

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2002.06.12

肺癌 gp96-多肽复合物/DC 疫苗体外诱导 CTL 反应的实验研究

沈晨阳 刘军 王丹蕾 赵辉 张国良 蔡鹏 童春容 王俊

【摘要】 目的 研究热休克蛋白 gp96-多肽复合物负载树突状细胞(dendritic cell, DC)后,能否诱导出 gp96-多肽复合物特异性的细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应。方法 从一例肺癌患者肿瘤组织中提取 gp96-多肽复合物和自体肿瘤细胞溶解物,分别负载从该患者骨髓血中培养的 DC。以不同形式的抗原/DC 疫苗分别刺激由患者外周血中分离的淋巴细胞。采用 ELISA 法检测淋巴细胞所释放的 IFN- γ 量作为 CTL 反应的指标,以 Cr⁵¹ 释放实验分析致敏后的淋巴细胞对不同靶细胞的裂解和杀伤作用。结果 所有肿瘤抗原致敏淋巴细胞后均可以诱导产生 CTL 反应,其中以 gp96-多肽复合物/DC 疫苗诱导释放的 IFN- γ 量最高。肿瘤抗原致敏淋巴细胞后对原代培养的肿瘤细胞的杀伤作用高于 PG 细胞和 K562 细胞。结论 自体肿瘤组织中提取的 gp96-多肽复合物能诱导出肿瘤特异性 CTL 反应,而负载 DC 后能激发起更强的 CTL。

【关键词】 gp96 树突状细胞 特异性 CTL 肿瘤疫苗 肺癌

【中图分类号】 R735.3

Autologous lung cancer tissues derived gp96-peptide complex/dendritic cell vaccine induces the cytotoxic T cell response *in vitro* SHEN Chenyang, LIU Jun, WANG Danlei, ZHAO Hui, ZHANG Guoliang, CAI Peng, TONG Chunrong, WANG Jun. Department of Thoracic Surgery, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate whether autologous lung cancer tissues derived gp96-peptide complex/dendritic cell vaccine could induce peptide specific cytotoxic T lymphocyte(CTL) response *in vitro*. **Methods** A patient's tumor-derived antigens including gp96-peptide complexes and tumor cell lysate were co-cultured with DCs derived from the same patient's bone marrow blood mononuclear cells. The various antigen/DC vaccines were used to stimulate peripheral lymphocytes. Interferon- γ (IFN- γ) level of activated lymphocytes was detected by ELISA method and the Cr⁵¹ release test was performed to evaluate the gp96-peptide specific CTL response in three kinds of target cells including the primary cultured tumor cells, PG cells and K562 cells. **Results** IFN- γ could be observed from the supernate collected in all antigen groups after the cognate T lymphocytes were stimulated by various vaccines. The concentration of IFN- γ induced by gp96-peptide complexes/DC vaccine was higher than that of other groups. In addition, the killing effect of the activated T lymphocytes on patient's primary tumor cells was higher than that on PG and K562 cells. **Conclusion** Autologous tumor-derived gp96-peptide complexes can induce a peptide complex specific CTL response, and the CTL response is significantly intensified after DCs are pulsed.

【Key words】 gp96 Dendritic cell Specific CTL Tumor vaccine Lung cancer

This work was supported by a grant from the National Natural Scientific Foundation of China (to ZHANG Guoliang)(No. 39970729).

目前的研究表明,从肿瘤组织中提取的热休克蛋白(heat shock protein, HSP),特别是 gp96 蛋白能够

激发特异性抗肿瘤免疫反应^[1,2]。应用自身肿瘤提取的 gp96 多肽复合物免疫晚期癌症患者的小规模临床试验目前已有报导^[3]。树突状细胞(dendritic cell, DC)作为人体内能力最强的抗原递呈细胞,可摄取、加工肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA),递呈给特异性 T 细胞,使后者迁移至肿瘤部位,发挥主动的抗肿瘤细胞免疫作用。以不同形式的肿瘤抗原负

本研究受国家自然科学基金(39970729)资助

作者单位:100044 北京大学人民医院胸外科(沈晨阳、刘军、王丹蕾、赵辉、张国良、王俊)细胞治疗中心(蔡鹏、童春容)

中国肺癌杂志
www.lungca.org

载 DC 制成瘤苗,已在恶性肿瘤的尝试性治疗中取得了令人振奋的疗效。但以 DC 为载体与 gp96-多肽复合物共孵育制备疫苗在抗肿瘤中的作用未见报道。本研究旨在考察从肺癌组织中提取的 gp96-多肽复合物与 DC 共孵育后能否在体外激发起更强的细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应,并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 标本来源 女性患者,56 岁,因左下肺鳞状细胞癌行左下肺叶切除术,TNM 分期为 II B 期(T₂N₁M₀)。留取瘤体标本约 10 g,生理盐水冲洗干净后,少量用于原代培养,剩余组织立刻置液氮中保存。

1.2 肿瘤细胞的原代培养 取同一患者的新鲜无菌组织标本约 2 g,用无血清的 RPMI-1640 冲洗两遍,经双抗生素(青霉素+链霉素)冲洗后,剪碎组织块在研钵中研磨,并过滤除去杂质,获得的细胞悬液在含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,37℃、5% CO₂ 连续培养至贴壁生长。

PG 细胞(pulmonary giant cell cancer line,北京大学医学部细胞生物教研室提供),K562 细胞(北京大学人民医院中心实验室提供)均常规复苏后进行细胞培养。

1.3 gp96 蛋白-多肽复合物的制备及鉴定 gp96 蛋白的提取参照文献 4 的方法并加以改进。简述如下,将瘤组织切碎置于 30 mmol/L NaHCO₃(pH 7.0)溶液中匀浆,4℃、100 000 × g 离心 90 min,上清液经 50% 和 70% 饱和硫酸铵二步法沉淀,沉淀物经平衡液(20 mmol/L Tris · Cl, pH 7.4; 200 mmol/L NaCl; 2 mmol/L CaCl₂和 2 mmol/L MgCl₂)重悬后用伴刀豆球蛋白 A 亲和层析柱(Concanavalin A-Sepharose, Pharmacia)和离子交换柱 DEAE Sephacel (Sigma)等分别层析过滤,取不同离子梯度的分离液经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白分子量及纯度鉴定。取等量待测样品做 10% SDS-PAGE 电泳,电转移至硝酸纤维素膜,以抗 gp96 单克隆抗体(StressGen Biotech Corp)为一抗,生物素化羊抗鼠 IgG 为二抗,进行 Western 印迹分析,鉴定 gp96。

1.4 肿瘤粗提物的制备 取液氮中保存的冰冻肺癌组织 1~2 g,置含无血清 RPMI-1640 的研钵中剪碎、研磨,匀浆液经过滤除菌后 -80℃ 冰箱保存。

1.5 DC 的体外培养及其免疫表型检测 术后一周抽取同一患者骨髓血约 20 ml,肝素抗凝,室温离心 20 min 去上清,加入等量 RPMI-1640 培养液

(GIBCO)按 1:4 加入 6% 羟乙基淀粉(DUPONT)沉降 30 min,取上清加一倍体积 RPMI-1640,2 000 r/min 离心弃上清。用灭菌双蒸水破红细胞后,RPMI-1640 培养液洗涤细胞 3 次,悬浮于无血清培养基(AIM-V, GIBCO)中,调节其浓度至 4 × 10⁶/ml,于 75 cm² 组织培养瓶(Nunc, Denmark)中,5% CO₂、37℃ 培养。4 h 后去悬浮细胞,于贴壁细胞中加入无血清培养基及以下各种细胞因子:SCF 1000 U/ml(军事医学科学院),IL-3 10 μg/L(军事医学科学院),GM-CSF 1 000 U/ml(军事医学科学院),TNF-α 1 000 U/ml,IL-4 1 000 U/ml(Promega, Madison, WI)。每三天加入 1/3~1/2 量无血清培养基及以上各种细胞因子,第 7 天加 IFN-α 1 000 U/ml(军事医学科学院),第 10 天收获细胞进行鉴定并用于诱导 CTL。

通过观察细胞形态和流式细胞仪分析细胞免疫表型进行 DC 的鉴定,PBS 冲洗 DC,重悬于含 0.2% FCS、0.1% NaN₃ 的 0.5 ml PBS 液中,4℃ 避光孵育 30 min,各取 5 μl 在 FCA Scan 流式细胞仪(FAC440, Becton, Dickinson)进行下列抗体检测:PE-结合的抗 CD14、PE 结合的抗 HLA Dr/CD86、PE 结合抗 CD1α、FITC 结合抗 CD80 和 FITC 结合抗 CD83。

1.6 不同肿瘤抗原形式负载 DC 疫苗的制备 将已培养鉴定好的 DC 分三组,每组的 1 × 10⁶/ml,其中两组于 DC 培养的第 3 天和第 7 天分别加入 25 μg 的 gp96-多肽复合物和肿瘤粗提物,第三组不加任何形式的肿瘤抗原物质,制备成不同形式的 DC 疫苗,拟行 CTL 反应。

1.7 CTL 反应的诱导及鉴定 常规密度离心法获取的同一患者外周血淋巴细胞作为效应细胞,调整细胞浓度为 1 × 10⁶/ml,分四组。以不负载 DC 的 gp96-多肽复合物疫苗、肿瘤粗提物/DC 疫苗和 gp96 多肽复合物/DC 疫苗作为实验组,以不加任何形式肿瘤抗原的 DC 疫苗为空白对照组,在 DC 培养的第 13 天和第 17 天,以 1:3 和 1:5 的比例分别加入效应细胞中。在含 10% FCS 和 10 μg/L IL-2 的 RPMI-1640 培养基中 5% CO₂、37℃ 培养,分离上清冻存进行 CTL 检测。应用活细胞定量计数法观察效应淋巴细胞被致敏前后的增殖情况,流式细胞仪测定效应淋巴细胞在接受刺激前后的 CD8、CD4 和 CD3 的表达。

1.8 IFN-γ 的检测 用 IFN-γ ELISA 法(IFN-γ ELISA Kit,晶美生物工程有限公司),检测效应淋巴细胞经不同肿瘤抗原形式负载 DC 疫苗致敏后所分泌的 IFN-γ 活性。实验过程完全按照试剂盒说明书进行操作,每组实验均重复三次。

1.9 ⁵¹Cr 释放细胞杀伤实验 原代培养的患者肿瘤细胞、PG 细胞和 K562 细胞在 5% CO₂、37℃ 条件下，加入 ⁵¹Cr 1 Ci/ L (Amersham Pharmacia Biotech) 共孵育 2 h 作为靶细胞，按每孔 1 × 10⁴ 个靶细胞的浓度加入到 96 孔板中。将诱导的 CTL 效应细胞浓度调整到 1 × 10⁶/ml，倍比稀释后，按靶细胞：效应细胞分别为 1：5、1：10、1：25 和 1：50 的比例，作为实验组加入到 96 孔板中，5% CO₂、37℃ 条件下孵育 4 h。同时设立实验体系对照组，即培养基背景孔、靶细胞自发释放孔（不加 CTL 效应细胞）和靶细胞最大释放孔（培养结束前 0.5 h 加入 0.1 ml Triton X-100 的靶细胞）等，每组均设立 3 个平行孔。培养结束后 200 × g 离心，5 min 后收集各孔上清，在 1470 WIZARD 型伽玛记数仪（automatic gamma counter, Pharmacia）上读取 cpm 值。按以下公式计算杀伤率：细胞杀伤百分率 = (实验组释放的 cpm 值 - 靶细胞自发释放的 cpm 值) / (靶细胞最大释放的 cpm 值 - 靶细胞自发释放的 cpm 值) × 100%。

2 结果

2.1 gp96 的纯化及鉴定 10% SDS-PAGE 电泳银染及 Western Blot 证实肺癌组织提取的 gp96 蛋白-多肽复合物如图 1 所示。蛋白浓度测定示每 1 g 肿瘤组织中可提取 gp96 蛋白-多肽复合物 10~80 μg。

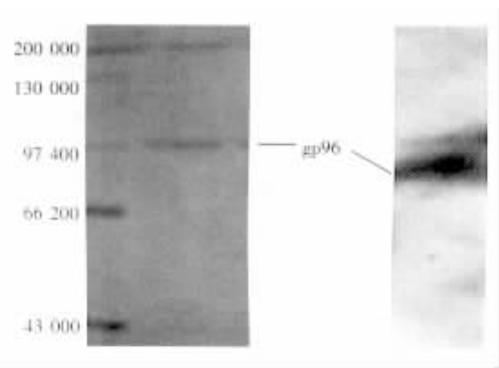


图 1 肺癌组织中提取 gp96-多肽复合物的鉴定
A: SDS-PAGE 凝胶电泳银染后显示 gp96 条带 ; B: Western blot 杂交显示的 gp96 电泳带

Fig 1 Identification of lung cancer tissue derived gp96-peptide
A: Silver staining ; B: Western blot

2.2 DC 的培养及鉴定 分离的骨髓血单个核细胞在显微镜下呈散在的表面光滑的球形，2~3 天后细胞变大，聚集成葡萄串样，非粘附状态，胞体表面出现短突起样改变。第 5~7 天，细胞大多数呈集束样悬浮或散在生长，胞体继续变大，并有长的树突状突起，呈典型 DC 外形，均匀分布于培养基中，疏松贴壁生长，同时有少量紧密贴壁生长的巨噬细胞及疏松贴壁的单核细胞。流式细胞仪检测 DC 表面标志物结果如下：CD14(-)，CD1α(+)，CD80(+)，CD83(+)，HLA-DR/ CD86(+)(图 2)。

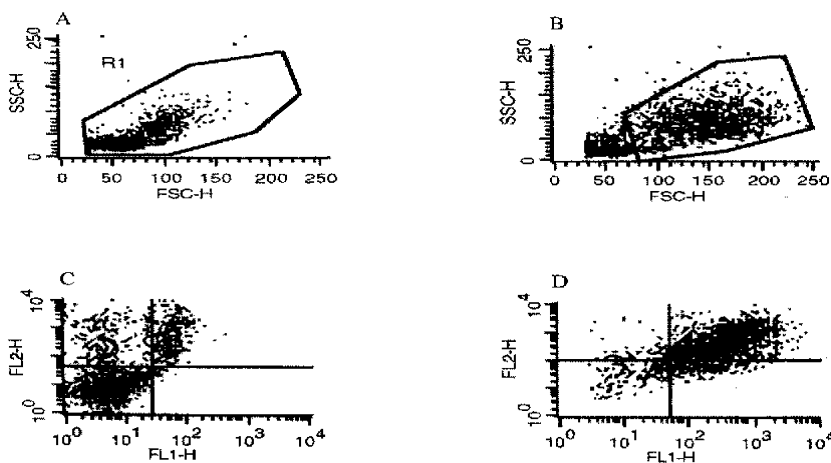


图 2 流式细胞仪鉴定 DC 及其表面标志物

A: 培养前的 DC ; B: 培养后的 DC ; C: 培养前 HLA-DR/ CD86⁺ ; D: 培养后 HLA-DR/ CD86⁺

Fig 2 FACS analysis of molecular markers for dendritic cells

A: Non-cultured DCs ; B: Cultured DCs ; C: Non-cultured DCs expressed HLA-DR/ CD86⁺ ; D: Cultured DCs expressed HLA-DR/ CD86⁺

2.3 效应淋巴细胞的增殖实验 台盼蓝排除实验 (trypan blue exclusion testing) 观察到在效应淋巴细胞被致敏的第 10 天后, T 淋巴细胞成倍增殖, 由 $1.1 \times$

10^6 增加到 2.1×10^6 。流式细胞仪分析发现, 肿瘤抗原刺激前后, $CD3/CD8^+$ T 细胞明显增加, 而 $CD3/CD4^+$ T 细胞显著减少(图 3)。

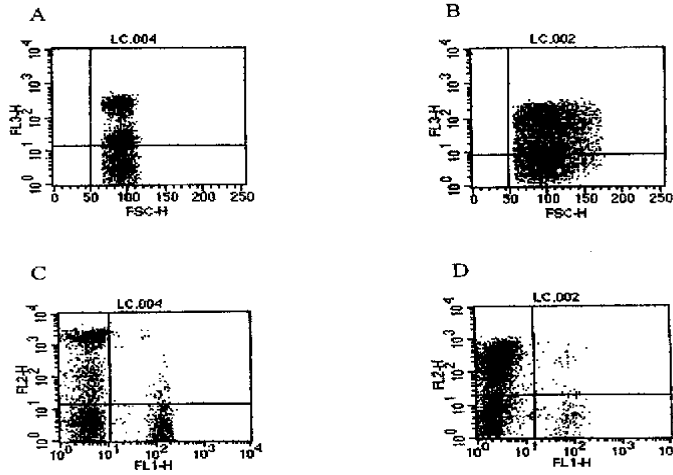


图 3 肿瘤抗原刺激诱导前后效应淋巴细胞的表型变化

A 诱导前 $CD3/CD8^+$ T 细胞 ; B 诱导后 $CD3/CD8^+$ T 细胞明显增加 ; C 诱导前 $CD3/CD4^+$ T 细胞 ; D 诱导后 $CD3/CD4^+$ T 细胞明显减少

Fig 3 FACS analysis of molecular markers of CTL

A $CD3/CD8^+$ T cells before tumor antigen stimulation ; B $CD3/CD8^+$ T cells increased after tumor antigen stimulation ; C $CD3/CD4^+$ T cells before tumor antigen stimulation ; D $CD3/CD4^+$ T cells decreased after tumor antigen stimulation

2.4 免疫学指标 ELISA 法检测不同肿瘤抗原形式负载的 DC 疫苗致敏后效应细胞释放的 $IFN-\gamma$ 。结果表明实验组均可以诱导出明显的 CTL 反应, 即有 $IFN-\gamma$ 释放。其浓度以 gp96-多肽复合物/DC 为最高 (4 150.835 ng/L), 其次是单独使用的 gp96-多肽复合物 (3 066.847 ng/L), 较弱的是肿瘤细胞粗提物/DC 疫苗 (921.687 ng/L), 而作为空白对照无任何抗原负

载的 DC 则检测不出 $IFN-\gamma$ (图 4)。

2.5 细胞杀伤实验 ^{51}Cr 细胞杀伤实验表明, 实验组对原代培养的肿瘤细胞杀伤作用最强 ; 对组织学类型相似的 PG 细胞较弱 ; 对与原代培养肿瘤细胞组织学上无关的 K562 细胞, 则不产生 CTL 反应。因此, 实验组对肿瘤原代培养细胞产生的是特异性 CTL 反应 (图 5)。

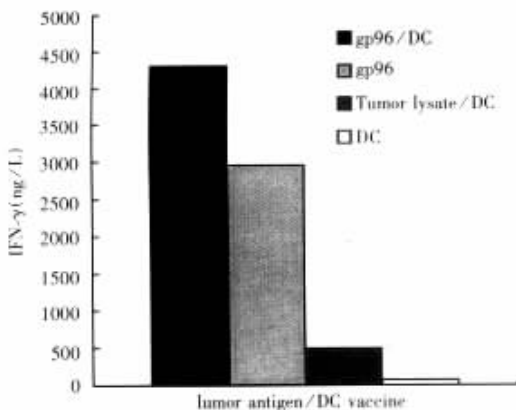


图 4 不同形式的肿瘤抗原负载 DC 后诱导的 CTL 反应

Fig 4 Interferon- γ expression from CTL response after DC vaccines pulsed by different tumor antigen stimulation

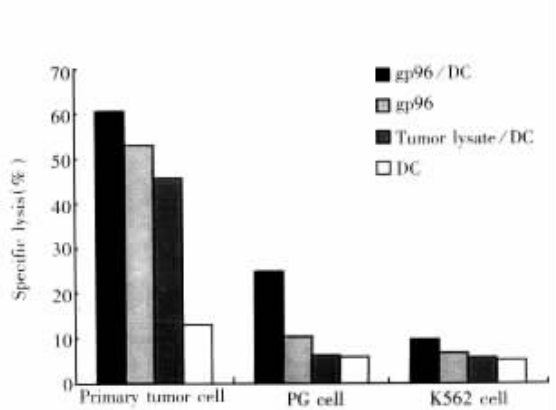


图 5 ^{51}Cr 细胞杀伤实验示肿瘤抗原/DC 疫苗的特异性 CTL 杀伤活性

Fig 5 ^{51}Cr cell killing test showed the specific CTL killing effect of tumor antigen/DC vaccines

3 讨论

肿瘤抗原的负载对于以 DC 为完全佐剂的免疫治疗方案是至关重要的环节。研究表明,各种抗原均可有效负载 DC,而肿瘤细胞性抗原,如肿瘤细胞、细胞裂解物或肿瘤抗原、MHC 限制性多肽等,由于能提供更广泛的肿瘤细胞的抗原谱,也无须知道其特异性抗原,因而简便易行,颇具临床应用价值。1986 年,美国学者 Srivastava 发现并提出 HSPs 具有肿瘤免疫原性,特别是其家族成员 gp96 蛋白在抗原呈递过程中结合了大量抗原性多肽,使其具有该细胞特有的抗原库的作用,从而能够激活特异性 CTL 反应^[5,6]。

研究认为, gp96 不仅参与了免疫应答过程中抗原加工呈递过程的 MHC I 类和 MHC II 类途径,分别将抗原信息呈递给 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞,而且还可作为抗原呈递分子直接将抗原肽呈递给 CD8⁺ T 细胞^[7]。那么,如果将 gp96 结合的肿瘤抗原肽库与机体抗原呈递能力最强的 DC 结合,是否比 gp96-多肽复合物自身能诱导产生更强的 CTL 能力呢?

本研究初步证实了这一推论, gp96 多肽复合物/DC、未负载 DC 的 gp96-多肽复合物和从相同组织量(1~2 g)中获取的肿瘤细胞粗提物/DC 疫苗,均可诱导被激活的淋巴细胞分泌产生 IFN- γ ,其浓度以 gp96 多肽复合物/DC 为最高。同样在以原代培养的肿瘤细胞为靶细胞的杀伤效应上,仍以 gp96 多肽复合物/DC 为最强,肿瘤细胞粗提物/DC 疫苗的杀伤作用最弱。推测其原因,可能是由于从肿瘤细胞粗提物中获得的抗原本身不完全或有损失,而且不一定能全部被 DC 细胞所摄取、递呈,而 HSP 有结合细胞内全部肽库的能力,因而它所提供的抗原量足以激发较强的 CTL 反应。当然,由于只是在一例患者中进行了研究,尽管实验中进行了平行的重实验,但仍无法进行统计学分析,因此这一结论仍需要今后在多样本的实验研究,以及能精确定量分析的实验研究中,得到进一步证实。

目前以 HSP 为肿瘤疫苗的临床试验均以自身肿瘤提取的 HSP 多肽复合物直接免疫癌症患者^[4],而本研究发现 gp96 多肽复合物与 DC 结合后所激发的

CTL 反应强于单独使用 gp96 多肽复合物。这表明尽管 gp96 有直接呈递抗原肽的能力,但经 DC 摄取后其激发 CTL 的能力显著提高。结合文献资料对这一现象的作用机理进行初步分析认为, HSP 能诱导不成熟的 DC 使之更加成熟,而成熟 DC 的主要功能是将结合的抗原呈递给淋巴细胞^[8]。因此, gp96 多肽复合物与 DC 结合后抗原呈递能力增强,激发的 CTL 反应也更强。尽管限于时间和肿瘤原代培养等因素的影响,本课题只对一例肺癌患者进行了 gp96-多肽复合物/DC 疫苗抗肿瘤作用的研究,但这一实验结论仍可为今后以 gp96-多肽复合物为肿瘤疫苗的治疗方案在临床中的应用提供新思路。

参 考 文 献

- 1 Greten TF, Jaffee EM. Cancer vaccines. *J Clin Oncol*, 1999, 17(3): 1047-1060.
- 2 Jamuru Y, Peng P, Liuk, et al. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*, 1997, 278(5335): 117-120.
- 3 Sylvia J, Dirk P, Valentino R, et al. Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int J Cancer*, 2000, 88(5): 232-238.
- 4 Srivastava PK. Purification of heat shock protein-peptide complexes for use in vaccination against cancer and intracellular pathogens. In: Lefkovits I ed. *Immunology methods manual*. London: Academic Press, 1997. 737-748.
- 5 Srivastava PK, Deleo AB, Old LJ. Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proc Nat Acad Sci (Wash)*, 1986, 83(12): 3407-3411.
- 6 Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science*, 1995, 269(10): 1585-1588.
- 7 Li Z. Priming of T cells by heat shock protein-peptide complexes as the basis of tumor vaccines. *Semin Immunol*, 1997, 8(5): 315-322.
- 8 Kuppner MC, Gastpar R, Gelwer S, et al. The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol*, 2001, 31(5): 1602-1609.

(收稿 2002-03-25 修回 2002-07-18)

(本文编辑 李蓓兰)