

树突状细胞肿瘤疫苗联合免疫佐剂治疗小鼠乳腺癌的初步探讨

贾鑫^{1a}, 李荣^{1b}, 徐迎新^{1b}, 李力^{1b}

[摘要] 目的 研究免疫佐剂绿脓杆菌菌毛是否可以提高树突状细胞肿瘤疫苗的治疗作用。方法 使用 EMT6 乳腺癌株种植 BALB/c 小鼠建立肿瘤模型,分成 4 组,次日在小鼠皮下分别注射生理盐水、免疫佐剂、树突状细胞肿瘤疫苗和树突状细胞肿瘤疫苗 + 免疫佐剂。定期测量肿瘤大小,21 d 后处死小鼠称量肿瘤重量。结果 注射树突状细胞肿瘤疫苗 + 免疫佐剂组肿瘤生长得到了明显抑制,与空白对照组比较, $P = 0.001$,与单纯应用树突状细胞肿瘤疫苗组比较, $P = 0.047$ 。结论 绿脓杆菌菌毛作为免疫佐剂,可以和树突状细胞肿瘤疫苗发生协同作用,提高对小鼠乳腺癌的治疗效果。

[关键词] 树突状细胞;免疫佐剂;乳腺癌

Effect of Dendritic Cell Vaccine Coupled with Immune Adjuvant on the Inhibition of Murine Breast Carcinoma JIA Xin, LI Rong, XU Ying-xin, et al. Vascular Surgery Department, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

[Abstract] Objective To investigate whether immune adjuvant can enhance the immunity of dendritic cell vaccine against murine breast cancer. Methods 4 groups of mice with tumor are injected saline, immune adjuvant, dendritic cell (DC) vaccine and DC vaccine coupled with immune vaccine, respectively. Tumor volume and weight are measured 21 d later. Results The tumor size in the DC vaccine coupled with immune vaccine group was significantly small compared with control group ($P = 0.001$) and the DC vaccine group ($P = 0.047$). Conclusion Immune adjuvant can enhance the immunity of dendritic cell vaccine against murine breast cancer.

[Key words] dendritic cell; immune adjuvant; breast carcinoma

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2006)05-0381-02

[本文著录格式] 贾鑫,李荣,徐迎新,等.树突状细胞肿瘤疫苗联合免疫佐剂治疗小鼠乳腺癌的初步探讨[J].中国康复理论与实践,2006,12(5):381—382.

树突状细胞(dendritic cell, DC)是一类特殊的抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC),由于胞膜生有大量树突状突起而得名。它比普通抗原递呈细胞提呈抗原的能力强 1000 倍,也是唯一能够激活初始型 T 细胞的抗原递呈细胞,处于免疫反应的中心地位^[1]。树突状细胞肿瘤疫苗,是将树突状细胞和肿瘤抗原在体外共培养制成,近年来日益引起国内外研究者关注,被认为是一种极具发展潜力的肿瘤辅助治疗方法。我们在以前的实验中也已经证明,树突状细胞肿瘤疫苗无论在体内还是体外,对小鼠乳腺癌均有明显的抑制作用^[2]。本实验,我们采用绿脓杆菌菌毛制剂作为免疫佐剂,以期提高树突状细胞肿瘤疫苗的抑癌效应。

1 材料与方法

1.1 实验动物 BALB/c 雌性小鼠,6~8 周龄,18~22 g 体重,购自军事医学科学院实验动物中心,二级动物。饲养于解放军总医院实验动物中心。

1.2 肿瘤细胞株 小鼠 EMT6 乳腺癌株,1988 年日本东京京都大学放射生物系键谷教授馈赠,于本室常规传代培养,培养液为含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培

养基。

1.3 主要实验器材、试剂及细胞因子 RPMI 1640 完全培养基,包括 RPMI 1640、10% 灭活新生牛血清、100 U/ml 青霉素、50 μ g/ml 庆大霉素和 2 mmol/L 谷胺酰氨:Life Technologies 公司;重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF),比活性 1×10^7 U/mg,重组小鼠白细胞介素-4(rmIL-4), 2.8×10^8 U/mg: Peprotech 公司;绿脓杆菌菌毛制剂每瓶 1 ml,含菌 1.6×10^9 :海南微克西生物药业有限公司。24 孔板:Costa 公司。

1.4 树突状细胞肿瘤疫苗的制备 根据 Inaba 方法^[3],稍有改动:无菌取小鼠双后肢胫骨和股骨,用 5 ml 注射器反复冲洗骨髓腔,将骨髓组织冲碎,使其完全溶于生理盐水中,置入 15 ml 离心管,1500 r/min 离心 10 min,弃上清,加入无菌注射水 10 ml,低渗使红细胞破裂,10 s 后加入 10% 高渗盐水 1 ml 恢复渗透压,2000 r/min 离心 10 min,记数。生理盐水洗涤两遍,用 1640 完全培养基重悬,使细胞密度达到 1.5×10^6 /ml,加入 rmGM-CSF 5 ng/ml 和 rmIL-4 3.3 ng/ml,铺于 24 孔培养板上,1 ml/孔,置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱,第 3 天轻轻吹吸,移去未贴壁细胞,更换培养基,补充全量细胞因子,按培养细胞与肿瘤细胞比例为 1:5 向培养基中加入肿瘤抗原裂解物,继续共培养 16 h。第

作者单位:1.中国人民解放军总医院,a.血管外科;b.普通外科研究所,北京市 100853。作者简介:贾鑫(1976-),男,山东文登市人,硕士,医师,主要研究方向:血管外科疾病的现代微创治疗。

4 天轻轻吹吸黏附于板底的聚集体,收集备用。取部分收集细胞送鉴定。

1.5 抑瘤效果检验 将 40 只小鼠随机分成 4 组,每组 10 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。次日,于各组小鼠双侧腋窝及腹股沟皮下分别注射生理盐水(第 1 组)、免疫佐剂绿脓杆菌菌毛(第 2 组)、树突状细胞肿瘤疫苗(第 3 组)以及树突状细胞肿瘤疫苗+绿脓杆菌菌毛(第 4 组)。4 d、7 d、12 d 和 17 d 后分别强化注射 1 次。用卡尺测量肿瘤的纵径和横径,通过公式 $1/6\pi ab^2$ (a 、 b 分别为纵径和横径)估算肿瘤体积。小鼠荷瘤 21 d 脱颈处死,完整剥离肿瘤组织,称重。

1.6 统计方法 使用 Stata 7 生物统计软件,进行单因素方差分析 One way 检验。

2 结果

2.1 树突状细胞体外培养与鉴定 树突状细胞体外培养第 4 天,细胞体积明显增大,光镜观察显示,细胞表面大量树突样突起。流式细胞仪(FACS)分析显示,收获的肿瘤抗原致敏成熟树突状细胞中,65%为 CD11c⁺ 树突状细胞(CD11c 是检测小鼠树突状细胞比较特异的细胞表面标志),80%为 CD80⁺,85%为 CD86⁺,与文献报导相近^[4]。

2.2 抑瘤效果 小鼠荷瘤至第 21 天时,与第 1 组比较,第 2 组肿瘤体积无显著性差异($P=0.054$),第 3、4 组均有显著性差异($P=0.009$ 和 $P=0.000$);第 3、4 组间也有显著性差异($P=0.017$)。与第 1 组比较,第 2 组肿瘤质量也无显著性差异($P=0.069$);第 3、4 组均有显著性差异($P=0.014$ 和 $P=0.000$);第 3、4 组间也有显著性差异($P=0.047$)。见表 1。

表 1 各组肿瘤大小比较

组别	肿瘤体积(cm^3)	肿瘤重量(g)
第 1 组	0.453 ± 0.281	0.574 ± 0.305
第 2 组	0.228 ± 0.132	0.348 ± 0.156
第 3 组	0.168 ± 0.126^a	0.263 ± 0.201^a
第 4 组	$0.052 \pm 0.048^{a,b}$	$0.111 \pm 0.102^{a,b}$

注:a:与第 1 组比较, $P<0.05$;b:与第 3 组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

树突状细胞是广泛分布于体内的一类独特细胞。研究表明,肿瘤患者体内的树突状细胞处于抑制状态,不能有效递呈抗原发挥正常免疫功能。而把这种“失能”的树突状细胞在体外与肿瘤抗原共同培养,则能够恢复它的免疫活性,回输体内后又可以启动体内的免疫应答,抑制肿瘤细胞生长,这就构成了树突状细胞肿瘤疫苗的基本原理^[1,5-6]。

21 世纪伊始,国外一些临床治疗中心已开始用树突状细胞肿瘤疫苗治疗黑色素瘤、肾癌和前列腺癌等恶性肿瘤,取得了一定疗效,长期治疗效果仍在进一步观察中^[3-4,7]。本实验以小鼠乳腺癌模型为研究对象,观察树突状细胞肿瘤疫苗联合免疫佐剂的治疗作用,希望能够为下一步临床研究奠定基础。

分析本次实验结果,可有以下推论:①单独应用绿脓杆菌菌毛对小鼠乳腺癌有一定程度的抑制作用,虽然尚不具有统计学意义,这可能与实验样本量小有关,还需要进一步实验论证。绿脓杆菌菌毛作为一种免疫制剂,可增强机体非特异性免疫功能,通过激活吞噬细胞和杀伤细胞来消灭肿瘤细胞;另外,它可以增加 T 细胞和 B 细胞的活性,从而提高机体的特异性免疫功能,杀伤肿瘤细胞。②树突状细胞肿瘤疫苗对小鼠乳腺癌具有明显的抑制作用,这与我们以前的实验结果基本一致。③树突状细胞肿瘤疫苗联合免疫佐剂后,抑瘤效果提高。其可能的作用机制包括:免疫佐剂可以促进树突状细胞成熟和迁移,促进树突状细胞表达 CD80 和 CD86 等共刺激分子,更有效地递呈抗原,增强机体的特异性免疫应答;另外,免疫佐剂还可以通过激活吞噬细胞和杀伤细胞增强机体非特异性免疫功能。这些作用相互协同,从整体上提高了机体抗肿瘤效果。

我们的研究只是初步的,仍存留一系列问题需要解决,如回输树突状细胞活性的检测、荷瘤小鼠的生存率等,有待进一步深化、细化。

[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] 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.

[3] Fong L, Brockstedt D. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients[J]. J Immunol, 2001, 166:4254 - 4259.

[4] Banchereau J, Schuler TB. Dendritic cells as vectors for therapy[J]. Cell, 2001, 106:271 - 274.

[5] 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.

[6] Steinman RM, Dhodapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future[J]. Int J Cancer, 2001, 94:459 - 473.

[7] Zou GM, Tam YK. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances[J]. Eur Cytokine Netw, 2002, 13(2):186 - 199.

(收稿日期:2006-03-21)