

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00521

PSA 特异性树突状细胞瘤苗过继免疫治疗小鼠前列腺癌

徐丹枫*, 高 轶, 刘玉杉*, 崔心刚, 车建平, 阴 雷, 邢继章, 姚亚成, 任吉忠, 闵志廉
第二军医大学长征医院泌尿外科, 全军泌尿外科中心, 上海 200003

[摘要] **目的:** 利用 LNCaP 前列腺癌裸鼠模型, 观察 PSA 特异性树突状细胞(dendritic cell, DC)瘤苗(PSA-DC)体外诱导的 CTL 体内过继输入的抗肿瘤效果。**方法:** 采用裸鼠皮下接种 LNCaP 细胞的方法建立 LNCaP 前列腺癌荷瘤裸鼠模型; 应用前期制备好的 Non-DC、Ova-DC、Lys-DC 及 PSA-DC 瘤苗体外诱导抗原特异性 CTL 细胞, 并在 LNCaP 细胞接种第 15 天模型制备成功时首次将体外诱导的抗原特异性 CTL 细胞经尾静脉过继输入小鼠体内, 7 d 后重复输入 1 次。以初次治疗后 50 d 为终止点, 观察肿瘤生长情况; 观察各组荷瘤裸鼠的存活情况。**结果:** 过继输入治疗后第 30、50 天, Non-DC、Ova-DC、Lys-DC 及 PSA-DC 组瘤体明显大于肿瘤细胞接种第 15 天($P < 0.01$); Lys-DC、PSA-DC 组瘤体明显小于 Non-DC、Ova-DC 组($P < 0.01$)。在观察期间内, Lys-DC、PSA-DC 组裸鼠生存时间明显长于 Non-DC、Ova-DC 组($P < 0.01$)。**结论:** 前列腺癌瘤苗 PSA-DC 体外诱导的 PSA 特异性 CTL 细胞过继输入可抑制裸鼠体内 LNCaP 肿瘤生长, 提高裸鼠生存时间。

[关键词] PSA; 树突状细胞; 细胞毒性 T 淋巴细胞; 过继免疫; 前列腺肿瘤

[中图分类号] R 737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0521-03

Adoptive immunotherapy with CTL induced by PSA-pulsed dendritic cell vaccine for prostate cancer in mice

XU Dan-feng*, GAO Yi, LIU Yu-shan*, CUI Xin-gang, CHE Jian-ping, YIN Lei, XING Ji-zhang, YAO Ya-cheng, REN Ji-zhong, MIN Zhi-lian

Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Center of Urology of PLA, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the anti-tumor effect of adoptive immunotherapy with CTL induced by PSA-pulsed dendritic cell vaccine against prostate cancer in mice. **Methods:** Nude mice were s. c. inoculated with LNCaP tumor cells to establish prostate cancer model. CTL induced *in vitro* by different peptide-pulsed dendritic cells (Non-DC, Ova-DC, Lys-DC and PSA-DC) were used for adoptive immunotherapy of experiment nude model through vena caudalis on d 15 and d 22 after inoculation. The survival of nude mice and the sizes of tumors were observed with d 50 after the initial treatment as the endpoint. **Results:** The tumor sizes in Non-DC, Ova-DC, Lys-DC and PSA-DC groups on d 30 and d 50 after adoptive immunotherapy were significantly larger than that at d 15 after inoculation ($P < 0.01$). The tumors sizes in Lys-DC and PSA-DC groups were significantly smaller than those in the Non-DC and Ova-DC groups ($P < 0.01$). The survival periods of animals in Lys-DC and PSA-DC groups were significantly longer than those in the Non-DC and Ova-DC groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Adoptive immunotherapy with CTL induced by DC-based PSA vaccine can inhibit the growth of prostate cancer LNCaP cells in nude mice and increase the survival of the animals.

[KEY WORDS] PSA; dendritic cell; cytotoxic T-lymphocytes; adoptive immunity; prostatic neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5):521-523]

肿瘤相关抗原和树突状细胞(dendritic cell, DC)的联合应用为肿瘤免疫治疗提供了新的研究方向, 以 DC 为基础的肿瘤免疫治疗策略成为目前研究的热点^[1-3]。我们的前期研究^[4]成功构建了前列腺癌 PSA 特异性 DC 瘤苗(PSA-DC), 其诱导的

CTL 细胞体外能有效杀伤 LNCaP 细胞, 但其体内抗肿瘤活性仍不清楚。因此, 本研究采用皮下接种 LNCaP 细胞的方法建立 LNCaP 前列腺癌荷瘤裸鼠模型, 过继输入 PSA-DC 体外诱导得到的 PSA 特异性 CTL, 观察 CTL 过继免疫治疗对裸鼠体内 LN-

[收稿日期] 2008-09-20 **[接受日期]** 2009-01-20

[基金项目] 上海市科学技术委员会基金(044119615)。Supported by Foundation of Shanghai Science and Technology Committee (044119615)。

[作者简介] 徐丹枫, 博士, 教授、主任医师, 博士生导师。

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel:021-81885721, E-mail: xu-danfeng@hotmail.com; Tel:021-81885724, E-mail: egoeup@163.com

CaP 肿瘤生长以及荷瘤裸鼠生存期的影响,进一步验证 PSA-DC 瘤苗的体内抗肿瘤效应。

1 材料和方法

1.1 动物来源及处理 雄性 4~5 周龄裸鼠 (BALB/c, nu/nu) 购于中国科学院上海实验动物研究所。动物饲养及实验操作在第二军医大学实验动物研究中心、第二军医大学免疫学研究所动物中心完成,二者均属于 SPF 级动物实验室,灭菌处理的水和饲料供动物自由摄取。

1.2 LNCaP 皮下荷瘤裸鼠模型的建立 以含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养基(Gibco 公司)在体外大量扩增人前列腺癌 LNCaP 细胞(ATCC 公司);取对数生长期、生长状态良好的 LNCaP 细胞,0.25% 胰酶室温消化 0.5 min,加入含 10% FBS 的培养液终止消化,200×g 离心 10 min,收集细胞;用 PBS 洗涤 2 次后重悬,细胞计数,调整密度至 2×10⁷/ml。以每只 5×10⁶/200 μl 的细胞密度皮下接种于裸鼠背部或右肩胛部,观察肿瘤发生时间及生长情况。

1.3 抗原特异性 CTL 的诱导

1.3.1 DC 瘤苗的制备 参照前期研究^[4]的方法制备抗原特异性的 DC 瘤苗。依不同抗原成分,DC 瘤苗分为 4 组:Non-DC 瘤苗(未加入抗原,阴性对照组),Ova-DC 瘤苗(无关抗原 ovalbumin 10 μg/ml 冲击,阳性对照组),PSA-DC 瘤苗(PSA 融合蛋白 10 μg/ml 冲击),Lys-DC 瘤苗(肿瘤裂解物冲击)。

1.3.2 DC 瘤苗体外诱导抗原特异性 CTL 参照前期研究^[4]的方法体外诱导抗原特异性 CTL。按 CTL 来源,抗原特异性 CTL 分为:Non-DC/CTL、Ova-DC/CTL、Lys-DC/CTL 和 PSA-DC/CTL。

1.4 CTL 过继免疫治疗效果观察

1.4.1 CTL 过继免疫治疗 裸鼠接种 LNCaP 后第 15 天,即模型制备成功时作为过继免疫治疗的开始。40 只荷瘤裸鼠随机分为 4 组(n=10):Non-DC/CTL、Ova-DC/CTL、Lys-DC/CTL 和 PSA-DC/CTL 组。将 CTL 细胞 1×10⁷/100 μl 经尾静脉注射于荷瘤鼠瘤体内,7 d 后重复注射 1 次,2 次治疗后不再给予 CTL 输注。

1.4.2 疗效观察 实验各组在第 2 次 CTL 注射后 7 d 处死 3 只动物,取肿瘤组织进行 H-E 染色,观察肿瘤坏死情况、瘤体内及瘤体周围淋巴细胞浸润情况。以初次治疗后 50 d 为终止点观察肿瘤生长情况,瘤体大小以游标卡尺测量并记录肿瘤的长轴(a)及短轴(b),其乘积代表肿瘤大小。观察过继输入治疗 85 d 内各组荷瘤裸鼠存活情况,记录每只受试裸

鼠的生存天数。

1.5 统计学处理 采用方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验比较治疗前后的差异,*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LNCaP 荷瘤裸鼠模型的制备情况 裸鼠皮下接种肿瘤细胞后第 15 天时,各实验组均可触及实体瘤,瘤径 1.5~2.5 mm,45 d 左右出现恶液质;在 23~28 d,5 只裸鼠皮下肿瘤突出有包块形成,直径 1.0~2.0 cm。自荷瘤裸鼠体内摘除的皮下实体瘤大体可见包膜完整,与周围组织分界清晰,瘤体表面密布增生血管,表明 LNCaP 荷瘤裸鼠模型制备成功。

2.2 CTL 过继免疫治疗后肿瘤大小的变化 与对照组比较,经第 2 次治疗后 Lys-DC 及 PSA-DC 组肿瘤增长缓慢,维持较长时间的抑制状态。肿瘤大小测定结果见表 1;治疗后第 30 天,Non-DC、Ova-DC、Lys-DC 及 PSA-DC 组瘤体明显大于治疗前(0 d),(*P*<0.01);而 Lys-DC、PSA-DC 组瘤体明显小于 Non-DC、Ova-DC 组(*P*<0.01)。治疗后第 50 天,Lys-DC、PSA-DC 组瘤体明显小于 Non-DC、Ova-DC 组(*P*<0.01)。Non-DC 与 Ova-DC 组肿瘤大小,Lys-DC 与 PSA-DC 组肿瘤大小均无统计学差异。

表 1 治疗前和治疗后各组小鼠瘤体的变化

Tab 1 Tumor volume in different groups before and after treatment

Group	Time after treatment <i>t</i> /d		
	(mm×mm, n=5, $\bar{x} \pm s$)		
	0	30	50
Non-DC	22.4±2.7	152.3±7.4**	547.6±23.2**
Ova-DC	20.6±3.3	145.4±6.5**	537.4±18.2**
Lys-DC	21.5±3.5	78.8±5.4**	180.3±10.4**
PSA-DC	23.3±3.2	75.3±4.7**	171.9± 8.9**

** *P*<0.01 vs 0 day after treatment

2.3 CTL 过继免疫治疗后肿瘤病理学检查 结果(表 2)表明:输入来源于 Lys-DC 及 PSA-DC 刺激诱导的 CTL,可见肿瘤组织内出现片状坏死,细胞崩解,核固缩;瘤体内和瘤体周围可见局部淋巴细胞浸润,效果优于 Non-DC、Ova-DC 组。

2.4 荷瘤小鼠生存时间的比较 Kaplan-Meier 生存曲线(图 1)显示,Lys-DC、PSA-DC 组间裸鼠生存时间明显长于 Non-DC、Ova-DC 组,差异具有统计学意义(*P*<0.01)。Lys-DC 与 PSA-DC 组,Ova-DC 与 Non-DC 组裸鼠生存时间均无统计学差异。

表 2 CTL 过继免疫治疗后各组小鼠肿瘤组织病理学改变

Tab 2 Pathological analysis of tumors after adoptive immunotherapy with CTL in different groups

Group	Necrosis of tumor mass	Intratumoral lymphocyte infiltration	Peritumoral lymphocyte infiltration
Non-DC	±	±	—
Ova-DC	±	±	—
Lys-DC	+++	+++	++
PSA-DC	+++	+++	++

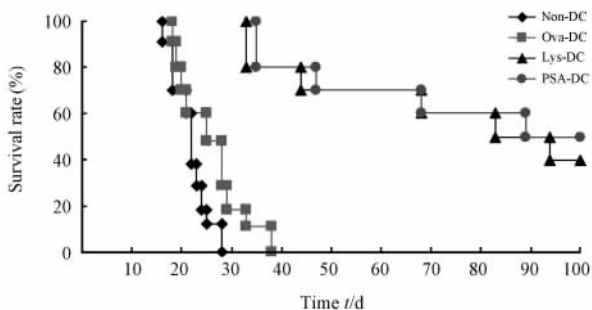


图 1 各组荷瘤裸鼠 Kaplan-Meier 生存曲线

Fig 1 Survival of nude mice in different groups

3 讨论

LNCaP 细胞是一种在裸鼠体内具有高成瘤率的人源前列腺癌细胞,是雄激素敏感、中等程度分泌 PSA 的前列腺癌细胞株,适合应用于雄激素依赖性前列腺癌中的研究,一般采取在裸鼠皮下和前列腺原位接种建立不同的前列腺癌动物模型^[5-6]。本研究采用裸鼠皮下接种的方法成功建立了 LNCaP 前列腺癌裸鼠模型,致瘤率达 90%。研究结果显示这种方法具有操作简单,肿瘤表浅,便于观察,成瘤期短,肿瘤生长速度较快等优点。

抗原特异性自体 CTL 具有肿瘤抗原特异性,存活时间长,且具有进一步增殖能力,可分泌细胞因子激活非特异性肿瘤免疫,并具有一定的免疫记忆功能;由于产生于体外,可有效打破肿瘤宿主的免疫抑制状态和肿瘤微环境存在的抑制因素,疗效显著^[7-9]。本研究发现负荷 PSA 或肿瘤细胞裂解物的成熟 DC 体外诱导产生的肿瘤特异性 CTL 经过继输入荷瘤裸鼠后,肿瘤生长缓慢,治疗组肿瘤体积明显小于各对照组($P < 0.001$),治疗组裸鼠生存期也高于各对照组($P < 0.01$)。裸鼠不具备 T 细胞免疫功能,4~6 周龄时裸鼠体内存在 B 细胞和 NK 细胞免疫缺陷,可以推测过继输入的治疗效果与外源性 PSA 特异性 CTL 对肿瘤细胞的杀伤抑制作用直接相关。负载无关抗原 DC(Ova-DC)诱导的 CTL 不具备杀伤 LNCaP 肿瘤活性,说明外源性 CTL 杀伤活性具有 PSA 特异性。肿

瘤病理变化提示外源性 PSA 特异性 CTL 可进入瘤体周围、瘤体内部杀伤肿瘤。研究结果表明,PSA 是前列腺癌免疫治疗的一个有效的靶向抗原;通过 PSA-DC 体外诱导产生的抗原特异性 CTL 具有明确的体内肿瘤细胞杀伤活性^[10]。

应该看到,PSA 特异性 CTL 在体内显著抑制表达 PSA 抗原的 LNCaP 肿瘤生长,但肿瘤并未完全消退。尽管我们采用了二次输注 CTL,但疗效有限,小鼠仍然是带瘤生存,肿瘤继续生长最终导致受鼠死亡^[7-9]。因此,后续研究仍需要针对上述问题进行改进,在不破坏 DCs 体内免疫调控功能,不增加 DC 瘤苗免疫原性的基础上进一步开发更有效的瘤苗。

[参考文献]

- [1] Tuyaerts S, Aerts J L, Corthals J, Neyns B, Heirman C, Breckpot K, et al. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56: 1513-1537.
- [2] Osada T, Clay T M, Woo C Y, Morse M A, Lyerly H K. Dendritic cell-based immunotherapy[J]. *Int Rev Immunol*, 2006, 25 (5-6): 377-413.
- [3] Shu S, Zheng R, Lee W T, Cohen P A. Immunogenicity of dendritic-tumor fusion hybrids and their utility in cancer immunotherapy[J]. *Crit Rev Immunol*, 2007, 27: 463-483.
- [4] 徐丹枫, 高 轶, 刘玉杉, 崔心刚, 车建平, 阴 雷, 等. 前列腺癌 PSA 特异性树突状细胞瘤苗的构建及其体外免疫活性的观察[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30: 265-270.
Xu D F, Gao Y, Liu Y S, Cui X G, Che J P, Yin L, et al. Construction of PSA specific dendritic cell vaccine and its *in vitro* immune activity[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2009, 30: 265-270.
- [5] Thalmann G N, Sikes R A, Wu T T, Degeorges A, Chang S M, Ozen M, et al. LNCaP progression model of human prostate cancer: androgen-independence and osseous metastasis [J]. *Prostate*, 2000, 44: 91-103.
- [6] Thalmann G N, Anezinis P E, Chang S M, Zhou H E, Kim E E, Hopwood V L, et al. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 2577-2581.
- [7] Selleck W A, Canfield S E, Hassen W A, Meseck M, Kuzmin A I, Eisensmith R C, et al. IFN-gamma sensitization of prostate cancer cells to Fas-mediated death: a gene therapy approach [J]. *Mol Ther*, 2003, 7: 185-192.
- [8] Pinthus J H, Waks T, Malina V, Kaufman-Francis K, Harmelin A, Aizenberg I, et al. Adoptive immunotherapy of prostate cancer bone lesions using redirected effector lymphocytes[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114: 1774-1781.
- [9] Zhou Y, Bosch M L, Salgaller M L. Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of antitumor immunity[J]. *J Immunother*, 2002, 25: 289-303.
- [10] Hildenbrand B, Sauer B, Kalis O, Stoll C, Freudenberg M A, Niedermann G, et al. Immunotherapy of patients with hormone-refractory prostate carcinoma pre-treated with interferon-gamma and vaccinated with autologous PSA-peptide loaded dendritic cells—a pilot study[J]. *Prostate*, 2007, 67: 500-508.