

MUC1 模拟表位肽对表达人 MUC1 T739 小鼠膀胱癌细胞的细胞毒作用的实验研究

崔志刚 刘刚 袁辉 潘进勇 路浩军 张立新

【摘要】 目的 观察 MUC1 模拟表位肽对表达人 MUC1 T739 小鼠膀胱癌细胞的细胞毒作用。**方法** 培养、诱导 T739 小鼠骨髓成熟树突状细胞,流式细胞仪鉴定纯度,用负载模拟表位肽成熟树突状细胞免疫 T739 小鼠,酶联免疫斑点(ELISPOT)检测活化的模拟表位特异性 T 细胞,用非放射性乳酸脱氢酶法检测不同效靶比例时活化的模拟表位特异性 T 细胞体外细胞毒效应。**结果** 培养出成熟树突状细胞,纯度为 78.8%,肽免疫的 T739 小鼠特异性分泌 IFN- γ 的 T 细胞频数是 106.5 ± 12.8 ,而 PBS 和 DC + PBS 组频数均少于 10,数量明显少于肽 + DC 组。当效靶比为 100:1 时肽免疫的 T739 小鼠产生的活化 T 淋巴细胞具有显著细胞毒功能,与 PBS 和 DC + PBS 免疫小鼠相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 负载 MUC1 模拟表位肽的树突状细胞免疫小鼠,可诱导产生特异性细胞毒性 T 细胞。

【关键词】 膀胱肿瘤; CA-15-3 抗原; T 淋巴细胞,细胞毒性; 模拟抗原表位

Cytotoxicity of MUC1-positive T739 mouse bladder cancer cells induced with MUC1 mimic peptide epitopes CUI Zhi-gang, LIU Gang, QIU Hui, PAN Jin-yong, LU Hao-jun, ZHANG Li-xin. Department of Urology, The 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China

Corresponding author: ZHANG Li-xin, Email: zhanglixin69@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the functional immunological responses and effectiveness in treatment of MUC1-positive T739 mouse bladder cancer induced with MUC1 mimic peptide epitopes. **Methods** Mouse dendritic cells (DCs) were derived from T739 bone marrow and analyzed on a flow cytometer. Mice were immunized peptide-loaded DCs. Mimotope-specific immune responses were detected by ELISPOT technology. Mimotope-specific CTL responses with different E/T ratio *in vitro* were also analyzed by non-radiative LDH cytotoxicity analysis. **Results** Mature DC were harvested and FCM showed that 78.8% cells expressed a marker of mature DC. The results of ELISPOT showed that the frequencies of functional IFN- γ secreting lymphocytes in immunized mice with loaded peptide DCs were 106.5 ± 12.8 and the frequencies in immunized mice with unloaded peptide DCs or PBS were not more than 10, which were significantly lower than experimental group. Non-radiative LDH cytotoxicity analysis manifested that the specific active T lymphocytes of mice immunized with peptide-loaded DCs could significantly kill BST739-MUC1 cells when the E/T ratio was 100:1, which were significantly different from that of mice immunized with unloaded peptide DCs or PBS ($P < 0.01$). **Conclusions** Mimotope-specific CTL of mice can be induced with immunized mimic epitope peptide-pulsed DC *in vitro*.

【Key words】 Urinary bladder neoplasms; CA-15-3 antigen; T-lymphocytes, cytotoxic; Mimic epitope

膀胱癌是泌尿系常见的肿瘤,好发中老年人,具有多发、术后易复发、预后差、危害大等特点,许多学者致力寻找膀胱癌的有效治疗手段。MUC1 是一种肿瘤相关黏蛋白,在膀胱癌等癌组织中异常丰富地表达于癌细胞表面,是一种理想的肿瘤免疫治疗的靶分子^[1]。细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T-lymphocytes, CTL)介导的特异性细胞免疫应答是机体主要的抗肿瘤机制。

树突状细胞(DC)是已知体内功能最强的抗原提呈细胞,能摄取各种抗原,体内外能激发 T 细胞增殖,诱导特异性 CTL。前期实验我们建立了稳定表达人 MUC1 T739 小鼠膀胱癌细胞细胞株,应用噬菌体随机肽库成功筛选出 MUC1 的模拟表位肽,表位预测提示为 T 细胞表位,但是其体外免疫活性如何?能否针对稳定表达人 MUC1 T739 小鼠膀胱癌细胞真正产生 CTL 效应,进一步对肿瘤细胞产生杀伤作用?通过本实验得到验证。

材料和方法

一、实验材料

1. 试剂: RPMI1640、胎牛血清购自 Hyclone 公司; DC 专用无血清培养基 CellGroR DC 购自 Cell Genix 公司; 诱导 DC 分化、成熟所用小鼠细胞因子 IL-4 和 GM-CSF 购自 AMS Biotechnology 公司; 识别成熟 DC 表面标志 CD33D1 的单克隆抗体(大鼠抗小鼠 IgG1) 购自 eBioscience 公司; FITC 标记的山羊抗小鼠二抗购自北京中杉生物技术有限公司; Mouse γ -Elispot 试剂盒为 U-Cytec 公司产品, 购自深圳达科为公司; CytoTox96 非放射性细胞毒性试验试剂盒(Non-Radioactive Cytotoxicity Assay) 购自 promega 公司。

2. 实验动物: 雌性 T739 小鼠, 4~8 周龄大小, 购于中国预防医学科学院动物所, 饲养于军事医学科学院动物中心, 饲养环境符合 SPF 标准。

3. 主要仪器: 高速冷冻离心机 RC 5B PLUS(日本 SORVALL 公司); XSJ-10 型倒置相差显微镜(美国 Bio-Rad 公司); ELISPOT 斑点成像分析仪(德国 BIOSYS); anthos2010 酶联仪(美国 Anthos labtech)。

二、小鼠骨髓 DC 的培养和鉴定

1. 骨髓树突状细胞的培养: T739 雌性小鼠 10 只颈椎脱臼处死, 无菌取双侧股骨和胫骨, 剔去肌肉, 剪去两端松质骨, 用 1 ml 注射器针头刺入骨髓腔, PBS 冲出骨髓细胞, 反复冲洗并过 200 目不锈钢滤网制成单细胞悬液, 红细胞裂解液裂解红细胞, 5 min 后 PBS 洗涤, 按 2×10^6 /ml 的细胞密度加入塑料培养皿, 37℃ 贴壁 24 h 后弃悬浮细胞, 黏附细胞加入 DC 专用培养基进行培养, 同时加入细胞因子 rmGM-CSF, rmlL-4 各 1000 U/ml, 隔日半量换液; 第 6 天收集疏松贴壁细胞转入新培养皿中, 加入 LPS(1 μ g/ml) 刺激 DC 成熟, 第 7 天收集悬浮细胞为成熟 DC, PBS 洗涤去除 LPS 并调整 DC 密度。

2. 小鼠成熟 DC 的鉴定: 第 7 天收集悬浮细胞为成熟 DC, 台盼蓝染色计数 DC 产量, 光学显微镜下观察成熟 DC 形态, 用特异性免疫荧光单抗 CD33D1 染色, 流式细胞仪检测成熟 DC 标记 CD33D1 的表达以判断 DC 纯度。

三、MUC1 模拟表位肽脉冲成熟 DC

收集成熟 DC, 按 10 μ g/ml 的浓度加入 MUC1 模拟表位肽, 37℃、5% CO₂ 浓度和饱和湿度下培养 1 h, 其间间断摇动数次。PBS 洗去未结合肽后, 用 PBS 调整肽孵育后 DC 密度为 2×10^6 /ml。

四、免疫动物

4~8 周龄雌性 T739 小鼠随机分为三组, 每组 5

只。第一组为空白对照组, 小鼠尾静脉注射 0.1 ml PBS; 第二组为空 DC 组, 小鼠尾静脉注射 0.1 ml 不加肽刺激的空 DC(2×10^5 /鼠); 第三组为实验组, 小鼠尾静脉注射 0.1 ml MUC1 模拟表位肽刺激的 DC(2×10^5 /鼠), 每周免疫一次, 共三次。

五、酶联免疫斑点(Enzyme-Linked Immuno SPOT, ELISPOT)检测免疫小鼠脾脏特异性分泌 γ -干扰素淋巴细胞

1. 脾脏淋巴细胞的制备: 无菌切取免疫三次小鼠脾脏, 制成单细胞悬液, 裂解红细胞并充分洗涤后, 按 2×10^6 /ml 的细胞密度加入塑料培养皿, 培养 4 h 后收集悬浮细胞为淋巴细胞。

2. 淋巴细胞预刺激: 取制备好的淋巴细胞, 按 2×10^6 /ml 的密度加入 6 孔培养板中, 每孔 4 ml, 实验组加入 MUC1 模拟表位肽体外预刺激(终浓度 10 μ g/ml), 对照组不加肽; 预刺激时间为 40 h。刺激结束后, 台盼蓝染色行活细胞计数, 调整细胞密度为 1×10^6 /ml。

3. ELISPOT 检测: 按试剂盒说明。

4. 结果判断: 阳性斑点直径中央密度较高、向周围逐渐弥散; 每次实验中, 与阴性对照组相比, 斑点数增加 2 倍以上认为有意义。

六、非放射性乳酸脱氢酶法(LDH 法)检测体外诱导细胞毒活性

1. 最适靶细胞密度的确定: 按试剂盒说明书进行, 选择最大释放量 > 自发释放量 2 倍以上的细胞密度为合适的细胞密度, 通过预实验确定最适靶细胞密度为 1×10^4 /孔。

2. 靶细胞的制备: BST739-MUC1 细胞消化计数(图 1), 调整细胞密度为 2×10^5 /ml, 96 孔板中加入上述细胞悬液 50 μ l。

3. 效应细胞的制备: 无菌切取免疫三次小鼠脾脏, 制备脾脏淋巴细胞方法同前, 完全 1640 培养基中胎牛血清浓度降低到 3% 以减少培养基背景。以按效靶比为 100:1、50:1、25:1 在各靶细胞的孔中加入 50 μ l 系列稀释密度的效应淋巴细胞, 每孔总体积为 100 μ l, 实验分组同前, 每组均设 3 个复孔。

4. 对照设置: (1) 培养基背景对照: 只含培养基, 不加细胞, 用于校正培养基中酚红和血清引起的误差; (2) 容量对照: 只含培养基, 不加细胞, 用于校正加入 10 μ l 细胞裂解液后容量变化引起的误差; (3) 效应细胞自发释放: 只含效应细胞, 不含靶细胞, 用于校正效应细胞自发释放乳酸脱氢酶引起的误差; (4) 靶细胞自发释放: 只含靶细胞, 不含效应细胞, 用于校正靶细胞自发释放乳酸脱氢酶引起的误差; (5) 靶细胞最大释放: 裂解液裂解靶细胞后释放最大乳酸脱氢酶引起的

误差。

5. 实验步骤:按试剂盒说明。

6. 靶细胞溶破率的计算:(1)最大释放孔吸光度减容量对照为靶细胞 LDH 最大释放量;(2)其余各孔吸光度减培养基背景对照为各自 LDH 释放量;(3)靶细胞 LDH 释放量 = 实验组释放 - 效应细胞自发释放 - 靶细胞自发释放;(4)靶细胞溶破率 = (LDH 最大释放 - 靶细胞 LDH 释放)/LDH 最大释放 × 100%。

7. 结果判定:靶细胞溶破率 > 10% 认为结果有意义。

七、统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,多组间比较用 ANOVA,组间比较方差齐时用 Bonferroni 检验,不齐时用 Tamhane's T2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠骨髓 DC 的光镜观察(图 2):经 37 °C 培养 24 h 后吸弃悬浮细胞,剩余部分疏松贴壁的 DC 聚集成团,到第 6 天时,此类疏松贴壁集落数量急剧增多,细胞表面可见有长短不一、形态不规则的突起。光镜下观察培养 7 d 的成熟 DC 细胞,可见细胞形态不规则,细胞表面有大量的皱褶和不规则毛刺样突起,具有典型的 DC 形态。

2. DC 表面标志鉴定(图 3):采用 FITC 标记的 CD33D1 抗体进行直接免疫荧光染色,流式细胞仪测定分析显示,通过上述方法所采集到的细胞,其 CD33D1 阳性细胞百分数约 78.8%。

3. ELISPOT 检测结果(图 4):负载 MUC1 模拟表位肽的成熟 DC 免疫 T739 小鼠后, 1×10^5 脾淋巴细胞产生的斑点数为 106.5 ± 12.8 ; PBS 和 DC + PBS 组 1×10^5 淋巴细胞产生斑点数均少于 10,表明肽免疫的 T739 小鼠脾脏细胞中,产生了特异性活化的 T 淋巴细胞,数量明显多于两个对照组。

4. 免疫小鼠脾脏淋巴细胞对 BST739-MUC1 的细胞毒效应(表 1):取免疫三次小鼠脾脏淋巴细胞为效

应细胞,以 BST739-MUC1 细胞为靶细胞,检测活化脾脏淋巴细胞的细胞毒效应。当效靶比为 25:1 时开始显示有细胞毒效应,在效靶比为 100:1 时,肽免疫的 T739 小鼠产生的活化 T 淋巴细胞具有显著的细胞毒功能,与 PBS 和 DC + PBS 免疫小鼠相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

讨 论

MUC1 是 Mucines 黏蛋白家族的重要成员,是一种肿瘤相关黏蛋白,正常情况下泌尿生殖道的管腔面顶部都有 MUC1 的表达,但在膀胱癌等肿瘤组织中,其广泛分布并异常丰富地表达于癌细胞表面,由于糖基化不全暴露出正常情况下隐蔽的肿瘤特异性表位,与肿瘤的发生、发展、预后密切相关,成为一种理想的肿瘤生物学标志物和肿瘤免疫学治疗的靶分子^[1-3]。我们选用针对 MUC1 核心肽表位的单克隆抗体 BC2 为筛选配基,对噬菌体随机 12 肽库进行了 3 轮筛选,获得 MUC1 的模拟表位,通过活性鉴定和计算机软件的表位预测,进一步明确所筛选 MUC1 模拟表位能够模拟原表位的免疫学特性,具有诱导产生特异性 CTL 可能,为潜在的 T 细胞表位。我们所筛选出 MUC1 的模拟表位肽是针对人 MUC1 分子为靶标,而人与小鼠 MUC1 分子同源性较差,对小鼠来源的肿瘤细胞没有作用,因此,我们通过脂质体介导将人 MUC1 全长 cDNA 转入 T739 小鼠的膀胱癌细胞 BST739 中,建立了稳定表达人 MUC1T739 小鼠膀胱癌细胞株。

DC 激活的细胞免疫在机体抗肿瘤反应中发挥着重要作用。关于 DC 疫苗临床应用的 I、II 期试验也取得了令人鼓舞的结果,显示出了 DC 疫苗在恶性肿瘤治疗中的巨大前景^[4-6]。有效的肿瘤疫苗应该提供 T 细胞激活所必需的全部信号。DC 是最强有力的专职性抗原提呈细胞,不但能高表达 MHC I 类和 II 类分子,而且还能高表达 B7 等共刺激分子,以及 ICAM1 黏附分子和细胞因子等。目前 DC 疫苗的制备方法很多,包括使用肿瘤特异性抗原、肿瘤相关抗原、完全细胞性抗原和肿瘤细胞 DNA、mRNA 等冲击致敏 DC 或采用细胞融合制备 DC 疫苗。其次,还可利用重组腺病毒、脂质体或裸 DNA 转染 DC 等,将编码肿瘤抗原的基因导入 DC 制备疫苗等^[7-10]。

DC 摄取、加工抗原,以 MHC I、II 类肽结合物的形式递呈抗原,能有效地激发 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞,尤其对 T 淋巴细胞免疫显得尤为重要。DC 最常负载的是 MHC I 类限制性 9~11 个氨基酸组成的肿瘤相关抗原肽。研究发现 DC 处理 MUC1 抗原时 O-糖苷键保持完好,通过分析 MUC1 多肽重复序列中蛋白质水解位置和参与水解的酶可以发现 MUC1 O-糖基化在抗原

表 1 不同效靶比各组免疫小鼠脾脏淋巴细胞的 CTL 效应(细胞裂解率)(%, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 效靶比 | | |
|----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 25:1 | 50:1 | 100:1 |
| PBS | 4.28 ± 2.74 | 4.41 ± 2.77 | 4.61 ± 3.09 |
| DC + PBS | 4.08 ± 0.78 | 4.03 ± 3.76 | 4.66 ± 3.29 |
| DC + 肽 | 8.50 ± 2.40 ^a | 11.01 ± 1.55 ^a | 37.86 ± 1.70 ^b |

注:与 PBS 和 DC + PBS 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

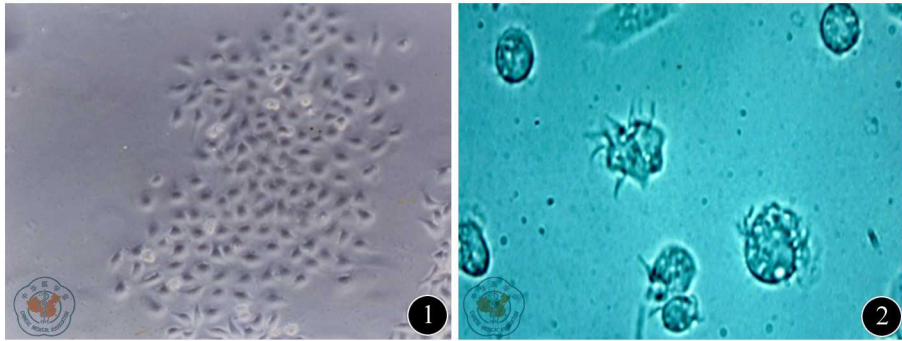


图1 培养BST739-MUC1细胞(×100) 图2 成熟DC倒置显微镜下所见(×400)

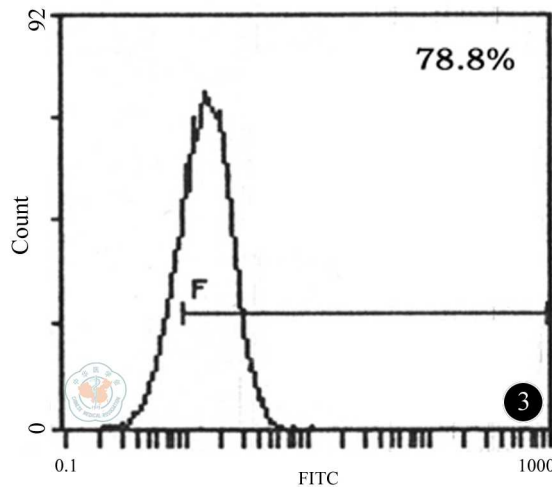


图3 成熟DC流式检测(右上角数字为阳性细胞百分数,代表成熟DC纯度)

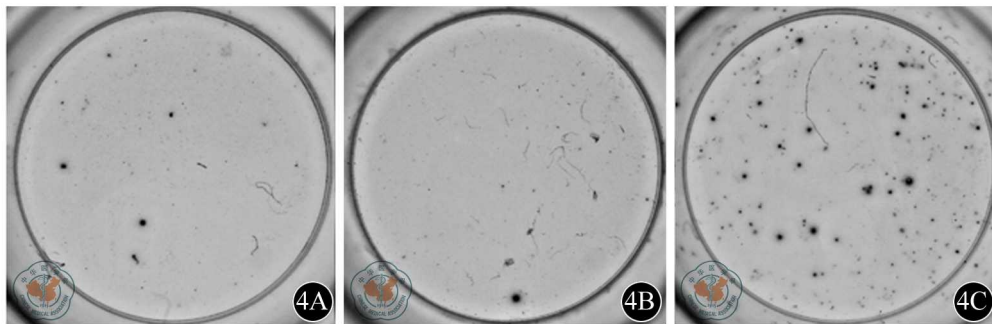


图4 ELISPOT斑点记数仪采集各组淋巴细胞产生斑点数之图像(×100)。4A: PSA组; 4B: DC+PSA组; 4C: DC+肽组

加工处理过程中起到位点特异性保护作用^[11-12]。DC降解蛋白时 MUC1 多肽重复序列 GVTSAPDTRPAP GSTAPPAH 的裂解部位发生在 Gly13-Ser14, His20-Gly1 和 Thr3-Ser4, 产生 STA27 或 GVT20 最初小肽片段和 O-糖基化完整的 SAPI17。人组织蛋白酶和小鼠相应蛋白酶参与了在胞内、体内位点特异性蛋白水解。O-糖基化可能通过掩盖酶解位点阻断 Thr3-Ser4 蛋白水解, 从而使 DC 加工处理蛋白时 MUC1 保持 O-糖基化完整, 这类糖基化很可能参与 MUC1 肿瘤免疫应答。

本研究用 ELISPOT 方法检测脾脏淋巴细胞中分泌 IFN- γ 的细胞频率, 代表模拟表位肽特异性的活化 T 淋

巴细胞。结果肽 + DC 免疫组斑点数目明显多于两个对照组, 表明 T739 小鼠体内产生了对抗原肽特异性的 CTL 免疫应答。体外杀伤实验亦得到证实。

大量实验证实 MUC1 表位是 T 细胞表位, 可以与 MHC 分子结合激发肿瘤特异性的细胞免疫, 是一个理想的抗原肽^[13-16]。但 MUC1 毕竟是一种自身抗原, 在用 MUC1 多肽进行免疫治疗时, 并不能完全排除产生自身免疫的可能性。因此, 用 MUC1 的模拟表位作为肿瘤疫苗, 作为一种异源分子, 一方面可增强其免疫原性, 另一方面可减少诱发自身免疫的机会。本研究表明从随机肽库中筛选得到的模拟性表位在一定条件下

可以引发识别原始抗原的免疫反应,即模拟表位肽与 MUC1 表位具有交叉免疫应答的特点。

综合本实验结果可以看出:MUC1 模拟表位肽免疫小鼠后可诱导小鼠产生 MUC1 特异性 CTL 应答,对 MUC1 + 膀胱癌细胞产生杀伤效应,体外显示一定的抗膀胱癌活性。

参 考 文 献

- [1] Yang H, Cho NH, Seong SY. The Tat-conjugated N-terminal region of mucin antigen 1 (MUC1) induces protective immunity against MUC1-expressing tumours. *Clin Exp Immunol*, 2009, 158:174-185.
- [2] Weiner LM, Surana R, Murray J. Vaccine prevention of cancer; can endogenous antigens be targeted? *Cancer Prev Res*, 2010, 4:410-415.
- [3] Kobukai S, Kremers GJ, Cobb JG, et al. Induction of antitumor immunity by dendritic cells loaded with membrane-translocating mucin 1 Peptide antigen. *Transl Onco*, 2011, 4:1-8.
- [4] Soleimani A, Berntsen A, Svane IM, et al. Immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with dendritic cells pulsed with tumor lysate. *Scand J Immunol*, 2009, 70:481-489.
- [5] Pan K, Zhao JJ, Wang H, et al. Comparative analysis of cytotoxic T lymphocyte response induced by dendritic cells loaded with hepatocellular carcinoma-derived RNA or cell lysate. *Int J Biol Sci*, 2010, 6:639-648.
- [6] Shurin MR, Gregory M, Morris JC, et al. Genetically modified dendritic cells in cancer immunotherapy: a better tomorrow? *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10:1539-1553.
- [7] Lesterhuis WJ, De Vries IJ, Schreiber G, et al. Immunogenicity of dendritic cells pulsed with CEA peptide or transfected with CEA mRNA for vaccination of colorectal cancer patients. *Anticancer Res*, 2010, 30:5091-5097.
- [8] Pan K, Zhao JJ, Wang H, et al. Comparative analysis of cytotoxic T lymphocyte response induced by dendritic cells loaded with hepatocellular carcinoma-derived RNA or cell lysate. *Int J Biol Sci*, 2010, 6:639-648.
- [9] Garetto S, Sizzano F, Brusa D, et al. Binding of prostate-specific membrane antigen to dendritic cells: a critical step in vaccine preparation. *Cytotherapy*, 2009, 11:1090-1100.
- [10] Lozano JM, Lesmes LP, Carreño LF, et al. Development of designed site-directed pseudopeptide-peptido-mimetic immunogens as novel minimal subunit-vaccine candidates for malaria. *Molecules*, 2010, 15:8856-8889.
- [11] Hanisch FG, Schwientek T, Von Bergwelt-Baildon MS, et al. O-Linked glycans control glycoprotein processing by antigen-presenting cells: a biochemical approach to the molecular aspects of MUC1 processing by dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2003, 33:3242-3254.
- [12] Lepisto AJ, Moser AJ, Zeh H, et al. A phase I/II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors. *Cancer Ther*, 2008, 6:955-964.
- [13] Rosenblatt J, Wu Z, Vasir B, et al. Generation of tumor-specific T lymphocytes using dendritic cell/tumor fusions and anti-CD3/CD28. *J Immunother*, 2010, 33:155-166.
- [14] Saeland E, de Jong MA, Nabatov AA, et al. MUC1 in human milk blocks transmission of human immunodeficiency virus from dendritic cells to T cells. *Mol Immunol*, 2009, 46:2309-2316.
- [15] Kondo H, Hazama S, Kawaoka T, et al. Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer using MUC1 peptide-pulsed dendritic cells and activated T lymphocytes. *Anticancer Res*, 2008, 28:379-387.
- [16] Williams MA, Bauer S, Lu W, et al. Deletion of the mucin-like molecule muc1 enhances dendritic cell activation in response to toll-like receptor ligands. *J Innate Immun*, 2010, 2:123-143.

(收稿日期:2012-08-19)

(本文编辑:郝锐)

崔志刚,刘刚,袁辉,等. MUC1 模拟表位肽对表达人 MUC1 T739 小鼠膀胱癌细胞的细胞毒作用的实验研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2012, 6(2):361-365.