

K-ras 抗原致敏的 DC 诱导 CTL 对胰腺癌体内杀伤活性的研究*

谭 广 徐 立^① 方艳秋^② 陶 钢^③ 王忠裕 谭 岩^②

摘要 目的:研究 K-ras 多肽的致敏树突状细胞(DC)活化的特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)对胰腺癌的体内外杀伤作用。方法:联合应用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和白细胞介素-4诱导培养外周血DC。表达 K-ras 突变体的胰腺癌细胞株全瘤、单纯 K-ras 突变体多肽和 K-ras 突变体表位肽阳离子纳米颗粒分别致敏 DC。致敏 DC 刺激 T 淋巴细胞得到肿瘤抗原特异的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。Patu8988、SW1990 细胞系制备荷瘤裸鼠模型评价 CTL 体内抗肿瘤活性。结果:负载全瘤抗原的 DC 其诱导产生的 CTL 对胰腺癌有较好的抑制,负载单纯 K-ras(12-Val)突变体多肽、K-ras(12-Val)突变体表位肽阳离子纳米颗粒的 DC 其诱导产生的 CTL 对表达 K-ras(12-Val)突变体阳性(Patu8988)的胰腺癌有较特异的抑制作用,而对 K-ras(12-Val)突变体阴性(SW1990)的胰腺癌的抑制作用与对照组比较无显著性差异。结论:负载肿瘤抗原的 DC 诱导的 CTL 可显著提高对荷瘤裸鼠的生存时间,抑制肿瘤的生长速度,并显示其可增加抗肿瘤特异性。

关键词 胰腺癌 树突状细胞 K-ras 多肽 细胞毒T淋巴细胞

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2010.08.001

Anti-tumor Effect of Specific Cytotoxic T Lymphocytes Activated by Dendritic Cells Pulsed with K-ras Antigen on Pancreatic Cancer

TAN Guang¹, XU Li², FANG Yanqiu³, TAO Gang⁴, WANG Zhongyu¹, TAN Yan³

Corresponding author: TAN Guang, E-mail: tanguang009@sina.com

¹Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China

²Department of General Surgery, The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China

³Central Laboratory of The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China

⁴The 210th Hospital of PLA, Dalian 116021, China

Grant support: National Natural Science Foundation of China (39470739)

Abstract **Objective:** To investigate the anti-tumor effect of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) activated by dendritic cells (DCs) pulsed with K-ras antigen. **Methods:** DCs were generated from PBMC in the presence of GM-CSF and IL-4 in vitro. DCs were sensitized with pancreatic cancer cell line expressing K-ras mutant, K-ras (12-Val) mutant peptide, K-ras (12-Val) mutant peptide with the surface of cationic nanoparticle. The mature DCs were cocultured with autologous T cells to obtain antigen specific CTL. The anti-tumor activity of CTL in vivo was evaluated in BALB/c nude mice bearing Patu8988 (K-ras+) and SW1990 (K-ras-) pancreatic cancer. **Results:** CTLs cocultured with DCs with the whole tumor antigen significantly inhibited the growth of transplanted pancreatic cancer (Patu8988 and SW1990) in nude mice. In vivo experiments showed that DCs with K-ras (12-Val) mutant peptide and K-ras mutant peptide with the surface of cationic nanoparticle induced killing activity of specific CTL against pancreatic cancer cell line Patu8988 (K-ras+) ($P<0.05$). **Conclusion:** CTL induced with DCs pulsed with K-ras antigen can significantly improve the survival of nude mice with pancreatic cancer, through inhibiting tumor growth.

Keywords Pancreatic cancer; Dendritic cells; K-ras peptide; Cytotoxic T lymphocyte

胰腺癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率占恶性肿瘤的1%~5%。胰腺癌在西方国家肿瘤的死亡率占第4位,在世界范围占第5位^[1]。由于其缺乏早期诊断方法,浸润生长,治疗措施有限,对放

疗及化疗不敏感,死亡率高^[2]。传统的治疗方法主要为手术,其5年生存率仅为1%~5%^[3],因此开展胰腺癌的其它治疗方法具有深远的意义。DC是目前已知的人体内功能最强大的抗原递呈细胞(antigen pre-

作者单位:大连医科大学附属第一医院普外二科(辽宁省大连市116011);^①吉林大学第二医院检验科;^②吉林大学第一医院中心实验室;^③解放军第210医院普外科

* 本文课题受国家自然科学基金资助(编号:30670624)

通讯作者:谭广 tanguang009@sina.com

senting cell, APC)^[4,5], DC 是当前抗肿瘤免疫治疗研究热点^[6]。现研究认为胰腺癌 K-ras 基因突变率约为 90%^[7], 这就为胰腺癌的早期诊断及免疫治疗提供了广泛的前景。本文探讨应用不同的抗原负载 DC 促进其成熟, 同时探讨其体外诱导特异性 CTL 对荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人胰腺癌细胞株 Patu8988 (含 K-ras 突变体)、SW1990 购于 ATCC; 阳离子多聚物 $\beta(1,4)$ -2-氨基-2-脱氧-D-葡聚糖购于 Sigma 公司; 人重组 GM-CSF、人重组 IL-4 购自 R&D 公司; 鼠抗人 CD80-PE、CD83-PE、CD86-PE、CD40-FITC、CD1a-FITC 单克隆抗体购于 Immunotech 公司; 胎牛血清(FCS)购于 Hyclone 公司; IMDM 培养基购于 Gibco 公司; K-ras 突变体表位肽 KLVVVGAGGVGKSALT 上海生工生物工程技术服务公司合成; BALB/c 裸鼠, 5~8 周龄, 雌性, 购于中国科学院上海动物中心, 在 SPF 级动物合格环境下饲养。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 胰腺癌细胞株 Patu8988、SW1990 培养于 37℃、5% CO₂ 含 10% 小牛血清的 IMDM 培养基中, 以 2% EDTA 胰酶消化。

1.2.2 肿瘤抗原制备 将人胰腺癌细胞株 Patu8988、SW1990 细胞调整为 2×10^7 /mL, 用液氮反复冻融 3 次, 离心 (100 000r/min) 5min, 过滤除菌, 备用。

1.2.3 K-ras 突变体表位肽阳离子纳米颗粒制备 阳离子多聚物 $\beta(1,4)$ -2-氨基-2-脱氧-D-葡聚糖 0.2% (w/v) 溶解于 25mM、pH 5.0 的醋酸钠溶液中, 加入化学合成的 K-ras 突变体表位肽 KLVVVGAGGVGK-SALT, 预热至 50℃~55℃, 磁力搅拌迅速振荡混匀, 过滤除菌, 备用。

1.2.4 分离单核细胞 取正常献血员空腹静脉血用淋巴细胞分离液分离单核细胞, 以含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基悬浮细胞, 终浓度为 2×10^6 /mL 于培养瓶内, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 2h 后, 洗去非黏附细胞; 收集黏附细胞备用。

1.2.5 mDC 诱导及抗原负载 上述黏附细胞按终浓度加入 rhGM-CSF 1 000 μ /mL、rhIL-4 500 μ /mL, 隔日加上述 1/2 浓度的细胞因子, 培养第 5d 分别加入: 1) 肿瘤细胞抗原 (瘤细胞与 DC 之比 1: 10); 2) 单纯 K-ras 突变体抗原表位肽 (2.5 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL); 3) K-ras 突变体抗原表位肽阳离子纳米颗粒 (2.5 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL)。于 37℃ 5% CO₂ 继续培养 2d, 加 TNF- α (10 μ g/mL), 继续培养 48h, 收集细胞。

1.2.6 流式细胞仪检测 DC 表面标志 收集细胞以 1 500r/min 离心 10min, 取细胞沉淀, PBS 液洗 3 次, 置 37℃ 孵育 30min, PBS 洗 1 次。加入 FITC-鼠抗人 CD80、CD83、CD86、CD1a、HLA-DR 及表面 K-ras 突变体肽, 以同种型荧光染色的 Ig 作为对照, 以 PBS 作为阴性对照。

1.2.7 成熟 DC 诱导的 CTL 细胞 外周血来自同一供血员。将 4mL 自体抗凝血加入 T 淋巴细胞分离液的离心管, 分层离心, 吸取单核细胞。将 2×10^5 /mL 的单核细胞分别与负载不同抗原的 DC 共同培养 5d, 去除贴壁细胞备用。

1.3 CTL 杀伤实验^[8]

1.3.1 动物实验 荷瘤小鼠模型的建立: 常规培养人胰腺癌细胞系 Patu8988、SW1990, 于对数生长期细胞用生理盐水制成 5×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 /0.2mL 的细胞悬液, 接种 5~8w 雌性 BALB/c 裸鼠背部皮下接种肿瘤细胞, 观察荷瘤裸鼠的存活时间。

1.3.2 实验分组 接种 10d 后随机分为 4 组, 每组 10 只, 1) 全抗原组, 每次注射全肿瘤抗原诱导的 CTL; 2) 阳离子肽组, 每次注射负载 K-ras 突变体抗原表位肽阳离子纳米颗粒诱导的 CTL; 3) 单纯肽组, 每次注射负载单纯 K-ras 突变体抗原诱导的 CTL; 4) 空白对照组, 每次注射生理盐水。腹腔注射, 从注射肿瘤第 10d 开始, 隔日 1 次共 10 次注射 2×10^6 个 CTL, 注射前测量肿瘤的长径 a 和横径 b, 按 $A=a \times b$, 估算肿瘤的大小。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对原始数据作方差齐性检验后作 t 检验和方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同抗原负载 DC 细胞表面分子标志的表达

肿瘤细胞全抗原负载 DC 的 CD1a、CD80、CD83、HLA-DR 表达水平明显高于成熟 DC ($P < 0.001$); 单纯 K-ras 突变体抗原表位肽与 K-ras 突变体抗原表位肽阳离子纳米颗粒负载的 DC 之间, 各组细胞表面标志的表达水平无明显差异 ($P > 0.05$); 肿瘤细胞全抗原负载 DC 的 CD1a、CD80、CD83、HLA-DR 表达水平明显高于单纯 K-ras 突变体抗原表位肽和 K-ras 突变体抗原表位肽阳离子纳米颗粒组 ($P < 0.05$); 单纯 K-ras 突变体抗原表位肽与 K-ras 突变体抗原表位肽阳离子纳米颗粒负载 DC 的 CD1a、CD80、CD83、HLA-DR 表达水平明显高于成熟 DC ($P < 0.05$); 但各组之间 CD86 的表达水平无显著性差异 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 流式细胞仪分析 DC 细胞上的 K-ras 突变体抗原表位肽提呈

当 K-ras 突变体抗原表位肽阳离子纳米颗粒为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,即可使 DC 提呈达到饱和状态,最高达 55.85%;单纯 K-ras 突变体抗原表位肽为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,才能使 DC 提呈达到饱和状态,最高达 48.4%。上

述结果表明,K-ras 突变体抗原表位肽阳离子纳米颗粒诱导 DC 负载抗原的能力优于单纯 K-ras 突变体抗原表位肽(图 1)。

表1 不同抗原负载DC细胞表面分子标志的分析 % , $\bar{x} \pm s$, $n=6$

分组	CD1a	CD80	CD83	CD86	HLA-DR
mDC 组	22.6 $\pm$ 3.6	49.4 $\pm$ 3.2	38.5 $\pm$ 4.6	72.6 $\pm$ 6.6	66.5 $\pm$ 4.6
DC(tumor, T:DC=1:10)组	55.2 $\pm$ 4.5	82.6 $\pm$ 4.9	76.3 $\pm$ 5.1	80.9 $\pm$ 5.7	93.2 $\pm$ 5.8
DC(K-ras+peptide, 10 $\mu\text{g/mL}$)组	35.1 $\pm$ 4.3	62.2 $\pm$ 5.8	51.1 $\pm$ 4.9	74.4 $\pm$ 5.2	82.4 $\pm$ 4.4
DC(K-ras+peptide-CNP, 5 $\mu\text{g/mL}$)组	38.4 $\pm$ 3.7	67.5 $\pm$ 4.7	58.4 $\pm$ 6.3	75.3 $\pm$ 4.8	86.1 $\pm$ 5.3

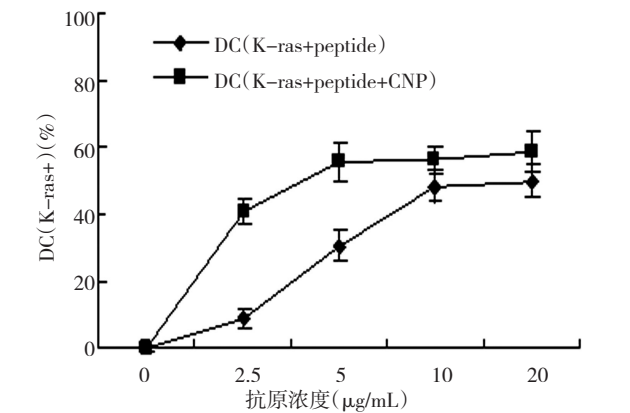


图1 不同浓度的 K-ras+ peptide 和 K-ras+ peptide-CNP 对 DC 负载抗原的影响
Figure 1 Effect of K-ras+ peptide and K-ras+ peptide-CNP on antigen loading of DCs

2.3 CTL 毒性实验检测
检测负载不同抗原的 DC 诱导的肿瘤特异性 CTL

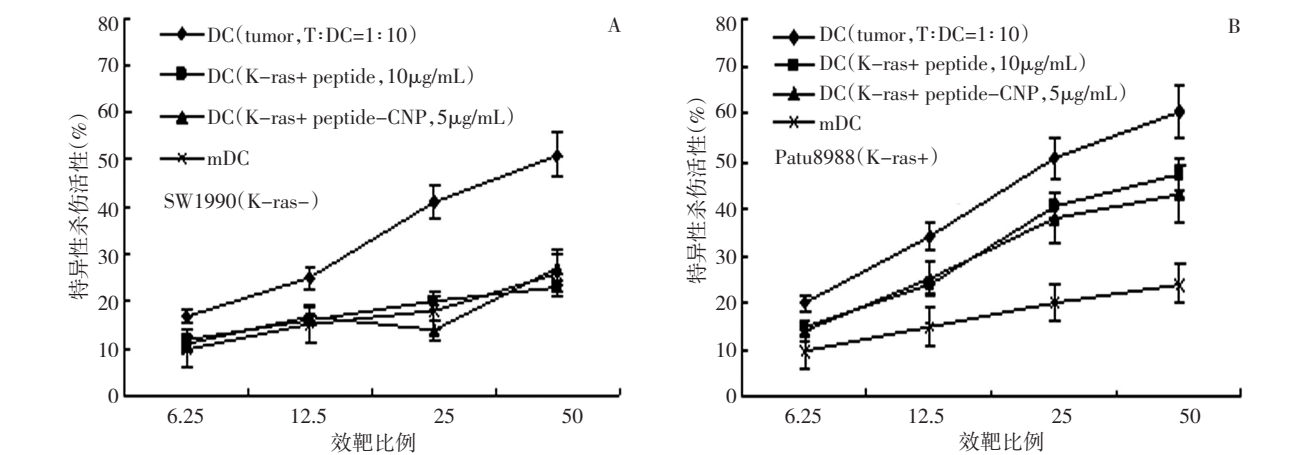


图2 负载不同抗原的 DC 诱导的 CTL 对 A:SW1990(K-ras-)和 B:Patu8988(K-ras+)细胞的特异性杀伤作用
Figure 2 Effect of DC loading different antigens on induction of tumor-specific CTL cytotoxicity against SW1990 (A) and Patu8988 (B) cells in vitro

2.4 不同浓度瘤细胞对裸鼠存活时间的影响
分别将 5 $\times 10^6$ 、1 $\times 10^7$ 、2 $\times 10^7$ /0.2mL 的 Patu8988、SW1990 肿瘤细胞悬液接种于裸鼠背部皮下,观察对

裸鼠的存活时间的影响(图 3,4)。实验结果可见,随着接种肿瘤细胞数的增加,裸鼠的存活时间明显缩短,接种 Patu8988 及 SW1990 在 1 $\times 10^7$ 个肿瘤细胞组,

荷瘤鼠的平均存活时间高于30d,适合本实验的条件,以后实验均选用这一条件。

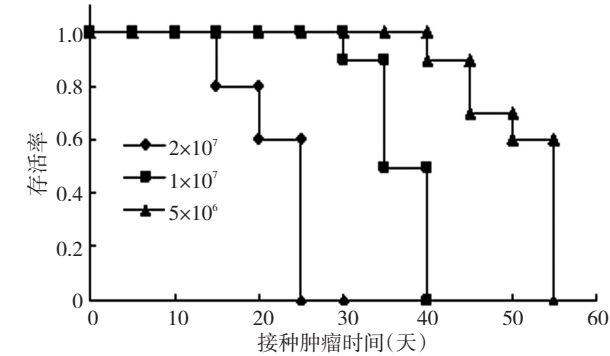


图3 皮下接种Patu8988细胞对BALB/C裸鼠存活时间的影响
Figure 3 Survival of BALB/C nude mice inoculated subcutaneously with Patu8988 cells

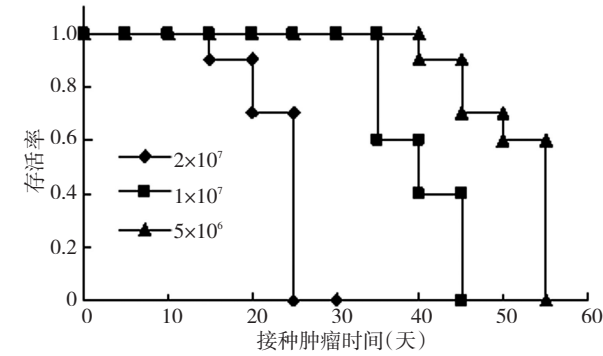


图4 皮下接种SW1990细胞对BALB/C裸鼠存活时间的影响
Figure 4 Survival of nude mice inoculated subcutaneously with SW1990 cells

2.5 负载不同肿瘤抗原诱导的CTL对荷瘤裸鼠肿瘤生长速度的影响

将 2×10^6 个不同抗原负载DC诱导的肿瘤特异性CTL细胞腹腔注射荷瘤裸鼠,观察对荷瘤裸鼠肿瘤的生长速度的影响。观察第30d荷瘤(Patu8988)鼠的肿瘤直径,其中全抗原组、阳离子肽组、单纯肽组治疗组与对照组的肿瘤直径分别为 (12.69 ± 4.5) mm、 (17.1 ± 2.5) mm、 (22.1 ± 3.7) mm、 (32.6 ± 3.0) mm,各组之间比较有显著性差异($P < 0.05$)。荷SW1990肿瘤裸鼠,第30d全抗原组、阳离子肽组、单纯肽组治疗组、对照组的肿瘤直径分别为 (17.06 ± 4.5) mm、 (27.7 ± 2.5) mm、 (28.0 ± 3.7) mm、 (31.6 ± 3.0) mm,全抗原组与其它各组相比有显著性差异($P < 0.05$),其余各组之间无差异($P > 0.05$)。上述两组实验结果说明,K-ras突变体抗原表位肽诱导的CTL能够特异性地抑制Patu8988(K-ras+)在荷瘤裸鼠体内的生长速度。

2.6 负载不同肿瘤抗原诱导的CTL对荷瘤裸鼠肿瘤存活时间的影响

应用不同抗原负载DC诱导的CTL 2×10^6 细胞腹腔注射,观察对荷瘤裸鼠存活时间的影响。对荷瘤

(Patu8988)存活时间的影响见图5,全抗原组、阳离子肽组、单纯肽组与对照组相比有显著性差异($P < 0.01$),小鼠存活时间明显延长,其中全抗原组延长最为明显,与另其它两组相比有显著性差异($P < 0.05$),阳离子肽组与单纯肽组两组之间无显著性差异($P > 0.05$)。对荷瘤(SW1900)存活时间的影响见图6,全抗原组与阳离子肽组、单纯肽组及对照组相比,小鼠存活时间明显延长($P < 0.01$),其它各组之间无显著性差异($P > 0.05$)。上述两组实验结果说明,应用K-ras突变体抗原表位肽诱导的CTL能够明显延长Patu8988(K-ras+)荷瘤裸鼠的存活时间。

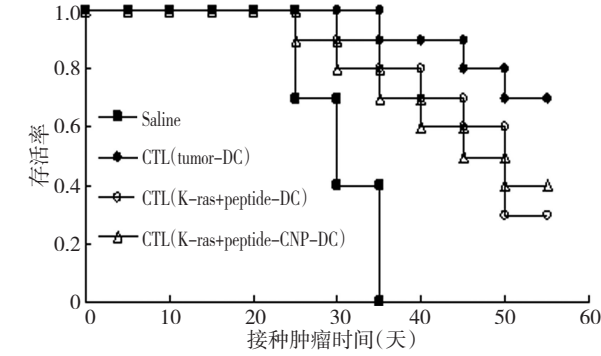


图5 负载不同抗原的DC诱导肿瘤特异性CTL对荷瘤(Patu8988-K-ras+)裸鼠存活时间的影响
Figure 5 Survival of nude mice inoculated subcutaneously with Patu8988 cells after immunotherapy with DC loading different antigens induced CTLs

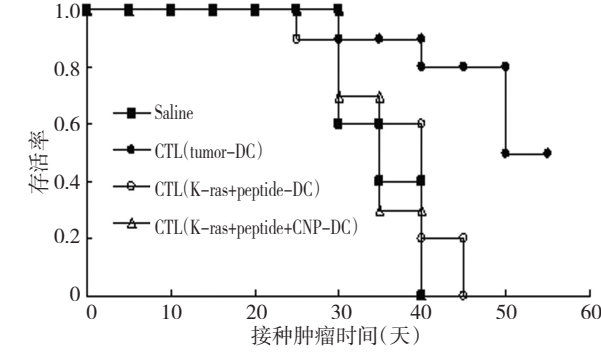


图6 负载不同抗原的DC诱导肿瘤特异性CTL对荷瘤(SW1990-K-ras-)裸鼠存活时间的影响
Figure 6 Survival of athymic mice inoculated subcutaneously into the back with SW1990 cells after immunotherapy with CTLs induced by DC loading different antigens induced CTLs

3 讨论

正常情况下体内大部分DC处于非成熟状态,表达较低水平的共刺激因子和黏附因子,但其具有极强的抗原吞噬能力,在受抗原或某些因素刺激时即可分化为成熟DC,获得高表达共刺激因子和黏附因子。

DC细胞在针对肿瘤治疗时往往需要在体外进行不同形式的修饰,如裂解的肿瘤抗原、抗原多肽、肿

瘤核酸致敏、凋亡的肿瘤细胞、细胞因子的修饰、热休克蛋白等,以活化 DC 细胞,提高其抗原提呈能力从而提高机体的抗肿瘤能力,有些方法已应用于临床试验阶段^[9]。

本实验应用三种不同的抗原负载于 DC,其表面成熟分子表达增加,诱导的 CTL 对靶细胞的杀伤能力增强。体外三种抗原诱导的 CTL 都能够有效地杀伤靶细胞,且 K-ras 突变体抗原表位肽阳离子纳米颗粒和单纯 K-ras 突变体抗原肽致敏的 CTL 对靶细胞的特异性更强,K-ras 突变体抗原表位肽阳离子纳米颗粒致敏优于单纯 K-ras 突变体抗原肽。体内试验显示,抗原负载的 DC 诱导的 CTL 可明显延长荷瘤裸鼠的存活时间,降低肿瘤的生长速度,具有明显的抑瘤作用,并且这种抑瘤作用具有抗原特异性。目前应用特异的肿瘤抗原肽致敏的 DC,在前列腺癌、黑色素瘤、恶性淋巴瘤、结直肠癌中已取得了疗效,是有广泛前景的免疫治疗方法^[10]。本研究的体内、外实验结果也支持这种观点,为今后胰腺癌 DC 疫苗的研制奠定了基础。

参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007[J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1): 43-66.
- 2 Chiang KC, Chen TC. Vitamin D for the prevention and treatment of pancreatic cancer[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(27): 3349-3354.
- 3 郭俊超,赵玉沛.多药耐药基因与胰腺癌化疗[J].胰腺病学,2002,2(4): 247-249.
- 4 Ridolfi R, Riccobon A, Galassi R, et al. Evaluation of in vivo labelled dendritic cell migration in cancer patients[J]. J Transl Med, 2004, 2(1): 27-37.
- 5 安秀梅,赵 华,任秀宝.耐受型树突状细胞的研究进展[J].中国肿瘤临床,2009,36(16):953-956.
- 6 韩 霖,孙早喜.胰腺癌的树突状细胞治疗研究进展[J].中国热带医学,2008,8(2):317-318.
- 7 Koorstra JB, Hustinx SR, Offerhaus GJ, et al. Pancreatic carcinogenesis[J]. Pancreatology, 2008, 8(2): 110-125.
- 8 方艳秋,谭 岩,段秀梅,等.IL-18在体外培养系统中诱导肿瘤快速杀伤效应及肿瘤特异性 CTL[J].免疫学杂志,2004,20(4):251-255.
- 9 Escobar A, López M, Serrano A, et al. Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients[J]. Clin Exp Immunol, 2005, 142(3): 555-568.
- 10 Begley J, Ribas A. Targeted therapies to improve tumor immunotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(14): 4385-4391.

(2009-10-28 收稿)

(2009-11-25 修回)

(杨红欣校对)

《中国肿瘤临床》编辑部诚聘审稿专家

《中国肿瘤临床》系中国科协主管,中国抗癌协会主办,天津医科大学附属肿瘤医院、肿瘤研究所承办与出版的全国性期刊。创刊于 1963 年 3 月,是全国创刊最早的肿瘤学术刊物,有着悠久的学术和人文底蕴。40 多年来,期刊始终严格遵循求实、求精、求快的办刊原则,体现引导创新、关注前沿、突出临床、讲求实用的办刊特色,不断缩短刊期,于 2004 年改为半月刊。目前稿件来源更加丰富,数量和质量不断提高。为了缩短稿件的平均周转时间,保证文章的时效性,本刊编辑部决定扩大审稿专家的规模,特向全国公开招聘优秀审稿专家,以适应期刊的发展。

凡符合以下条件者,请下载并填写表格(下载网址:www.cjco.cn),同时将您的个人简历一起通过电子邮件发送到编辑部邮箱(cjco@cjco.cn),务必详细说明您擅长审阅的专业范围。

审稿专家的基本条件:1)热爱审稿工作。2)具有副高及以上职称,或者已获博士学位的中级职称人员。3)能够及时审阅稿件,并按时寄回编辑部。

您的材料经审核录用后,您将会收到我刊向您颁发的审稿专家证书。同时,您将享受以下待遇:1)您撰写的论文免收处理费。2)您推荐的论文只送一审,您的意见可以作为编委会定稿讨论的参考。3)每期赠送杂志一册。