

M 蛋白致敏树突状细胞诱导的抗骨髓瘤细胞效应

刘军民,李玉峰*,宣恒报,李媛媛,邓之奎

(南京医科大学附属淮安第一人民医院血液科,淮安 223300)

[摘要] **目的:**探讨 M 蛋白致敏树突状细胞(DC)诱导激活的自体 T 细胞对骨髓瘤细胞特异性免疫杀伤效应。**方法:**取多发性骨髓瘤(MM)患者外周血单核细胞经 GM-CSF、IL-4 和 TNF- α 体外联合诱导生成 DC,用 DEAE-纤维素提取法自 MM 患者血清中分离、纯化 M 蛋白。以 M 蛋白冲击致敏 DC(同时设未致敏的 DC 为对照),流式细胞术分析 DC 免疫表型,并与自体 T 淋巴细胞进行混合淋巴细胞反应。 ^{51}Cr 释放法测定 T 细胞对不同靶细胞(患者骨髓瘤细胞、U266 细胞)的杀伤活性。**结果:**经 M 蛋白致敏的 DC 激发自体 T 细胞增殖的能力明显强于未致敏的 DC($P < 0.05$);同时负载 M 蛋白 DC 激活的 T 细胞杀伤活性也明显强于对照组($P < 0.01$),而两组 T 细胞对 U266 细胞均无明显杀伤活性。**结论:**M 蛋白致敏 DC 能有效诱导自体 T 细胞对骨髓瘤细胞的特异性杀伤作用。

[关键词] 多发性骨髓瘤;M 蛋白;树突状细胞;T 淋巴细胞

[中图分类号] R 733.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0624-04

Myeloma protein-pulsed dendritic cells induced anti-myeloma cells activity

LIU Jun-min, LI Yu-feng*, XUAN Hen-bao, LI Yuan-yuan, DENG Zhi-kui (Department of Hematology, The First people's Hospital of Huai'an, Huai'an 223300, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the anti-myeloma cells specific immune activity induced by myeloma protein-pulsed dendritic cells(DCs). **Methods:** DCs were obtained from peripheral blood(PB) of multiple myeloma(MM) patients after co-culture with GM-CSF, IL-4 and TNF- α . The phenotype of DCs was examined by flow cytometry. Host lymphocytes were stimulated with DCs pulsed with myeloma protein acquired from serum of MM patients on DEAE-cellulose; lymphocytes treated with unpulsed-DC served as control. [^3H]-thymidine incorporation and 4 h ^{51}Cr -release assay were used to detect the proliferation and cytotoxicity against different targets(auto-myeloma cells, U266 cells) by T lymphocytes. **Results:** *In vitro* proliferation and cytotoxicity of T lymphocytes activated by myeloma protein pulsed-DCs were greater than those of T lymphocytes in the control group($P < 0.01$). T lymphocytes in neither of the 2 groups had notable cytotoxicity against U266 cells. **Conclusion:** DCs pulsed by myeloma protein can effectively induce specific cytotoxicity of T lymphocytes against myeloma cells.

[KEY WORDS] multiple myeloma; myeloma protein; dendritic cells; T-lymphocytes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6): 624-627]

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是浆细胞恶性增殖性疾病。大剂量化疗加造血干细胞移植虽可延长 MM 患者的无病生存期,但都不能有效阻止疾病的复发^[1]。为此,新的治疗方法有待探索。树突状细胞(DC)是目前已知功能最强的专职抗原提呈细胞,在抗肿瘤免疫反应中具有非常重要的作用,许多实验显示^[2,3],负载有肿瘤抗原的 DC 能有效地诱导抗肿瘤免疫反应,以 DC 为中心的免疫治疗是肿瘤生物学治疗的主要方向之一。本实验将 MM 患者血清中的 M 蛋白在体外与自体 DC 共同培养,研究其介导的特异性抗骨髓瘤效应,为制备这种新的抗骨髓瘤 DC 疫苗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 标本 12 例 MM 患者均为我院血液科住院患者,其中男 5 例,女 7 例,平均年龄 52.5(36~68)

岁,诊断标准参照文献^[4],且符合下列条件:(1)骨髓中浆细胞 $> 20\%$;(2)血清中有大量 M 蛋白(IgG $> 35\text{ g/L}$, IgA $> 20\text{ g/L}$)。按免疫球蛋白分型 IgG 型 9 例, IgA 型 3 例。临床分期 III A 期 8 例, III B 期 4 例。所有患者均签署知情同意书。

1.2 细胞株、试剂及仪器 骨髓瘤细胞株 U266 细胞由苏州大学医学院血液研究所提供并传代培养。rhGM-CSF、rh-IL-2、rh-IL-3、rh-IL-4、rh-IL-6、rhTNF- α 购自邦定生物公司;CD1a-PE、抗 CD14-FITC、抗 CD86-FITC 和抗 HLA-DR-FITC mAb 为 Bur-

[基金项目] 江苏省淮安市医学科研计划项目(WX200505)。Supported by Project of Medical Science of Huai'an Municipal Government(WX200505)。

[作者简介] 刘军民,硕士,主治医师。

E-mail: liujm2001@gmail.com

* Corresponding author. E-mail: liuyufeng99@netease.com

lingame 公司产品;抗 CD3-FITC,抗 CD4-PE,抗 CD8-PE mAb 为 Immunotech 公司产品;Na₂⁵¹CrO₄ 为 Amershan 公司产品;[³H]-TdR(中科院上海核技术公司);淋巴细胞分离液(Ficoll 相对密度 1.077)为上海生物有限公司产品;完全培养基包括 RPMI 1640(Gibco 公司产品)、胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、1×10⁵ U/L 青霉素、100 g/L 链霉素;液闪仪为 Beckman-Coulter 公司(美国)产品;BB5060/BB16 CO₂ 孵箱(Heraeus),流式细胞仪(EPIC SXL 型)为 Coulter 公司产品。

1.3 M蛋白的分离、纯化及检测 取 MM 初诊患者外周血,静置凝固收集血清,通过紫外分光光度仪检测 M 蛋白浓度,用 DEAE-纤维素提取法分离、纯化 M 蛋白。具体方法参照文献^[5]。用蛋白电泳法检测 M 蛋白纯度。

1.4 靶细胞制备^[6] 经骨髓穿刺抽取初诊 MM 患者骨髓细胞,用淋巴细胞分离液分离出单个核细胞(mononuclear cell, MNC),调整细胞密度为 2×10⁶/ml,放置含 20%小牛血清、IL-2、IL-3、IL-6 及 TNF-α(终浓度均为 200 U/ml)的 RPMI 1640 液中,37℃ 培养并收集骨髓瘤细胞(悬浮细胞)作靶细胞。-80℃ 下保存。

1.5 效应细胞制备 采集 MM 患者缓解期外周血,用 Ficoll 分离获得 MNC,用 RPMI 1640 洗涤 2 次,用含 10%小牛血清(FCS)的 RPMI 1640 制成密度为 1×10⁶/ml 细胞悬液,加入 12 孔培养板中,在 5%CO₂、37℃ 条件下培养 2 h,调整洗出的悬浮细胞密度至 5×10⁷/ml,与绵羊红细胞(SRBC,经 10 g/L AET 处理 1 h)按 1:100 混合,在 37℃、5%CO₂ 条件下培养 1 h,轻轻加在 Ficoll 上离心(1 500 r/min, 20 min),取 SRBC 层细胞洗涤收获 T 细胞并行流式细胞仪分析 CD3、CD4、CD8 免疫表型,-80℃ 下保存。

1.6 DC 的培养、鉴定及致敏 取 MM 患者缓解期外周血,经 Ficoll 离心(20℃,1 500 r/min,15 min),取界面层细胞,置 50 ml 离心管中,用生理盐水悬浮细胞,离心(1 500 r/min,10 min)2 次,用含体积分数为 10%的胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基悬浮细胞,加入 9 孔培养板,每孔 2.0×10⁶/ml,37℃、5%CO₂ 培养箱孵育 2 h,洗弃培养上清,用预热的完全培养基轻洗培养板,去除非贴壁细胞即获贴壁的单核细胞,每孔加入完全培养基、rhGM-CSF(200 U/ml)、rhIL-4(50 U/ml),每 2 d 半量换培养液 1 次,同时补充细胞因子,光镜下观察细胞形态。于第 6 天取等量细胞(5×10⁵/ml,100 μl/孔)分成两组,

M 蛋白致敏组加入 M 蛋白(10 mg/ml,50 μl),未致敏组加入免疫球蛋白(10 mg/ml,50 μl),两组均同时加入 TNF-α(100 U/ml),继续培养 3 d,应用流式细胞仪检测 DC 的特异性表面标志^[6]CD1a、CD14、HLA-DR 及共刺激分子 CD86。

1.7 负载抗原 DC 的混合淋巴细胞反应(MLR)

取培养 9 d 的 DC,加入丝裂霉素 25 μg/ml,入培养箱灭活 45 min,洗涤计数,用含 10%FCS 的 1640 液调整细胞密度为 1×10⁵/ml,取 100 μl 分别加入冷冻复苏的 T 细胞(DC 与 T 细胞之比为 1:50,1:10),于含 IL-2 30 kU/L 的 10%FCS RPMI 1640 培养于 96 孔板。终止培养前 16~18 h,每孔掺入 [³H]-TdR 317×10⁴Bq,再培养 18 h,收集洗涤细胞,作液闪计数。按以下公式计算刺激指数(SI):SI=(实验组 cpm 值-本底 cpm 值)/(空白对照组 cpm 值-本底 cpm 值)。空白对照为 30 kU/L IL-2 培养的 T 细胞。

1.8 T 细胞对靶细胞杀伤活性的检测 冻存的自体骨髓细胞复苏后在含有 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液中培养 24 h,用 Ficoll 分离液去除死细胞,再用 RPMI 1640 完全培养液调整细胞密度为 2×10⁸/L 作为靶细胞用,经负载 M 蛋白的 DC 激活的 T 细胞为效应细胞(M 蛋白致敏组),对照组以负载免疫球蛋白的 DC 激活的 T 细胞为效应细胞(未致敏组),用 Na₂⁵¹CrO₄ 标记靶细胞(骨髓瘤细胞和 U226 细胞)1 h,采用 100:1、50:1、20:1、10:1 不同的效靶比,用⁵¹Cr 4 h 释放法检测 T 细胞杀伤活性。杀伤活性(%)=(cpm_{实验孔}-cpm_{自然释放孔})/(cpm_{最大释放孔}-cpm_{自然释放孔})×100%。

1.9 统计学处理 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 软件进行配对 *t* 检验或方差分析。

2 结果

2.1 M 蛋白的浓度、纯度 12 例 MM 患者中,9 例 IgG 型 M 蛋白浓度为(45.5±5.4) g/L,3 例 IgA 型 M 蛋白浓度分别为 28.7、38.5、41.2 g/L,经 DEAE-纤维素提取法可使 M 蛋白浓度达(620.8±120.6) g/L,纯度均达 98%以上。

2.2 T 细胞免疫表型分析 经 E 花环形成分离法获取的 T 细胞流式细胞仪检测,表达 CD3、CD3CD4、CD3CD8 的淋巴细胞分别为(92.6±8.3)%、(64.1±4.9)%、(28.4±5.3)%、CD3CD4/CD3CD8 为 2.27±0.35。

2.3 DC 的形态观察和表面标志 贴壁细胞经体外诱导培养 24 h,倒置显微镜下可见细胞开始聚集生

长,至第4天渐呈分散状态,疏松贴壁生长,胞膜向外延伸刺状突起,为典型的DC形态。培养至第6天大部分悬浮不贴壁,第9天取少量悬浮细胞用FACS分析其表型特性,90%的细胞表达HLA-DR及其共刺激分子CD86,部分表达CD1a,无细胞表达CD14。

2.4 DC对自体T细胞扩增能力 由表1可见,M蛋白致敏DC和未致敏DC的SI在刺激比例(T cells : DCs)为50 : 1时,分别为8.7±0.6和5.4±

0.2 ($P < 0.05$);在刺激比例为10 : 1时,分别为11.2±0.7和6.5±0.4 ($P < 0.05$)。

2.5 T细胞对靶细胞的杀伤活性 M蛋白致敏DC诱导的T细胞比未致敏DC诱导的T细胞对患者骨髓瘤细胞杀伤率高,不同效靶比时两组均有显著差异 ($P < 0.05$)。而两种蛋白诱导的T细胞对U226细胞的杀伤率低,与对骨髓瘤的杀伤率相比差异显著 ($P < 0.01$,表1)。

表1 M蛋白致敏DC诱导的T细胞对骨髓瘤细胞的杀伤活性

Tab 1 Cytotoxicity against auto-myeloma cells of T lymphocytes activated by myeloma protein pulsed-DC(M-DC)

($n = 12, \bar{x} \pm s, \%$)

| Target cells | Effective cells | Ratio of effective cells to target cells | | | |
|--------------|-----------------|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 10 : 1 | 20 : 1 | 50 : 1 | 100 : 1 |
| U226 | DC | 4.2±0.3 | 7.4±0.8 | 13.4±1.4 | 18.5±1.6 |
| | M-DC | 5.4±0.3 | 8.3±0.5 | 12.7±0.9 | 20.4±2.1 |
| Myeloma | DC | 18.5±1.0 ^{△△} | 25.4±1.8 ^{△△} | 39.5±3.0 ^{△△} | 62.7±5.6 ^{△△} |
| | M-DC | 24.1±1.1 ^{*△△} | 37.5±2.3 ^{*△△} | 63.4±3.9 ^{*△△} | 89.7±7.1 ^{*△△} |

* $P < 0.05$ vs DC against myeloma cells; ^{△△} $P < 0.01$ vs U226 cells by the same effective cells

3 讨论

树突状细胞(dentric cells, DC)是目前发现的功能最强的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC),在抗肿瘤免疫反应中具有非常重要的作用,许多研究^[7~9]显示,负载有肿瘤抗原的DC能有效地诱导抗肿瘤免疫反应。目前,临床上已有多种形式的肿瘤抗原负载DC用于各类肿瘤的辅助治疗,并获得良好效果。利用DC治疗肿瘤时,可以先从骨髓、外周血或脾脏中获取其前体细胞,经体外诱导扩增,并用肿瘤特异性抗原或肿瘤提取物等冲击致敏DC,或通过肿瘤抗原基因转染使DC致敏;再回输给患者,以触发较强的特异性抗肿瘤免疫反应。目前转基因技术尚未成熟,临床上主要是通过肿瘤特异性抗原(TSP)或肿瘤相关性抗原(TAP)冲击致敏DC。因此,利用DC治疗肿瘤的先决条件有两个:一是要找到能有效冲击致敏DC的TSP或TAP,二是要获取大量能有效识别、摄取、处理和提呈抗原的DC。

MM是一种浆细胞恶性增殖性疾病,能分泌M蛋白,这种Ig上的独特型(idiotype, Id)决定簇是一种公认的TSP^[10,11],已经有人用之诱导出特异性杀骨髓瘤细胞的免疫效应^[12,13]。M蛋白在MM患者血浆中始终存在,且较容易大量获得,这为其DC的免疫疗法提供了良好的物质基础。尽管MM患者血浆中有M蛋白大量存在,但由于其体内DC数量

减少、功能缺陷,在体内并不能有效地被DC吞噬、加工、提呈并激活初始T细胞^[14,15]。而经体外诱导培养MM患者来源的DC在表型、功能上与正常人来源的无明显差异^[16]。近年来,国外已率先将其用于MM的治疗^[17,18],国内尚未有类似报道。

本研究采用DEAE-纤维素提取法从MM初诊患者血清中分离出高纯度的M蛋白,而且由患者缓解期外周血单核细胞体外经诱导培养DC,其形态、免疫表型及功能均符合典型DC特征。实验观察发现,经M蛋白致敏的DC刺激患者自体T细胞增殖的能力较未致敏DC明显要强,考虑可能有两方面的因素:(1)M蛋白中含有肿瘤抗原肽,可被DC的MHC分子提呈激活相应T细胞并使其增殖;(2)M蛋白致敏的DC还有助于DC的成熟,促使DC表达共刺激分子协同激活T细胞。同时,本结果还显示两种DC激活的T细胞对患者骨髓瘤细胞均有杀伤作用,而M蛋白致敏组明显强于对照组,但其激活的T细胞只能杀伤患者骨髓瘤细胞,而对自体骨髓瘤细胞(U226细胞)的杀伤率很低,说明这种杀伤效应具有特异性。邓晓辉等^[19]用骨髓瘤冻融物致敏DC,发现当效靶比为20 : 1时,骨髓瘤细胞冻融物致敏的DC加IL-2诱导的自身T细胞对骨髓瘤细胞有明显的溶解作用。本研究针对性选用M蛋白这种骨髓瘤细胞特异性的肿瘤抗原物致敏DC,去除骨髓瘤冻融物中非肿瘤抗原物质,在相同剂量时能获得更强的抗骨髓瘤效果,而且这种抗原物来源更

为丰富和便利。提示 M 蛋白致敏 DC 能有效诱导自身 T 细胞的抗骨髓瘤免疫,值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Powata LF, Inwards DJ, Lacy MQ, et al. Immunomodulation of early engrafted natural killer cells with interleukin-2 and interferon- α in autologous stem cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2001, 28: 673-680.
- [2] 李明松, 袁爱力. 树突状细胞体外诱导高效而特异的抗肿瘤免疫[J]. 实用肿瘤学杂志, 1998, 13: B83-B85.
- [3] 朱学军, 曹雪涛, 雷虹, 等. 弱酸洗脱提取的肿瘤抗原肽致敏的树突状细胞对 CTL 的体内外激活效应[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000, 20: 98-101.
- [4] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2版. 天津: 天津科技技术出版社, 1998.
- [5] 吴雄文, 梁智辉. 实用免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 279-280.
- [6] Bergui L, Schena M, Gaidano G, et al. Interleukin 3 and interleukin 6 synergistically promote the proliferation and differentiation of malignant plasma cell precursors in multiple myeloma [J]. J Exp Med, 1989, 170: 613-618.
- [7] 唐华, 邵平章, 曹雪涛, 等. 冻融抗原冲击致敏的树突状细胞对结肠癌小鼠的治疗作用[J]. 中国肿瘤生物学杂志, 2000, 7: 199-202.
- [8] 王玮, 孙秉中. 树突状细胞与恶性血液病的免疫治疗[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16: 553-555.
- [9] 邹征云, 刘宝瑞. 树突状细胞疫苗制备与临床应用进展[J]. 肿瘤防治杂志, 2004, 11: 1205-1210.
- [10] Lim SH, Wen YJ, Ling M, et al. Malignancy: idiotype immune targeting of multiple myeloma[J]. Hematology, 2000, 4: 471-477.
- [11] Wen YJ, Barlogie B, Yi Q, et al. Idiotype-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: evidence for their capacity to lyse autologous primary tumor cells[J]. Blood, 2001, 97: 1750-1755.
- [12] Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, et al. *Ex vivo* induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes[J]. Blood, 2003, 102: 1435-1442.
- [13] Yin XR, Zhang M, Luo YY, et al. Induction of active antitumor immune response by myeloma idiotype protein-pulsed dendritic cells [J]. Ai Zheng, 2005, 24: 657-662.
- [14] Ratta M, Fagnoni F, Curti A, et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6 [J]. Blood, 2002, 100: 230-237.
- [15] Brown RD, Pope B, Murray A, et al. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10[J]. Blood, 2001, 98: 2992-2998.
- [16] 王京华, 郭搏, 刘芳, 等. 多发性骨髓瘤与正常人来源树突状细胞培养及特性的比较研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2004, 38: 373-375.
- [17] Kim SB, Baskar S, Kwak LW, et al. *In vitro* priming of myeloma antigen-specific allogeneic donor T cells with idiotype pulsed dendritic cells[J]. Leuk Lymphoma, 2003, 44: 1201-1208.
- [18] Zeis M, Frenzke H, Schmitz N, et al. Idiotype protein-pulsed dendritic cells produce strong anti-myeloma effects after syngeneic stem cell transplantation in mice[J]. Bone Marrow Transplant, 2002, 29: 213-221.
- [19] 邓晓辉, 翁霞, 陈琳军, 等. 骨髓瘤冻融物致敏树突状细胞诱导特异性细胞免疫反应[J]. 上海第二医科大学学报, 2004, 24: 334-336.

[收稿日期] 2005-12-09

[修回日期] 2006-04-05

[本文编辑] 孙岩

Investigation of recombinant *Schistosoma japonicum* paramyosin fragments for immunogenicity and vaccine efficacy in mice

Zhang DM, Pan WQ, Qian L, Duke M, Shen LH, McManus DP (Department of Etiologic Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] *Schistosoma japonicum* paramyosin, a 97 kDa myofibrillar protein, is a recognized vaccine candidate against schistosomiasis. To improve its expression and to identify protective epitopic regions on paramyosin, the published Chinese *Schistosoma japonicum* paramyosin cDNA sequence was redesigned using *Pichia* codon usage and divided into four overlapping fragments (fragments 1, 2, 3, 4) of 747, 651, 669 and 678 bp, respectively. These gene fragments were synthesized and expressed in *Pichia pastoris* (fragments 2 and 3) or *E. coli* (fragments 1 and 4). The recombinant proteins were produced at high level and purified using a two-step process involving Ni-NTA affinity chromatography and gel filtration. BALB/c mice were immunized subcutaneously three times at 2-week-intervals with the purified proteins formulated in adjuvant Quil A. The protein fragments were highly immunogenic, inducing high, though variable, ELISA antibody titres, and each was shown to resemble native paramyosin in terms of its recognition by the anti-fragment antibodies in Western blotting. The immunized mice were subjected to cercarial challenge 2 weeks after the final injection and promising protective efficacy in terms of significant reductions in worm burdens, worm-pair numbers and liver eggs in the vaccinated mice resulted. There was no apparent correlation between the antibody titres generated and protective efficacy, as all fragments produced effective but similar levels of protection.

[Parasite Immunol, 2006, 28: 77-84]