

负载辐射凋亡 MB49 肿瘤细胞抗原的树突状细胞(DC)疫苗对小鼠膀胱癌的抑制作用

谢雪峰 侯剑刚[△] 陈刚¹ 丁强²

(¹ 复旦大学附属金山医院泌尿科 上海 201508; ² 复旦大学附属华山医院泌尿外科研究所 上海 200040)

【摘要】 目的 研究辐射凋亡 MB49 肿瘤细胞诱导的树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗的制备及对 C57BL/6 小鼠体内膀胱肿瘤的免疫学效应。方法 采用辐射法获取 MB49 细胞抗原并用其致敏骨髓来源的 DC 来制备 DC 疫苗。用 MB49 小鼠膀胱癌细胞建立荷瘤动物模型,随机分为实验组和对照组,于肿瘤细胞接种后第 7、14 天给予相应 DC 疫苗治疗或者 PBS,每组分为 2 个亚组,分别用于测量瘤质量、体积及用于观察荷瘤小鼠存活情况。结果 负载辐射凋亡肿瘤细胞 DC 疫苗的实验组荷瘤小鼠,其肿瘤的平均体积和平均质量均显著低于对照组($P < 0.01$),生存期长于对照组。DC 疫苗实验组中有 2 只小鼠 30 天内无肿瘤生长,再次皮下接种 MB49 细胞观察 30 天仍无肿瘤发生。结论 负载辐射凋亡肿瘤细胞的 DC 疫苗对膀胱肿瘤荷瘤小鼠具有抑瘤效应和延长生存期的作用。

【关键词】 树突状细胞(DC); 膀胱肿瘤; 疫苗; MB49 细胞; 小鼠

【中图分类号】 R 737.14 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2014.01.014

Inhibitory effects of dendritic cell (DC) vaccine loading antigen with irradiated apoptotic MB49 tumor cells against bladder cancer cells in mice

XIE Xue-feng¹, HOU Jian-gang^{2△}, CHEN Gang¹, DING Qiang²

(¹ Department of Urology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508, China;

² Institute of Urology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of dendritic cell (DC) vaccine sensitized by antigen with irradiated apoptotic MB49 tumor cells on the treatment of bladder cancer in mice. **Methods** MB49 antigen was obtained by irradiation and then sensitized bone marrow derived DC (BM-DC) to establish DC vaccine. Mice bearing bladder cancer were divided into DC group and control group. On the 7th and 14th day after subcutaneous of tumor cell, DC group was injected DC vaccine, and the control group was injected PBS. Each group was divided into two subgroups in order to measure tumor mass and volume and to observe survival condition of mice. **Results** The average mass and volume of tumors in mice of DC group were significantly higher than those of the control group ($P < 0.01$), which also had longer survival period. Two mice in DC group survived without tumor for 30 days. Although they were injected MB49 cells for the second time, there was no tumor growth in 30 days. **Conclusions** DC vaccine loading antigen with irradiated apoptotic MB49 tumor cells can inhibit the growth of MB49 cells *in vivo*.

【Key words】 dendritic cell (DC); bladder tumor; vaccine; MB49 cells; mice

[△]Corresponding author E-mail: hou_jiangang@hotmail.com

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前发现最强大的抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC),能有效激发 T 细胞应答并诱导特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxicity T lymphocyte, CTL)生成。在我国,膀胱肿瘤是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,发病率居全身肿瘤的第 5 位,其中移行细胞癌占 95%。利用 DC 疫苗接种宿主,诱导或增强宿主防御功能,提高机体免疫系统对肿瘤的特异杀伤能力,已成为晚期膀胱癌免疫治疗中的研究热点。

材料和方法

细胞培养 MB49 细胞来源于通过致癌物诱发 C57BL/6 雌性小鼠的膀胱移行细胞癌(复旦大学华山医院泌尿外科研究所提供)。细胞培养液为 10% 胎牛血清、1% 盘尼西林/链霉素及含 0.1% 丙酸钠的 RPMI-1640 培养液。细胞在 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。

实验动物 采用 C57BL/6 雌性小鼠,4~6 周龄,体质量 17~20 g,饲养在 SPF 级动物房中。

骨髓来源 DC 的制备及鉴定 DC 细胞提取方法主要参照 Inaba 的方法。取 6 周龄健康雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠,处死后取胫骨和股骨,1 mL 注射器抽取无菌预冷 PBS 冲洗骨髓腔;经 200 孔单细胞过滤钢筛过滤,收集滤液,161 × g 离心 5 min,弃上清;加 40 g/L 的 Tris-NH₄Cl 溶液 1 mL 重悬细胞团,反应 2 min,161 × g 离心 5 min,去除裂解之红细胞,弃上清,PBS 洗涤 2 次,每次 5 min。细胞团重悬于含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,使细胞密度达到 1.5 × 10⁶/mL 转移至 6 孔培养板内,每孔 2 mL,培养 24 h 后,PBS 洗涤 2 次,去除未贴壁细胞,换用含重组小鼠粒-巨噬细胞集落刺激因子(10 μg/L)和重组小鼠 IL-4 (5 μg/L)的 RPMI-1640 完全培养液继续培养。

采用流式细胞仪鉴定细胞。将收集的细胞(密度 5 × 10⁵/mL)置于含 2 μg 单抗(CD11c-APC、CD11b-PE、CD11c-PE、CD80-PE、CD46-PE)的 BSA-PBS 中,4℃ 孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次,加 FITC 荧光标记的羊抗大鼠 IgG,4℃ 孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次,重悬于含 1% 多聚甲醛的 PBS 中,进行流式细胞仪(FACS Becton-Dickenson)检测。

肿瘤细胞的照射和凋亡测定 为了获得凋亡的肿瘤细胞,我们收集了培养中的 MB49 细胞,制成密

度为 1 × 10⁷/mL 的单细胞悬液,然后用 100 Gy X 线照射(Faxitron CP-160)^[1]。经过照射的细胞用不含胎牛血清的 RPMI-1640 培养,每天通过 Annexin V-FITC 和 PI 染色后利用流式细胞仪测定凋亡细胞的比例。

肿瘤细胞抗原的负载 经过照射的 MB49 细胞用不含胎牛血清的 RPMI-1640 培养 3 天,以 1:1 的比例和密度为 1 × 10⁶/mL 的未成熟 DC 混合培养 24 h 于实验组。对照组用 LPS 刺激的未成熟 DC 细胞。

DC 疫苗的保护作用研究 C57BL/6 雌性小鼠 40 只,随机分为 4 组,分别皮下注射 PBS、未成熟 DC 细胞(im-DC)、LPS 促熟的 DC (LPS-DC)及经过照射含有凋亡 MB49 细胞共同培养的 DC 细胞(MB49-DC)。7 天后重复接种 1 次。第 2 次接种的 7 天后,皮下接种 MB49 肿瘤细胞。每组分为 2 个亚组,分别测量肿瘤体积,并观察荷瘤小鼠的存活情况。

数据分析 采用 SPSS 10.0 软件。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

通过体外培养可以获得大量 DC 细胞 骨髓来源的干细胞可以被诱导分化成具有免疫效应的 DC。为了研究负载肿瘤抗原诱导的免疫反应,需要足够量的处于同一成熟水平的 DC 细胞。我们首先在培养液中加入 IL-4 和 GM-CSF,以体外扩增小鼠骨髓来源的干细胞(图 1)。扩增到第 5 天,检测表面抗体显示 CD11c 高表达,但是 CD80、CD86 及 I-A 低表达,提示为未成熟 DC 细胞。加入 LPS 共同培养后第 7 天,检测 CD80、CD86 及 I-A,提示为 DC 细胞成熟(图 2)。

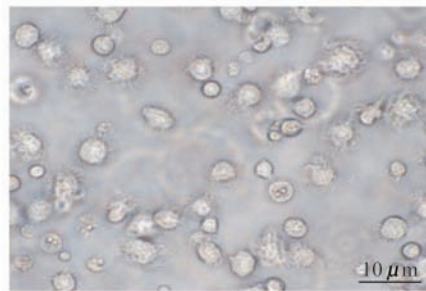


图 1 培养 5 天后小鼠骨髓来源的 DC

Fig 1 Bone marrow derived DC in mouse cultured for 5 days

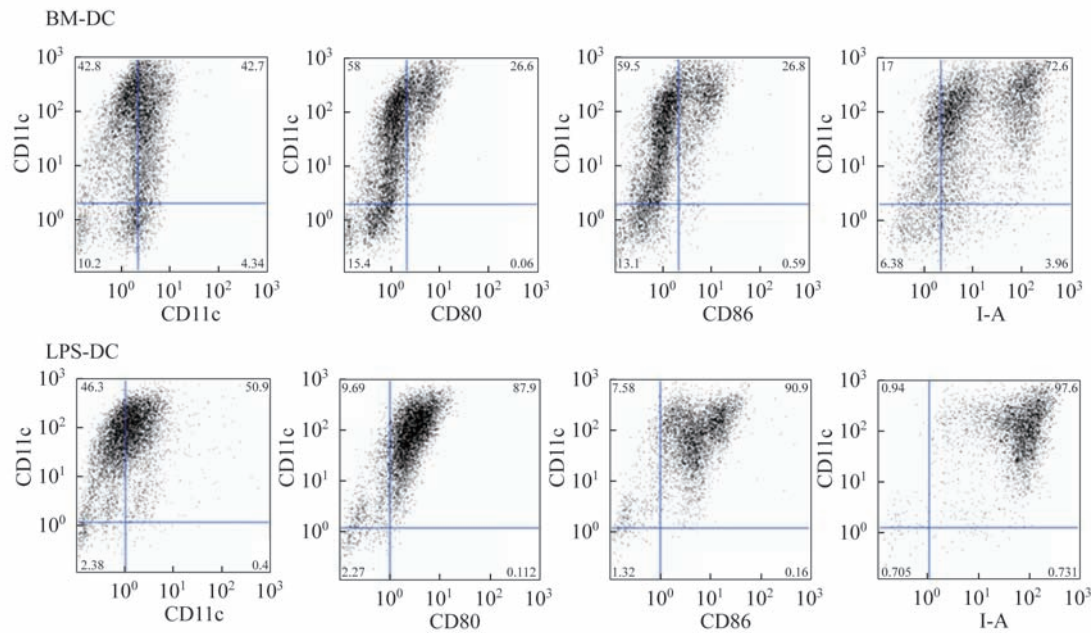


图2 流式细胞检测小鼠DC细胞

Fig 2 Flow cytometry of DC cells in mice

When cultured for 5 days, the results detected by surface antibody shows high expression of CD11c, but low expression of CD80, CD86 and IA. It suggested immature DC. Then LPS was added and co-cultured. On the 7th day, mature DC was found by detecting CD80, CD86 and I-A. BM-DC: Bone marrow derived DC cells; LPS-DC: Bone marrow-derived cells after co-culture with LPS.

X线照射后获得凋亡的肿瘤细胞 为了获得最佳的凋亡细胞数, 每天用流式细胞仪测定经过照射

并用无血清培养液培养的肿瘤细胞, 结果显示在第3天细胞凋亡达到最佳数目(图3)。

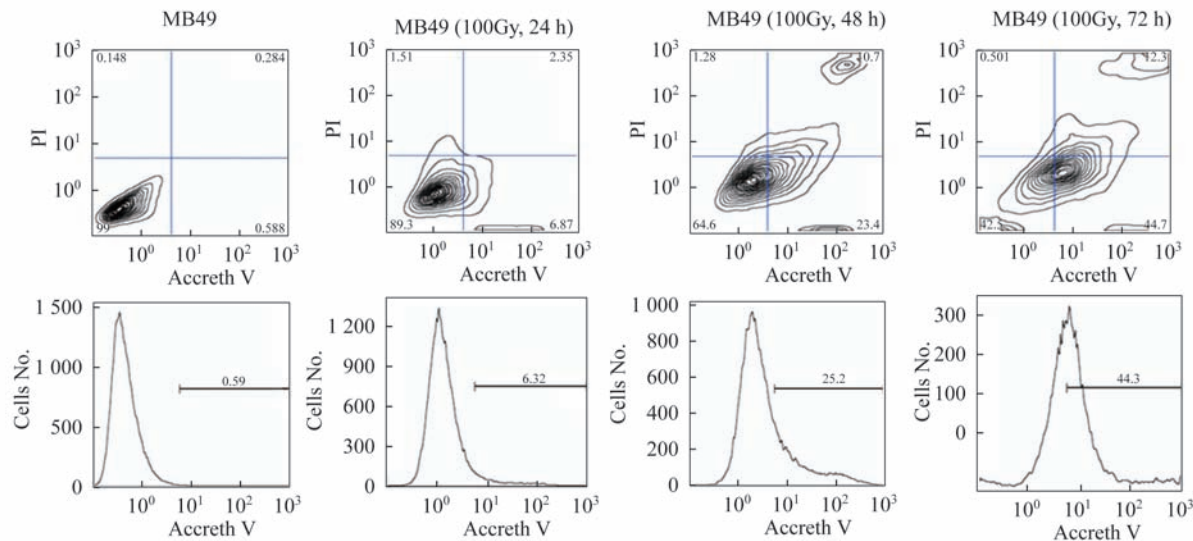


图3 X线照射后肿瘤细胞的凋亡数目

Fig 3 Numbers of apoptosis tumor cells after X-ray irradiation

PI: Propidium iodide.

凋亡肿瘤细胞和未成熟DC细胞共培养获得成熟DC细胞 培养至第5天的未成熟DC和经照射

及无血清培养的DC共培养1天后, 流式细胞测定显示成为成熟DC细胞(图4)。

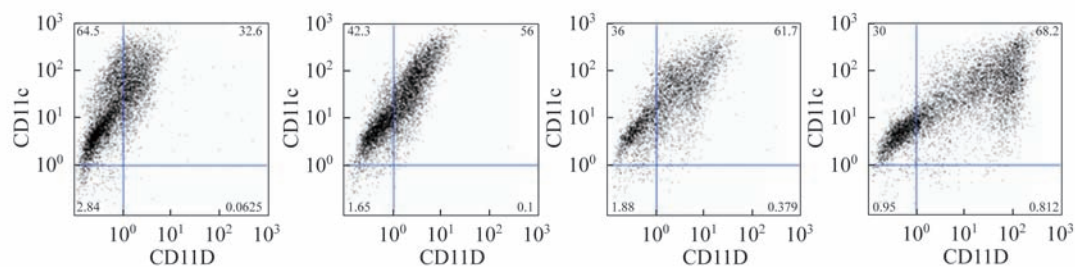


图 4 流式细胞检测小鼠成熟 DC 细胞

Fig 4 Mature DC cells in mice detected by flow cytometry

After co-cultured for one day with immature DC and apoptotic tumor cells, FCM tests showed that immature DC grew into mature DC.

DC 疫苗的保护作用 为了检测负载了特殊肿瘤抗原的 DC 细胞是否具有疫苗功能,我们进行了皮下肿瘤模型^[1]的抑制实验。单纯注射 PBS 后,肿瘤生长速度快,且小鼠很快出现死亡;注射未成熟

DC 及 LPS-DC 后,肿瘤生长速度有所减慢,但最终也导致小鼠全部死亡(图 5);注射 MB49-DC 后,肿瘤生长速度缓慢,且有 2 只小鼠出现无瘤存活(图 6)。

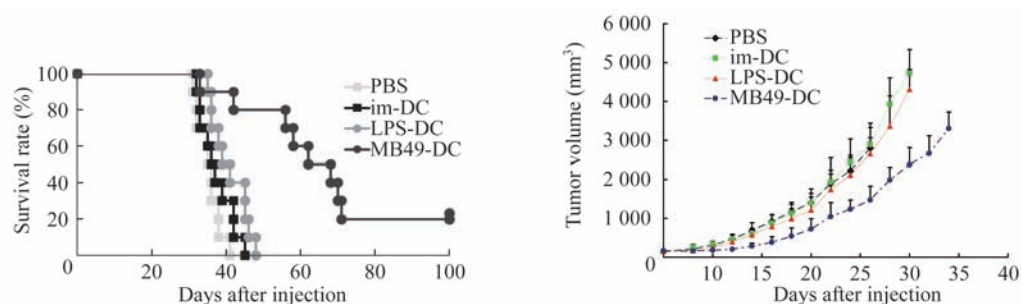


图 5 DC 疫苗对荷瘤小鼠的保护作用

Fig 5 DC vaccine against tumor in mice

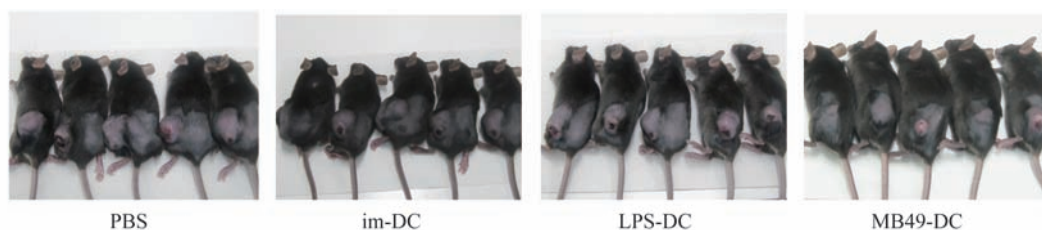


图 6 荷瘤小鼠注射 PBS, im-DC, LPS-DC 及 MB49-DC 后肿瘤生长情况

Fig 6 Tumor growth after injected PBS, im-DC, LPS-DC and MB49-DC in mice bearing bladder cancer

MB49-DC vaccination significantly slowed tumor growth in mice, specifically no tumor in two mice survived without tumor.

讨 论

DC 是目前所知功能最强的抗原提呈细胞,DC 可在其分布位置上捕获、加工抗原,迁移到淋巴器官中激活 T 淋巴细胞,尤其是初始 T 细胞(naive T

cells)和静息 T 细胞(resting T cells)。T 淋巴细胞介导的细胞免疫特别是 CTL 在机体抗肿瘤和抗感染中起到重要作用^[2],利用负载相关抗原的 DC 作为疫苗进行肿瘤生物治疗大有前景^[3]。大量实验证实,用不同形式的肿瘤抗原体外冲击致敏 DC 后,可以产生较强的抗肿瘤免疫,并能抑制肿瘤生长和转

移,目前一些体内和临床试验仍在进行中^[4-5]。在对肿瘤疫苗的探索中,研究人员采用多种策略研制DC疫苗,以激发抗肿瘤特异性免疫应答,主要包括负载肿瘤抗原的DC、肿瘤抗原致敏的DC和肿瘤抗原基因转染的DC等^[6]。用肿瘤细胞裂解物致敏的DC疫苗能诱导有效的CTL反应,裂解肿瘤细胞,并能分泌高水平的干扰素 γ (interferon, IFN)^[7]。然而,细胞性抗原因含有多种非肿瘤相关抗原且抗原性差。而全细胞性抗原具有多种抗原表位,可诱导针对不同抗原决定簇的CTL克隆,更有利于对肿瘤细胞的免疫攻击。Fry等^[8]研究表明,相对于其他方法,肿瘤细胞经过照射后导致细胞凋亡,并与未成熟DC共同培养,未成熟DC可以吞噬凋亡体,并摄取、加工和提呈肿瘤抗原,从而能极大地提高DC的抗肿瘤活性。Hoffmann等^[9]认为,使用凋亡细胞比使用裂解物对产生自体CD8⁺CTL更有效。

我们的研究提示,通过体外培养可以获得大量高质量的DC,为DC治疗提供了可能性。但是未成熟DC不具有疫苗作用而达不到治疗效果。利用LPS诱导的成熟DC因为没有呈递肿瘤抗原,同样没有疫苗作用。

经过射线照射后的肿瘤细胞可以检测到大量凋亡细胞。一方面,射线利用其穿透力,使肿瘤细胞内部发生电离效应,破坏其DNA结构,抑制或杀死肿瘤细胞;另一方面,射线通过诱导肿瘤细胞释放HMGB-1、HSP70等内源性“危险信号”而提高肿瘤细胞的免疫原性,同时会上调MHC-1和ICAM-1、VCAM-1等黏附分子的表达,进而趋化免疫细胞,并激活宿主固有免疫应答甚至适应性免疫应答。凋亡的肿瘤细胞可作为抗原信号诱导特异性免疫反应。另外,DC吞噬凋亡细胞后出现成熟反应,上调趋化因子、细胞因子和共刺激分子。Albert等^[10]认为,DC与凋亡细胞共孵育可产生肿瘤特异性CTL,而坏死细胞不可以。

我们的实验提示,经射线照射后肿瘤细胞中可检测到大量凋亡细胞,其与未成熟DC共孵育后,可以产生高纯度的成熟DC,利用凋亡的肿瘤细胞诱

导的成熟DC具有疫苗作用。本研究表明,负载辐射凋亡肿瘤细胞的DC疫苗对C57BL/6小鼠膀胱肿瘤具有肿瘤抑制效应,并能延长小鼠生存期。

参 考 文 献

- [1] 侯剑刚,徐可,方祖军,等.应用MB49细胞建立三种膀胱癌模型[J].中华实验外科杂志,2010,27(6):840-841.
- [2] Morel PA,Turner MS. Designing the optimal vaccine:the importance of cytokines and dendritic cells [J]. *Open Vaccine J*,2010,3:7-17.
- [3] Koido S,Homma S,Hara E, et al. Regulation of tumor immunity by tumor/dendritic cell fusions [J]. *Clin Dev Immunol*,2010;516768.
- [4] von Euv EM,Barrio MM,Furman D, et al. A phase I clinical study of vaccination of melanoma patients with dendritic cells loaded with allogeneic apoptotic/necrotic melanoma cells. Analysis of toxicity and immune response to the vaccine and of IL-10-1082 promoter genotype as predictor of disease progression[J]. *J Transl Med*,2008,6:6.
- [5] Steinman RM,Pope M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy[J]. *Clin Invest*,2002,109(12):1519-1526.
- [6] Yanofsky VR,Mitsui H,Felsen D, et al. Understanding dendritic cells and their role in cutaneous carcinoma and cancer immunotherapy [J]. *Clin Dev Immunol*,2013;624123.
- [7] Li YL,Wu YG,Wang YQ, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor lysates induce anti-tumor immunity against gastric cancer *ex vivo* [J]. *World J Gastroenterol*,2008,14(46):7127-7132.
- [8] Fry TJ,Shand JL,Milliron M, et al. Antigen loading of DCs with irradiated apoptotic tumor cells induces improved anti-tumor immunity compared to other approaches [J]. *Cancer Immunol Immunother*,2009,58(8):1257-1264.
- [9] Hoffmann TK,Meidenbauer N,Dworacki G, et al. Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells[J]. *Cancer Res*,2000,60(13):3542-3549.
- [10] Albert ML,Jegathesan M,Darnell RB. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8⁺T cells[J]. *Nat Immunol*,2001,2(11):1010-1017.

(收稿日期:2013-03-28;编辑:王蔚)