

黄芪注射液增强树突细胞的抗肺癌作用

董晓辉, 董竞成

(复旦大学附属华山医院中西医结合肺和特异性疾病研究室, 上海 200040)

摘要:目的: 研究黄芪注射液联合 MHC I 类限制性肿瘤抗原多肽 Mut1 致敏的树突细胞(DCs)对肺癌小鼠的治疗作用及其免疫学原理。方法: 制备小鼠骨髓来源的树突细胞, 用转移性 Lewis 肺癌特异性多肽 Mut1 预激 DCs 并联合黄芪注射液治疗肺癌小鼠, 通过 FACS 分析其脾细胞内 T 淋巴细胞比例的变化, 用 Elisa 法检测荷瘤小鼠血清内 IL-2、IL-4 浓度的变化, 间接提示 Th1/Th2 比例的变化。同时免疫正常小鼠, 观察宿主对随后肿瘤细胞攻击的保护作用。结果: 肿瘤抗原多肽致敏的 DCs 与黄芪注射液联合治疗后, 比单用 DCs 更有效的治疗转移性肺癌, 小鼠脾细胞内 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞明显比例升高, 联合治疗组的 IL-2/IL-4 比例也明显升高。在观察时间内经黄芪注射液和 DCs 联合免疫的小鼠成瘤率低于对照组和单用 DCs 组。结论: 以肿瘤抗原多肽致敏的 DCs 与黄芪注射液联合治疗能更有效的促进荷瘤宿主的免疫应答, 具有显著的体内抑制肺癌转移的效果。对正常动物免疫保护作用更加明显。

关键词: 树突细胞; 肺癌; 黄芪注射液

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-9903(2005)01-0025-04

Effects of Dendritic cells Combined with Astragalus on Lewis Lung Cancer

DONG Xiao-hui, DONG Jing-cheng

(Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: Objective: To investigate the antitumor effects and mechanisms of tumor antigen peptide-pulsed dendritic cells combined with Astragalus. Methods: High purity DCs were obtained from 9-day culture of murine bone marrow cells. Mut1 is a MHC class I-restricted tumor antigen peptide of Lewis lung cancer. DCs were incubated with Mut1, then vaccines were established. Lung cancer were established on the mice. The tumor-bearing mice were treated and the survival period of the mice was observed. Treatment groups were divided into PBS, DC-Mut1, DC-Mut1 with Astragalus(DC-Mut1+ AG). The phenotypes of splenocytes of these treated mice were detected by FACS. Interleukin-2 and interleukin-4 in the serum were measured by cytokine-specific ELISA. Normal mice developed a potent immune protection against the attack from tumor cells. The treatment groups were same as the previous groups. Results: The DC-Mut1+ AG group demonstrated antitumor effects with the regression majority of tumors. The proportion of the CD4⁺ T and CD8⁺ T cells in DC-Mut1+ AG group increased compared with that of DC-Mut1 group($P < 0.05$). The IL-2 level of DC-Mut1+ AG group was higher than those of DC-Mut1 group. The IL-4 level of DC-Mut1+ AG group was lower than that of the PBS group. Upon undergoing attack from LLC cells, DC-Mut1+ AG group had no formation of tumors. In contrast, 4 of all the mice(6) treated with DC-Mut1 developed tumors. Conclusion: DC-Mut1+ AG could exert antitumor effects in the mice and significantly inhibit tumor metastasis, which demonstrated a specific immune protection.

Key words: Dendritic cells; Lewis lung cancer; Astragalus

树突细胞(dendritic cells, DCs)是目前已知的功能最强的抗原提呈细胞, 运用肿瘤抗原多肽致敏的 DCs 治疗肿瘤是树突状细胞研究领域的热门课题^[1-2]。有文献^[3-4]应用 Mut1 致敏的 DCs 治疗转移

性 Lewis 肺癌取得了显著疗效, 其机理在于有效诱导了荷瘤小鼠产生了肿瘤抗原特异性细胞毒性 T 细胞(CITL)。若能进一步增强 DCs 对 CITL 诱导作用将有可能更有效的提高治疗效果, 同时考虑到黄芪注射液(Astragalus, AG)能有效的逆转 Th1/Th2 比例^[5], 因此我们设想, 在应用肿瘤抗原多肽致敏的 DCs 治疗肿瘤的同时, 联合运用 AG 将有可能更有效的协同

收稿日期: 2004-03-23

通讯作者: 董竞成, Tel: (021) 62494664,

E-mail: jcdong2004@126.com

诱导荷瘤宿主产生肿瘤抗原特异性的 CTL, 从而取得更佳的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 H-2K^b 限制性的小鼠 Lewis 肺癌细胞株的 Mut1 抗原 8 肽 (FEQNTAQP), 由西安美联公司合成纯化, 纯度 > 95%; 重组 GM-CSF 和重组小鼠 IL-4 购自美国 Peprotech 公司; 荧光标记的抗 CD86 抗体 抗 MHC-I 类分子 (I-H-2K^b)、抗 MHC-II 类分子 (I-A^b) 购自美国 CALTAG 公司; 荧光标记的抗 CD3⁺、抗 CD4⁺ 和抗 CD8⁺ 购自美国 CALTAG 公司。小鼠 IL-2 JIL-4 ELISA 试剂盒购自奥地利 Bender MedSystems 公司。黄芪注射液: 正大青春宝药业有限公司, 20g/10mL, 批号: 0306012。

1.2 动物和细胞株 C57BL/6 小鼠 (H-2K^b), 雌性, 6~8 周龄, 购自中科院上海实验动物中心。Lewis 肺癌细胞株 (LLC): 中科院上海细胞所提供。

1.3 小鼠骨髓来源 DCs 的培养和肿瘤抗原多肽的 Mut-1 致敏 获取 C57BL/6 小鼠股骨骨髓细胞 (2 × 10⁶/mL), 用含 10% FCS、重组小鼠 GM-CSF 20ng/mL 和重组小鼠 IL-4 5ng/mL 的 RPMI 1640 液培养基在 24 孔板中培养。培养至第 3 天, 吸弃悬浮细胞, 补足新鲜培养基; 培养至第 7 天, 收集悬浮细胞, 置于另一培养板 (1 × 10⁶/mL) 继续培养 2~3 天, 收集悬浮细胞即为 DCs。将培养至第七天的 DCs 与 GM-CSF、IL-4 与多肽抗原 Mut-1 (0.1mg/mL) 于 37 °C 共同孵育 24h, 收集细胞并离心洗涤 3 次, 用生理盐水调整至 1 × 10⁶/mL (DC-Mut1)。

1.4 自发性转移性肺癌模型的建立 将 5~6 周龄的 C57BL/6 小鼠足垫注射 Lewis 肺癌细胞 5 × 10⁵ (50μL)⁻¹/只。当 Lewis 肺癌细胞接种后第 13 天, 荷瘤小鼠足垫部肿瘤直径长至 8~10mm 时, 于 0.67% 戊巴比妥钠 67mg/kg 麻醉下 2% 的碘酒消毒患肢, 于膝关节处进行截肢术。至截肢 20 天后称取小鼠肺重量, 观察、计数肺部表面转移结节数, 以确定转移模型成功与否。

1.5 Mut1 致敏的 DCs 与 AG 联合治疗肺癌 将自发性肺癌小鼠随机分为下面各治疗小组, 每组 15 只。①PBS 对照治疗组 (PBS), 即截肢后第 2 天至第 15 天皮下注射 PBS 100μL。②DC-Mut1 治疗组 (DC-Mut1), 即截肢后第 2 天肩部皮下注射 DC-Mut1 5 × 10⁵/100μL, 第 8 天、15 天时再分别注射 DC-Mut1 5 × 10⁵/100μL。③DC-Mut1 联合 AG 治疗组 (DC-Mut1+AG)。即截肢后第 2 天到第 15 天每天腹腔注射 AG

50g/kg, 同时在截肢后第 2、8、15 天共三次肩部皮下注射 DC-Mut1 5 × 10⁵/100μL。在截肢后第 20 天时, 各组杀死小鼠 5 只, 观察这些小鼠的肺重量和肺表面结节数; 另外观察各组剩余 10 只小鼠的生存期和存活率。

1.6 经治疗荷瘤小鼠脾细胞表型的分析 上述荷瘤小鼠截肢后, 于免疫治疗的第 20 天取各组小鼠脾脏, 制备单细胞悬液, 去除红细胞后, 用大鼠抗小鼠直接荧光标记的抗 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ 单克隆抗体标记 30min 后经 FACS 分析各组脾细胞内 T 淋巴细胞的比例。

1.7 诱导小鼠抗肿瘤免疫保护实验 取 18 只雌性 6~8 周龄 C57BL/6J 正常小鼠, 随机分为 3 组, 每组 6 只, 分组情况同治疗组。每组免疫途径和剂量同前, 只是免疫时间是原来的 2 倍即 30 天。第 31 天时小鼠足垫注射 Lewis 肺癌细胞 5 × 10⁵ (50μL)⁻¹/只, 观察瘤体的生长情况。

1.8 小鼠血清内 IL-2 和 IL-4 浓度的测定 采用 ELISA 方法。以标准品的浓度为横坐标, 以相应的吸光度值为纵坐标, 先做标准曲线。然后样本吸光度由标准曲线查得相应浓度值 (pg)。

1.9 统计学处理 采用单因素方差分析, Q 检验行两组间转移参数的比较。以时序检验比较截肢后 3 个月各组间生存期及存活率的组间差异, P < 0.05 具有统计学差异。

2 结果

2.1 Mut1 致敏的 DCs 联合 AG 对荷瘤小鼠的治疗效果 截肢 20d 后处死各组小鼠, 取肺称重, 结果显示, DC-Mut1+AG 联合治疗组肺重量平均为 284mg, 而与其它组之间存在显著性差异 (P < 0.01)。DC-Mut1 组治疗效果强于 PBS 组 (P < 0.05)。这些结果表明, 中药黄芪对 DC 疫苗治疗肺癌的增强作用明显。(详见表 1)

表 1 治疗后荷瘤小鼠肺重量和肺表面转移结节数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	肺重量 (mg)	肺表面转移结节数
Normal mice	181 ± 22	—
PBS	1050 ± 32	49.3 ± 4.1
DC-Mut1	435 ± 43 ¹⁾	8.1 ± 1.4
DC-Mut1+AG	284 ± 33 ²⁾	3.0 ± 0.6

治疗组与 PBS 组相比¹⁾ P < 0.05; 治疗组与 PBS 组和 DC-Mut1 组相比²⁾ P < 0.01, 以下同

对经治疗后的荷瘤小鼠的生存期及存活率的观察显示 (详见图 1): DC-Mut1+AG 联合治疗组小鼠

生存期最长, 到第 52 天时还有 80% 的小鼠存活, 而 PBS 组 35 天时已经全部死亡, 其生存率高于 DC 疫苗组和 PBS 组 ($P < 0.05$)。DC 疫苗组小鼠的生存期及存活率高于 PBS 组 ($P < 0.05$)。

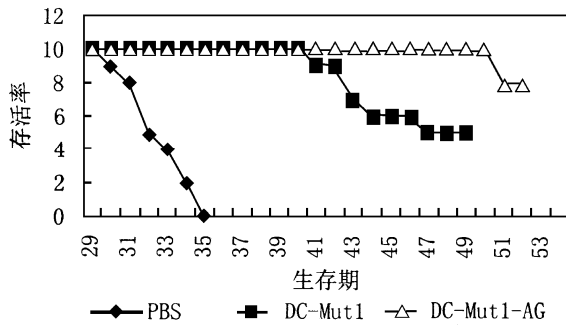


图 1 荷瘤小鼠的生存期及存活率 ($n = 10$)

2.2 经治疗荷瘤小鼠脾细胞表型的分析 荷瘤小鼠截肢后免疫治疗的第 20 天, FACS 分析荷瘤小鼠脾细胞表型。结果可见, PBS 组与正常小鼠组相比, $CD3^+$ T、 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 细胞降低 ($P < 0.05$)。DC-Mut1+ AG 组与 PBS 组相比, $CD3^+$ T、 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞增高 ($P < 0.05$), 其中 $CD4^+$ T 细胞与 DC-Mut1 组相比有显著性差异 ($P < 0.01$)。DC-Mut1 组与 PBS 组相比, $CD3^+$ T、 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞增高 ($P < 0.05$)。(详见表 2)

表 2 荷瘤小鼠脾细胞中 T 细胞亚群的比例 ($\bar{x} \pm s, n = 5, \%$)

组别	$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$
Normal mice	35.8 ± 0.8	22.9 ± 1.0	12.9 ± 1.0
PBS	$21.9 \pm 0.7^{3)}$	$11.8 \pm 1.9^{3)}$	$10.0 \pm 1.3^{3)}$
DC-Mut1	$28.4 \pm 0.9^{1)}$	$16.3 \pm 0.4^{1)}$	$12.1 \pm 0.6^{1)}$
DC-Mut1+ AG	$31.8 \pm 1.0^{1)}$	$18.9 \pm 1.4^{1)2)}$	$12.7 \pm 0.5^{1)}$

PBS 组与 Normal mice 组相比³⁾ $P < 0.05$

2.3 荷瘤小鼠血清内 IL-2 和 IL-4 浓度的测定 DC-Mut1+ AG 组的 IL-2 比其他两组的 IL-2 浓度都高 ($P < 0.05$)。DC-Mut1 组的 IL-2 高于 PBS 组 ($P < 0.05$)。DC-Mut1+ AG 组的 IL-4 比 PBS 组浓度低 ($P < 0.05$)。(详见表 3)

表 3 荷瘤小鼠血清内 IL-2 和 IL-4 浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)
PBS	8.365 ± 0.370	8.276 ± 1.036
DC-Mut1	$10.592 \pm 1.795^{1)}$	7.085 ± 1.365
DC-Mut1+ AG	$13.463 \pm 1.731^{1)2)}$	$6.385 \pm 0.393^{1)}$

2.4 免疫保护实验 LLC 攻击实验中, 在接种 LLC 后观察的第 21 天, DC-Mut1+ AG 治疗组无一成瘤, PBS 组全部成瘤, DC-Mut1 组有 4 只成瘤 (成瘤率为

66.7%)。(详见表 4)

表 4 免疫小鼠受 LLC 细胞攻击后的成瘤率 ($n = 6$)

组别	观察时间 (d)	成瘤率 (%)	接种细胞数 (个)
PBS	21	100 (6/6)	5×10^5
DC-Mut1	21	66.7 (4/6) ¹⁾	5×10^5
DC-Mut1+ AG	21	0 ²⁾	5×10^5

3 讨论

T 细胞介导的免疫排斥反应是机体抗肿瘤免疫应答的最重要组成部分, 抗原递呈是诱导和调节 T 细胞免疫的中心环节。通过调节肿瘤抗原的提呈以增强抗肿瘤免疫应答是目前肿瘤免疫治疗的重要策略之一。Th1 细胞主要介导机体的细胞免疫, 而细胞免疫是机体抗肿瘤免疫应答的主要形式, 可见如要机体处于良好的抗肿瘤状态, Th1 型反应应占主导地位, 而 Th2 型反应的优势状态将干扰机体的抗肿瘤免疫, 如果能使宿主机体的 Th2 向 Th1 反应逆转, 可为肿瘤治疗提供另一新手段。

DCs 作为功能最强的抗原提呈细胞和免疫反应的启动者, 与机体的免疫状态密切相关, 且在肿瘤免疫治疗中已显示出其独特的临床应用价值^{6,7)}。

DCs 的抗原提呈有赖于其体内与 T 细胞的相互作用: DCs 将抗原提呈给 $CD4^+$ T 细胞, 由 Th1 细胞释放的细胞因子 IL-2 作用于 CTL 或靶细胞, 从而产生 CTL 活化的第二信号; 同时 DCs 的成熟分化也受 Th1/Th2 反应状态的影响⁸⁾。本研究选择 MHC I 类抗原限制性多肽 Mut1 致敏 DCs, 希望高效发挥 DCs 通过 MHC I 类途径对抗原的提呈, 与此同时联合应用能改善 Th1/Th2 反应状态的中药黄芪, 以提高对特异性抗肿瘤免疫反应的诱导效果。

结果表明, 应用 Mut1 致敏的 DCs 联合黄芪注射液治疗转移性肺癌, 可使其肺部转移结节明显减少, 荷瘤小鼠的生存期明显延长, 体内特异性免疫功能得到较大程度的提高, 同时 Th2 向 Th1 反应逆转。黄芪注射液与 DCs 疫苗在肿瘤切除后及时联合应用, 可提高机体多环节的抗肿瘤免疫反应, 有效防止手术残留的癌细胞扩散而取得较理想的免疫治疗效果, 本研究同时阐明了补气中药黄芪在抗肿瘤免疫治疗中所起作用的部分机理。

参考文献:

- [1] Paczesny S, Ueno H, Fay J. Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13 (6): 439-447.

- [2] Ardavin C, Amigorena S, Reis e Sousa C. Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy [J]. *Immunity*, 2004, 20(1) : 17-23.
- [3] 章卫平, 何龙, 曹雪涛. 淋巴细胞趋化因子基因修饰增强肿瘤多肽致敏的树突状细胞的抗肿瘤免疫效果 [J]. *中华医学杂志*, 1999, 79(3) : 170-176.
- [4] K. Shimizu, R. C. Fields. Systemic administration of interleukin 2 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5) : 2268-2273.
- [5] 肖伟, 郑春燕, 孙继萍, 等. 肺癌 TH1/TH2 反应状态及黄芪的调节作用 [J]. *山东医科大学学报*, 2001, 39(4) : 309-313.
- [6] Orange DE, Jegathesan M, Blachere NE, et al. Effective antigen cross-presentation by prostate cancer patients' dendritic cells: implications for prostate cancer immunotherapy [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2004, 7(1) : 63-72.
- [7] Homma S, Matai K, Irie M, Ohno T, et al. Immunotherapy using fusions of autologous dendritic cells and tumor cells showed effective clinical response in a patient with advanced gastric carcinoma [J]. *J Gastroenterol*, 2003, 38(10) : 989-994.
- [8] Buatois V, Baillet M, Becart S, et al. MHC class II-peptide complexes in dendritic cell lipid microdomains initiate the CD4 Th1 phenotype [J]. *J Immunol*, 2003, 171(11) : 5812-5819.