进行研究。

### 1 材料与方法

1996 年~2000 年间膀胱移行细胞癌手术标本 45 例。组织学分级为 G1 11 例, G2 20 例, G3 14 例。年龄 27~84

岁,平均 57.8 岁。10 例正常膀胱粘膜取自前列腺增生症患者。标本石蜡切片应用免疫组化 ABC 法检测 T $\alpha$ R 和 T $\beta$ R 表达情况。以正常皮肤基底细胞作为二者的阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。T $\alpha$ R 和 T $\beta$ R 阳性表现为胞膜及胞浆染成棕黄色,按着色与否分为阳性及阴性。采用 SPSS10.0 统计软件进行统计学分析。

### 2 结果

正常膀胱粘膜 T $\alpha$ R 和 T $\beta$ R 染色均阳性,膀胱移行细胞癌中 T $\alpha$ R 和 T $\beta$ R 表达阳性率分别为 64%(29/45)和 67%(30/45),其中 G1 分别

为 91%(10/11)和 100%(11/11), G2 分别为 70%(14/20)和 65%(13/20), G3 分别为 36%(5/14)和 43%(6/14)。随着膀胱移行细胞癌组织学分级的增高, T $\alpha$ R 和 T $\beta$ R 表达阳性率呈逐渐降低趋势,统计学具有显著性意义(T $\alpha$ R $\chi^2$ =8.482, P<0.05; T $\beta$ R $\chi^2$ =8.94, P<0.05)。

### 3 讨论

TGF 通过其受体信号传导途径对人和动物多种类型上皮细胞及其所发生的肿瘤表现为抑制作用,其中包括膀胱移行细胞癌。但 TGF 的功能取决于其受体 T $\alpha$ R 和 T $\beta$ R,二者在 TGF 信号传导中都是必需的,任何一种受体表达缺失都会失去对 TGF 反应的敏感性。本实验显示,膀胱移行细胞癌中 T $\alpha$ R 和 T $\beta$ R 表达阳性率随组织学分级增高而逐渐降低,并均有显著性意义,提示 T $\alpha$ R 和 T $\beta$ R 缺失而逃逸 TGF 的抑制作用,可能在膀胱移行细胞癌恶性转化过程中发挥重要作用。由于肿瘤分级为判断膀胱移行细胞癌预后的一个重要指标,因此 T $\alpha$ R 和 T $\beta$ R 表达与否在临床上有助于判断其预后。

(李奇明校对)

收稿日期:2001-10-18;修回日期:2002-01-24

作者单位:1.410011 长沙,中南大学湘雅二医院泌尿外科,分别为 64%(29/45)和 67%(30/45),其中 G1 分别

2.肝胆疾病研究室