

• 基础研究 •

肿瘤细胞裂解物致敏树突状细胞对小鼠乳腺癌作用的研究

贾鑫 李荣 徐迎新 夏绍友 李力

[摘要] 目的 观察肿瘤细胞裂解物致敏树突状细胞(DC)对小鼠乳腺癌的治疗作用。方法 无菌取小鼠骨髓细胞,在体外培养条件下经细胞因子作用诱导为树突状细胞(DC),用 EMT6 肿瘤抗原裂解物冲击致敏 DC 细胞,检测 DC 体外刺激活化淋巴细胞作用,以及经 DC 免疫产生的细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)体外杀伤肿瘤细胞的活性,观察致敏 DC 免疫对小鼠乳腺癌模型的治疗作用。结果 镜下可见抗原致敏后的 DC 可吸引淋巴细胞聚集成团;致敏 DC 诱导生成的特异性 CTL 在体外对肿瘤细胞可产生杀伤作用(与 PBS 对照组比较, $P = 0.027$),而未成熟 DC 细胞组和肿瘤抗原组与 PBS 对照组间无显著性差异($P = 0.17$, $P = 0.072$);经致敏 DC 注射免疫后,小鼠负荷肿瘤得到抑制(与 PBS 对照组比较, $P = 0.035$),而单纯肿瘤抗原及未致敏 DC 免疫组与 PBS 对照组间无显著性差异($P = 0.26$, $P = 0.11$)。结论 肿瘤抗原裂解物致敏的 DC 可有效递呈抗原并诱导淋巴细胞杀伤肿瘤细胞。

[关键词] 树突状细胞;乳腺肿瘤;免疫治疗

Effect of dendritic cells sensitized by tumor cells lysates on the murine breast cancer JIA Xin, LI Rong, XU Ying-xin, et al. Department of General Surgery, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

[Abstract] Objective To investigate the effect of dendritic cells (DC) sensitized by tumor cells lysates on the murine breast cancer. Methods Bone marrow-generated DCs were sensitized by EMT6 tumor cell lysates, and tested whether they produced antigens to T lymphocytes and induced tumor-specific CTL. Antigen-sensitized DCs were also used to treat the mice with breast carcinoma. Results DCs sensitized by tumor cell lysates markedly led to the proliferation of lymphocytes in vitro, and induced tumor specific CTL that significantly difference compared with PBS control group ($P = 0.027$). Meanwhile, DCs sensitized by tumor lysates could inhibit the growth of established murine breast cancer that also significantly difference compared with PBS control group ($P = 0.035$). Conclusion DCs sensitized by tumor cell can induce an effective antitumor immune response both in vitro and in vivo.

[Key words] dendritic cell; breast carcinoma; immunotherapy

中图分类号: R737.9, R730.51 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2004)02-0079-03

[本文标引格式] 贾鑫,李荣,徐迎新,等.肿瘤细胞裂解物致敏树突状细胞对小鼠乳腺癌作用的研究[J].中国康复理论与实践,2004,10(2):79-81.

树突状细胞(dendritic cell, DC)是一种抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)(比普通抗原递呈细胞的递呈能力强 1 000 倍),也是惟一能够激活初始型 T 细胞的 APC,处于免疫反应的中心地位。近年来,以 DC 为基础的免疫治疗作为一种主动特异性细胞免疫治疗,逐渐成为人们关注的焦点。国内外的医学研究者尝试在体外用多种肿瘤抗原致敏 DC,然后将其回输体内,希以此望打破宿主对肿瘤的耐受,激发针对肿瘤的主动特异性细胞免疫。本实验采用将小鼠 EMT6 乳腺癌株注射到 BALB/c 小鼠皮下的方法建立小鼠乳腺癌肿瘤模型,然后观察肿瘤细胞裂解物体外致敏的 DC 对小鼠乳腺癌是否具有治疗作用^[1-4]。

1 材料及方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及细胞株 BALB/c 雌性小鼠,6—8 周龄,体重 18—22g,购自军事医学科学院实验动物中

心。小鼠 EMT6 乳腺癌株购自中国医学医科院肿瘤医院。

1.1.2 主要试剂及培养基 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液、重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)和重组小鼠白细胞介素 4(rmIL-4)等购自 Peprotech 公司。

1.2 方法

1.2.1 DC 扩增培养及抗原致敏 在 Inaba 方法^[2]基础上稍加改动。具体操作为:取小鼠骨髓细胞,低渗分离除去红细胞,计数后用含 10% 小牛血清的 1640 完全培养基重悬,加入 rmGM-CSF(10 ng/ml)和 rmIL-4(10 ng/ml),铺于 24 孔培养板, 1×10^6 个细胞/孔,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱;隔日半量换液及时补充细胞因子和完全培养基;第 7 天轻轻吹吸下黏附于板底的聚集体,置于培养瓶中备用;收集处于对数生长期的 EMT6 肿瘤细胞,计数, -20℃/37℃ 反复冻融 4 次, 2 000 g/min 离心 30 min,吸取上清即为肿瘤细胞裂解物。按 DC 与肿瘤细胞为 1:3 的比例向 DC 培养瓶中加入肿瘤细胞裂解物,继续培养 48 h,此时的 DC 即为经肿瘤抗原致敏的成熟 DC。

作者单位:100853 北京市,中国人民解放军总医院普通外科。作者简介:贾鑫(1976-),男,山东文登市人,在读硕士研究生,医师,主要研究方向:普通外科肿瘤的现代诊断与治疗。

1.2.2 检测 DC 抗原递呈功能 无菌取正常 BALB/c 小鼠脾脏细胞,用含 10% 小牛血清的 1640 完全培养基溶解并置于培养瓶 2 h;收集非黏附细胞作为反应淋巴细胞,铺于 96 孔板, 5×10^5 个细胞/孔;按 DC 与反应细胞为 1:20、1:50 和 1:100 的比例向板中加入肿瘤抗原致敏成熟的 DC,另设一组加入未经肿瘤抗原致敏的 DC 作为对照,置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱 48 h 后观察结果。

1.2.3 检测 DC 诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的杀伤活性 将 24 只小鼠随机分成 4 组,每组 6 只。分别在每组小鼠皮下注射 PBS、肿瘤细胞裂解物、未致敏 DC 和致敏 DC,免疫 7 d 后处死小鼠,无菌收集脾脏淋巴细胞作为 CTL 效应细胞,另取 EMT6 肿瘤细胞作为靶细胞,将效:靶细胞按 100:1、50:1 和 25:1 的比例置于 96 孔板,放入培养箱内孵育 24 h。采用定量乳酸脱氢酶(LDH)法检测 CTL 杀伤活性。

CTL 杀伤活性 = (实验孔 - 效应细胞自主释放孔 - 靶细胞自主释放孔) / (靶细胞最大释放孔 - 靶细胞自主释放孔) × 100%

1.2.4 体内抑瘤效果检验 将 32 只小鼠随机分成 4 组,每组 8 只。实验第 1 天,于各小鼠右后肢皮下接种处于对数生长期的 EMT6 肿瘤细胞(1×10^6 个细胞/只)。次日,于各组小鼠同侧后肢皮下分别注射 PBS、冻融肿瘤抗原、未致敏 DC 和肿瘤抗原致敏后的成熟 DC,注射剂量为 1×10^6 个 DC/只。然后于第 7 d 和第 14 d 分别强化注射 1 次,剂量同上。当皮下肿瘤可触及后,用卡尺测量肿瘤的纵径和横径,通过公式 $1/6\pi ab^2$ 估算肿瘤体积(a 为长轴纵径, b 为短轴横径)。

1.3 统计学处理 使用 Stata 7 软件,进行不同试验组间的方差分析。

2 结果

2.1 DC 抗原递呈功能检测 48 h 后,于显微镜下可观察到肿瘤细胞裂解物致敏的 DC 组淋巴细胞明显增殖,并且有大量的淋巴细胞在 DC 周围聚集成团,形成花环现象。而未经抗原致敏的 DC 周围则未发现明显的细胞聚集和增殖。

2.2 DC 诱导 CTL 体外杀伤功能检测 如图 1 所示,效:靶比为 100:1 时,与 PBS 对照组($16.2\% \pm 2.1\%$)比较,抗原致敏后的成熟 DC 细胞诱导的 CTL 体外对肿瘤细胞有明显的杀伤作用($37.6\% \pm 6.4\%$) ($P = 0.027$);而未成熟 DC 细胞组和肿瘤抗原组与 PBS 对照组间无显著性差异(分别为 $P = 0.17$, $P = 0.22$)。

2.3 DC 免疫治疗效果检测 观察小鼠荷瘤至 21 d。肿瘤抗原致敏 DC 免疫小鼠组的肿瘤生长得到明显抑制,体积为(0.12 ± 0.074) cm³ 与 PBS 对照组($0.85 \pm$

0.63) cm³ 有显著性差异($P = 0.035$);而单纯肿瘤抗原及未致敏 DC 免疫组小鼠虽然肿瘤也得到一定的抑制,但与 PBS 对照组间无显著性差异($P = 0.26$, $P = 0.11$)(见图 2)。

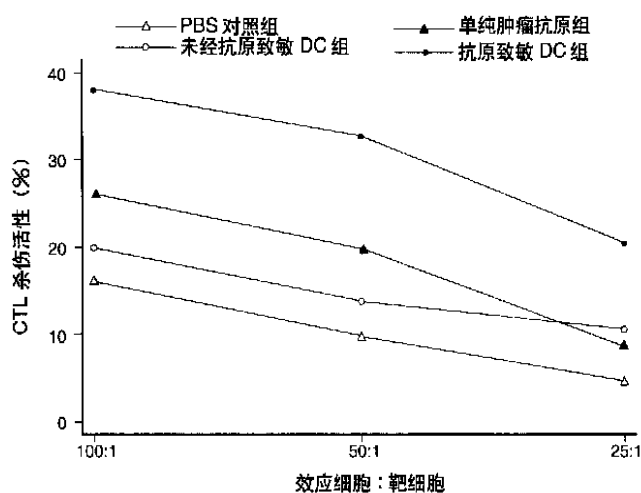


图 1 CTL 体外杀伤肿瘤细胞活性

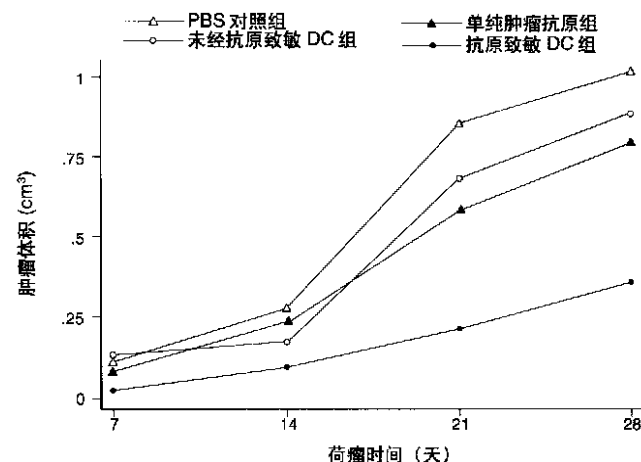


图 2 DC 免疫治疗对小鼠乳腺癌的作用

3 讨论

现代医学认为,恶性肿瘤是一种全身性疾病,除手术和放疗等局部治疗外,还必须辅以全身性治疗。化疗虽为一种全身性治疗,但由于毒副作用大和多药物抗性等原因,难以完全控制局部复发及转移。为进一步提高肿瘤治疗效果,国内外医学工作者开始将精力转向免疫治疗等其他替代治疗模式。以 DC 细胞为基础的免疫治疗是近年来研究的一个热点。DC 是广泛分布于体内的一类独特细胞,具有清道夫样作用,可吞噬处理抗原并递呈给 T 细胞,从而激发机体免疫系统对致病抗原产生应答,达到保护机体、抵御外来微生物、及时清除自体突变细胞的目的。近几年,随着体外大量培养扩增 DC 方法的建立,促进了 DC 及相关免疫治疗研究的进展。国内外已先后出现关于 DC 治疗黑色素瘤、肾癌和结肠癌等的报道,成果令人鼓舞^[5-7]。

本实验主要探讨肿瘤细胞裂解物体外冲击致敏的 DC 对小鼠 EMT6 乳腺癌模型的治疗作用,从而为下一步临床研究提供依据。

本实验结果提示:①肿瘤细胞裂解物致敏的 DC 在体外可以将吞噬处理的抗原递呈给 T 淋巴细胞,从而强烈刺激淋巴细胞的增殖和活化;而未经抗原致敏的 DC 则处于未成熟状态,表面缺乏共刺激分子(如 CD80、CD86 等)的表达,因而不能有效递呈抗原;②致敏成熟 DC 免疫后的小鼠可产生肿瘤特异性 CTL,从而有效杀伤肿瘤细胞;而单纯肿瘤抗原或未经致敏的 DC 免疫后的小鼠则不能产生足够的具有杀伤肿瘤作用的特异性 CTL;③经过 3 周 DC 免疫治疗,各治疗组小鼠的肿瘤都未能完全根治;然而与空白对照组比较,肿瘤抗原致敏 DC 治疗组小鼠皮下肿瘤生长得到明显抑制,虽然单纯肿瘤抗原及未致敏 DC 组小鼠的肿瘤生长也得到一定的抑制,然而却未能达到统计学上的差异。

DC 为基础的细胞免疫治疗是一种很有前途的肿瘤辅助治疗手段。当然,由于人们对其认识的时间尚短,还不可能对其的长期治疗效果进行评价,而且还有一些相关问题亟需解决(如选择最佳体内注射途径、注

射 DC 的剂量和频率等)。随着人们对 DC 生物活性认识的进一步深化,它必将在肿瘤生物治疗领域发挥越来越重要的作用。

[参考文献]

- [1] Dallal RM, Lotze MT. The dendritic cell and human cancer vaccines[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12: 583—588.
- [2] Inaba K, Inaba M, Romani N. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with GM-CSF[J]. J Exp Med, 1992, 176: 1693.
- [3] Nestle FO, Burg G, Dummer R. New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma[J]. Immunol Today, 1999, 20: 5—7.
- [4] 曹雪涛. 树突状细胞的基础与临床研究新进展[J]. 中国免疫学杂志, 1998, 14: 161.
- [5] Steinman RM, Dhodapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future[J]. Int J Cancer, 2001, 94: 459—473.
- [6] Fong L, Brockstedt D. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients[J]. J Immunol, 2001, 166: 4254—4259.
- [7] Banchereau J, Schuler TB. Dendritic cells as vectors for therapy[J]. Cell, 2001, 106: 271—274.

(收稿日期: 2003-11-19)