

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.017

· 短篇论著 ·

携带癌胚抗原基因重组腺相关病毒感染 DC 诱导 CTL 活化

Activation of CTL induced by DC transfected with recombinant adeno-associated virus containing carcinoembryonic antigen gene

朱成英¹,董小林¹,韩亚萍²,张俊萍²(1. 山西医科大学 研究生学院,山西 太原 030001; 2. 山西医学科学院 山西大医院 生物治疗科,山西 太原 030013)

[摘要] **目的:**探讨携带癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)基因重组腺相关病毒 rAAV/CEA 感染直肠癌患者的 DC 诱导 CTL 对肿瘤的杀伤作用。**方法:**抽取直肠癌患者的外周血培养 DC 细胞,用 rAAV/CEA 感染 DC,DC 成熟后与淋巴细胞混合诱导产生 CTL,用流式细胞仪分别检测感染和未感染病毒的 DC 的表型及其诱导的 CTL 杀伤活性。**结果:**实验组 DC 的 CD40、CD80、CD86 表达显著增高[(81.95±1.45)% vs (72.27±1.59)%,(80.10±1.03)% vs (70.59±1.04)%,(58.93±1.84)% vs (48.66±1.97)%;均 P<0.05]。实验组 DC 中 CEA 的表达率显著增高[(59.04±1.68)% vs (46.03±1.23)%;均 P<0.05]。在效靶比为 12.5:1、25:1、50:1、100:1 时,实验组 CTL 对直肠癌 LoVo 细胞的杀伤率明显提高[(12.65±0.30)% vs (6.59±0.21)%,(25.77±2.53)% vs (8.35±1.12)%,(43.36±0.83)% vs (12.79±0.23)%,(61.03±1.83)% vs (23.35±0.69)%;均 P<0.05],并且随着效应细胞比例的增加,杀伤率也逐渐增加。**结论:**携带 CEA 重组腺相关病毒感染 DC 激活 CTL 对肿瘤细胞能产生高效的杀伤作用。

[关键词] 树突状细胞;癌胚抗原基因;大肠癌;LoVo 细胞

[中图分类号] R735.3; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)03-0313-04

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)化学结构是糖蛋白,相对分子质量 160 000~220 000,由 1 条肽链和 24~26 条糖链组成,肽链含约 700 个氨基酸^[1]。树突状细胞(dendritic cell,DC)作为体内功能最强的专职抗原提呈细胞,通过对肿瘤抗原进行加工、处理诱导抗肿瘤免疫。但研究^[2]表明,肿瘤可使 DC 的活性下降,降低协同刺激分子的表达。本实验通过利用重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus,rAAV)携带 CEA 基因感染直肠癌患者的 DC,研究 rAAV 携带 CEA 是否可以增强肿瘤患者 DC 的活性和细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)的抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

直肠癌细胞 LoVo 细胞购自中国科学院实验室,外周血来自本院直肠癌患者(已获知情同意)。携带 CEA 基因的病毒液 rAAV/CEA 购自天津核力康健公司。RPM I 1640 完全培养基购自 Gibco 公司,10%胎牛血清购自杭州四季青,FITC 标记 CD80 mAb、FITC 标记 CD40 mAb、PE 标记 CD86 mAb 均购自 BD 公司,APC 标记 CEA mAb、Permeabilization 缓冲液均购自 RD 公司,rhGM-CSF 购自 Immunex 公

司,rhIL-4 和 rhTNF- α 购自 R&D 公司,rhIL-7 购自 peprotech 公司,rhIL-2 购自诺华公司。FACSRria 流式细胞仪购自 BD 公司。

1.2 患者外周血 DC 的培养和 rAAV/CEA 的感染

取直肠癌患者外周血肝素钠抗凝,以淋巴细胞分离液梯度离心(1 200×g,40 min,25℃),分离外周血单个核细胞,以每孔 5.4×10⁶ 个加入 6 孔细胞培养板,培养 3 h,收集悬浮细胞以 2×10⁶/ml 浓度培养于含 rhIL-2(5 IU/ml)30 ml AIM-V 的培养瓶中,隔天半量换液,并加入同体积的 rhIL-2。6 孔板用无菌生理盐水轻柔冲洗 3 遍后,实验组每孔加入含 rAAV/CEA 100 μ l、rhGM-CSF(900 IU/ml)的 AIM-V 的培养液 1.5 ml,对照组每孔加入含 PBS100 μ l、rhGM-CSF(900 IU/ml)的 AIM-V 的培养液 1.5 ml 培养。第 1 天、第 3 天每孔加入 rhIL-4(1 000 U/ml)和 rhGM-CSF(900 IU/ml),第 4 天每孔加入 rhIL-4(1 000 U/ml)、rh-

[基金项目] 山西省青年科技研究基金资助(No. 2010021035-6)。Project supported by Youth Science and Technology Foundation of Shanxi Province(No. 2010021035-6)

[作者简介] 朱成英(1984-),女,天津市人,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究。E-mail: zhuchengying8@163.com

[通信作者] 张俊萍(ZHANG JUN-ping, corresponding author), E-mail: junpingzhang-118@163.com

GM-CSF(900 IU/ml)和 rhTNF- α (100 IU/ml), 第5天收集成熟 DC 进行检测。

1.3 流式细胞术检测 DC 的表型

收集 DC, 以 $1\ 500 \times g$, 5 min, 25 °C 离心, PBS 洗 3 次, 调整细胞密度为 2×10^6 /ml, 取 500 μ l 加到流式样品管中, 然后加入 20 μ l FITC 标记 CD40 mAb、PE 标记 CD86 mAb、FITC 标记 CD80 mAb, 避光孵育 30 min, 洗涤 3 次, 上流式细胞仪检测。

1.4 FCM 检测 DC 的 CEA 表达率

收集 DC, 以 $1\ 500 \times g$, 5 min, 25 °C 离心 PBS 洗 3 次, 调整细胞密度为 2×10^6 /ml, 取 500 μ l 加到流式样品中, 加入预先稀释好的 Permeabilization 缓冲液 10 μ l, 孵育 20 min。洗涤 1 次, 加入 20 μ l APC 标记 CEA mAb、避光孵育 30 min, 洗涤 3 次, 上流式细胞仪检测。

1.5 成熟 DC 和淋巴细胞混合诱导 CTL

收集成熟 DC 和 T 淋巴细胞(上述悬浮细胞), 调整细胞密度, 按 DC:T = 1:30 的比例混合, 培养于含 rhIL-2(100 U/ml)和 rhIL-7(10 ng/ml)的 AIM-V 培养基中, 隔天半量换液和补充等体积的细胞因子, 培养至第 14 天收获激活的 CTL。

1.6 CTL 在体外的杀伤实验

效应细胞 CTL 和靶细胞 LoVo 细胞混合放入 U 型 96 孔酶标板中, 反应体系为 200 μ l。设置 3 个平行复孔, 每孔加入 1×10^5 个靶细胞, 效靶比分别为 12.5:1、25:1、50:1、100:1, 然后 $1\ 200 \times g$ 。离心 2 min, 37 °C、5% CO₂ 分别孵育 4 h。每孔加入 6 μ l PI 置于冰浴 5 min, 洗涤 3 次, 上流式细胞仪检测杀伤活性。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计软件进行, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数的比较采用配对的 *t* 检验, 多样本均数的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 感染 rAAV/CEA 后 DC 的形态观察

DC 从培养第 2 天起细胞形态出现不规则改变, 周边可见少量突起, 第 4 天加入 rhTNF- α 后细胞体积增大, 细胞表面出现大量长短不一的突触, 与正常 DC 相比, 未见明显差别, 提示 rAAV/CEA 病毒感染并不影响 DC 的生长。

2.2 rAAV/CEA 感染后 DC 的表型

rAAV/CEA 感染后 DC 的 CD40、CD80、CD86 表达显著增高[(81.95 \pm 1.45)% vs (72.27 \pm

1.59)%], (80.10 \pm 1.03)% vs (70.59 \pm 1.04)%], (58.93 \pm 1.84)% vs (48.66 \pm 1.97)%], $P < 0.05$]。

2.3 rAAV/CEA 感染后 DC 中 CEA 的表达

FCM 检测 rAAV/CEA 感染后 DC 中 CEA 的表达, 感染组为 (59.04 \pm 1.68)% , 未感染组为 (46.03 \pm 1.23)% , 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 rAAV/CEA 病毒感染后 DC 中 CEA 表达提高。

2.4 rAAV/CEA 感染后 DC 诱导 CTL 的杀伤活性

在效靶比为 12.5:1、25:1、50:1、100:1 时感染后, DC 诱导的 CTL 杀伤率较感染前 DC 诱导的 CTL 明显提高[(12.65 \pm 0.30)% vs (6.59 \pm 0.21)%], (25.77 \pm 2.53)% vs (8.35 \pm 1.12)%], (43.36 \pm 0.83)% vs (12.79 \pm 0.23)%], (61.03 \pm 1.83)% vs (23.35 \pm 0.69)%], $P < 0.05$](图 1), 并且随着效应细胞比例的增加, 杀伤率也逐渐增加。

3 讨论

治疗肿瘤常用手术、放疗、化疗, 但此 3 种方法无法彻底治愈, 也不能防止肿瘤复发^[3]。目前, 肿瘤相关的总体病死率逐年上升。随着免疫学和肿瘤生物学的迅速发展, 免疫治疗在肿瘤治疗中发挥着关键作用^[4,5]。DC 是体内功能最强大的专职抗原提呈细胞, 在抗原特异性的免疫反应中起到重要作用^[6]。DC 可以通过提呈抗原, 诱导产生 CTL。CTL 是杀伤肿瘤的主要细胞, 通过分泌穿孔素和颗粒酶杀伤肿瘤^[7]。但是肿瘤细胞可以分泌细胞因子, 降低 DC 的成熟度, 使 DC 的表面协同刺激分子表达不足。研究^[8]已证实在黑素瘤、卵巢癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、肺癌中 DC 的协同刺激分子低表达, 并且低表达协同刺激分子的 DC 容易造成机体免疫耐受^[9]。因此如何提高肿瘤患者 DC 的成熟度, 增强 DC 促进淋巴细胞增殖分化能力, 是肿瘤免疫治疗首要解决的难题。

动物实验^[10]已经表明, 以 DC 为基础的疫苗免疫可能是一种很有前途的癌症治疗手段, 但是临床上由于 DC 的低转染率, 还没有得到广泛应用。于是, 以 DC 为基础的免疫治疗, 首先要解决如何提高 DC 的转染率^[11]。刚开始, 人们用相关抗原肽去致敏 DC, 例如黑素瘤相关抗原、叶酸结合蛋白、前列腺膜抗原、黏蛋白 1 等, 但是此方法没有完全发挥 MHC II 限制性辅助 T 细胞的功能, 并且发现与 MHC 相匹配的抗原肽种类很少。在临床试验^[12]中发现, 此方法负载 DC 仅能在一小部分人群中应用。为了克服以上缺点, 人们又开始使用肿瘤全细胞裂

解物去致敏 DC,但是由于肿瘤细胞不容易收集,且肿瘤细胞裂解物含有的抗原容易引起自身免疫,其临床应用受到限制。研究^[13]证实,用载体携带 RNA 转染 DC 有明显的抗肿瘤作用。于是开始用各种载体携带编码 TAA 或抗原表位的 mRNA 转染

DC,虽然此方法具有能控制、特异性、价格低、没有插入宿主基因组中的风险,但是 mRNA 转染率很低,并且容易被 RNA 快速分解,肿瘤抗原也不能有效的表达,临床上治疗疗效不是很满意^[14-16]。

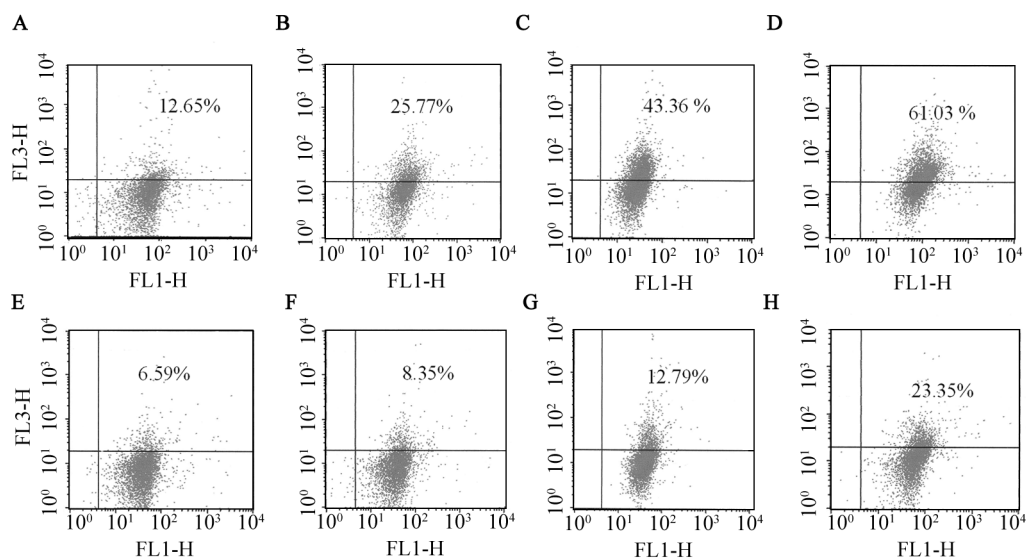


图1 rAAV/CEA 感染前后 DC 诱导的 CTL 对 LoVo 细胞的杀伤活性

A:rAAV/CEA 感染后,效靶比为 12.5:1;B:rAAV/CEA 感染后,效靶比为 25:1;C:rAAV/CEA 感染后,效靶比为 50:1;D:rAAV/CEA 感染后,效靶比为 100:1;E:rAAV/CEA 感染前,效靶比为 12.5:1;F:rAAV/CEA 感染前,效靶比为 25:1;G:rAAV/CEA 感染前,效靶比为 50:1;H:rAAV/CEA 感染前,效靶比为 100:1

用携带编码 TAA 或协同刺激因子的 DNA 载体转染 DC 虽然有好多优点,但是载体的选择一直使此项治疗不能广泛应用临床。如果使用非病毒作为载体存在低转染率的缺点,用病毒作为载体会有病毒基因插进宿主基因的危险。然而 AAV 却可以解决此难题,它具有以下特征^[17]:第一,AAV 作为一种缺陷型病毒,在无辅助病毒感染时,只能整合到宿主细胞的 DNA 中,呈“潜伏”感染状态;第二,引起的免疫反应轻微,病源性低;第三,携带的外源基因可长期、稳定表达;第四,可定点整合,AAV 是一种以位点特异性方式整合到人的 19 号染色体上的真核病毒,从而避免随机整合导致宿主细胞突变;第五,宿主范围广。更让人可喜的是 rAAV 是对腺相关病毒的进一步修饰,有研究^[18]证实,修饰的病毒在临床应用中具有有很高的感染率,是基因治疗的最理想选择。尤长宣等^[19]以 rAAV 为载体介导乳腺癌抗原 BA46 基因感染 DC 诱导特异细胞免疫时,诱导出高表达 CD8、CD69 和 IFN- γ 的 CTL。

本实验结果表明,rAAV/CEA 感染组 DC 的 CD40、CD80、CD86 表达率明显高于对照组 DC 的

CD40、CD80、CD86 表达率。CD80、CD86 是 DC 表面重要的共刺激分子,CD40 可以激发 T 细胞免疫活性,CD40、CD80、CD86 的高表达,表明 DC 已经成熟^[20]。另外,rAAV/CEA 感染组 DC 的 CEA 表达率明显高于未感染组,表明 rAAV 作为载体可以提高 DC 中外源抗原的表达率。rAAV/CEA 感染组 DC 诱导的 CTL 对 LoVo 肿瘤细胞的杀伤率明显高于未感染组。结果说明,rAAV 携带 CEA 抗原感染患者 DC 可以增强患者 DC 的成熟度,提高其诱导的 CTL 的杀伤力。

CEA 是 1965 年首先从结肠癌组织中分离出来的一种 TAA,是国际上公认的结直肠癌肿瘤标志物,可作为主动免疫治疗的靶抗原^[21],并且目前已在结肠癌、胃癌、肝癌、胆囊癌、乳腺癌、小细胞肺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、间皮瘤、髓样甲状腺癌等肿瘤组织中发现 CEA 表达上调^[22]。因此,把 CEA 作为免疫治疗的靶点,把 rAAV 作为感染 DC 的载体,将使肿瘤的治疗发生重大变化。

[参考文献]

[1] Hamm arstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family:

- Structure, suggested functions and expression in normal and malignant tissue [J]. *Semin Cancer Biol*, 1999, 9(2): 67 - 81.
- [2] Mailliard RB, Dallal RM, Son Yi, et al. Dendritic cells promote T-cell survival or death depending upon their maturation state and presentation of antigen [J]. *Immunol Invest*, 2000, 29 (2): 177-185.
- [3] Kalinski P, Okada H. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: Directing effector-type T cells to tumors [J]. *Emin Immunol*, 2010, 22(3): 173-182.
- [4] Le DT, Pardoll DM, Jaffee EM. Cellular vaccine approaches [J]. *Cancer J*, 2010, 16(4): 304-310.
- [5] Xia D, Moan T, Xiang J. Combinational adenovirus-mediated gene therapy and dendritic cell vaccine in combating well-established tumors [J]. *Cell Res*, 2006, 16(3): 241-259.
- [6] Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine [J]. *Nature*, 2007, 449(7161): 419-426.
- [7] Finn OJ. Molecular origins of cancer: Cancer immunology [J]. *New Eng J Med*, 2008, 358(25): 2704-2715.
- [8] Della Bella S, Gennaro M, Vaccari M, et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(8): 1463-1472.
- [9] Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 685-711.
- [10] Kalinski P, Urban J, Narang R, et al. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: What we have and what we need [J]. *Future Oncol*, 2009, 5(3): 379-390.
- [11] Dhodapkar MV, Dhodapkar KM, Palucka AK. Interactions of tumor cells with dendritic cells: Balancing immunity and tolerance [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(1): 39-50.
- [12] Thurner B, Haendle I, Röder C, et al. Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma [J]. *J Exp Med*, 1999, 190(11): 1669-1678.
- [13] Ashley DM, Faiola B, Nair S, et al. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors [J]. *J Exp Med*, 1997, 186(7): 1177-1182.
- [14] Chen L, Tang XD, Yu ST, et al. Induction of anti-tumor immunity by dendritic cells transduced with hTERT recombinant adenovirus in mice [J]. *J Pathol*, 2009, 217(5): 685-692.
- [15] Tyagi RK, Mangal S, Garg N, et al. RNA-based immunotherapy of cancer: Role and therapeutic implications of dendritic cells [J]. *Exp Rev Ant Ther*, 2009, 9(1): 97-114.
- [16] Morse MA, Lyerly HK. DNA and RNA modified dendritic cell vaccines [J]. *World J Surg*, 2002, 26(7): 819-825.
- [17] Liu Y, Chiriva-Internati M, You C, et al. Use and specificity of breast cancer antigen/milk protein BA46 for generating anti-self-cytotoxic T lymphocytes by recombinant adeno-associated virus-based gene loading of dendritic cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3): 304-312.
- [18] Clément N, Knop DR, Byrne BJ. Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies [J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20 (8): 796-806.
- [19] 尤长宣, 苏瑾, 廖旺军, 等. rAAV/BA46 转染树突状细胞诱导特异细胞免疫 [J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(12): 2146-2149.
- [20] Tuytaerts S, Aerts JL, Corthals J, et al. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56 (10): 1513-1537.
- [21] Aldrich WA, Ren C, White AF, et al. Enhanced transduction of mouse bone marrow derived dendritic cells by repetitive infection with self complementary adeno-associated virus 6 combined with immunostimulatory ligands [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(1): 29-39.
- [22] Chan CH, Stanners CP. Recent advances in the tumour biology of the GPI anchored carcinoembryonic antigen family members CEACAM 5 and CEACAM 6 [J]. *Curr Oncol*, 2007, 14 (2): 70-73.
- [收稿日期] 2012 - 02 - 18 [修回日期] 2012 - 05 - 10
[本文编辑] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》，全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定，正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示(pH 用正体除外)，例如 m (质量)、 t (时间)、 c (浓度)、 V (体积)、 p (压力)、 F (力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示，例如 kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的量浓度或质量浓度时，一般使用 L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时，不能写成 mg/kg/d 的形式，应写成 mg/(kg · d) 或 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 的形式。(5)单位符号常见书写错误：长度单位符号 A° (埃)已不用，应写作 0.1 nm；时间单位“小时”符号为 h(不是 hr)、“秒”符号为 s(不是 sec)；转速单位符号为 r/min(不是 rpm)；量浓度单位符号为 mol/L(不是 M、N，也不是 mol/mm³)；力的单位“牛顿”符号为 N[不是 dyn(达因)、kgf(千克力)，换算 1 dyn = 10⁻⁵N]；热量单位“焦耳”符号为 J[不是 cal(卡)、kcal(千卡)，换算 1 cal = 4.187 J]；放射性活度单位符号为 Bq[不是 Ci(居里)，换算 1 Ci = 3.7 × 10¹⁰Bq]。

(本刊编辑部)