

# 应用Toll样受体激动剂促进DC成熟的研究

胥阶英<sup>1</sup> 丁娜<sup>2</sup> 操跃<sup>3</sup> 钱其军<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018; <sup>2</sup>东方肝胆外科医院基因病毒实验室, 上海 200438;

<sup>3</sup>福建医科大学第一临床医学院, 福州 350000)

**摘要** 树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前被广泛认可的抗原提呈功能最强的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC), 成熟DC具有很强的诱导初始T细胞活化、激活免疫应答的功能, 是固有免疫中巨噬细胞和适应性免疫中B细胞功能的100~1 000倍。树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(dendritic cells-cytokine induced killer cell, DC-CIK)联合放疗治疗多种恶性肿瘤, 对抑制肿瘤进展和转移、降低肿瘤负荷、提高患者生活质量及延长患者生存时间都有一定的意义, 但目前临床应用的DC其成熟度与疗效所需的成熟度仍有差距, 这可能是限制DC-CIK疗效的原因之一。该研究将贴壁法获得的DC用多聚次黄嘌呤胞嘧啶核苷酸[polyinosinic-polycytidylic acid, Poly(I:C)]和传统刺激DC成熟的物质肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )刺激DC成熟, 第8 d用流式细胞术检测成熟DC的表型, 发现与TNF- $\alpha$ 相比, Poly(I:C)能够更有效地促进DC成熟。同时, 该研究还比较了Poly(I:C)协同腺病毒对DC成熟的影响, 通过流式细胞术或ELISA检测成熟DC的表型CD80、CD83、CD86、人类白细胞抗原-DR(human leukocyte antigen DR, HLA-DR)以及白介素-12(interleukin-12, IL-12)的分泌, 发现腺病毒并不能协同Poly(I:C)刺激DC的成熟。最后, 探讨了不同成熟度的DC对初始T淋巴细胞活化程度的影响。结果表明, 成熟度较高的DC可更好地诱导初始T淋巴细胞的活化, 并且大量分泌TNF- $\alpha$ 和 $\gamma$ 干扰素(inteferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )。

**关键词** 树突状细胞; Toll样受体; Poly(I:C); 腺病毒

## Application of Toll-like Receptor Agonists in Promoting Maturation of DCs

Xu Jieying<sup>1</sup>, Ding Na<sup>2</sup>, Cao Yue<sup>3</sup>, Qian Qijun<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

<sup>2</sup>Laboratory of Gene and Viral Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China;

<sup>3</sup>The First Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350000, China)

**Abstract** DCs (dendritic cells) are the most potent professional antigen presenting cells, which play a pivotal role in antigen-specific T cell immunity. Mature DCs have the capacity to induce T cell proliferation and differentiation into effect or T cells that are thousands folds compared with macrophages in inherent immunity and B cells in adaptive immunity. The DC-CIK (dendritic cells-cytokine induced killer cell) combined with radiotherapy and chemotherapy has been applied to treatment of various malignancies, and shows promising results in controlling the proliferation and metastasis of tumors, reducing tumor loading, improving patients life quality and prolonging the survival time. However, the current applications of DCs do not meet the clinical needs due to insufficient

收稿日期: 2016-11-25 接受日期: 2017-02-07

上海市科学技术委员会工程中心能力提升项目(批准号: 16DZ2281000)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-81875371, E-mail: qianqj@sino-gene.cn

Received: November 25, 2016 Accepted: February 7, 2017

This work was supported by the Capacity Building Project of Shanghai Science and Technology Commission Engineering Research Center (Grant No.16DZ2281000)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-81875371, E-mail: qianqj@sino-gene.cn

网络出版时间: 2017-03-27 13:08:55

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170327.1308.004.html>

enforcement of DCs immunogenicity, which may be one of the reasons for limiting the efficacy of DC-CIK. In this study, the DCs obtained by the adherent method were stimulated with Poly(I:C) (polyinosinic-polycytidylic acid) and TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), and the phenotypes of mature DCs were detected by FCM (flow cytometry) on the 8th day. It was found that Poly(I:C) could promote DCs maturation more effectively. We also explored the effect of Poly(I:C) combined with adenovirus on the maturation of DCs, and the levels of CD80, CD83, CD86, HLA-DR (human leukocyte antigen DR) and IL-12 (interleukin-12) were detected by flow cytometry or ELISA. As a result, Poly(I:C) and adenovirus couldn't synergistically stimulate the maturation of DCs. Finally, we investigated the effect of different maturity of DCs on stimulating naive T cell activation. The results showed that DCs with higher maturity level could better induce naive T lymphocyte activation, and promote the secretion of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ).

**Keywords** dendritic cells; Toll-like receptors; Poly(I:C); adenovirus

手术是治愈多种恶性肿瘤的唯一希望,但大多数患者在确诊时已为晚期,无手术适应症。综合性治疗方案对改善患者生活质量、预防肿瘤复发、转移、延长患者生存时间仍不理想。近年来,过继性免疫细胞治疗成为一种新型的肿瘤治疗模式,并且被认为是治愈恶性肿瘤新的希望<sup>[1]</sup>。目前,树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(dendritic cells-cytokine induced killer cell, DC-CIK)是过继性免疫细胞治疗中应用最为广泛的一种<sup>[2]</sup>。

肿瘤细胞生长过程中会分泌不同的细胞因子,阻碍DC分化和成熟过程中不同信号转导通路,导致DC无法达到正常人体内DC成熟度水平,甚至可以直接诱导凋亡信号通路导致DC凋亡,引起DC数量减少和功能缺陷<sup>[3-4]</sup>。大多数肿瘤患者体内存在DC数量减少和功能障碍的情况,这提示我们,体外诱导足够数量、功能强大的DC有可能纠正患者的免疫缺陷,达到杀灭肿瘤细胞的目的。有研究显示,将正常人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)来源的CIK和DC共培养后,DC和CIK细胞数量较单独培养时显著增加、CIK细胞的杀伤活性也明显增强<sup>[5-6]</sup>。此外,研究者发现,效应细胞的数量是影响免疫效能的关键,只有当CIK细胞数大于 $1 \times 10^9$ 时其杀伤活性才能抑制肿瘤的进展<sup>[7]</sup>。

DC作为适应性免疫应答的起始者,是功能最强的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC),可识别肿瘤细胞表面的抗原,增强肿瘤细胞的免疫原性而有效避免免疫逃逸,同时,分化为成熟DC后表现出高效的抗原提呈功能和诱导初始T细胞活化参与免疫应答的功能<sup>[8-9]</sup>。未成熟DC多存在于外周血和各组织中,其摄取抗原、迁移、吞噬的能力较强。研究发现,未成熟DC由于功能缺陷,其表面表型的表

达和白介素-12(interleukin-12, IL-12)分泌量较低,无法将抗原肽有效提呈给免疫细胞,从而无法激活有效的免疫应答,在肿瘤微环境中诱导的是免疫耐受,而非免疫激活<sup>[10]</sup>。未成熟DC摄取抗原后,在病原体携带脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$ 干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )刺激下逐渐分化为成熟DC。成熟DC高表达主要组织相容性复合物I类分子(major histocompatibility complex-I, MHC-I)和CD80、CD83、CD86等表型<sup>[11]</sup>,同时摄取、处理抗原,迁移、吞噬的能力下降,但向免疫细胞提呈抗原、诱导初始T细胞活化为CD8<sup>+</sup>T细胞或CD4<sup>+</sup>T细胞、分泌IL-12的能力增强<sup>[12]</sup>。DC诱导免疫激活的前提是需要足够数量的高度成熟DC,及表达足够量的抗原肽和分泌大量细胞因子,才能有效地诱导免疫应答,发挥临床疗效。

Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)是果蝇Toll受体的同源物,可存在于不同细胞的细胞表面和细胞内,是模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)家族中的一员,通过识别并结合病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)<sup>[13]</sup>,起始信号转导通路,刺激产生不同类型的免疫应答并发生协同作用,起到了将天然免疫和适应性免疫应答联系在一起的作用。目前已经确定的人类Toll样受体家族成员有13个(TLR1~13)。它们分布于不同的免疫细胞表面或细胞内,如单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、树突状细胞等。自从发现Toll样受体3(TLR3)的配体可以作为干扰素诱生剂后,国内外开始大量探索TLR的功能并证实TLR的配体可作为免疫佐剂,有刺激DC成熟的作用,而且当2种TLR的配体联合作用时,联合组DC的IL-12分泌量明显高于单一刺激组,且DC表型的表达也明显升高,

提示TLR配体联合使用时能够协同刺激DC成熟,对增强免疫效果有更好的作用<sup>[14]</sup>。

腺病毒(adenovirus, Ad)是Toll样受体9(TLR9)的配体,关于腺病毒转染在促进DC成熟和激活作用上的作用目前尚无统一结论,有文献报道腺病毒转染能够促进DC的成熟<sup>[15]</sup>,但也有人持相反观点<sup>[16]</sup>。多聚次黄嘌呤胞嘧啶核苷酸[polyinosinic-polycytidylic acid, Poly(I:C)]是一种人工合成的高效干扰素诱生剂,是Toll样受体3的配体,可作为免疫佐剂。Poly(I:C)与许多疫苗联合应用时可显著增强疫苗的免疫原性<sup>[17]</sup>,促进DC的成熟,上调人类白细胞抗原-DR(human leukocyte antigen-DR, HLA-DR)、CD80、CD86和CD83的表达,从而提呈抗原,激活活化的CTL发挥免疫应答的功能。本研究比较了Poly(I:C)和TNF- $\alpha$ 在促进DC成熟方面的功能,同时还比较了Poly(I:C)协同腺病毒空载体对DC成熟的影响,最后探讨了不同成熟的DC对初始T淋巴细胞活化程度的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

患者外周血单核细胞(PBMC)由东方肝胆外科医院提供。腺病毒空载体(Ad-blank)由本实验室构建并保存。

### 1.2 实验试剂

AIM-V培养液和FBS购自Gibco公司;GM-CSF、IL-4、Poly(I:C)、IL-2、INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 购自Pepro Tech公司;anti-CD80-PE、anti-CD83-PECy5、anti-CD86-PE、anti-HLA-DR-PE、anti-TNF $\alpha$ -PE、anti-IFN $\gamma$ -PE流式抗体购自BECKMAN公司;IL-12 ELISA检测试剂盒购自达科为生物技术有限公司;Cell Stimulation Cocktail购自eBioscience公司;IntraPrep Permeabilization Reagent购自Immunotech公司;IgG1-PE同型、anti-CD28-PE、anti-CD137-PE、anti-CD107a-PECy5流式抗体购自BD公司;Anti-CD3-FITC购自BioLegend公司。

### 1.3 DC的制备和培养

利用Ficoll密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞,将分离的PBMC置于6孔板中,在37℃、含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养2~4 h。收集未贴壁的细胞并且冻存,以便后期和DC共培养,6孔板中贴壁的为DC。向6孔板中加入3 mL/孔无血清AIM-V培液和100 ng/mL GM-CSF、100 ng/mL IL-4(记为第0 d),第4 d补加上述细胞因子。第6 d分组,根据实验所需按

感染复数(multiplicity of infection, MOI)=5加入实验室构建的腺病毒空载体。第7 d向实验组中加入3  $\mu$ L促成熟因子Poly(I:C),对照组加入15  $\mu$ L TNF- $\alpha$ 刺激DC成熟,同时设1组不加任何物质的空白对照,观察细胞形态的变化,并收集细胞上清,用ELISA试剂盒检测DC的IL-12分泌量。第8 d收集成熟的DC和细胞上清,用流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测DC的表型,并用ELISA试剂盒检测第8 d细胞上清中IL-12的分泌量。第9 d再次收集细胞上清,检测IL-12的分泌量。

### 1.4 流式细胞术检测DC的表型

第8 d收集受促成熟因子Poly(I:C)刺激的实验组、受TNF- $\alpha$ 刺激的对照组以及不受任何物质刺激的空白对照组的DC,平均分成5份,加入到5个1.5 mL EP管中,用生理盐水洗涤1次,3 000 r/min离心5 min,弃上清,分别加入2  $\mu$ L的同型对照抗体、anti-CD80-PE、anti-CD83-PECy5、anti-CD86-PE、anti-HLA-DR-PE流式抗体,避光孵育30 min,用PBS洗涤1次,上机检测。

### 1.5 ELISA检测DC外IL-12的分泌水平

(1)根据实验孔(空白和标准品)数量,确定所需的板条数目;(2)加入样品(经样品稀释液适当稀释)及标准品(经稀释液倍比稀释),每孔100  $\mu$ L,设复孔;(3)加检测抗体:加入50  $\mu$ L/孔Biotinylated antibody工作液,混匀后盖上封孔膜,室温(18~25℃)孵育3 h;(4)洗板:倒掉孔内液体,每孔加入300  $\mu$ L 1 $\times$ 洗涤液,洗涤3次,每次1 min,拍干;(5)加入100  $\mu$ L/孔酶标二抗,盖上封板膜,室温孵育20 min;(6)重复步骤4;(7)显色:加入100  $\mu$ L/孔TMB,室温避光孵育10~20 min,当孔内颜色为深蓝色时终止反应;(8)终止反应:迅速加入100  $\mu$ L/孔终止液终止反应,在酶标仪上用450 nm的波长测D值,最后绘制标准曲线,算出样品的表达量。

### 1.6 活化T细胞的制备

收集第8 d实验组和对照组的DC,计数,作为刺激细胞,加入到6孔板中(实验组和对照组DC数相同)。复苏第0 d冻存的初始T细胞,计数,按T细胞:DC=20:1的比例往DC中加入初始T淋巴细胞。加入500 IU/mL IL-2,置于37℃、含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,4 d后收集活化的T细胞。

### 1.7 活化T细胞CD28、CD137和CD107a表达水平的检测

(1)将收集的活化T细胞,平均分成5份,加入到5

个1.5 mL EP管中, 3 000 r/min离心5 min, 弃上清; (2)加入1 mL生理盐水, 洗涤1次, 3 000 r/min离心5 min, 弃上清; (3)分别加入2  $\mu$ L同型对照抗体, 即anti-CD28-PE+anti-CD3-FITC、anti-CD137-PE+anti-CD3-FITC、anti-IgG2a-PECy5同型抗体和anti-CD107a-PECy5+anti-CD3-FITC, 混匀, 4  $^{\circ}$ C避光孵育30 min; (4)生理盐水洗涤1次, 上机检测。

### 1.8 流式细胞术检测活化T细胞内IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 的水平

将实验组和对照组细胞按2  $\mu$ L/mL培养基加入细胞因子刺激剂, 置于37  $^{\circ}$ C、含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养4~6 h。(1)收集实验组和对照组的细胞, 平均分成3份, PBS洗涤1次, 弃上清; (2)每管加入100  $\mu$ L IntraPrep Permeabilization Reagent试剂盒里的溶液1, 剧烈震荡后室温孵育15 min; (3)加入1 mL PBS, 洗涤1次, 1 200 r/min离心5 min, 弃上清; (4)每管加入100  $\mu$ L溶液2, 勿涡旋震荡, 室温孵育5 min; (5)加入5  $\mu$ L流式细胞术检测抗体TNF- $\alpha$ -PE、IFN- $\gamma$ -PE、IgG1-PE(同型), 室温避光孵育30 min; (6)生理盐水洗涤1次, 上机检测。

## 2 结果

### 2.1 Poly(I:C)刺激DC的成熟及鉴定

#### 2.1.1 人PBMC来源的DC培养过程中在光镜下的形

态 贴壁法获得DC, 第0 d, 细胞均匀散落在6孔板底, 无聚团, 细胞大都呈圆形或接近圆形, 小且无突触。IL-4、GM-CSF促分化后, 培养第4 d, 细胞散落不均匀, 体积较第0 d长大, 呈椭圆形、蝌蚪型或不规则形状, 部分细胞长出较短的突起。细胞因子刺激成熟后, 培养第8 d, 6孔板中大多数细胞呈半悬浮状态, 细胞体积较第4 d大, 细胞形态多不规则, 胞质饱满, 有多个突起突出, 为成熟DC。通过对比第8 d Poly(I:C)的实验组、TNF- $\alpha$ 的对照组以及空白对照组发现, 实验组细胞生长情况明显要比对照组好, 细胞数多, 体积较大, 并且大部分细胞有多个突起(图1)。

2.1.2 Poly(I:C)能够更好地刺激DC成熟 应用流式细胞术检测第8 d Poly(I:C)实验组、TNF- $\alpha$ 对照组以及空白对照组的DC表型CD80、CD83、CD86、HLA-DR水平, 发现Poly(I:C)实验组CD80、CD83、CD86和HLA-DR的水平分别为99.5%、64.7%、93.8%和11.9%, 显著高于对照组CD80(66.6%)、CD83(28.6%)、CD86(67.2%)、HLA-DR(2.7%)的水平, 空白对照组CD80、CD83和CD86的水平分别为48.8%、1.7%和59.3%, 显著低于Poly(I:C)实验组和TNF- $\alpha$ 对照组(图2)。此结果显示, Poly(I:C)实验组比TNF- $\alpha$ 实验组能更好地刺激DC的成熟。

2.1.3 Poly(I:C)诱导DC分泌更多的IL-12 在第7、8、9 d连续3 d收集实验组和对照组细胞上清, 然

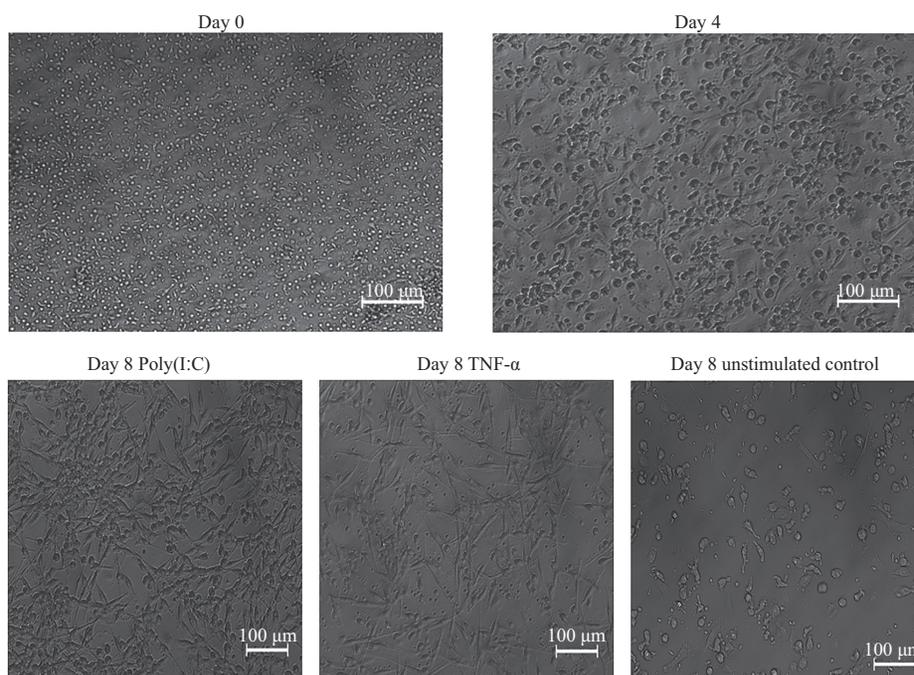


图1 在光镜下不同实验组DC的形态

Fig.1 The morphology of DCs in different groups under light microscope

后用IL-12的ELISA试剂盒检测实验组和对照组DC分泌到细胞外的IL-12的含量。结果表明, Poly(I:C)实验组IL-12的分泌量在第8 d达到最高, 第9 d已明显下降, 约为第8 d分泌量的一半, 提示DC在体外培养的第8 d成熟度最高, 而TNF- $\alpha$ 对照组在第7 d和第9 d几乎不分泌IL-12, 空白对照组在第7 d、第8 d和第9 d都检测不到IL-12, Poly(I:C)实验组IL-12的分泌量在第7、8、9 d时均高于对照组(图3), 这说明Poly(I:C)刺激DC成熟的能力较TNF- $\alpha$ 强。

## 2.2 Poly(I:C)协同腺病毒对DC成熟的影响及鉴定

### 2.2.1 在光镜下培养过程中DC的形态

IL-4、GM-CSF促分化培养4 d后, 大部分细胞仍贴壁生长, 只有少量的细胞悬浮, 长出较短的突起; 第7 d分别加入促成熟因子Poly(I:C)、Ad-blank和Poly(I:C)+Ad-blank; 培养第8 d, 6孔板中大多数细胞呈半悬浮状态, 细胞成团生长, 胞质饱满, 有多个突起, 为成熟DC。第8 d通过对比用Poly(I:C)、Ad-blank和Poly(I:C)+Ad-blank刺激成熟的DC发现, Poly(I:C)组

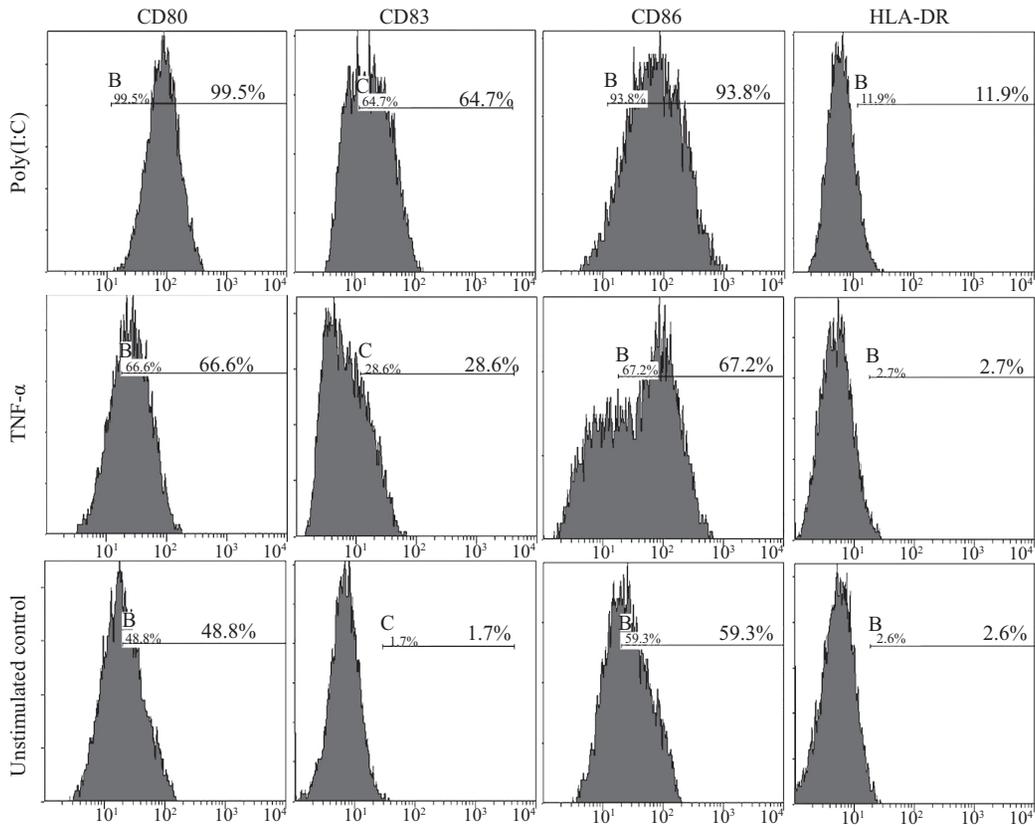


图2 流式细胞术检测DC的表型

Fig.2 The phenotypes of DCs detected by FCM

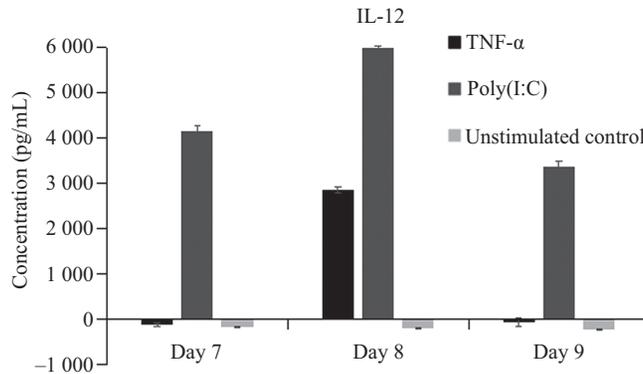


图3 实验组和对照组IL-12的分泌量

Fig.3 The secreted contents of IL-12 in the experimental group and the control group

和Poly(I:C)+Ad-blank组不规则状细胞数量相当, 大多数细胞成团生长, 且细胞表面可见明显突起, 而Ad-blank组细胞数相对较少, 细胞较分散(图4)。

**2.2.2 Poly(I:C)协同腺病毒对DC成熟的影响** 用流式细胞术检测采用不同促成熟因子刺激后第8 d DC的表型CD80、CD83、CD86和HLA-DR水平。结果显示, Ad-blank组CD80(43.6%)、CD83(2.5%)、CD86(56.5%)的水平均低于Poly(I:C)组和Poly(I:C)+Ad-blank组CD80(99.2%, 97.1%)、CD83(41.7%, 40.3%)、CD86(90.0%, 86.1%)的水平。然而我们发现, Poly(I:C)组和Poly(I:C)+Ad-blank组CD80、CD83、CD86和HLA-DR的水平均无明显差异, 说明Poly(I:C)和腺病毒空载体并不能协同促进DC的成熟(图5)。

**2.2.3 不同促成熟因子刺激后DC的IL-12分泌水平** 通过ELISA试剂盒检测不同促成熟因子刺激后第8 d DC分泌到细胞外IL-12的量, 发现Poly(I:C)组和Poly(I:C)+Ad-blank组IL-12的分泌量均高于Ad-blank组, 提示Poly(I:C)能够有效刺激DC分泌IL-12, 而Poly(I:C)组和Poly(I:C)+Ad-blank组IL-12的分泌量无统计学差异, 进一步说明Ad-blank并不能协同Poly(I:C)促进DC分泌更高水平的IL-12(图6)。

### 2.3 不同成熟度DC对T细胞活化程度的影响及其活性分析

#### 2.3.1 DC和T细胞共培养过程中T细胞在光镜下的

形态 在DC培养第8 d时, 重悬第0 d冻存的初始T细胞, 按DC:T=1:20的比例共培养, 同时加入500 IU/mL IL-2。共培养第4 d, 光学显微镜下观察T细胞的形态, 发现大多数初始T细胞被活化, 细胞成团生长, 散落不均匀, 细胞体积明显较初始T细胞大, 同时观察到细胞形态呈不规则形, 胞质饱满, 但是Poly(I:C)组比TNF- $\alpha$ 组一个视野内活化T细胞更多, 胞质更饱满(图7)。

**2.3.2 流式细胞术检测活化T细胞CD28、CD137、CD107a的水平** 在初始T细胞与DC共培养4 d后, 用流式细胞术检测了CD3<sup>+</sup>T细胞表面CD28、CD137、CD107a的水平, 发现Poly(I:C)组CD3<sup>+</sup>T细胞表面CD28、CD137、CD107a的水平分别为71.2%、12.6%和10.8%, 均高于TNF- $\alpha$ 组T细胞CD28(47.1%)、CD137(2.5%)、CD107a(3.1%)的水平(图8)。这说明, 成熟度较高的DC能够更好地诱导初始T细胞的活化。

**2.3.3 活化T细胞内IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 的水平** 在初始T细胞与DC共培养4 d后, 按2  $\mu$ L/mL培养基的量加入细胞刺激剂, 37  $^{\circ}$ C培养箱孵育4 h后收集细胞, 根据IntraPrep Permeabilization Reagent试剂盒的步骤进行固定、破膜处理。然后通过流式细胞术检测细胞内IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 的水平, 发现Poly(I:C)组IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的平均水平分别为22.1%和73.0%, 而对照组IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的平均水平分别为15.5%和50.2%(图

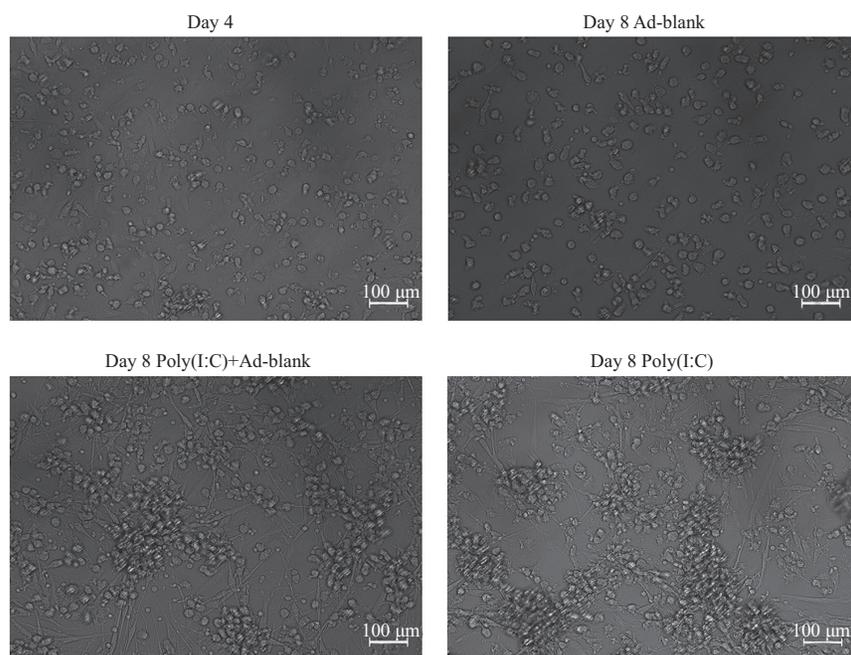


图4 在光镜下促成熟因子刺激后DC的形态

Fig.4 The morphology of DCs stimulated by maturation promoting factor

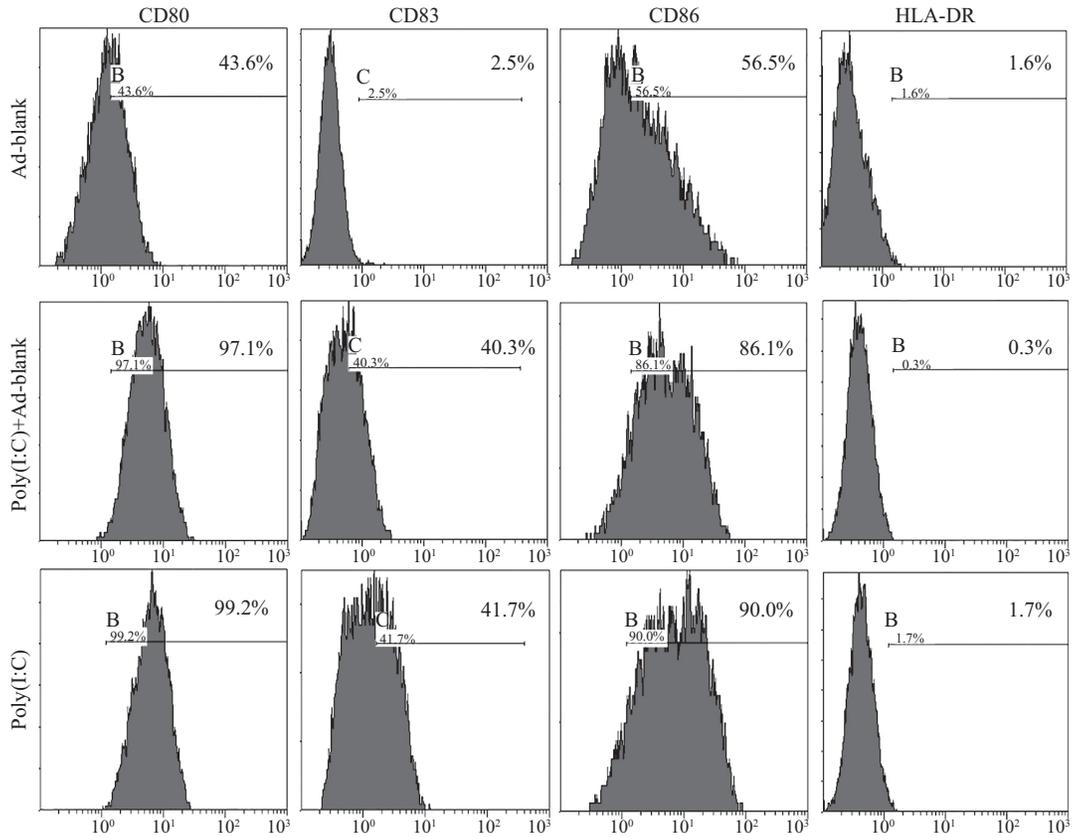


图5 Poly(I:C)协同腺病毒对DC表型的影响

Fig.5 Effect of Poly(I:C) combined with adenovirus on surface protein level in DCs

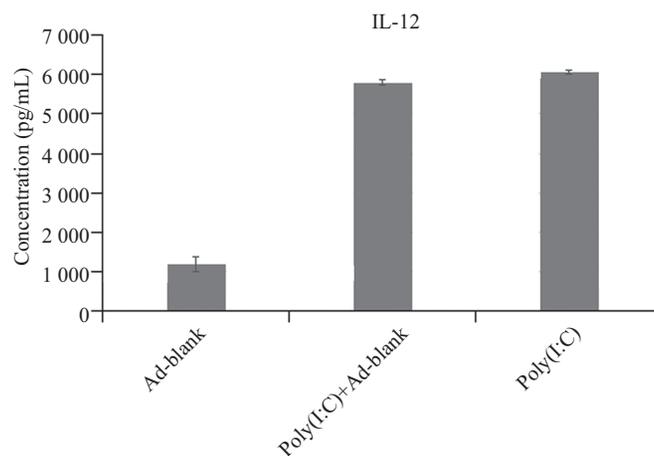


图6 不同促成成熟因子刺激后DC IL-12的分泌水平

Fig.6 The expression level of IL-12 after DCs were stimulated by different maturation promoting factor

9), 并且二者间有统计学差异。这进一步说明, 成熟度较高的DC刺激T细胞活化的能力更强。

### 3 讨论

在特异性免疫应答中, 效应细胞CTL的活化需要高度成熟的DC向初始T细胞提呈抗原, 并诱导其活化。成熟DC是抗原提呈功能最强的抗原提呈细

胞(APC), 也是唯一能刺激初始T细胞活化的APC, 对起始机体免疫应答和调节免疫系统稳定、增强免疫功能有重要意义。目前用于刺激DC成熟的物质有TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、LPS等, 它们可在一定程度上刺激DC成熟, 但仍无法得到与临床所需疗效相匹配的高度成熟DC。本研究通过比较Poly(I:C)和传统物质TNF- $\alpha$ 对DC成熟的影响, 并通过流式细胞

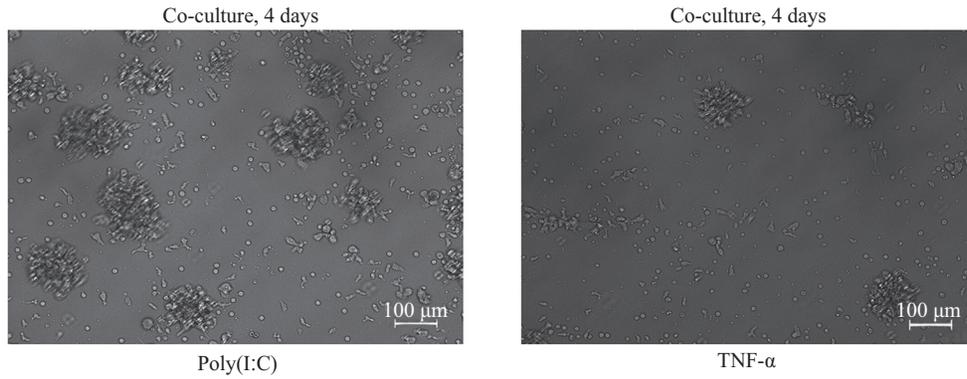


图7 在光镜下与DC共培养后T细胞的形态

Fig.7 The morphology of T cells after co-culture with DCs

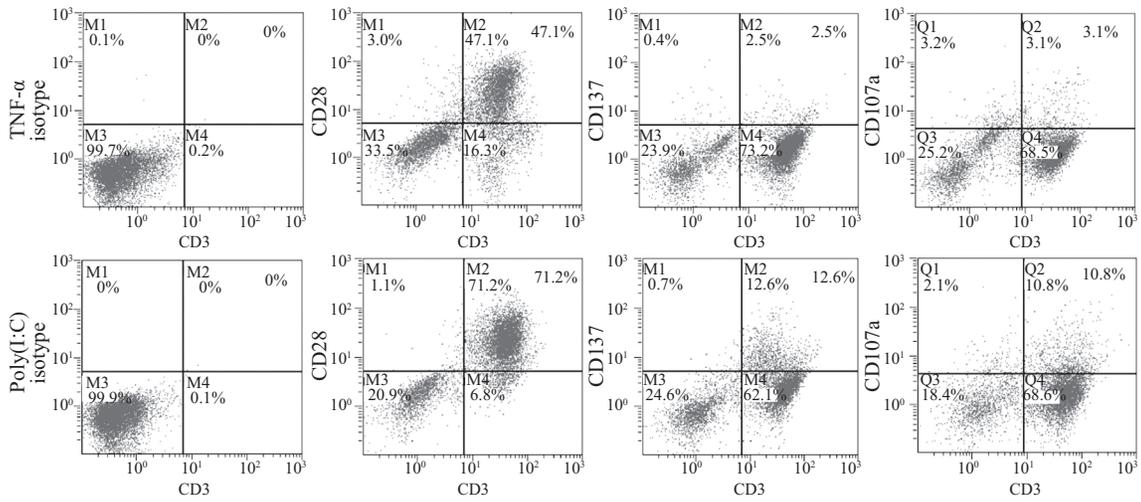


图8 DC和T细胞共培养后流式细胞术检测活化T的表型

Fig.8 The phenotypes of activated T cells after co-culture with DCs detected by FCM

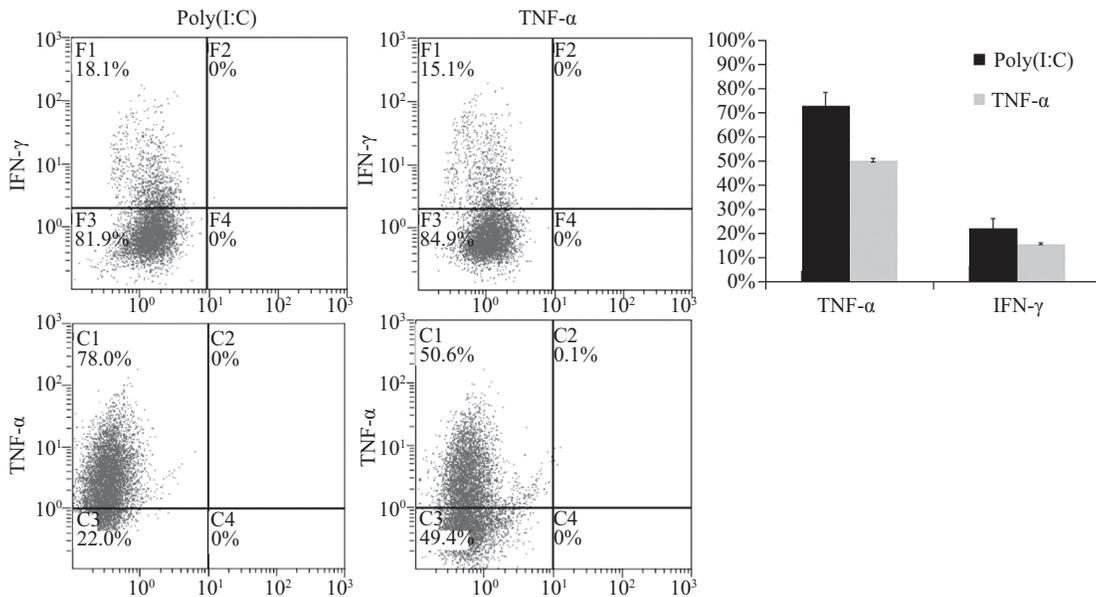


图9 活化T细胞内IFN-γ、TNF-α的水平

Fig.9 The levels of IFN-γ and TNF-α in activated T cells

术和ELISA检测两种物质刺激后DC的表型CD80、CD83、CD86、HLA-DR水平以及IL-12的分泌,发现Poly(I:C)较传统刺激DC成熟物质TNF- $\alpha$ 能更有效地刺激DC成熟,这为临床上提高DC-CTL的疗效提供了新方法。

关于腺病毒转染在促进DC成熟和激活的作用上目前尚无统一结论,有人认为腺病毒转染能够促进DC的成熟,有人则持相反的观点。本研究比较了Poly(I:C)协同腺病毒空载体对DC成熟的影响,发现Poly(I:C)组和Poly(I:C)+Ad-blank组DC的表型CD80、CD83、CD86、HLA-DR水平以及IL-12分泌没有明显差异,说明Ad-blank并不能协同Poly(I:C)促进DC的成熟。

DC与T细胞共培养,刺激T细胞活化后分泌大量的IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ 反过来又促进MHC类限制性分子高表达,然后提高DC的抗原提呈能力,同时又能分泌多种与细胞凋亡有关的细胞因子,以增强Fas介导的凋亡信号通路。成熟DC分泌的细胞因子的主要功能是协同活化NK细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞等各种效应细胞,以协助增强免疫效能达到最大的抗病毒、抗肿瘤作用<sup>[18]</sup>。同时,成熟DC分泌大量的IL-12,研究发现,DC分泌IL-12的水平与CTL分泌IFN- $\gamma$ 的水平呈正比,而IFN- $\gamma$ 的分泌水平可作为CTL活化程度的标志。此外,IL-12可以促进T细胞向CD8<sup>+</sup>T细胞分化,同时增强NK、NKT、CTL等细胞的活化能力<sup>[19-20]</sup>。本实验在初始T细胞与DC共培养4 d后,通过流式细胞术检测活化T细胞表面CD28、CD137、CD107a及细胞内TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 的水平。结果显示,实验组细胞因子TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 的水平显著高于对照组, Poly(I:C)刺激的实验组CD28、CD137和CD107a的水平也明显高于对照组。这说明,实验组T细胞的活化程度明显高于对照组,成熟度较高的DC刺激T细胞活化的能力更强。

机体内免疫系统失衡和肿瘤的发生发展密切相关。肿瘤细胞在生长过程中分泌的大量细胞因子会导致免疫细胞损伤甚至凋亡。肿瘤患者自身免疫系统紊乱提示低表达CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞,高表达CD8<sup>+</sup>细胞<sup>[21-22]</sup>。目前应用于治疗肿瘤的免疫疗法有TIL、NK细胞、DC-CIK等,但除了DC-CIK外,这些细胞均存在着不同的缺陷,无法大规模应用于临床。DC-CIK在多种肿瘤中得到广泛应用,但疗效十分有限,虽然DC-CIK可以适用于多种肿瘤,但对晚

期肿瘤患者效果较弱,且大多为联合治疗。对此,我们考虑其原因之一可能是DC成熟度不够,本研究发现, Poly(I:C)较TNF- $\alpha$ 刺激的DC成熟度更高,且能够更好地诱导T细胞活化。而我们所有实验的最终目的是应用于临床,缓解病人痛苦,延长生存时间,达到抗肿瘤的作用。在正常的CTL活化和增殖过程中,需要活性正常的初始T细胞、一定数量的成熟DC以及DC内一定量的抗原和共刺激信号。成熟DC的数量和DC所提呈的抗原数量是影响CTL活化和增殖的直接因素。

综上所述,本研究证实, Poly(I:C)比TNF- $\alpha$ 能更好地促进DC的成熟,并且DC的成熟度和初始T细胞的活化程度呈正相关,成熟度较高的DC刺激T细胞活化的能力更强。同时,我们也发现,腺病毒空载体和Poly(I:C)没有协同促进DC的成熟。

### 参考文献 (References)

- 1 Visioni A, Skitzki J. Technical considerations for the generation of adoptively transferred T cells in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)* 2016; 8(9): pii:E86.
- 2 Gammon T, Lee WJ, Zhang Z, Johnson B. A review of commonly used DC arc models. Pulp and Paper Industry Technical Conference, Conference Record of 2014, IEEE 2014; 34-43.
- 3 Chung TW, Kim SJ, Choi HJ, Kim KJ, Kim MJ, Kim SH, *et al.* Ganglioside GM3 inhibits VEGF/VEGFR-2-mediated angiogenesis: Direct interaction of GM3 with VEGFR-2. *Glycobiology* 2009; 19(3): 229-39.
- 4 Zong J, Keskinov AA, Shurin GV, Shurin MR. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. *Cancer Immunol Immunother* 2016; 65(7): 821-33.
- 5 Wei X, Zhai X, Zhao W, Yang D, Han X. Research on the biological activity and anti-tumor effect against lymphoma cells of DC-CIK cells. *Chinese-German J Clinl Onco* 2008; 7(11): 666-9.
- 6 Märtens A, Ziske C, Schöttker B, Renoth S, Weineck S, Buttgerit P, *et al.* Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations. *J Immunother* 2001; 24(6): 502-10.
- 7 钱其军, 吴孟超. 肿瘤过继细胞治疗——老故事新演绎. *中国肿瘤生物治疗杂志(Qian Qijun, Wu Mengchao. Adoptive cell therapy of cancer—an old story with new twist. Clin J Cancer Biother)* 2011; 18(1): 1-6.
- 8 Takeda T, Makita K, Okita K, Haba A, Xianhui D. Intratumoral injection of immature dendritic cells (DC) for cancer patients. *Gan To Kagaku Ryoho* 2005; 32(11): 1574-5.
- 9 Wathelet N, Moser M. Role of dendritic cells in the regulation of antitumor immunity. *Oncoimmunology* 2013; 2(4): e23973.
- 10 Galon J, Costes A, Sanchezcabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313(5795): 1960-4.

- 11 Hu W, Jain Y, Gao Y, Dozmorov IM, Mandraju R, Wakeland EK, *et al.* Differential outcome of TRIF-mediated signaling in TLR4 and TLR3 induced DC maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(45): 13994-9.
- 12 den Haan JM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett* 2014; 162(2): 103-12.
- 13 Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11(5): 373-84.
- 14 Gautier G, Humbert M, Deauvieu F, Scuiller M, Hiscott J, Bates EE, *et al.* A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 2005; 201(9): 1435-46.
- 15 Vujanovic L, Whiteside TL, Potter DM, Chu J, Ferrone S, Butterfield LH. Regulation of antigen presentation machinery in human dendritic cells by recombinant adenovirus. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58(1): 121-33.
- 16 Tillman BW, de Gruijl TD, Luykx-de Bakker SA, Scheper RJ, Pinedo HM, Curiel TJ, *et al.* Maturation of dendritic cells accompanies high-efficiency gene transfer by a CD40-targeted adenoviral vector. *J Immunol* 1999; 162(11): 6378-83.
- 17 Cao Y, Lu Z, Li Y, Sun P, Li D, Li P, *et al.* Poly(I:C) combined with multi-epitope protein vaccine completely protects against virulent foot-and-mouth disease virus challenge in pigs. *Antiviral Res* 2013; 97(2): 145-53.
- 18 Lazastanca V, Message SD, Edwards MR, Parker HL, Zdrenghea MT, Keadze T, *et al.* The role of IL-15 deficiency in the pathogenesis of virus-induced asthma exacerbations. *PLoS Pathog* 2011; 7(7): e1002114.
- 19 Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(2): 133-46.
- 20 Gardner A, Ruffell B. Dendritic cells and cancer immunity. *Trends Immunol* 2016; 37(12): 855-65.
- 21 Lee WC, Wu TJ, Chou HS, Yu MC, Hsu PY, Hsu HY, *et al.* The impact of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2012; 151(2): 213-22.
- 22 Chen KJ, Zhou L, Xie HY, Ahmed TE, Feng XW, Zheng SS. Intratumoral regulatory T cells alone or in combination with cytotoxic T cells predict prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *Med Oncol* 2012; 29(3): 1817-26.