

CB6F1 小鼠树突状细胞诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的杀伤作用

Killing Effect of Cytotoxic T Lymphocytes Induced by Dendritic Cells from CB6F1 Mice
DONG Xiao-lin, HAN Ya-ping, WANG Hui, et al.

董小林¹, 韩亚萍², 王 辉¹, 张俊萍²

(1. 昆明市延安医院, 云南 昆明 650001; 2. 山西大医院, 山西 太原 030001)

摘要: [目的] 探讨 CB6F1 小鼠脾树突状细胞(DC)的培养及其诱导针对小鼠路易斯肺癌(LLC)的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)对肿瘤的杀伤效应。[方法] 应用 CB6F1 小鼠脾细胞在 GM-CSF、IL-4 等细胞因子作用下培养出 DC, 反复冻融法制备 LLC 抗原致敏 DC, 与淋巴细胞及 IL-2 混合培养诱导肿瘤特异性 CTL, 利用乳酸脱氢酶法检测 CTL 的杀伤活性。[结果] 用 GM-CSF、IL-4 联合培养小鼠脾细胞第 4d, 可见细胞形态发生改变, 培养第 8d, 可见典型的刺突样 DC, 通过流式细胞术检测了 DC 表型高表达 CD80 占 76.5%, CD86 占 60.0%, MHC II 占 67.4%, CD11c 占 80.6%。[结论] 应用 GM-CSF、IL-4、LPS 等细胞因子培养 CB6F1 小鼠脾细胞经过肿瘤抗原冲击, 可以培养出成熟 DC, 并且 DC 可以诱导出具有杀伤活性的肿瘤特异性 CTL。

关键词: 树突状细胞; 细胞毒性 T 淋巴细胞; 小鼠

中图分类号: R73-35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)07-0544-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.07.B009

树突状细胞(dendritic cell, DC)作为一种很强的抗原提呈细胞, 通过提呈和处理外周抗原, 激活、调控并维持机体免疫反应, 为机体免疫系统重要的细胞因子^[1,2]。随着现代肿瘤治疗学的研究进展, 以 DC 为基础的免疫治疗, 包括 DC 疫苗和通过 DC 诱导的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxicity T lymphocyte, CTL)及其杀伤活性在肿瘤的免疫治疗中起着关键作用, 已经应用于多种恶性肿瘤治疗中^[3-5]。本实验通过 CB6F1 小鼠脾脏 DC 的培养及其在体外诱导出 CTL 的杀伤活性的检测, 为 DC 的功能研究和 CTL 的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及实验动物

细胞株: C57BL/6 小鼠来源的小鼠路易斯肺癌(Lewis lung carcinoma, LLC)细胞系, 黑色素瘤细胞

系 B16-F10 (由中国医学科学院肿瘤研究所张叔人教授惠赠); 细胞培养条件: RPMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清) 37℃、5% CO₂ 培养。

实验动物: CB6F1 近交系小鼠, 雌性, 8~10 周、体重 18~20g (北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号: 1100017308), 在山西省肿瘤医院动物实验室标准饲料喂养。

1.2 实验器材和仪器

RPMI 1640 培养基(Hyclone 公司); 10% 胎牛血清(Hyclone 公司, 4℃ 保存); 小鼠重组 GM-CSF、IL-4 及 IL-2 (Peprotech 公司, 分装为 10ng/ml, -80℃ 保存); LPS(Sigma 公司); 小鼠脾淋巴细胞分离液(达科为生物技术公司); LDH 试剂盒 (Promega 公司); FITC-CD80 单抗、FITC-CD11c 单抗、PE-CD86 单抗和 PE-MHC II (eBioscience 公司); 流式细胞仪(FACS Callibur, BD 公司) 及分析软件(Cellquest, BD 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠脾 DC 的诱导培养

颈椎脱臼法处死小鼠, 无菌操作台取出小鼠脾脏, 80 目尼龙网轻轻研磨, 加入脾淋巴细胞分离液,

基金项目: 山西省青年科技研究基金(2010021035-6)

通讯作者: 张俊萍, 科主任, 主任医师, 学士; 山西大医院生物治疗科, 山西省太原市龙城大街 99 号(030001); E-mail: junpingzhang-118@163.com。

收稿日期: 2012-04-11; **修回日期:** 2013-02-11

收集细胞。将细胞混液移入离心管中,加入适量培养液,保持界面清楚,800g 离心机离心 30min,吸取中间细胞层,加入培养液,250g 离心 10min,弃上清,沉淀加入 10%胎牛血清的 1640 培养基,移入 6 孔培养板,每孔 4ml,加 GM-CSF 和 IL-4 因子,置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 12h 后,悬浮细胞为淋巴细胞,移出至另外培养瓶。贴壁细胞的培养板加入 4ml 新鲜培养基,补充 GM-CSF 和 IL-4 细胞因子,隔天半量换液,培养第 7d,加入 LPS 和 LLC 抗原促成熟,继续培养 8d 后,即为成熟的小鼠脾细胞来源 DC。每天用倒置显微镜观察 DC 变化。

1.3.2 小鼠 CTL 培养

将淋巴细胞移入培养瓶,加入 IL-2 继续培养。细胞培养 8d,将培养瓶中的细胞培养液与 6 孔板中成熟 DC 混合培养,培养至 12~14d,收获细胞,即为针对 LLC 的特异性 CTL。

1.3.3 FACS 检测 DC 表面抗原

收集培养成熟的 DC,用 PBS 悬浮为 1×10^6 个/ml,加入离心管,加入荧光标记抗体:包括 FITC-CD80 单抗、FITC-CD11C 单抗、PE-CD86 单抗、PE-MHC II,终浓度为 1×10^6 个/ml,以荧光标记的同型 IgG 为对照,避光染色 40min,洗涤 3 次,流式细胞仪检测分析。

1.3.4 乳酸脱氢酶法检测 CTL 的杀伤活性

收集培养 12~14d 的 CTL 作为效应细胞,以 LLC 和 B16-F10 肿瘤细胞为靶细胞,设定效靶比为 100:1、50:1 和 25:1,LDH 法检测细胞的杀伤活性,测量结果按公式计算效应细胞的杀伤活性。杀伤率(%)=(实验组-效应细胞自发释放-靶细胞自发释放)/(靶细胞最大释放组-靶细胞自发释放)×100%

2 结果

2.1 DC 镜下形态

培养第 4d 开始可见 DC 集落形成。在培养过程中,最初

可见细胞贴壁形成短簇,随着培养过程加入 LPS 和 LLC 抗原后,可见大量成熟的毛刺突起细胞,且随着培养时间的延长,细胞呈悬浮状态(Figure 1)。

2.2 FACS 检测细胞表面抗原

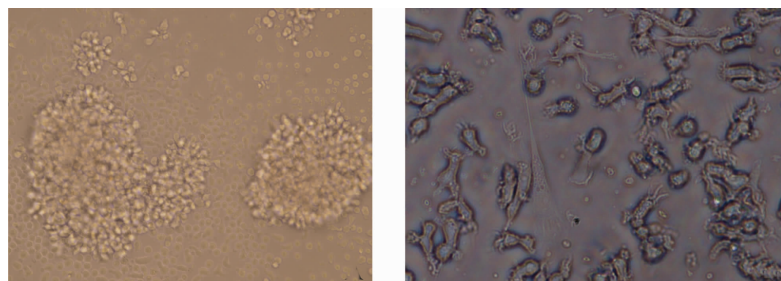
流式细胞仪检测培养第 8d 的 DC,表面高表达 CD80 占 76.5%,CD86 占 60.0%,MHC II 占 67.4%,CD11C 占 80.6%(Figure 2)。

2.3 杀伤活性的检测

结果显示 LLC 致敏 DC 诱导出的 CTL 对 LLC 有着明显的杀伤活性,杀伤活性分别为 4.8%、15.2%、41.0%,且随着效应细胞的增多,杀伤活性逐渐增强;与之相对应的效应细胞对于 B16-F10 肿瘤细胞没有明显的杀伤,杀伤活性分别为 1.8%、3.9%、10.5%。

3 讨论

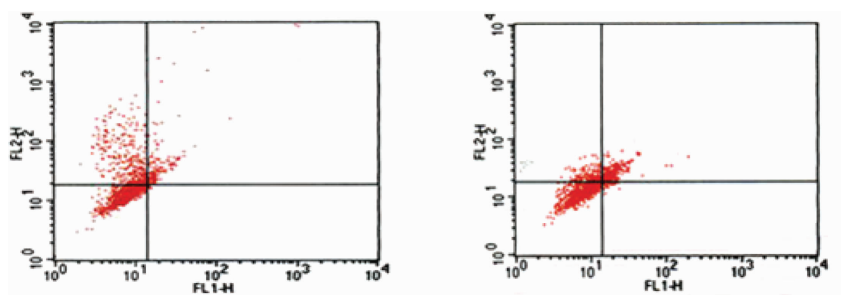
在所有抗原提呈细胞里,DC 提呈、加工、表达 MHC 分子和共刺激分子,是最强有力激活 CD8⁺T 细胞的提呈细胞。已有学者在体外通过骨髓和外周血



A:DC colonies(×200)

B:Burr on cell surface(×200)

Figure 1 DC observation under microscope



A:FITC labelled CD80,PE labelled CD86

B: FITC labelled CD11C,PE labelled MHC II

Figure 2 DC phenotype detection by flow cytometry

培养出成熟的DC并进行DC为基础的免疫治疗^[6-8],主要包括DC疫苗以及肿瘤相关抗原致敏DC,使得培养成熟DC在体内引起抗原特异性反应^[9,10]。因此,如何获得成熟DC并诱导出肿瘤抗原特异性CTL成为重点所在。

为了提高DC自身抗原提呈及诱导特异性反应能力,有学者利用肿瘤抗原肽致敏DC,但是考虑到抗原肽抗原表位的局限性,且与HLA其相匹配的相关肿瘤抗原较少,具有很大的限制性^[11];随后有学者采用携带相关基因的载体转染DC,具有特异性强、易控制等优点,但转染率较低,临床疗效较差^[12,13];而用肿瘤细胞作为抗原致敏DC,这样可以提供多种肿瘤抗原表位供DC识别,通过对肿瘤抗原的识别选择从而诱导出特异的抗肿瘤反应,且肿瘤抗原刺激过DC具有更强细胞毒刺激作用^[14-17]。

本实验中,小鼠脾黏附细胞应用GM-CSF、IL-4细胞因子培养,隔天半量换液去除非黏附细胞,培养第4d光镜下可见细胞呈集落生长状态,此时为未成熟的DC。未成熟DC与成熟DC在MHC抗原肽、共刺激因子的表达和免疫因子释放存在一定差别,不仅如此,两者在诱导T细胞活化和耐受方面也存在很大差异。未成熟DC具有较高的抗原提呈能力,但对T淋巴细胞刺激作用很弱^[18];本实验尚需继续淋巴细胞反应,需要获取足够数量的成熟DC,需要将未成熟DC转化为成熟状态。因此加入了LPS和经过反复冻融法获取的肿瘤抗原,促进DC的成熟转化,显微镜下可见大量伸展突起,通过流式细胞术表面因子检测结果可以看出,DC相对特异性标志高水平表达CD80、CD86、MHC II和CD11C分子,证实我们成功培养出了成熟DC。与传统骨髓培养DC相比,该试验方法具有取材简单、细胞数量多且易于培养等优点。

自体混合淋巴细胞反应是通过刺激细胞表面的MHC分子及共刺激因子刺激T淋巴细胞增殖和分化,产生特异性杀伤反应^[19],该反应需要足够的成熟DC表达高水平的细胞共刺激细胞因子,且随着表面因子的增多,细胞混合反应会增强^[20,21]。本实验中,在IL-2细胞因子的作用下,将成熟DC与T淋巴细胞混合,培养出具有杀伤活性的CTL。研究结果证实,肿瘤抗原致敏的小鼠脾脏DC在体外可以诱导出具有杀伤活性的CTL,且诱导出的CTL对LLC

具有很强的杀伤活性,而对其他肿瘤细胞如B16-F10无明显杀伤活性,证实诱导出CTL的高度杀伤活性和特异性。

实验证实,经过肿瘤抗原刺激的小鼠脾来源DC可以在体外诱导产生特异性的针对LLC细胞的抗肿瘤作用,为以后DC为基础的免疫治疗提供实验依据。

参考文献:

- [1] Gilboa E. DC-based cancer vaccines[J]. J Clin Invest, 2007, 117(5):1195-1203.
- [2] Melief CJ. Cancer immunotherapy by dendritic cell[J]. Immunity, 2008, 29(3):372-383.
- [3] Park MH, Yang DH, Kim MH, et al. Alpha-type 1 polarized dendritic cells loaded with apoptotic allogeneic breast cancer cells induce potent cytotoxic T lymphocytes against breast cancer[J]. Cancer Res Treat, 2011, 43(1):56-66.
- [4] Burgdorf SK, Fischer A, Myschetzky PS, et al. Clinical responses in patients with advanced colorectal cancer to a dendritic cell based vaccine[J]. Oncol Rep, 2008, 20 (6): 1305-1311.
- [5] Kalinski P, Urban J, Narang R, et al. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need[J]. Future Oncol, 2009, 5 (3): 379-390.
- [6] Kalinski P, Okada H. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-type T cells to tumors [J]. Semin Immunol, 2010, 22(3): 173-182.
- [7] Luo J, Li J, Chen RL, et al. Autologous dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: a pilot, open-label, clinical trial in human volunteers[J]. Vaccine, 2010, 28(13):2497-2504.
- [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[J]. Int J Biol Sci, 2010, 6(7):639-648.
- [9] Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine[J]. Nature, 2007, 449(7161):419-426.
- [10] Palucka K, Ueno H, Fay J, et al. Harnessing dendritic cells to generate cancer vaccines [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1174:88-98.
- [11] Chen YZ, Yao XL, Tabata Y, et al. Gene carriers and transfection systems used in the recombination of dendritic cells for effective cancer immunotherapy [J]. Clin Dev Immunol, 2010, 2012:565643.
- [12] Chen L, Tang XD, Yu ST, et al. Induction of anti-tumour immunity by dendritic cells transduced with hTERT re-

- combinant adenovirus in mice [J]. J Pathol, 2009,217(5): 685-692.
- [13] Tyagi RK, Mangal S, Garg N, et al. RNA-based immunotherapy of cancer: role and therapeutic implications of dendritic cells[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2009,9 (1):97-114.
- [14] Delirezh N, Moazzeni SM, Shokri F, et al. Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro[J]. Cell Immunol, 2009,257(1-2):23-31.
- [15] Lee JJ, Park MS, Park JS, et al. Induction of leukemic-cell-specific cytotoxic T lymphocytes by autologous monocyte-derived dendritic cells presenting leukemic cell antigens[J]. J Clin Apher, 2006,21(3):188-194.
- [16] 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.
- [17] Ribas A, Camacho LH, Lee SM, et al. Multicenter phase II study of matured dendritic cells pulsed with melanoma cell line lysates in patients with advanced melanoma [J]. J Transl Med, 2010,8:89.
- [18] Orsini E, Guarini A, Chiaretti A, et al. The circulating dendritic cell compartment in patients with chronic lymphocytic leukemia is severely defective and unable to stimulate an effective T-cell response[J]. Cancer Res, 2003, 63(15):4497-4506.
- [19] Reid DC. Dendritic cells and immunotherapy for malignant disease[J]. Br J Haematol, 2001,112(4):874-887.
- [20] 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.
- [21] Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, et al. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells [J]. J Exp Med, 2001,193(2):233-238.

第六届浙江省抗癌协会抗癌药物专业委员会 2013 年继续教育项目预告

1. 项目名称:抗肿瘤药物研究新趋向与肿瘤个性化药物治疗论坛

2. 会议时间与地点:10 月 25 日~27 日 杭州

3. 主办单位:浙江省抗癌协会

承办单位:浙江省肿瘤医院 肿瘤学杂志社

4. 继续教育内容:本次研讨会主题为“抗肿瘤新药研发与个体化治疗最新进展”。届时,将邀请国内外著名的专家作前沿性的大会报告,从基础研究、转化医学研究、临床研究三个层面探讨肿瘤药物研发、肿瘤标志物和个性化治疗的新进展、新技术以及新成果,探索肿瘤个体化药物治疗的新模式。

5. 征文内容与要求

征文内容:抗肿瘤药物新通路与新靶点;抗肿瘤新药的研发;肿瘤标志物与肿瘤个性化药物治疗;基因向导与肿瘤个性化治疗;肿瘤个性化药物治疗的临床实践等相关内容。

征文要求:相关学术论文提交全文的同时请附 500~800 字中文摘要。首页请注明第一作者姓名、单位、科室、地址、邮编、联系电话等,邮件主题请标注“抗肿瘤药物研究新趋向与肿瘤个性化药物治疗论坛”投稿,所有投稿论文均将编入大会论文集,并将评选优秀论文给予一定的奖励,并刊登于《中国肿瘤》、《肿瘤学杂志》。

征文方式:征文截止日期:2013 年 9 月 30 日,投稿请通过电子邮件提交,文稿请以附件形式发送至 leofang6000@gmail.com;联系人:方罗,童莹慧;联系电话:0571-88122114。

6. 学分授予:对全程参会者经考试合格,将授予省级 I 类继续教育学分 5 分。