

文章编号: 1673-3851 (2014) 06-0678-07

突变型 P53 特异性活化 T 细胞的诱导与扩增

郑竹影^{1,2}, 孙 艳², 程静波², 钱其军^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438)

摘要: 采用多种细胞因子诱导外周血单核细胞分化为成熟的树突状细胞(DC, Dendritic Cell), 将成熟 DC 与初始 T 细胞共培养, 并连续加入 DC 刺激从而避免活化的 T 细胞凋亡。将活化的 T 细胞转入包被有 CD3 和 CD28 抗体的板中, 使活化 T 细胞进一步大量扩增。流式检测多因子诱导后 DC 表型发现, 高表达 CD83、CD11c、CD11b、CD80、CD86、CCR7、CD54, 低表达 CD14、CD3、CD33, 说明因子成功诱导单核细胞为成熟 DC。流式检测扩增的活化 T 细胞发现高表达 CD3、CD8, 含有很低量的调节性 T 细胞(Treg), 分泌大量的 IFN- γ , 表明扩增出的细胞中活化 T 的含量很高, 为临床研究提供参考。

关键词: 多因子诱导; 树突状细胞; 特异性活化 T 细胞; 扩增

中图分类号: R392.12 **文献标志码:** A

0 引言

癌症的高发率和年轻化的趋势已经越来越威胁到人类的健康。目前, 已有的治疗方法包括外科手术切除法、放疗、化疗等^[1-2]。但是这些方法都不能完全治愈癌症, 最新研究表明过继性免疫细胞治疗为癌症的治疗带来了新的希望^[3]。与传统的肿瘤治疗方法不同, 大多数免疫治疗在消除肿瘤的过程中显示出重要的作用, 而且可以通过诱导免疫记忆来建立肿瘤与机体之间新的平衡, 从根本上治愈肿瘤。免疫细胞治疗技术与其他抗肿瘤策略如手术、放化疗的联合应用已经证实优于单一的治疗方案, 极大拓宽了细胞免疫治疗。

但是, 过继性 T 细胞转移还面临很多的问题: DC 的成熟程度低, 免疫耐受, 特异性活化 T 细胞的数量不足等。由于 DC 扩增具有很大的难度, 所以这也间接限制了特异性活化 T 细胞的数量。本文利用体外诱导成熟的 DC 连续刺激初始 T 细胞形成特异性活化 T 细胞, 并用 CD3 和 CD28 抗体刺激,

两步法使特异性活化 T 细胞得到大量扩增。

1 材料和方法

1.1 实验材料

质粒 pDC659 和质粒 pCMV-Neo-Bam p53 R175H。癌症病人的外周血来自于上海东方肝胆外科医院生物治疗科。

1.2 主要实验药品及试剂

AIM-V (gibco 公司), GM-CSF、IL-4、TNF- α 、IL-2、IL-7、IL-15 (Pepro Tech 公司), LPS、PGE-2 (Sigma 公司), 淋巴细胞分离液 (GE 公司), CD83-FITC、CD80-PE、CD86-APC、CD1 α -FITC、HLA-DR-PE (BD 公司), CD14-PE、CD11c-APC、CD3-FITC、CD33-APC、CD11b-FITC、CD3-PC7、CD3-FITC、CD8-FITC、CD4-FITC、CD4-PC5、CD25-APC、CD127-PE、CD56-PE (Beckman 公司), CCR7-PE、CD54-PE (Bioscience 公司), 抗 CD28 抗体 (美天施), 用于检测 INF- γ 的 Elispot 试剂盒, D-PBS、Retronectin (TakaRa 公司)。

收稿日期: 2014-02-22

基金项目: 上海细胞治疗工程技术研究中心, 上海工程技术研究中心课题(12DZ2251600)

作者简介: 郑竹影(1988-), 女, 江苏无锡人, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤细胞治疗。

通信作者: 钱其军, E-mail: qianqj@163.com

1.3 携带 MUP53 基因的腺病毒的构建

1.3.1 PCR 获得 MUP53 基因

以 pCMV-Neo-Bam p53 R175H 质粒中的 MUP53 为模板,使用引物 1 和引物 2,PCR 获得 MUP53 基因。引物 1: **CCGGAATTCGCCACCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCC**;引物 2: **ACGC GTCGACTTATCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTC**

1.3.2 酶切、连接和转化

pDC659 和 PCR 获得的 MUP53 基因分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切后用 Solution I 将回收的目的片段 MUP53 和线性化的载体 pDC659 相连接。

1.3.3 病毒的重组和鉴定

将 pDC659-MUP53-PPE3 质粒与 pBHGlox (δ)E1,3Cre 通过试剂盒共转染至 293 细胞中。共转染细胞 9~14 d 后出现空斑,经过 3 次病毒空斑纯化得到比较纯的腺病毒。使用 QIAGEN DNA Blood Mini Kit 提取病毒 DNA,再通过 PCR 进行鉴定。

1.4 诱导单核细胞成为成熟的树突状细胞(DC)

通过淋巴细胞分离液利用密度梯度离心的方法从外周血中分离单核细胞。将单核细胞依据 4×10^6 的密度铺于六孔板中,3 mL/孔,放于 37°C 、5% CO_2 孵育箱中贴壁。2 h 后将悬液用移液管吸走,并冻存。将贴壁细胞用 D-PBS 洗 1 遍后,加入含有 rhGM-CSF (100 ng/mL), rhIL-4 (100 ng/mL) 和 FLT3L (50 ng/mL) 的 AIM-V 培养基继续培养,3 mL/孔, 37°C 、5% CO_2 孵育箱中培养 7 d。在第四天加入 rhGM-CSF、rhIL-4 和 FLT3L 细胞因子浓度不变。第六天加入携带 P53 基因的 ad5 型腺病毒,MOI=5,负载树突状细胞。第七天加入 TNF- α 100 ng/mL, LPS 100 ng/mL, PGE-2 100 ng/mL, 促进树突状细胞成熟。第八天收集部分悬浮细胞做流式表型检测。

1.5 成熟的树突状细胞(DC)与初始 T 细胞共培养

DC 和 T 细胞共培养的第一天,收集成熟的 DC 细胞,计数。将成熟的 DC 细胞和复苏的自体 T 细胞以 1:5 的比例共培养,T 细胞取约 5×10^6 ,DC 取约 10^6 ,加入 5 mL AIM-V 后放入 25 mm^2 小瓶中培养,使 T 细胞的密度保持在 $(1 \sim 2) \times 10^6/\text{mL}$ 。同时,加入细胞因子包括:IL-2 (50 U/mL)、IL-7 (50 ng/mL)、IL-15 (50 ng/mL)。对剩余的 DC 进行冻存,用于之后对 T 细胞的连续刺激。第二天,复苏一支 DC,加入到 DC 和 T 细胞共培养的小瓶中。第

三天,再复苏一支 DC,加入到 DC 和 T 细胞共培养的小瓶中,并补加因子 IL-2 (50 U/mL)、IL-7 (50 ng/mL)、IL-15 (50 ng/mL)。取一个 25 mm^2 的小瓶,加入 5 mL D-PBS、CD3、CD28、Retronectin,避光包被过夜。第四天,取出包被好的小瓶,分别用 D-PBS 和 AIM-V 润洗 1 遍。从共培养的小瓶中取出一部分悬浮细胞用于流式检测和 INF- γ 分泌检测。

1.6 特异性 T 淋巴细胞的大量扩增

特异性活化 T 细胞转移到包被板的第二天,发现培液变黄,计数,并加入原有培液的 1 倍,补足因子,使因子浓度保持在 IL-2 (50 U/mL)、IL-7 (50 ng/mL)、IL-15 (50 ng/mL)。第三天,发现培液变黄,计数,并加入原有培液的 1 倍,补足因子,使因子浓度保持在 IL-2 (50 U/mL)、IL-7 (50 ng/mL)、IL-15 (50 ng/mL)。第五天,发现培液变黄,计数,并加入原有培液的 1 倍,补足因子,使因子浓度保持在 IL-2 (50 U/mL)、IL-7 (50 ng/mL)、IL-15 (50 ng/mL)。用移液管吹散细胞,防止细胞聚团过大。取一部分悬浮细胞分别用于流式检测和 IFN- γ 分泌检测。

1.7 用流式检测细胞表型

每管收集 1×10^6 个细胞,2 000 r/min 离心 2 min,倒掉上清。 4°C 以上冷 PBS 洗 1 次,2 000 r/min 离心 2 min,倒掉上清。加入荧光标记抗体 (CD80-FE、CD86-APC、CD83-FITC、CD1 α -FITC、CD14-PE、CD11c-APC、CD3-FITC、HLA-DR-PE、CD33-APC、CD11b-FITC、CCR7-PECD54-PE、CD3-PC7、CD8-FITC、CD69-PC5、CD4-FITC、CD25-APC、CD127-PE、CD3-FITC、CD4-PC5、CD56-PE) 冰上孵育 30 min。 4°C 以上冷 PBS 洗 1 次,2 000 r/min 离心 2 min,弃去上清。用流式细胞仪检测荧光值,每管计数 10 000 个细胞。

1.8 INF- γ 分泌的检测

实验步骤依据 INF- γ 的 Elispot 试剂盒中的说明书进行。

2 结果

2.1 成熟树突状细胞的形态

DC 作为一种抗原递呈细胞,在它不成熟的阶段时 DC 的形态较小,细胞周围也较平滑。当 DC 通过因子诱导成熟后,细胞会变大,细胞周围也会伸出许多突触(图 1)。

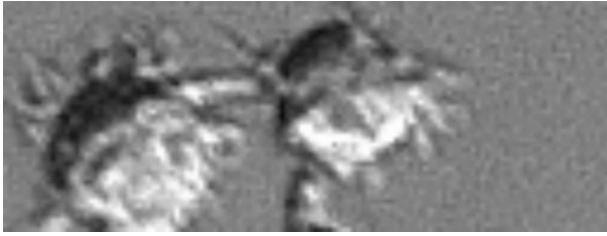
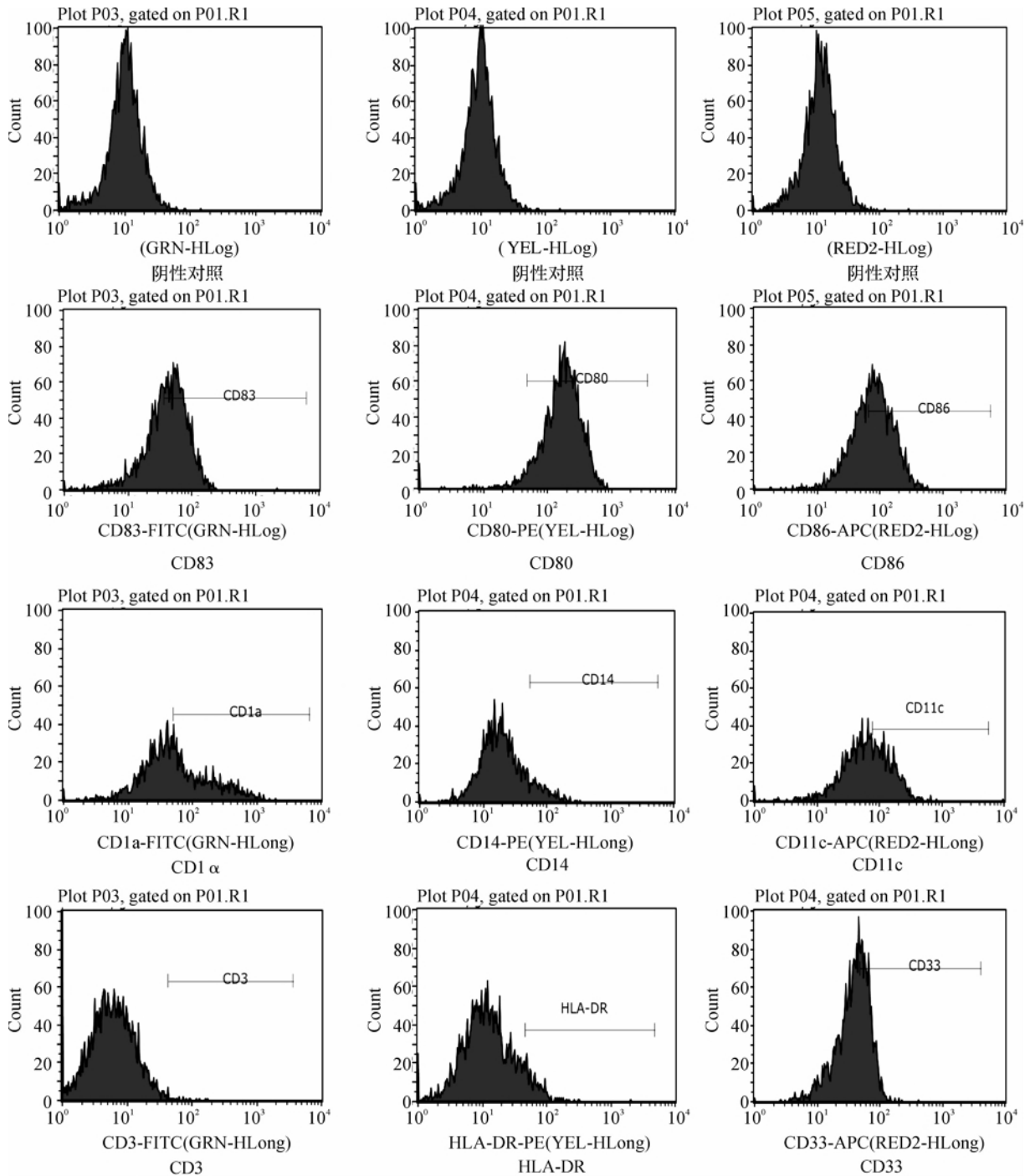


图1 显微镜下成熟DC的形态

行鉴别和分类。将培养成熟的DC细胞通过流式检测其表面各种CD分子的表达情况(图2,表1),发现用因子诱导成熟的DC中DC的特异性标记CD83,CD11c,CD11b的表达较高,共刺激分子CD80,CD86,趋化因子受体CCR7,细胞粘附分子CD54的表达都较高。单核细胞特异性标记CD14,淋巴细胞标记CD3,祖细胞标记CD33都较低。所以,通过体外因子的诱导,成功得使单核细胞分化成为大量成熟的DC。

2.2 流式检测成熟树突状细胞的表型

通过对细胞表面的CD分子检测能够对细胞进



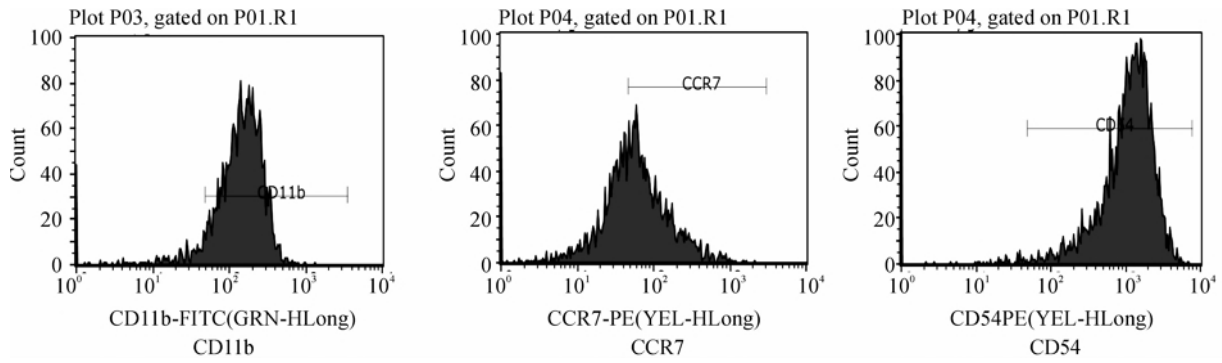


图 2 细胞因子诱导的成熟 DC 的各表型特点

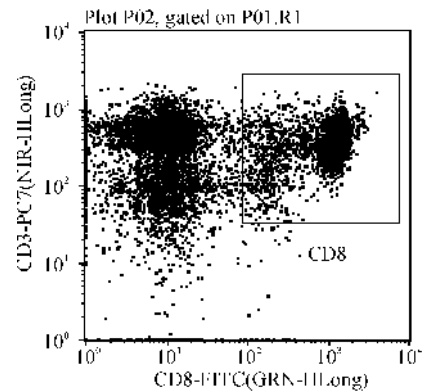
表 1 细胞因子诱导的成熟 DC 的表型特点统计 (n=3, mean±SD)

成熟 DC 的表型	阳性百分比/%
CD83	58.1±14
CD80	93.6±6.1
CD86	76.4±6
CD1 α	57.5±14.3
CD14	17.2±3.7
CD11c	44.9±19.6
CD3	4±5.8
HLA-DR	21.7±9.4
CD33	14.7±10.2
CD11b	85.4±8.1
CCR7	62.6±17.2
CD54	96.2±1.5

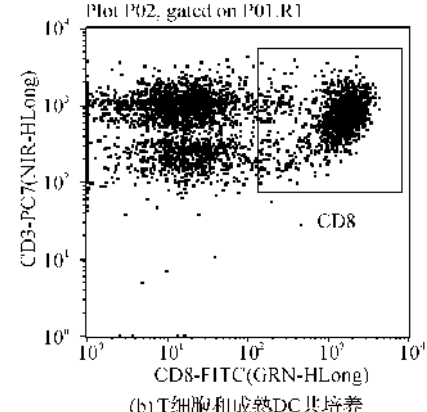
注:取 10⁵~10⁶ 成熟 DC 细胞重悬液,用流式细胞术检测各细胞表型特点

2.3 成熟的 DC 与初始 T 细胞共培养后流式检测 T 细胞 CD3 和 CD8 的表型, Treg(调节性 T 细胞)的含量,以及 IFN- γ 的分泌

初始 T 细胞与 T 细胞和成熟 DC 共培养后的 T 细胞相比较,CD3 和 CD8 的表型特点没有明显差别(图 3),说明在 T 细胞和成熟 DC 共培养后 CD8⁺ 的特异性活化 T 细胞仍然占较大比例。成熟 DC 细胞和 T 细胞共培养产生的特异性活化 T 细胞中获得少量的 Treg 细胞(图 4),检测培养细胞的 IFN- γ 的分泌,发现共培养前的初始 T 细胞 IFN- γ 分泌量很低(图 5),而共培养后的特异性活化 T 细胞 IFN- γ 分泌量明显提高。不仅如此,对分泌 IFN- γ 单个细胞点的平均大小进行统计发现,实验组仍然大于阳性对照组,说明和成熟 DC 共培养后的 T 细胞能分泌 IFN- γ 的细胞不仅数量增多而且单个细胞的分泌量也增大。



(a) 初始 T 细胞



(b) T 细胞和成熟 DC 共培养

图 3 流式检测初始 T 细胞及 T 细胞和成熟 DC 共培养后 CD3, CD8 的表型

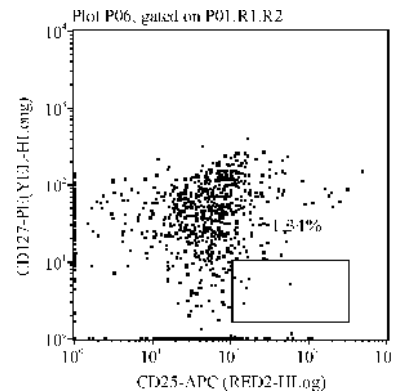


图 4 流式检测 T 细胞和成熟 DC 共培养后 Treg 的比例

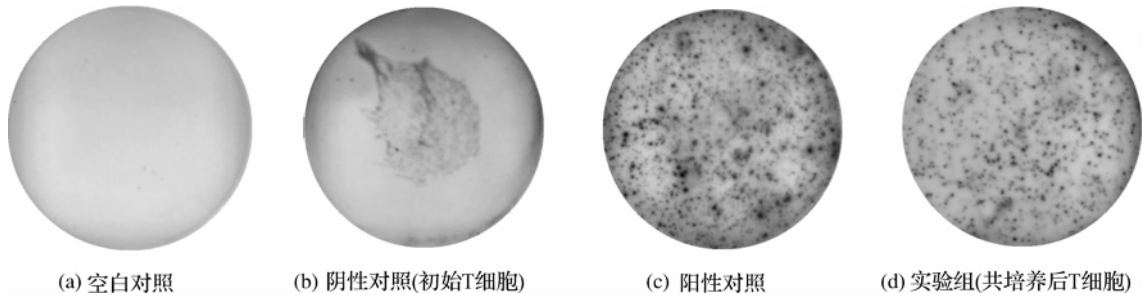


图5 用 IFN- γ 的 Elispot 试剂盒检测 IFN- γ 的分泌(放大倍数 80 倍)

2.4 大量扩增抗原特异性 T 细胞后流式检测其 CD3, CD8 表型特征, Treg 的含量, NK 细胞含量及通过 Elispot 试剂盒检测 IFN- γ 的分泌水平

通过用 CD3, CD28 抗体包板刺激后的细胞在第 10 d 开始大量扩增, 到第 15 天细胞数量达到巅峰, 最多能扩增约 30 倍(图 6)。流式检测包板刺激后细胞 CD3, CD8 的分布, 发现在包板刺激后产生的细胞中 CD3⁺ CD8⁺ 的细胞仍占有一定比例(图 7), 说明产生的抗原特异性活化 T 细胞得到了大量扩增。流式检测培养后细胞中 Treg 细胞的比例, 发现 Treg 细胞的比例仍然很低, 只有 1.69%(图 8)。

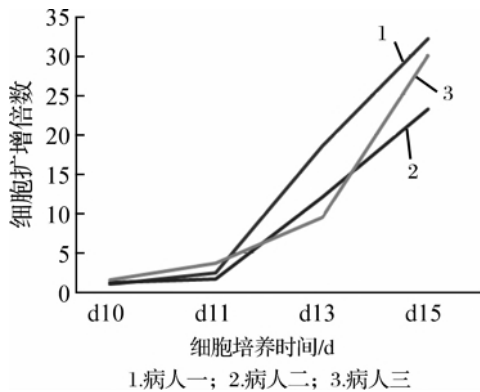


图6 特异性 T 细胞体外扩增曲线

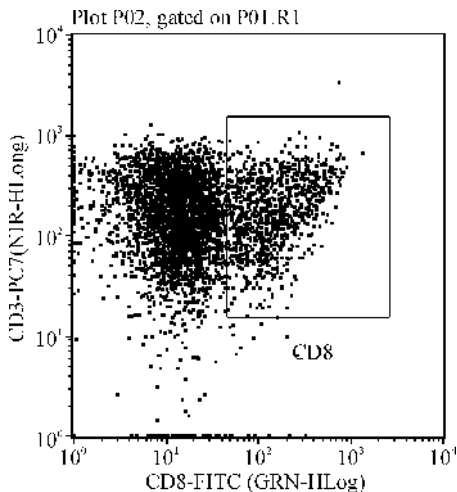


图7 流式检测包板刺激后细胞 CD3, CD8 的表型

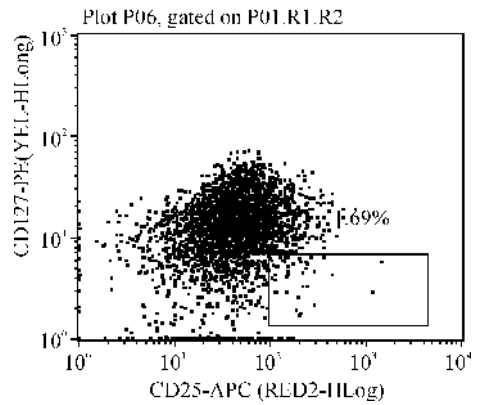


图8 流式检测包板刺激后 CD4⁺ 细胞中的 Treg 比例

流式检测 CD3⁻ CD56⁺ 的自然杀伤细胞(NK, Natural Killer)发现, 包板刺激后的细胞中含有少量的 NK 细胞(图 9)。用 IFN- γ 的 Elispot 试剂盒检测包板刺激后的细胞发现, 有大量细胞分泌 IFN- γ (图 10), 并且每个细胞分泌的 IFN- γ 量较大, 说明培养细胞中抗原特异性活化 T 细胞的比例较高, 具有较强的肿瘤杀伤能力。

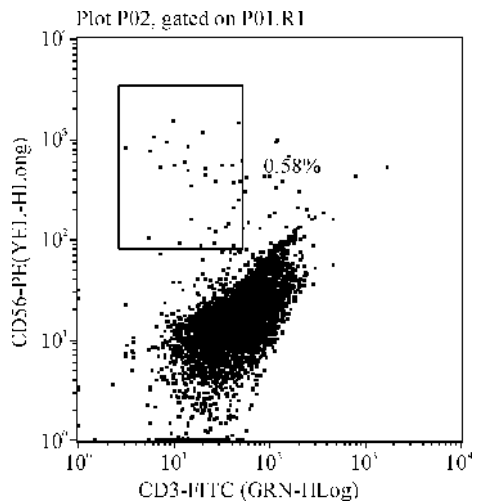


图9 流式检测包板刺激后细胞中的 NK 比例

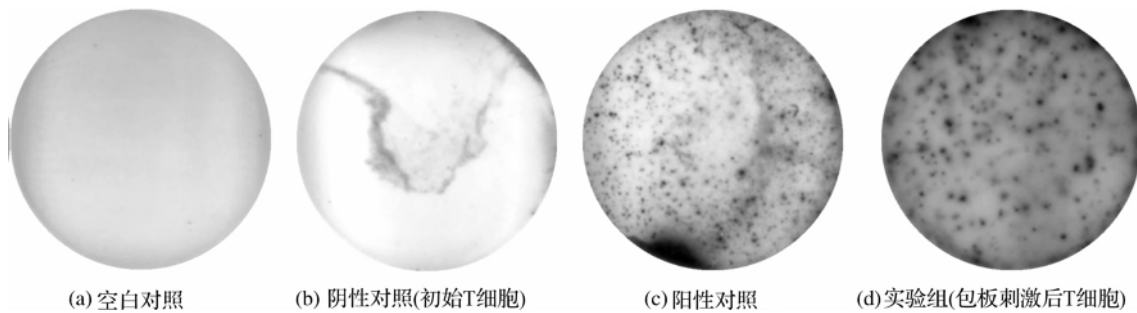


图 10 用 IFN- γ 的 ELISPOT 试剂盒检测 IFN- γ 的分泌(放大倍数 80 倍)

3 讨论

癌症作为现代人类的最可怕杀手之一,一直威胁着人类的健康。肿瘤的免疫细胞治疗为癌症的治愈提供了新的希望。免疫细胞治疗主要是通过增强免疫细胞对肿瘤的识别能力,增大免疫细胞的数量,增强免疫细胞对肿瘤的杀伤活性等来治疗癌症。最早也是效果比较好的利用免疫细胞治疗的癌症是黑色素瘤,随着科技的发展和研究的不断深入,现在许多其他的癌症也能通过免疫细胞治疗获得较好的疗效。

DC,又名树突状细胞,是功能最强大的抗原呈递细胞,具有独特的功能可以起始和维持抗原特异性的初始免疫反应^[4-6]。德国生物学 Paul Langerhans 于 1868 年第一次发现了树突状细胞。当时他在皮肤中观察到 DC 细胞的一个亚群——朗格汉斯细胞。之后,在 1973 年 Ralph Steinman 和 Cohn 在鼠的脾脏中也发现了 DCs^[7]。大部分的 DCs 都来源于骨髓中 CD34⁺的造血干细胞。在进入循环和沉积下来之前,DCs 以一种未成熟的细胞状态存在于靶组织中。这些组织包括抗原的入口,例如皮肤和胃肠道^[8]。然而,DCs 也可以来源于单核细胞前体,通过持续的特定细胞因子的刺激产生。有研究显示未成熟的 DCs 能够绑定 T 细胞,可能导致 T 细胞的凋亡或者产生调节性 T 细胞(Treg)和抑制性 T 细胞,从而引起免疫耐受。因此诱导产生成熟的 DC 对于产生强而有效的免疫反应是至关重要的。本文从癌症病人的外周血中分离得到 PBMC(外周血单核细胞)通过加入细胞因子诱导和 Ad-MUP53 抗原负载培养 8d 后,形成了成熟的 DC。通过流式检测细胞表型发现,细胞因子诱导后的细胞高表达 DC 特异性标记 CD83, CD1 α , CD11b, CD11c, 还高表达共刺激分子 CD80、CD86, 趋化因子 CCR7, 细胞粘附分子 CD54 等。

CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ 的 Treg 细胞,即调节性 T 细胞,是一种对免疫反应有抑制作用的细胞。研

究发现,在肿瘤部位的免疫抑制现象很有可能是这种细胞在起作用。本文通过成熟 DC 细胞和 T 细胞共培养产生的特异性活化 T 细胞中获得少量的 Treg 细胞,证明这种培养方式产生的细胞在免疫反应中产生免疫抑制现象的可能性较小,这有助于特异性活化 T 细胞发挥其靶向肿瘤的免疫反应。CD3⁻ CD56⁺ 的 NK 细胞又名自然杀伤细胞,是人体非特异性免疫系统的重要组成部分,能够非特异性地杀伤病原体。流式检测的 NK 细胞发现,包板刺激后的细胞中含有少量的 NK 细胞。

IFN- γ 的分泌在肿瘤免疫反应中起着至关重要的作用。免疫细胞通过分泌 IFN- γ 使肿瘤细胞的特异性抗原外翻,使抗原递呈细胞能更好地识别肿瘤细胞,从而召集活化 T 细胞杀死肿瘤细胞。

肿瘤的免疫细胞治疗主要是通过增强人体的免疫力来抗击癌症。参与细胞治疗的免疫细胞中,具有直接抗肿瘤作用的细胞主要是 T 淋巴细胞。现今主要采用过继性 T 细胞转移的方式进行细胞治疗,即在体外培养具有特异性抗肿瘤作用的 T 细胞后回输到病人体内。第一次报道通过过继性淋巴细胞转移来靶向治疗疾病是在 50 年前的啮齿类动物模型中^[9]。随着对 T 细胞生物学知识的理解,包括 T 细胞活化和识别靶点的机制,表面分子的作用和调控 T 细胞功能及生存的细胞转导途径,以及识别和克隆 T 细胞生长因子,已经使体外大量扩增 T 更有效得应用于过继性免疫性治疗^[3,10-11]。DC 将抗原递呈给初始 T 细胞,并激活初始 T 细胞,使 T 细胞向抗原特异性活化 T 细胞方向分化。然而,活化后的 T 细胞很容易凋亡,所以本文通过将 DC 连续刺激活化后的 T 细胞,再利用包被 CD3 抗体和 CD28 抗体的板刺激,使抗原特异性活化 T 细胞大量扩增。结果显示在第 15 天 T 细胞能扩增到 30 倍左右,流式检测 CD3, CD8 表型发现,CD3 细胞阳性率很高,CD8 阳性率也较高。培养的细胞中 Treg 细胞仍然维持在较低水平,而且能够分泌大量的 IFN- γ 。

综上所述,本文通过因子诱导和成熟DC对初始T细胞的连续刺激建立了一种能够大量扩增抗原特异性活化T细胞的方法,为之后的临床研究打下基础。

参考文献:

- [1] Ryder S D. Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in adults [J]. *Gut*, 2003, 52(S 3): 1-8.
- [2] Roayaie S, Obeidat K, Sposito C, et al. Resection of hepatocellular cancer ≤ 2 cm: results from two western centers [J]. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1426-1435.
- [3] Rapoport A P, Stadtmauer E A, Aqui N, et al. Restoration of immunity in lymphopenic individuals with cancer by vaccination and adoptive T-cell transfer [J]. *Nature Medicine*, 2005, 11(11): 1230-1237.
- [4] Banchereau J, Steinman R M. Dendritic cells and the control of immunity [J]. *Nature*, 1998, 392 (6673): 245-252.
- [5] Steinman R M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity [J]. *Annual Review of Immunology*, 1991, 9(1): 271-296.
- [6] Wu L, Dakic A. Development of dendritic cell system [J]. *Cell Mol Immunol*, 2004, 1(2): 112-118.
- [7] Sun K, Wang L, Zhang Y. Dendritic cell as therapeutic vaccines against tumors and its role in therapy for hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Mol Immunol*, 2006, 3 (3): 197-203.
- [8] Van Brussel I, Berneman Z N, Cools N. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy: tackling the complexity of different arms of the Immune system [J]. *Mediators of inflammation*, 2012: 1-14.
- [9] Dudley M E, Wunderlich J R, Robbins P F, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes [J]. *Science*, 2002, 298(5594): 850-854.
- [10] Laport G G, Levine B L, Stadtmauer E A, et al. Adoptive transfer of costimulated T cells induces lymphocytosis in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma following CD34+ selected hematopoietic cell transplantation [J]. *Blood*, 2003, 102 (6): 2004-2013.
- [11] Brentjens R J, Davila M L, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia [J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5 (177): 1-19.

Induction and Amplification of Mutant P53 Specific Activated T Cells

ZHENG Zhu-ying^{1,2}, SUN Yan², CHENG Jing-bo², QIAN Qi-jun^{1,2}

(1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Laboratory of Virus and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military University, Shanghai 200438, China)

Abstract: This study induces peripheral blood mononuclear cells to differentiate into mature dendritic cell (DC) by using multiple cell factors, co-cultures mature DC and original T cell, adds DC stimulation continuously to avoid activated T cell apoptosis and transfers activated T cell to a plate coated with CD3 and CD28 so that activated T cell can be amplified further. Flow test on DC phenotype subject to multi-factor induction finds CD83, CD11c, CD11b, CD80, CD86, CCR7 and CD54 with high expression and CD14, CD3 and CD33 with low expression, indicating that factors successfully induce mononuclear cells into mature DC. Flow test on amplified activated T cell finds CD3 and CD8 with high expression which contain a small amount of regulatory T cells (Treg) and secrete a lot of IFN- γ , indicating that amplified cells have a high content of activated T. This provides reference for clinical research.

Key words: multi-factor induction; dendritic cell; specific activated T cell; amplification

(责任编辑: 许惠儿)