

rhHSP70 联合 Mage-3 抗原肽修饰树突状细胞诱导的抗乳腺癌作用

李 斌¹⁾, 陈 鹏²⁾, 郑建云³⁾

(1) 西安医学院附属医院肿瘤外科, 陕西 西安 710077; 2) 西安医学院生化教研室, 陕西 西安 710021; 3) 西安医学院附属医院病理科, 陕西 西安 710077)

[摘要] **目的** 探讨利用 rhHSP70 联合 Mage-3 抗原肽修饰树突状细胞递呈肿瘤抗原的特性增强抗乳腺癌的作用. **方法** 利用 GM-CSF 和 IL-4 诱导外周血单个核细胞产生树突状细胞, 负载 Mage-3 抗原肽的同时加入新型热休克蛋白 (Hsp70L1), 不同分组分别诱导自体 CTLs 产生. ELISA 测定细胞因子的分泌和 CTLs 杀伤活性. **结果** Mage-3 抗原肽致敏的 DCs 增加 CTLs 增殖, 上调细胞因子 TNF- α 、IL-6 的分泌; Mage-3 抗原肽致敏的 DCs 诱导的 CTLs 淋巴细胞对人乳腺癌细胞 MCF-7 有明显杀伤效应, 并以 rhHSP70 联合 Mage-3 抗原肽组最为明显, 能显著上调细胞因子 TNF- α 、IL-6 的分泌与增强 CTLs 对肿瘤细胞的杀伤率. **结论** rhHSP70 联合 Mage-3 抗原修饰的 DCs 生物活性增强, 能刺激淋巴细胞的增殖, 使细胞因子的分泌量提高. rhHSP70 联合 Mage-3 抗原修饰的 DCs 诱导的 CTLs 杀乳腺癌细胞作用明显增强.

[关键词] 乳腺癌; T 淋巴细胞; 热休克蛋白; 树突状细胞

[中图分类号] R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 08 - 0036 - 04

Dendritic Cells Pulsed with Recombinant Human Hsp70 and Mage -3 Peptide from Breast Cancer Induce Specific Anti-tumor Immune Responses

LI Bin¹⁾, CHEN Peng²⁾, ZHENG Jian - yun¹⁾

(1) Dept. of Oncology Surgery, The Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an Shaanxi 710077; 2) Dept. of Biochemistry, Xi'an Medical College, Xi'an Shaanxi 710021; 3) Dept. of Pathology, The Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an Shaanxi 710077, China)

[Abstract] **Objective** To make use of the characteristics of presenting and processing tumor antigen of Dendritic cells pulsed with recombinant human Hsp70 and Mage -3 peptide to enhance killing capability of breast neoplasms. **Methods** Autologous dendritic cells were isolated from PBMC and then stimulated in vitro with GM-CSF and IL-4. Dendritic cells were loaded with Mage -3 peptide; at the same time Hsp70L1 was added. The specific groupings each induce generation of tumor specific cytotoxic assay with ELISA. Results DCs pulsed with Mage -3 peptide enhanced the growth expansion of CTL, and promoted the secretion of cytokines such as TNF- α and IL-6. DCs pulsed with recombinant human Hsp70 and Mage -3 peptide had cytotoxicity against human breast cancer cells MCF-7. **Conclusions** DCs pulsed with recombinant human Hsp70 and Mage -3 peptide have higher biological activities. Modified DCs can stimulate the proliferation of lymphocytes, present effectively tumor antigen to stimulate generation of specific CTLs. Dendritic cells pulsed with recombinant human Hsp70 and Mage -3 peptide have high ability to kill breast cancer cells.

[Key words] Breast cancer; T lymphocytes; Heat shock protein; Dendritic Cells

[基金项目] 陕西省教育厅科研基金资助项目 (2010JK806); 西安医学院校级科研基金资助项目 (2007FZ11)

[作者简介] 李斌 (1975~) 男, 陕西富平县人, 硕士、讲师、主治医师, 主要从事肿瘤免疫治疗工作.

乳腺癌是危害妇女健康的主要恶性肿瘤, 占女性所有肿瘤的 18%。由于抗原呈递细胞功能低下导致免疫逃逸是肿瘤发生发展的一个重要原因, 肿瘤的免疫治疗就是利用特定的抗原激发自身体内免疫反应来杀伤肿瘤细胞。树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 是目前已知最强的抗原递呈细胞, 是机体内免疫反应的始动子和调节子^[1]。黑素瘤相关抗原 3 (melanoma-associated antigen 3, MAGE-3), 属于黑素瘤相关抗原家族 (melanoma-associated antigen family, MAGE family), 在上皮细胞来源的多种肿瘤细胞表面都有不同程度的表达, 是肿瘤免疫治疗的理想靶抗原。目前, 针对 MAGE-3 抗原的 DC 肿瘤疫苗研究已经广泛开展, 并取得了一定的临床疗效^[2,3]。热休克蛋白 70 (heat shock protein70, HSP70) 是一类重要的抗原呈递分子, 可以结合肽并对 DC 具有高亲和力^[4,5]。联合应用免疫佐剂 HSP70, 能使小分子量的肽能够很好地被提呈给 DC。本研究 rhHSP70 联合 Mage-3 抗原肽修饰树突状细胞诱导的抗乳腺癌的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及主要仪器

重组人粒细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 与重组人白细胞介素 4 (rhIL-4), 购自美国 Cytolab 公司; CD80-FITC、CD83-PC5、HLA-DR 购自美国 Coulter 公司; 人 TNF- α 、IL-6 和新型热休克蛋白 Hsp70L1 (深圳晶美生物工程有限公司); 淋巴细胞分离液 (Ficoll-Hypaque), 天津生物; 四甲基偶氮唑盐 (MTT), 天津灏扬生物有限公司。Mage-3 多肽片段合成: 多肽 269~277 肽段 YEFLWGPR, 由深圳市宇生物工程有限公司合成, 纯度为 97.0%。倒置显微镜, 日本奥林巴斯公司; 流式细胞仪, 美国贝克曼公司。

1.2 肿瘤细胞系

人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞系, 购自中国上海研晶细胞生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 DCs 的体外诱导扩增 健康女性志愿者, 取外周抗凝静脉血 100 mL, 加等量 0.01 MPBS, 均匀混合, 缓慢加入已加入 20 mL 淋巴细胞分离液的刻度离心管, 水平离心, 吸取界面层细胞, 即为单个核细胞 (PBMC), 静止培养, 2 h 后吸走未贴壁的 PBMC 待用 (供分离淋巴细胞用), 留下贴壁细胞, 加入含 rhGM-CSF (50 μ g/mL) 和 rhIL-4 (10 μ g/mL) 的培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中

培养, 在培养的第 2、4、6 天用含上述成分的培养体系半量换液。培养 6 d, 收集细胞的细胞即为未致敏 DCs。

1.3.2 MCF-7 人乳腺癌细胞 MCF-7 乳腺癌细胞常规培养。

1.3.3 DCs 的修饰 收集培养 6 d 未致敏的 DCs, 置入 6 孔细胞培养板中, 分为记为 A 组、B 组、C 组、D 组共 4 组 (DCs 的终浓度为 5×10^5 /mL); A 组: 单独 DCs, 作为对照组; B 组: DCs+Mage-3 抗原, 作为 Mage-3 抗原肽致敏 DCs 组; C 组: DCs+Mage-3 抗原 +Hsp70L1, 作为 rhHSP70 联合 Mage-3 抗原肽修饰 DCs 组; D 组: DCs+Hsp70L1。所加肿瘤 Mage-3 抗原蛋白浓度为 100 μ g/mL, Hsp70L1 浓度为 1 mg/mL。于 6 孔板中继续培养。在倒置显微镜下观察细胞形态。

1.3.4 DCs 细胞表型分析 于培养第 8 d, 收集上述处理后 4 组的部分 DCs, 用流式细胞仪检测 FITC 标记的鼠抗人的 CD80, CD83, HLA-DR 抗体。

1.3.5 CTLs 分泌细胞因子的检测 按 ELISA 检测试剂盒所示方法测定上述不同分组的 DCs 诱导的 CTLs 上清中细胞因子含量。

1.3.6 细胞毒试验 取对数生长期的 MCF-7 乳腺癌细胞为靶细胞, 上述 4 组刺激培养诱导的 T 淋巴细胞作为效应细胞, 4 组 CTLs 分别同 OD549 细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞共培养。靶细胞 1×10^3 /孔, 按不同效靶比 (10:1, 20:1, 50:1) 加入效应细胞, 充分混合, 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度孵育 24 h, 加入 5 mmol MTT 10 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 加入 0.04 mmol 酸化异丙醇后过夜, 使其充分裂解。在酶标仪上读出各实验组的 OD 值, 计算其对乳腺癌细胞的杀伤率。

1.4 统计学处理

用 SAS8.0 软件包进行数据处理, 实验结果数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表述。单反应变量数据, 用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 及组间两两比较 (Student-Newman-Keuls 法) 进行数据分析, 差异水平 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DCs 的产生

分离的外周血单个核细胞在倒置显微镜下培养初期可见散在圆形贴壁细胞, 表面光滑; 培养 24 h 后可见有少数细胞悬浮; 3~4 d 悬浮细胞增多, 聚

集成团, 细胞体积增大, 形态不规则, 胞体表面出现短突. 培养 6~7 d 时细胞数目明显增多, 体积增大, 呈多边形, 长的突起增多, 呈集落样生长. 与肿瘤抗原共孵育后, 可观察到 DC 细胞体积增大, 突起增多增长. 细胞表型变化显示, 抗原刺激后, 树突细胞表达成熟 DC 特征性标志 CD80, CD86, HLA-DR 分子均明显增加. 结果显示, Mage-3 (B 组)、Hsp70L1 (D 组) 以及 Mage-3+Hsp70L1 (C 组) 均可刺激 DCs 的 CD80、CD83、HLA-DR 分子表达增加, 整体上来说, 刺激强度依次为 Mage-3+Hsp70L1 (C 组) > Mage-3 (B 组) > Hsp70L1 (D 组), 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1.

2.2 DCs 上清液中细胞因子的分泌量

采用 ELISA 法检测, 按照试剂盒说明书, 检测上述 4 组 DCs 培养液上清中细胞因子的量, 实

验进行操作, 每组试验均重复 3 次结果见表 2. 结果表明, Mage-3 (B 组)、Hsp70L1 (D 组) 以及 Mage-3+Hsp70L1 (C 组) 均可刺激 DCs 分泌两种细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的增加, 与单独 DCs (A 组) 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 刺激强度依次为 Mage-3+Hsp70L1 (C 组) > Mage-3 (B 组) > Hsp70L1 (D 组), 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2.

2.3 DCs 呈递 Mage-3 抗原诱导产生 CTLs 细胞毒活性的测定

结果显示, Mage-3+Hsp70L1 (C 组) 诱导的 CTLs 对 A549 细胞杀伤率高于其它三组, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); DCs (A 组) 与 DCs+Hsp70L1 (D 组) 对 A549 细胞杀伤率相当, 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3.

表 1 修饰 DCs 前后细胞表型的变化 [% , ($\bar{x} \pm s$)]

Tab. 1 The phenotypic variation of DCs after modification [% , ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	CD80	CD83	HLA-DR
A 组	10	33.8 \pm 3.1 [#]	10.9 \pm 3.4 [#]	31.97 \pm 2.8 [#]
B 组	10	63.5 \pm 3.6 ^{*#}	61.0 \pm 6.9 ^{*#}	53.3 \pm 2.9 ^{*#}
C 组	10	72.9 \pm 6.2 [*]	81.7 \pm 6.2 [*]	72.4 \pm 3.0 [*]
D 组	10	45.9 \pm 5.2 ^{*#}	57.1 \pm 5.9 ^{*#}	41.4 \pm 5.5 ^{*#}

与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, [#] $P < 0.05$.

表 2 抗原冲击 DCs 前后细胞因子的分泌 [pg/mL, ($\bar{x} \pm s$)]

Tab. 2 The cytokines secretion of DCs after the antigen-pulsing [pg/mL, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	IL-6	TNF- α
A 组	10	42.1 \pm 4.8	117.5 \pm 9.6
B 组	10	125.9 \pm 8.2 ^{*#}	1 713.0 \pm 17.6 ^{*#}
C 组	10	168.5 \pm 8.4 [*]	3 049.6 \pm 32.8 [*]
D 组	10	108.9 \pm 9.3 ^{*#}	1 855.5 \pm 8.7 ^{*#}

与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, [#] $P < 0.05$.

表 3 不同靶靶比下各组 CTLs 对肿瘤细胞的杀伤百分率 [% , ($\bar{x} \pm s$)]

Tab. 3 The killing percentage of tumor cells induced by CTLs in different target groups [% , ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	10:1	20:1	50:1
A 组	10	10.21 \pm 2.58	14.21 \pm 3.32	12.40 \pm 3.20
B 组	10	49.95 \pm 3.64 ^{*#}	48.17 \pm 7.61 ^{*#}	55.95 \pm 7.80 ^{*#}
C 组	10	62.60 \pm 6.42 [*]	67.56 \pm 6.13 [*]	74.34 \pm 6.52 [*]
D 组	10	11.76 \pm 1.83	15.42 \pm 2.52	13.82 \pm 3.86

与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, [#] $P < 0.05$.

3 讨论

树突状细胞是体内最强的专职抗原递呈细胞^[4,5],

具有独特的抗原递呈和免疫激发作用, 是介导 T 淋巴细胞抗肿瘤效应的中心环节^[6]. 以此为基础的肿瘤疫苗在一些肿瘤治疗中获得了较好疗效^[7-9]. MAGE 是肿瘤特异性抗原, MAGE 家族类肿瘤表面

标志物能被用于早期发现肿瘤细胞, 并针对该类抗原进行特异性的免疫治疗, 是肿瘤免疫治疗的理想靶抗原^[10,11].

本实验中负载 Mage-3 抗原的 DC 细胞表型变化显示, 抗原刺激后, 树突细胞成熟加快. 抗原刺激后 DCs 上清液中细胞因子 TNF- α 、IL-6 分泌的量明显增多, 并以 DCs+Mage-3+Hsp70L1 组最为明显. 表明 DC 能将 Mage-3 抗原提呈给 T 淋巴细胞, 而 Hsp70L1 作为免疫佐剂, 能结合小分子肽, 又对 DC 细胞具有高度亲和力, 能明显增强 DCs 负载 Mage-3 抗原的能力, 促进 DCs 成熟, 提高细胞因子的分泌, 从而诱导更强烈的免疫应答反应^[12].

在本实验中 Mage-3 抗原肽冲击的能对乳腺癌细胞产生特异性杀伤 (杀伤率 E/T50:1 时为 55.95%), 加入免疫佐剂 Hsp70L1 后, 杀伤效果进一步增强 (杀伤率 E/T50:1 时为 74.34%), 结果证实负载 Mage-3 抗原肽的 DCs 诱导的 CTL 能对肿瘤细胞产生特异性杀伤, 而 Hsp70L1 能诱导多克隆 CTLs 活化, 从而进一步提高杀伤效果. 但发现 DCs+Hsp70L1 (D 组) 组虽然可有效致敏 DCs 诱导特异性 T 细胞表型变化, 提高 CTLs 分泌细胞因子, 但对肿瘤细胞无特异性杀伤作用. 说明只是发挥其免疫佐剂作用, 其增强 DCs 抗肿瘤能力的机制可能与其促进 DCs 成熟有关. 热休克蛋白的诱导的免疫放大效应已经在多个临床试验中得到验证^[13,14].

肿瘤的免疫治疗被誉为手术、放疗、化疗三大常规疗法后的第四种治疗方法. 以 DC 为基础的肿瘤免疫疗法已经显现出临床应用前景, 是未来抗肿瘤治疗的很有前景的手段之一. 本文采用 Hsp70L1 作为佐剂, 与 Mage-3 抗原肽联合致敏 DC 细胞, 对肿瘤细胞产生了较强的杀伤能力, 为 DC 体外活化提供了一条可行的途径, 为肿瘤 Hsp70 抗原肽疫苗的制备提供了理论基础.

[参考文献]

[1] 才志刚, 段德溥, 张绍明, 等. 冻融抗原冲击致敏的树突状细胞诱导产生肺癌特异性免疫应答的实验研究 [J]. 南通大学学报, 2006, 26(5), 321 - 324.
[2] HERSEY P, MENZIES SW, HALLIDAY G M, et al. Pha-

se I / II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(2):125 - 134.
[3] TOH HC, WANG W W, CHIA W K, et al. Clinical benefit of allogeneic melanoma cell lysate-pulsed autologous dendritic cell vaccine in MAGE-positive colorectal cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(24):7 726 - 7 736.
[4] ARNOLD-SCHILD D, HANAU D, SPEHNER D, et al. Receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells [J]. *Immunol*, 1999, 162(7):3 757.
[5] CASTELLINO F, BOUCHER P E, EICHELBERG K, et al. Receptor-mediated uptake of antigen-heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(11):1 957.
[6] JONES T, LIN R. Potential role granulocyte-macrophage-3e colony-stimulating factor as vaccine adjuvant [J]. *Clin Microbiol Infect Dis*, 1994, 13(2):47 - 53.
[7] JACQUES B, FRANCINE B, CHRISTOPHE C, et al. Immunobiology of dendritic cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18(1):767 - 811.
[8] NAIR S K, SYNDER D, ROUSE B T, et al. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed tumor extract [J]. *Int J Cancer*, 1997, 70(6):706 - 715.
[9] 马腾, 李宝江, 叶欣. 树突状细胞在乳腺癌治疗中的研究进展 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2011, 38(7):521 - 524.
[10] SOLIMAN H. Developing an effective breast cancer vaccine [J]. *Cancer Control*, 2010, 17(3):183 - 190.
[11] 李艳秋, 吴玉章, 倪兵, 等. 肿瘤抗原 MAGE-12 的 B 细胞表位 4 分支多重抗原肽的合成及鉴定 [J]. *第三军医大学学报*, 2002, 24(10):1 143.
[12] WOLFGANG H, ELENA R, WALTER O, et al. Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4⁺ and CD8⁺T lymphocyte responses [J]. *Blood*, 2000, 7(96):1 857.
[13] 刘玉侠, 于鸿, 张振武, 等. 热休克蛋白 70 激发树突状细胞抗肝癌作用的实验研究 [J]. *中国试验诊断学*, 2012, 14(12), 1 969 - 1 971.
[14] 朱传东, 郑勤, 张全安. 树突状细胞在肿瘤免疫治疗中的应用与进展 [J]. *实用癌症杂志*, 2011, 26(1):108 - 110.

(2013 - 04 - 10 收稿)