

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00265

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

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:** 构建前列腺癌 PSA 特异性树突状细胞 (PSA-DC) 瘤苗, 并观察其体外免疫活性, 为后续研究奠定基础。 **方 法:** 分离骨髓前体细胞, 大量制备骨髓 DCs (bone marrow derived DC, BMDC); 分别以 PSA、癌细胞裂解产物 (lysate, Lys)、无关蛋白卵清蛋白 (Ova) 冲击 DC 制备 PSA-DC、Lys-DC、Ova-DC 瘤苗。ELISA 法检测 PSA-DC 瘤苗培养上清中细胞因子 (IL-12 p70 和 IL-1 β) 水平的变化; 观察 PSA-DC 瘤苗刺激抗原特异性 T 细胞增殖活性和诱导抗原特异性 CTL 杀伤活性, 并与 Lys-DC、Ova-DC 瘤苗及未加入抗原冲击的 DC (Non-DC) 组作比较。 **结果:** 成功获得成熟 DC, 纯度可以达到 >95%。ELISA 法检测结果表明, PSA-DC、Lys-DC 和 Ova-DC 组培养上清中 IL-12 p70 和 IL-1 β 水平均较 Non-DC 组明显升高 ($P < 0.05$)。混合淋巴细胞培养 (MLR) 显示: PSA-DC、Lys-DC 组 DCs 刺激 CD4⁺ T 细胞增殖的能力明显优于 Ova-DC、Non-DC 组 ($P < 0.01$); PSA-DC、Lys-DC 组培养上清中 IL-2、IFN- γ 水平明显高于后两者 ($P < 0.01$), 而 IL-10 和 IL-4 水平下调 ($P < 0.05$)。PSA-DC、Lys-DC 组可产生针对 PSA 和肿瘤裂解物的 DTH 反应, 而对无关抗原无效 ($P < 0.05$)。与 OVA-DC、Non-DC 组相比, Lys-DC、PSA-DC 组体外诱导的 CTL 细胞对 LNCaP 细胞的杀伤活性较强 ($P < 0.05$), 且具有抗原特异性。 **结论:** 利用 PSA 蛋白冲击 DC 可成功制备 PSA 特异性 DC 瘤苗, 该瘤苗体外具有较强的免疫活性, 能有效杀伤 LNCaP 细胞。

[关键词] 树突细胞; 前列腺特异抗原; 前列腺癌; 癌症疫苗; 细胞毒性 T 淋巴细胞

[中图分类号] R 737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0265-06

Construction of PSA-specific dendritic cell vaccine and its *in vitro* immune activity

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

[ABSTRACT] **Objective:** To construct of PSA-specific dendritic cell (DC) vaccine and to observe its *in vitro* anti-tumour activity, so as to pave a way for future study. **Methods:** Bone marrow precursors were isolated and bone marrow derived DCs were prepared. Mature DCs were pulsed by PSA, Lysate of cancer cells, OVA and PBS to yield PSA-DC, Lys-DC, Ova-DC, and Non-DC, respectively. After primed by antigen, the changes of IL-12 p70 and IL-1 β in the supernatant of dendritic cells were assessed by ELISA. The antigen-specific proliferation and cytotoxicity activity of T cell-primed by PSA-pulsed DCs were observed and the results were compared with those by Lys-, Ova- and PBS-pulsed DCs. **Results:** Mature DCs were successfully derived from bone marrow cells with a purity higher than 95%. ELISA assay showed PSA-DC, Lys-DC and Ova-DC group secreted high levels of IL-12 p70 and IL-1 β than Non-DC group ($P < 0.05$). In addition, PSA-DCs and Lys-DCs had significantly stronger ability to stimulate the proliferation of CD4⁺ T cells in 3-day classic mixed lymphocyte reaction (MLR) compared with Ova-DCs and Non-DCs ($P < 0.01$). Higher levels of IFN- γ and IL-2 were detected in PSA-DCs and Lys-DCs groups compared with the other two groups ($P < 0.01$), whereas the levels of IL-10 and IL-4 were lower than the other two groups ($P < 0.05$). Moreover, PSA-DCs and Lys DCs enhanced DTH responses of C57BL/6 mice after antigen immunization; the third antigen and control did not show the enhancement effect ($P < 0.05$). To observe the *in vitro* anti-PSA CTL reactions induced by PSA-DCs and Lys-DCs, the LNCaP cell line (PSA specific) was used as syngeneic target and the E. G7 cell line (H-2^b) was used as Ova-specific target cells. Compared with Ova-DCs and Non-DCs, CTL cells induced by PSA-DCs, Lys-DCs had significantly enhanced antigen-specific CTL activity to LNCaP cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** DC-based PSA-epitope vaccine can be prepared by pulsing DCs with PSA protein; the prepared vaccine has strong *in vitro* immune activity and can kill LNCaP cells.

[收稿日期] 2008-07-20 **[接受日期]** 2008-12-05

[基金项目] 上海市科委基金(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 author). Tel: 021-81886999, E-mail: xu_danfeng@hotmail.com; Tel: 021-81886999, E-mail: egoep@163.com

[KEY WORDS] dendritic cells; prostate specific antigen; prostatic neoplasms; cancer vaccines; cytotoxic T-lymphocytes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(3): 265-270]

树突状细胞(dendritic cells, DCs)在免疫调控方面的中心作用引起了人们对以 DCs 为基础设计疫苗的关注^[1-2]。前列腺特异抗原(PSA)可限制性表达于前列腺癌细胞和正常前列腺上皮细胞,且具 HLA-A2 限制性,因此也成为前列腺癌免疫治疗的一个潜在的理想靶标^[3]。本研究通过体外大量扩增骨髓来源的 DCs,再分别以 PSA、癌细胞裂解产物(lysate, Lys)冲击 DC 制备前列腺癌 PSA-DC 瘤苗、全细胞抗原瘤苗(Lys-DC),并观察其体外免疫活性,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及细胞株培养

重组小鼠粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)购自先灵葆雅中国公司(效价 1.11×10^6 U/mg), IL-4 购自 Peprtech 公司(效价 5×10^6 U/mg)。细胞因子(IL-12、IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-2)ELISA 检测试剂盒购于 R&D 公司。淋巴细胞分离液 Ficoll-Hypaque 购自 Sigma 公司,密度 (1.077 ± 0.001) g/ml。生物级二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司。小鼠 FITC 连接的抗 I^ab 单抗、抗 CD40 单抗及小鼠 PE 连接的抗 B7.2 单抗和抗 CD11c 单抗购自 R&D 公司。EL-4 肿瘤细胞株(C57BL/6 来源于胸腺瘤, H-2^b)由 Gilboa 医生(Duke University, USA)馈赠。针对无关蛋白卵清蛋白(ovalbumin, Ova)特异性增生的 MF2.2D9 肿瘤细胞株为小鼠 EL-4T 杂交瘤细胞株来源,具备 MHC-II 方式(I^ab)限制性。E. G7 肿瘤细胞株(OVA 的 cDNA 经逆转录病毒载体转入 EL-4 肿瘤细胞株, H-2^b)。完全细胞培养液由 RPMI 1640 加入 10% 的灭活 FCS (购自 Gibco 公司)、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素配制。人前列腺癌细胞株 LNCaP 购自 ATCC 公司, PSA 融合蛋白由我们前期制备纯化所得。

1.2 骨髓来源 DC 的体外扩增和培养

8~12 周龄雄性 C57BL/6 小鼠(H-2^b)购于中国科学院上海实验动物研究所。无菌取 C57BL/6 小鼠股骨骨髓细胞,经 Tris-NH₄Cl 溶解红细胞,用包含大鼠抗小鼠 GK1.5 (抗 CD4 单抗)、B220/CD45R (抗 B 细胞单抗)、B21-2 (抗 I^a 单抗)、2.43 (抗 CD8 单抗)及 FcR 单抗混合性抗体加新鲜兔血清制作的低毒性补体在 37℃ 共孵育 45 min,以去除淋巴细胞和 I^a 阳性细胞。将收获的骨髓细胞用 RPMI 1640 洗 2 遍后,

按 1×10^6 细胞/ml 密度悬于含有重组 GM-CSF (终浓度为 25 ng/ml) 和 IL-4 (终浓度为 1 ng/ml) 的完全细胞培养液,于 100 mm 组织平皿(购于 Falcon 公司)进行贴壁,进一步去除单核细胞。3 d 后,轻轻晃动培养板,半量换液,加入半量含有等浓度重组 GM-CSF 和 IL-4 的新培养液。第 7 天,收集成簇生长的 DC 或经 Metrizamide (购于 Sigma 公司)梯度离心后收集。流式细胞仪 FACS (FACScan, Becton Dickinson 公司)分析 DC 的表型,纯度 $\geq 95\%$ 的成熟 DC 方能用于实验。

1.3 前列腺癌细胞株培养

LNCaP 细胞株在含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中置 37℃、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中孵育,每 3 d 更换培养液 1 次。倒置生物显微镜观察细胞贴壁生长情况。细胞生长至铺满瓶底时吸净上清液,0.25% 胰蛋白酶消化 5 min,振荡后加入含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液终止消化。收集细胞:将细胞悬液置离心管中,低速离心 ($15\ 000 \times g$),弃上清液,生理盐水漂洗 2 次后再次低速离心,弃上清液,加生理盐水混悬调整浓度,将培养细胞制成细胞悬液,重悬均匀后立即吸细胞少许,不稀释或加生理盐水后混匀。从血球计数板边缘滴 1 滴该细胞悬液,使之充满计数板和盖片间隙中,镜下计算四角大方格内的细胞数,按下列公式计算:细胞数/ml = (四大格细胞总数/4) \times 稀释倍数 $\times 10^4$ 。

1.4 全肿瘤细胞冻融抗原的制备

取对数生长期的肿瘤细胞 (2×10^7 /ml),用 0.25% 的胰酶消化 3~5 min 后终止消化,离心肿瘤细胞。PBS 冲洗 3 遍。细胞悬液装入冻存管,经 42℃ 水浴加热 1 h 后,60℃ 水浴继续加热 1 h。将冻存管迅速浸入液氮速冻,10 min 后取出,放入室温融化,反复 5 次。将肿瘤细胞裂解物加入 15 ml Falcon 离心管, $400 \times g$ 离心 20 min,收取上清。将含有肿瘤细胞冻融抗原的上清液经 0.2 μ m 一次性无菌过滤器过滤除菌。用 BCA 法测定蛋白浓度。将所制备的冻融抗原分装备用。

1.5 PSA、冻融抗原 DC 瘤苗的制备

收取培养至第 7 天的 DC,用含 10% FCS、重组 GM-CSF 25 ng/ml、重组 IL-4 1 ng/ml 的新鲜完全培养基调成 2×10^7 /ml 的细胞悬液,分别加入不同抗原共孵育 16 h, PBS 冲洗 3 次,加入 TNF- α 继续培养 DC,培养 32 h 后,收获成熟 DC 细胞。每组细胞加入 40 ml 无菌生理盐水, $200 \times g$ 离心 10 min 洗涤,连续 3 次。收集细胞即为抗原冲击

的DC。实验依据不同抗原成分冲击DC分为4组:(1)未加入抗原组(Non-DC);(2)10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ova蛋白冲击组(Ova-DC);(3)10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PSA融合蛋白冲击组(PSA-DC);(4)肿瘤裂解物(肿瘤细胞:DC=3:1)冲击组(Lysate-DC, Lys-DC)。

1.6 双向混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)检测抗原特异性增生

1.6.1 共培养 用含有PSA以及肿瘤裂解物100 μg 的弗氏完全佐剂0.2 ml经足垫免疫C57BL/6小鼠3次,时间分别为0、7、14 d,于第18天以同等剂量腹腔加强1次。于加强后的第3天,收获C57BL/6小鼠纯脾细胞,过尼龙毛柱收获T细胞,用CD4单抗包裹的磁珠分离CD4⁺T细胞,用作反应细胞。将C57BL/6来源的Non-DC、Ova-DC、PSA-DC和Lys-DC经3 000 rad放射线灭活(不灭活细胞留作双向MLR),用10%FCS的RPMI 1640培养基悬浮,用作刺激细胞。将刺激细胞加入96孔板(2×10^5 /孔),用10%FCS的RPMI 1640培养基补足200 μl 反应总体积,设3复孔。与反应细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂的饱和湿度条件下混合培养96 h。刺激细胞与反应细胞梯度比分别为1:2、1:5、1:10和1:20。于培养结束前18 h于每孔中加入 3.7×10^4 Bq [³H]-TdR(20 μl ,特异性比活性为 1.85×10^{11} Bq/mmol)。另于混合培养72 h,从每组培养细胞的姊妹孔收获上清100 μl ,冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$,留作细胞因子检测。

1.6.2 CD4⁺T细胞活力测定 培养结束后,用细胞收集器将细胞吸附在玻璃纤维滤纸上,生理盐水充分洗涤,洗去游离的[³H]-TdR。滴加5%三氯醋酸1~2 ml固定细胞,滴加无水乙醇脱水、脱色。将滤纸片烘干,用液闪计数器(购于Wallac公司)测量待测细胞的[³H]-TdR掺入。

1.6.3 ELISA检测细胞因子水平 按说明,分别用ELISA检测试剂盒对DC和CD4⁺T淋巴细胞的混合培养上清(MLR)中细胞因子IL-4、IL-10、IL-2和IFN- γ 的分泌进行测定。

1.7 DC瘤苗诱导DTH反应检测 于第0、12天,以各组 1×10^6 DC皮下接种于C57BL/6小鼠背部,于第7、14天在小鼠右足垫皮下接种用含有PSA以及肿瘤裂解物100 μg 的弗氏完全佐剂0.2 ml,左侧注射PBS作为对照。于第8、15天以千分尺测量皮垫厚度,计算肿胀程度(右侧足垫厚度减去左侧对照)。

1.8 体外DC瘤苗诱导抗原特异性CTL杀伤活性检测 收集上述各组DC,用PBS调整细胞密度为

$2 \times 10^6/\text{ml}$,于C57BL/6小鼠右肩背部分别皮下注射各组DC 0.2 ml或PBS 0.2 ml,7 d后处死小鼠,采用尼龙毛柱法分离脾脏T细胞。取LNCaP作为刺激细胞,以E. G7为刺激细胞对照,加入50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的丝裂霉素C,37 $^{\circ}\text{C}$ 灭活30 min。将脾脏T细胞和刺激细胞以10:1混合培养于24孔板,每孔加入重组IL-2(100 U/ml),于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5%CO₂孵育箱培养。收集共培养5 d的活T细胞作为效应细胞。将LNCaP细胞作为靶细胞,以E. G7为刺激细胞对照,靶细胞用 3.7×10^6 Bq的⁵¹Cr常温下标记30 min。将标记的靶细胞洗3遍,洗去残存的⁵¹Cr,以 5×10^3 个/孔的细胞密度接种于96孔板,然后,加入效靶比(E:T)为40:1、20:1和10:1的2倍稀释的效应细胞,每孔培养液终体积为200 μl 。设单一靶细胞、单一效应细胞及空白对照,共孵育4 h。经250 $\times g$ 离心1 min,收获100 μl 上清,特异性⁵¹Cr的释放用闪烁计数器进行 γ 射线测定。用1%NP40介溶细胞作最大释放。设最大释放孔为6复孔,自发释放孔为6复孔。特异性杀伤活性的计算公式如下:杀伤率(%)=[实验释放(cpm)-自发释放(cpm)]/[最大释放(cpm)-自发释放(cpm)]($1 \text{ cpm}=6.17 \times 10^8 \text{ Bq}$)。

1.9 统计学处理 统计学分析采用方差分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验比较处理前后是否有统计学差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 抗原冲击前后DC生物学特征变化

2.1.1 DC表型的变化 培养第5天CD40、CD80、CD86、I^a表达量较低,为未成熟DC。通过FACS分析,与正常第7天的DC相比,不同抗原成分冲击致敏和受到TNF- α 刺激后CD40、CD80、CD86、I^a表达均可见上调(表1)。用CD11c作为检测DC纯度的标志,发现DC的纯度可以达到>95%。

表1 不同抗原致敏和加入TNF- α 作用下DC表型的变化
Tab 1 Phenotype assay of DCs in different groups after antigen pulsing and supplementation of TNF- α

Group	CD40	B7.1	I ^a	B7.2
Non-DC	36.06	26.76	109.45	44.26
Ova-DC	57.67	44.26	451.50	68.54
Lys-DC	64.24	69.31	662.33	110.92
PSA-DC	72.13	54.42	493.43	112.16

2.1.2 DC分泌细胞因子的变化 ELISA法检测各实验组加入抗原或TNF- α 前后DC培养液上清中

细胞因子的变化,结果(图1)表明:Ova-DC、PSA-DC、Lys-DC组 IL-12 p70 和 IL-1 β 均较 Non-DC 组有明显的增加 ($P < 0.05$),Ova-DC、PSA-DC、Lys-DC 组间比较未见明显差异 ($P > 0.05$)。说明 DC 在接触抗原后,可被抗原信号刺激活化,并分泌 Th1 类细胞因子和前炎症细胞因子,通过这些细胞因子分泌进一步激活免疫反应,促进免疫应答。PSA-DC 组和 Lys-DC 组与 Non-DC 组相比,IL-2 水平也存在差别,但无统计学意义 ($P > 0.05$)。

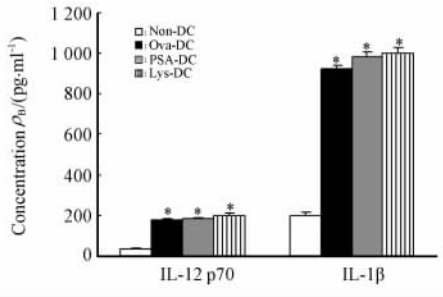


图1 抗原冲击各组 DC 细胞因子的分泌
Fig 1 Cytokine secretion by DCs pulsed by different antigens

* $P < 0.05$ vs Non-DC group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 抗原特异性混合淋巴细胞反应

2.2.1 T 淋巴细胞增殖反应 结果(图2)可见, Non-DC 尽管未经抗原刺激活化,但仍然具有刺激 T 淋巴细胞能力;而经活化的 Lys-DC、PSA-DC 刺激 CD4⁺T 淋巴细胞增殖的能力明显优于负荷无关抗原 Ova-DC 组 ($P < 0.01$),这一结果表明 DC 可诱导抗原特异性 CD4⁺T 淋巴细胞增殖。

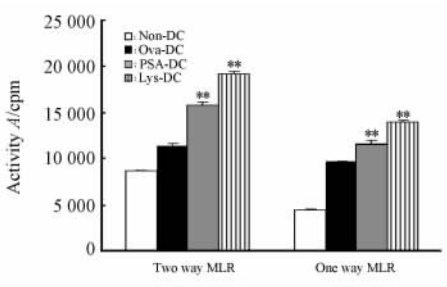


图2 抗原冲击各组 DC 诱导抗原特异性 T 细胞增殖反应
Fig 2 Mixed lymphocyte response(MLR) assay of DCs in different groups

** $P < 0.01$ vs Non-DC group; 1 cpm = 6.17×10^8 Bq; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2.2 培养上清细胞因子水平 结果表明,与 Non-DC、Ova-DC 组相比,Lys-DC、PSA-DC 组 Th1 亚群细胞因子 IL-2、IFN- γ 水平明显升高 ($P < 0.01$, 图3);Th2 亚群细胞因子 IL-10、IL-4 水平无变化(图3)。结果说明,Lys-DC、PSA-DC 可促进 Th1 亚

群的增生反应,诱导 CD4⁺T 细胞向 Th1 亚群偏移,而不是 Th2 亚群。PSA-DC 组刺激 CD4⁺T 细胞向 Th1 亚群偏移的能力较 Lys-DC 组稍强(图3),但无统计学差异 ($P > 0.05$),提示全抗原刺激 DC 活化的能力可能弱于单一特异性抗原。

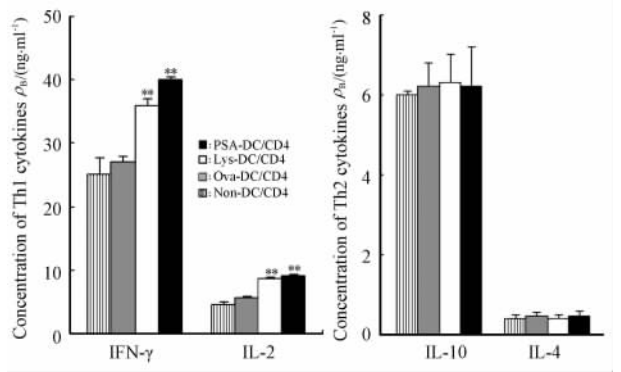


图3 MLR 增殖反应中各组 Th1、Th2 类细胞因子的分泌水平

Fig 3 Assay of Th1 and Th2 cytokines secretion in mixed lymphocyte response

between DCs of different groups with CD4⁺T cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Non-DC group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 DTH 反应 PSA-DC 和 Lys-DC 可体内致敏 T 淋巴细胞,引起针对肿瘤抗原的免疫反应(图4)。DTH 反应随着重复接种得到加强,可引起 80%~95% 的小鼠足垫明显水肿,而对无关抗原则无明显 DTH 效应 ($P < 0.05$)。

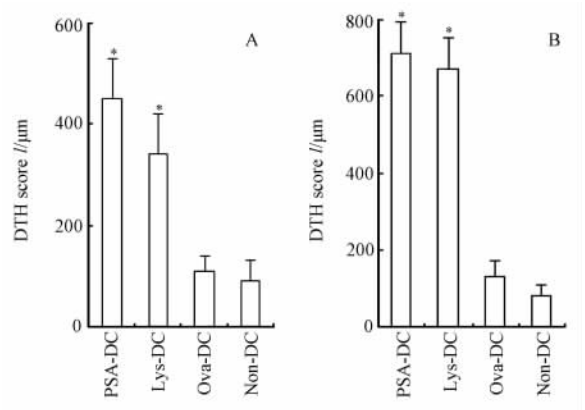


图4 首次(A)及加强(B)免疫接种条件下各组 DC 致敏小鼠体内产生的 DTH 反应

Fig 4 The first challenge (day7, A) and Second challenge (day14, B) DTH response immunized with DCs in different groups

* $P < 0.05$ vs Non-DC group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 抗原特异性 CTL 反应 与 Ova-DC、Non-DC 组相比,Lys-DC、PSA-DC 组体外诱导的杀伤性 T

细胞对 LNCaP 细胞显示出较强的杀伤活性 ($P < 0.05$, 图 5A)。PSA-DC、Non-DC 及 Lys-DC 组对 E. G7 细胞的 CTL 杀伤反应均较低, Ova-DC 组 CTL 杀伤 E. G7 活性明显高于前 3 组 ($P < 0.05$, 图 5B)。结果说明抗原冲击的 DC 在体外诱导 CTL 生成, 且具有抗原特异性。此特征提示特定抗原冲击制作的 DC 瘤苗体外具有杀伤分泌相关抗原的肿瘤细胞能力, 提示经此方法制作的瘤苗具有进一步应用前景。

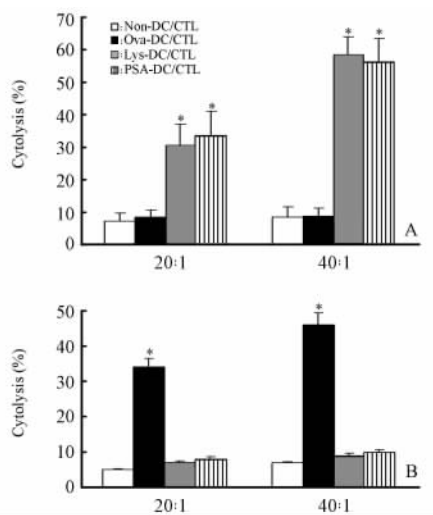


图 5 不同抗原冲击的 DC 体外诱导 CTL 杀伤 LNCaP(A)、E. G7(B) 细胞活性

Fig 5 CTL responses induced by different groups of Ag pulsed DCs to LNCaP(A) and E. G7 (B) cell line

* $P < 0.05$ vs Non-DC group; $n = 6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

与巨噬细胞、B 细胞等相比, DC 可以极其高效地摄取、处理、加工和提呈抗原。DCs 在天然免疫和获得性免疫中都发挥着极其重要的作用^[4], 能直接激活初始型 T 细胞^[5]。DCs 以 MHC I、II 类肽结合物的形式递呈抗原给 T 细胞受体 (TCR), 协同其表面共刺激分子 B7-1、B7-2、ICAM-1 和 CD40 等的表达, 和 T 细胞表面对应的配体 (如 CD40L) 相互交联激活 T 细胞。DCs 与 T 细胞结合后可分泌大量的 IL-12, IL-12 可强有力地诱导 T 细胞、NK 细胞和 LAK 细胞产生大量 TNF- γ 、穿孔素和颗粒酶, 增强 CTL、NK 对靶细胞的溶解作用^[6]。

本研究通过小鼠骨髓前体细胞, 在 GM-CSF + IL-4 作用下可以成功在体外培养、大量扩增 DCs。DCs 的表型检测和细胞因子分析以及细胞株检测抗原提呈功能等实验, 均证实为成熟 DCs。本研究证实与 Non-DC 组相比, PSA/Lys 冲击组 DC 分子表

面的 MHC I 类 (I^a)、CD80、CD40 表达水平明显升高 ($P < 0.05$), IL-12 细胞因子分泌水平升高 ($P < 0.05$)。

但应该看到, 多数肿瘤细胞的免疫原性弱, 不表达或低表达 MHC 类分子, 同时也缺乏共刺激分子的表达, 因而不能有效地激活 T 淋巴细胞, 这是肿瘤逃避免疫监视而生长转移的重要原因之一^[7]。有关研究^[8]也指出, 肿瘤微环境决定 DC 功能, 肿瘤抑制性微环境可调控 DCs 诱导 T 细胞无能或抑制 DCs 引发的肿瘤特异性反应。因此, 活化直接针对肿瘤的 DCs 可能不足以产生抗肿瘤效应。从肿瘤微环境以外培育针对肿瘤相关抗原 (tumor related antigen, TAA) 的活化 DCs 有可能改善抗肿瘤免疫反应。以肿瘤抗原冲击 DCs, 重新输入 DCs 可建立特异性肿瘤免疫^[9]。

本研究采用 PSA 和肿瘤裂解物作为抗原体外刺激 DCs 的方法, 将 DCs 与 PSA/肿瘤裂解物致敏的 CD4⁺ T 淋巴细胞作混合淋巴细胞培养 (MLR), 发现 PSA-DC、Lys-DC 组 DCs 可明显刺激 CD4⁺ T 细胞增殖, 而无关抗原 Ova-DC 和 Non-DC 组虽具刺激 T 细胞的能力, 但 T 细胞增殖水平明显低于前两组 ($P < 0.01$)。实验组 MLR 反应中培养上清中 Th1 型细胞因子 IL-2、IFN- γ 水平明显高于无关抗原 Ova-DC 和 Non-DC 组 ($P < 0.01$); 各组 Th2 型细胞因子 IL-10、IL-4 水平均处低水平。体内实验显示, PSA-DC、Lys-DC 可产生针对 PSA 和肿瘤裂解物的 DTH 反应, 无关抗原则无 DTH 效应 ($P < 0.05$)。本实验通过分泌 PSA 的 LNCaP 细胞和分泌 Ova 的 E. G7 肿瘤细胞作了杀伤对比实验, 发现与 Ova-DC、Non-DC 对照组相比, Lys-DC、PSA-DC 组体外诱导的 CTL 对 LNCaP 细胞显示出较强的杀伤活性 ($P < 0.05$); 而 Ova-DC 组 CTL 则具有明显的杀伤 E. G7 肿瘤细胞的能力 ($P < 0.05$)。

由于目前肿瘤特异性抗原或相关抗原得到明确鉴定的为数甚少, 因而予以瘤细胞全部抗原表位修饰 DC 成为最简便而有实效的一种方法^[10]。缺点是所需要的瘤细胞数量多, 非相关抗原量大且可能含有自身抗原, 易诱发自身免疫病^[11]。除 PSA 外, 前列腺细胞和前列腺癌细胞均能分泌前列腺酸性磷酸酶 (PAP) 和前列腺特异性膜抗原 (PSMA), 均可产生特异性针对前列腺细胞或癌细胞的主细胞免疫^[12]。但是, 单一表位的抗原多肽容易诱导免疫耐受, 若要诱导出高水平、持久的抗肿瘤免疫反应, 需反复多次体内致敏宿主。一个可能的策略是进一步研究新的 DCs 表面表达的目标分子为靶标。为此需

要建立 DCs 有关的抗原多肽库,以设计尽可能小的多肽仅限于结合 DCs 而不是其他细胞^[13-14]。

总之,本方法制备的 PSA/肿瘤裂解物 DC 瘤苗具有体外特异性抗前列腺癌活性。

(志谢 本研究得到张江高科技园区彭燕博士后、陈建鹤博士的大力支持和帮助,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

[1] Steinman R M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity[J]. *Annu Rev Immunol*,1991,9:271-296.

[2] Figdor C G, de Vries I J, Lesterhuis W J, Melief C J. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way[J]. *Nat Med*,2004,10: 475-480.

[3] Bismar T A, Demichelis F, Riva A, Kim R, Varambally S, He L, et al. Defining aggressive prostate cancer using a 12-gene model[J]. *Neoplasia*,2006,8:59-68.

[4] Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice M A, Lallas C D, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors[J]. *J Clin Invest*,2002,109: 409-417.

[5] Furumoto K, Soares L, Engleman E G, Merad M. Induction of potent antitumor immunity by *in situ* targeting of intratumoral DCs[J]. *J Clin Invest*,2004,113: 774-783.

[6] Fields R C, Shimizu K, Mul J J. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses *in vitro* and *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998,95:9482-9487.

[7] Zhang S, Zeng G, Wilkes D S, Reed G E, McGarry R C, Eble J N, et al. Dendritic cells transfected with interleukin-12 and

pulsed with tumor extract inhibit growth of murine prostatic carcinoma *in vivo* [J]. *Prostate*, 2003,55: 292-298.

[8] Wu J D, Higgins L M, Steinle A, Cosman D, Haugk K, Plymate S R. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer[J]. *J Clin Invest*,2004,114: 560-568.

[9] Evel-Kabler K, Song X T, Aldrich M, Huang X F, Chen S Y. SOCS1 restricts dendritic cells' ability to break self tolerance and induce antitumor immunity by regulating IL-12 production and signaling[J]. *J Clin Invest*, 2006,116: 90-100.

[10] Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang B K, Coleman D, Yancey D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells[J]. *J Clin Invest*,2005, 115: 3623-3633.

[11] Liu M, Acres B, Balloul J M, Bizouarne N, Paul S, Slos P, Squiban P. Gene-based vaccines and immunotherapeutics[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2004,101(Suppl 2): 14567-14571.

[12] Chang S S, Benson M C, Campbell S C, Crook J, Dreicer R, Evans C P, et al. Society of Urologic Oncology position statement: redefining the management of hormone-refractory prostate carcinoma[J]. *Cancer*,2005,103: 11-21.

[13] Salgaller M L, Lodge P A, McLean J G, Tjoa B A, Loftus D J, Ragde H, et al. Report of immune monitoring of prostate cancer patients undergoing T-cell therapy using dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific peptides from prostate-specific membrane antigen (PSMA)[J]. *Prostate*,1998,35:144-151.

[14] 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.

[本文编辑] 贾泽军

• 书 讯 •

《乳腺疾病钼靶 X 线诊断图谱》已出版

本书由韩本谊、陈允硕、赵亚娥等主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-823-7,16开,定价 98.00 元。

乳腺疾病尤其是乳腺癌的发病率快速上升,严重影响着女性身心健康。防治乳腺癌的最有效办法是早期诊断和早期治疗。乳房钼靶 X 线摄片不仅安全、简便、廉价,且诊断正确率高,是乳腺疾病检查或常规乳腺体检的最佳选择。

本书共分 14 章,包括钼靶 X 线的基本原理、乳腺的生长发育、各时期正常乳腺的图片特征、各种乳腺疾病(均由临床病理证实)的图片特点。资料收集历时数十年,内容详实,是放射科医师和乳腺外科医师不可多得的临床参考资料。

通讯地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595

<http://www.smmup.com>