

黏蛋白 1 (MUC1) 致敏的树突状细胞疫苗 体外抗肿瘤实验研究

徐 富 谢映红 杨翔云 刘 云 郑晓华 吴 炎 张 昊 徐 路

摘 要 **目的** 研究以 CpG 作为免疫佐剂,应用黏蛋白 1(MUC1)致敏树突状细胞(DC)制备疫苗在体外诱导的特异性抗肿瘤作用。**方法** 健康人外周血采用密度梯度离心法,分离外周血单核细胞(PBMC),应用 GM-CSF、IL-4、TNF- α 等细胞因子体外培养诱导 DC,观察细胞形态,并通过流式细胞术检测成熟 DC 细胞标志物 CD80、CD86。再应用 CpG 作为免疫佐剂,MUC1 作为抗原致敏 DC 制备疫苗,致敏的 DC 与 T 细胞混合培养,观察其诱导 T 淋巴细胞增殖能力。诱导产生的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)与肿瘤靶细胞以 5:1、10:1、20:1 的效靶比共孵育,MTT 法检测 CTL 杀伤活性。**结果** DC 表型检测结果为 CD80⁺ 细胞占 70.4%,CD86⁺ 细胞占 72.0%,呈现成熟 DC 表型。MUC1 致敏的 DC 疫苗与淋巴细胞混合培养显示,DC 疫苗具有刺激 T 细胞增殖活化的作用,其中 DC + CpG + MUC1 组明显高于 MUC1 + DC 或 CpG + DC 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。DC 疫苗诱导产生的特异性 CTL 对肿瘤细胞的杀伤作用较单独 T 细胞组或 DC 组明显增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。并随着效靶比增大,其杀伤作用呈逐渐增强。**结论** 经 CpG 和 MUC1 致敏的 DC 疫苗在体外可诱导产生特异性抗肿瘤免疫效应。

关键词 黏蛋白 1(MUC1) 树突状细胞(DC) CpG(CpG ODN2006) 肿瘤 疫苗

中图分类号 R73-36

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.12.010

Experimental Study on the Antitumor Effects in Vitro of Dendritic Cell Vaccine Pulsed with Mucin1 (MUC1). Xu Fu, Xie Yinghong, Yang Xiangyun, et al. People's Liberation Army No. 202 Hospital, Liaoning 110003, China

Abstract **Objective** To study CpG as immune adjuvant,application of Mucin1-sensitization dendritic cells(DC) vaccine to induce specific antitumor effect in vitro. **Methods** DCs were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. The CD80 and CD86 markers of mature DCs were detected by flow cytometry. CpG was used as immune adjuvant,MUC1 was used as antigen to induce DC vaccine, and DC vaccine were mixed with T cells to induce T lymphocyte proliferation. The cytotoxic T lymphocytes (CTLs) were incubated with tumor target cells at the ratios of 5:1,10:1,20:1. MTT assay was used to detect the cytotoxicity of CTL. **Results** CD80⁺ cells accounted for 70.4% and CD86⁺ cells accounted for 72.0% of the DC phenotype, showing a mature DC phenotype. DC vaccine and lymphocyte mixed culture showed that the DC vaccine had the effect of stimulating T cell proliferation and activation. DC + CpG + MUC1 group was significantly higher than MUC1 + DC or CpG + DC group($P < 0.01$). The specific CTL induced by DC vaccine on tumor cells was significantly higher than that in DC alone or in T cell group ($P < 0.01$). And with the effector-target ratio increased, the killing effect was gradually increased. **Conclusion** MUC1 sensitized DC vaccine can induce specific antitumor immune effect in vitro, combined with CpG can further enhance the antitumor effect of DC vaccine.

Key words Mucin 1 (MUC1); Dendritic cells(DC); CpG (CpG ODN2006); Tumor; Vaccine

黏蛋白 1(MUC1)是一种主要分布于腺上皮细胞的跨膜糖蛋白,分为细胞外区、跨膜区和胞内区。胞外段基因含有 20~125 个连续重复序列(VNTR),每个 VNTR 由 20 个氨基酸组成,它们是 HGVTSAPDTR-PAPGSTAPPA。其中 PDTRP 部位是 B 细胞及 T 细胞

共同识别的表位,可与 MUC1 特异性抗体及细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)相结合。MUC1 在多数正常的上皮组织的细胞表面都有表达,而在恶性肿瘤组织中,MUC1 的表达存在质与量的异常,出现异常表达,异常糖基化,使正常时被糖链遮蔽的胞外段暴露,可以被免疫系统识别,因此成为一种理想的肿瘤免疫治疗的靶分子^[1]。CpG ODN 在体内外可以激活多种免疫细胞,可以直接激活 B 细胞、树突状细胞、单核-吞噬细胞。由于 MUC1 为自身抗原,免疫原性极弱。因此,为增加 MUC1 的免疫原性,本实验以 CpG 作为佐

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(2013020181)

作者单位:110003 沈阳,中国人民解放军第 202 医院干部病房
(徐富、谢映红、杨翔云、刘云、郑晓华、吴炎),检验科(张昊、徐路)

通讯作者:徐富,副主任医师,电子信箱:xf6662000@aliyun.com

剂,应用含有 VNTR 基因编码的 MUC1 多肽作为肿瘤抗原,联合 DC 制备特异性肿瘤疫苗,通过细胞实验,观察其抗肿瘤活性。

材料与方法

1. 主要试剂和材料:重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组白细胞介素 4(rhIL-4)、重组人白细胞介素-2(rhIL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)购自 Peprotech 公司;RPMI1640、MTT、DMSO 购自美国 Sigma 公司。荧光标记的鼠抗人 CD80、CD86 单克隆抗体购自 eBioscience 公司。胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。MUC1 蛋白购自美国 MACS 公司;CpG ODN2006 由上海生工生物工程公司合成。卵巢癌细胞株(OVCAR-3)由中国医科大学病理研究所提供。

2. DC 体外培养:采集正常人抗凝外周血 30ml,用 PBS 1:1 稀释,缓慢加入到细胞分离液中,2000r/min 常温离心 30min,吸取界面层细胞,即为单个核细胞(PBMC),用含有 10U/ml DNase、100U/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素的无血清 RPMI1640 重悬,调整细胞浓度为 1×10^5 个/毫升,加入 6 孔板,每孔加入细胞悬液 2ml,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 2h。用预热的 PBS 清洗培养板 2 次,吸出细胞悬液(为外周血淋巴细胞 PBL,采用尼龙毛柱法分离 T 淋巴细胞,冻存储用)。留下贴壁细胞,每孔加入 2ml DC 完全培养基(含 10% 胎牛血清、GM-CSF 100ng/ml 及 IL-4 50ng/ml 的 RPMI1640)培养,第 3 天半量换液,补充新鲜细胞因子;第 5 天每孔加入 0.4 μ l 的 TNF- α (10ng/ml),继续培养 2 天诱导其成熟。

3. DC 表型鉴定:取诱导后的 DC,用 PBS 漂洗 3 次,PBS 重悬细胞,调整浓度为 1×10^6 /ml。流式管中加入带有标记的 CD80、CD86 抗体(其中包括对照管),37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,离心收集细胞,小心吸尽上清,PBS 漂洗 3 次。500 μ l PBS 重悬细胞,进行流式检测。

4. MUC1 致敏 DC 疫苗制备及混合淋巴细胞反应:调整 DC 浓度为 1×10^6 /ml 加入 24 孔板,根据预试验结果,分别加入 CpG (10 μ g/ml) 和 MUC1 蛋白 (20 μ g/ml),培养 72h,收获 DC 即为 MUC1 抗原特异性疫苗。再与淋巴细胞混合培养,按如下分组:A:DCs;B:DCs + CpG;C:DCs + MUC1;D:DCs + CpG + MUC1;E:CpG + MUC1。再将各组 DCs 作为刺激细胞,复苏同种异体 T 淋巴细胞,将 DC 和 T 淋巴细胞以不同的比例(1:10、1:20、1:50)混合,培养 72h 后进行 MTT 检测。

5. CTL 的体外诱导及杀伤试验:根据上述实验结果,选择 DC 疫苗和 T 淋巴细胞按 1:20 比例,各取 500 μ l 加入 24 孔板,并于第 1、3、5 天加入终浓度为 100U/ml 的 IL-2,设单独培养的 T 细胞和单独培养的 DC 细胞为对照组,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 7 天后收集上述悬浮细胞即 CTL,将 CTL 与肿瘤细胞 OVCAR-3 以效/靶比 5:1、10:1、20:1、50:1 加入 96 孔板,培养 6h 后进行 MTT 检测其杀伤活性。

6. MTT 检测:将各组待检测细胞加入 5mg/ml 的 MTT,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 4h,小心吸去上清(贴壁细胞),如悬浮细胞则先进行离心后再吸出上清,加入 200 μ l DMSO 震荡 10min 以溶解细胞形成的紫色结晶,在酶标仪上测定其在 490nm 处 A 值,进行数据分析。

7. 统计学方法:应用 SPSS 19.0 统计软件分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. DC 培养鉴定:外周血单个核细胞经 rhIL-4 及 rhGM-CSF 刺激诱导后,第 3 天可见细胞体积增大呈圆形或椭圆形;第 5 天,细胞周边出现短的毛刺状突起,并开始出现悬浮;第 7 天,经 TNF 刺激后细胞悬浮逐渐增多,表面突起数量增多,体积增大,表面毛刺明显增多变长,呈典型成熟 DC 形态。

DC 表型检测结果为 CD80⁺ 细胞占 70.4%, CD86⁺ 细胞占 72.0%,呈现成熟 DC 表型。而阴性对照组 $< 3.0\%$ (图 1)。

2. MUC1 致敏的 DC 疫苗对淋巴细胞的刺激增殖作用:DC 具有刺激 T 细胞增殖的作用,DC + CpG + MUC1 组明显高于单用 MUC1 + DC 组或 CpG + DC 组,差异有统计学意义($P < 0.01$),DC 加 CpG 和(或)MUC1 致敏后,较单纯 DC 组对 T 细胞的刺激增殖作用明显增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。而单纯加 CpG 和 MUC1(无 DC 组)则基本无 T 细胞刺激增殖作用。而不同浓度 DC/T 效靶比,对 T 细胞刺激增殖作用无明显影响,具体见图 2。

3. 特异性 CTL 的杀伤实验:经特异性 DC 疫苗刺激活化的 CTL 对肿瘤细胞的杀伤作用较单独 T 细胞或 DC 组明显增强,差异有统计学意义($P < 0.01$),并且随着效靶比增大,其杀伤作用逐渐增强,呈正相关(图 3)。

讨 论

近年来恶性肿瘤的免疫治疗逐渐成为热点,并取

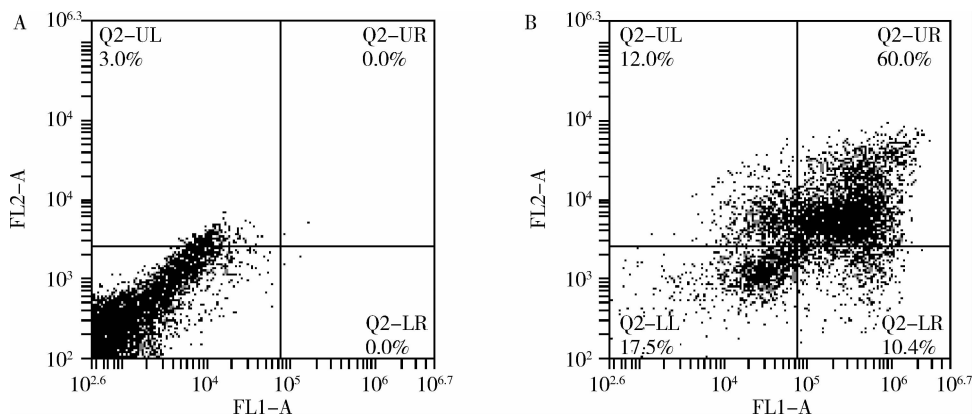


图1 DC表型测定流式细胞图

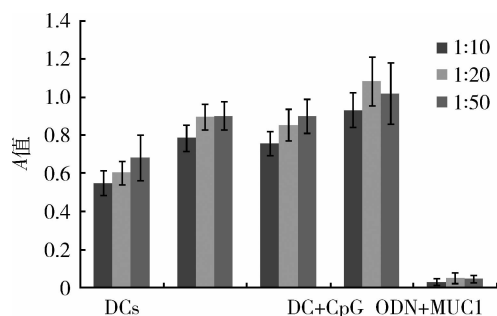
A. 阴性对照; B. CD80⁺ CD86⁺

图2 混合淋巴细胞反应,不同效靶比及不同DC组对淋巴细胞增殖的刺激作用

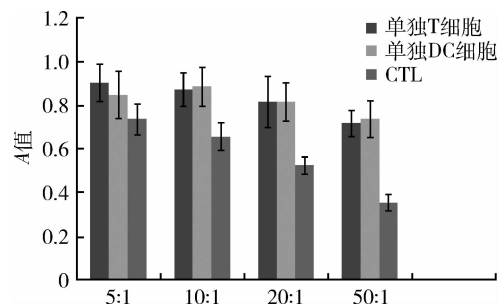


图3 特异性DC疫苗刺激活化的CTL杀伤实验结果

得了可喜的成绩。MUC1 是黏蛋白家族的重要成员,广泛分布于上皮细胞表面,而在恶性肿瘤细胞出现异常表达,且由于糖基化不全使正常情况下隐蔽的抗原表位暴露,成为肿瘤抗原,具有广谱性和肿瘤相对特异性,以 MUC1 为靶点的肿瘤疫苗研究已取得很大进展,包括 MUC1 单抗、基因及多肽疫苗等,部分已进入临床实验阶段^[3~5]。但仍存在疗效低,个体差异大等问题,虽然在Ⅱ期临床取得阳性结果,但Ⅲ期临床效果不佳^[6~8]。

DC 是最强有力的专职性抗原递呈细胞,DC 激活

的细胞免疫在机体抗肿瘤反应中发挥着重要作用。关于 DC 疫苗临床应用的前期试验也取得了令人鼓舞的结果,DC 疫苗在恶性肿瘤治疗中显示出了良好的应用前景^[9]。CpG 基序是指含有非甲基化的胞嘧啶和鸟嘌呤核苷酸核心的寡聚脱氧核苷酸序列,近年研究结果显示,含有非甲基化的 CpG 基序具有强大的免疫激活作用。在体内和体外均表现免疫刺激作用,包括直接激活 B 细胞、树突状细胞、单核-吞噬细胞,间接激活其他大部分免疫细胞,可以引起先天性免疫反应。CpG 作为佐剂时可对肿瘤细胞免疫起增强作用,可明显延长机体免疫记忆的时间。CpG 可以特异性提高树突状细胞、单核细胞和巨噬细胞等抗原递呈细胞的活性功能,增强共刺激因子的表达,增强抗原传递细胞对抗原的处理和递呈^[10,11]。人工合成的 CpG 同样具有免疫刺激活性,作为免疫佐剂、抗肿瘤增敏剂已进入临床试验阶段。

本实验通过健康人外周血在体外培养出典型形态的 DC,并且高表达成熟标志的细胞表面分子 CD80、CD86 等。以 CpG ODN 作为佐剂,应用 MUC1 多肽抗原联合 DC 制备疫苗,用此疫苗诱导刺激 T 细胞活化,产生 MUC1 特异的 CTL。实验发现加用 CpG + DC 组活性较单纯 DC 组明显增强,提示 CpG 能够增强 DC 的活性。MUC1 + CpG + DC 组能够显著刺激特异性 CTL 的增殖,比 MUC1 + DC 或 CpG + DC 作用明显增强 ($P < 0.01$),说明联合应用 CpG + MUC1 能产生协同作用,进一步增加 DC 递呈抗原及刺激淋巴增殖活化的作用。CTL 的杀伤实验结果提示,负载 MUC1 的 DC 疫苗致敏的 CTL 对产 MUC1 阳性的 OVCAR-3 细胞的杀伤活性明显强于单纯的 DC 组及 T 细胞组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

在体外实验显示出良好的杀伤癌细胞活性。本实验结果提示应用 MUC1 作为肿瘤抗原可以在体外致敏 DC,并能诱导产生特异性 CTL,加入免疫佐剂 CpG 后能进一步改进提高 CTL 抗肿瘤免疫杀伤活性。今后笔者将进一步在动物实验中观察联合疫苗的作用。

参考文献

- 1 Baldus SE, Hanisch FG, Kotlarek GM, *et al.* Coexpression of MUC1 mucin peptide core and the thomsen - friedenreich antigen in colorectal neoplasms[J]. *Cancer*, 1998, 82(6): 1019 - 1027
- 2 Schuman JT, Grinstead JS, Apostolopoulos V, *et al.* Structural and dynamic consequences of increasing repeats in a MUC1 peptide tumor antigen[J]. *Biopolymers*, 2005, 77: 107 - 120
- 3 陈红敏, 张明川, 罗艳林, 等. 抗 MUC1 单克隆抗体 C595 对人卵巢癌 OVCAR - 3 细胞增殖和凋亡的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(7): 361 - 364
- 4 Wang L, Chen H, Liu, FH, *et al.* Monoclonal antibody targeting MUC1 and increasing sensitivity to docetaxel as a novel strategy in treating human epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer Let*, 2011, 300: 122 - 133
- 5 Pichinuk E, Benhar L, Jacobi O, *et al.* Antibody targeting of cell - bound MUC1 SEA domain kills tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2012, 72

- (13): 3324 - 3336
- 6 Quoix E, Ramlau R, Westeel V, *et al.* Therapeutic vaccination with TG4010 and first - line chemotherapy in advanced non - small - cell lung cancer: a controlled phase II B trial[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12: 1125 - 1133
 - 7 Butts C, Murray N, Maksymiuk A. Randomized phase II B trial of BLP25 liposome vaccine in stage III B and IV non - small - cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(27): 6674 - 6681
 - 8 Charles B, Mark AS, Paul LM, *et al.* Tecemotide (L - BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non - small - cell lung cancer (START): a randomised, double - blind, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15: 59 - 68
 - 9 Zhang P, Yi S, Li X, *et al.* Preparation of triple - negative breast cancer vaccine through electroporation with day - 3 dendritic cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102197
 - 10 李娜, 孙志伟, 俞炜, 等. CpG 免疫刺激 DNA 序列及其在疫苗佐剂中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2008, 19(4): 572 - 575
 - 11 Bode C, Zhao G, Steinhagen F, *et al.* CpG DNA as a vaccine adjuvant. [J]. *Exp Rev Vaccines*, 2011, 10(4): 499 - 511

(收稿日期: 2016 - 04 - 06)

(修回日期: 2016 - 04 - 29)

血乳酸和 APACHE II 评分在评估重症胰腺炎患者病情预后中的价值

左小淑 朱睿瑶 周晨亮 周青山

摘要 **目的** 分析探讨重症胰腺炎患者血乳酸水平与 APACHE II 评分的相关性及指导预后的意义。**方法** 回顾性分析 45 例入住笔者医院重症医学科(intensive care unit, ICU)中重症胰腺炎患者的临床资料,根据其预后将患者分为存活组和死亡组,比较血乳酸水平与 APACHE II 分值之间的关系,分析上述指标与患者预后之间的关系。**结果** 死亡组患者的血乳酸水平、APACHE II 评分明显高于存活组($P < 0.05$),APACHE II 评分 > 30 分组血乳酸水平明显高于 21 ~ 30 分组($P < 0.05$),APACHE II 评分 21 ~ 30 分组血乳酸水平明显高于 ≤ 10 及其 11 ~ 20 分组($P < 0.05$);血乳酸水平和 APACHE II 分值的相关性呈显著正相关($r = 0.995$, $P < 0.01$)。**结论** 血乳酸水平、APACHE II 评分均与重症胰腺炎患者病情严重程度相关,在该类患者预后判断中具有一定的临床指导意义。

关键词 乳酸 APACHE II 评分 预后

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.12.011

Value of APACHE II Scoring System and Blood Lactate in Assessing Prognosis in Patients with Severe Acute Pancreatitis. Zuo Xiaoshu, Zhu Ruiyao, Zhou Chenliang, *et al.* Department of Intensive Care Unit, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To analyze the correlation of blood lactate level and APACHE II score, and their significance in guiding the prognosis of severe acute pancreatitis patients. **Methods** The clinical data of 45 patients with severe pancreatitis, admitted in intensive

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2013CFB238)

作者单位:430060 武汉大学人民医院重症医学科

通讯作者:左小淑,电子邮箱:bigmouse zuoxiaoshu@126.com