

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102559598 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201110448122. 3

(22) 申请日 2011. 12. 27

(71) 申请人 陆华

地址 214000 江苏省无锡市江海西路 888 号
金山北科技产业园

(72) 发明人 陆华

(51) Int. Cl.

C12N 5/09 (2010. 01)

C12Q 1/02 (2006. 01)

G01N 15/10 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

A61K 39/00 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备与检测方法

(57) 摘要

本发明提出一种热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备与检测方法,其应用于热休克凋亡脑胶质瘤负载树突状细胞肿瘤疫苗的制备工艺,所述制备工艺采用先将肿瘤细胞处于热休克状态,诱导细胞高表达热休克蛋白 (HSP),再用化学药物诱导细胞凋亡进而制备成富含热休克蛋白的凋亡细胞抗原,制备好的抗原与未成熟的 DC 细胞混合培养获得成熟的 DC 疫苗。本发明采用热休克法负载制备得到的 DC 疫苗成熟度高,可用于诱导免疫应答。

S1. 热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备和检测



S2. DC 肿瘤疫苗的制备和检测

1. 一种热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备与检测方法,其应用于热休克凋亡脑胶质瘤负载树突状细胞肿瘤疫苗的制备工艺,所述制备工艺包括步骤:热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备和检测以及 DC 肿瘤疫苗的制备和检测;其中,所述热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备和检测方法包括:

采用的人脑胶质瘤细胞株 U251 引自美国 ATCC,按常规方法传代培养;用 RPMI1640 培养基调整细胞浓度至 $10^6/\text{ml}$,将细胞置于 40°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中 3h,取出细胞培养瓶,加入白桦酯酸至终浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$,将细胞培养瓶移至 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱继续培养诱导细胞凋亡;收获凋亡细胞,加入无菌 PBS 洗涤 4 次,获得凋亡肿瘤细胞抗原;

肿瘤细胞经 40°C 处理 3h 后用 FITC-Annexin-V 和 PI 双标细胞后进行流式检测计算凋亡率结果;

软琼脂克隆法检测细胞抗原体外成瘤能力;以及
取制备抗原进行内毒素检测。

热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备与检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备与检测方法,其应用于热休克凋亡脑胶质瘤负载树突状细胞肿瘤疫苗的制备工艺。

背景技术

[0002] 脑恶性胶质瘤是中枢神经系统原发性恶性肿瘤中最常见的肿瘤。因生长速度快且沿神经纤维浸润性生长,致使手术难以完全切除;同时对化疗和放疗仅为中度敏感。因此,目前现有的国际公认的常规手术、放疗、化疗的序贯治疗方案,难以根治脑恶性胶质瘤。免疫治疗是通过调整、提高机体免疫系统功能,清除残留的肿瘤细胞,达到真正的治愈的目的。目前,以 DC 为基础的细胞疫苗治疗是一种主动免疫治疗,正成为研究的热点。DC 是体内最强大的抗原提呈细胞 (antigen presenting cell APC),其抗原提呈能力可为其他提呈细胞的数百倍,能有效刺激静息的 T 细胞诱发初次免疫应答,其在 T 细胞对肿瘤抗原的识别过程中起着重要的作用,DC 能通过血脑屏障进入靶向区,从而发挥特异性抗肿瘤效应。DC 的体外培养在目前已经是一项常用的生物治疗技术,国内外动物和临床试验研究的常用方法可分为四类:1) 特异性肿瘤抗原肽负载 DC。肿瘤抗原肽可以通过人工合成、弱酸洗脱肿瘤表面的 MHC-I 类抗原肽获得;2) 肿瘤细胞抗原负载 DC。利用超声波破碎、反复冻融或放射线辐照肿瘤细胞等方法获取肿瘤细胞性抗原,然后致敏 DC 制备的疫苗;3) 肿瘤细胞-DC 融合体疫苗。DC 与肿瘤细胞融合后的杂交细胞可获得双亲本细胞的表型特性;4) 肿瘤细胞 RNA 或 cDNA 负载 DC。如何选择一种高效、安全的 DC 疫苗制备法是主动细胞免疫治疗成败的关键,对于临床推广价值意义重大。本方法属于第二类,先将肿瘤细胞处于热休克状态,诱导细胞高表达热休克蛋白 (heat shock proteins HSP),再用化学药物诱导细胞凋亡进而制备成富含热休克蛋白的凋亡细胞抗原,制备好的抗原与未成熟的 DC 细胞混合培养制备成熟的 DC 疫苗。

发明内容

[0003] 为实现本发明的目的,本发明提出一种热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备与检测方法,其应用于热休克凋亡脑胶质瘤负载树突状细胞肿瘤疫苗的制备工艺,所述的制备工艺采用先将肿瘤细胞处于热休克状态,诱导细胞高表达热休克蛋白 (HSP),再用化学药物诱导细胞凋亡进而制备成富含热休克蛋白的凋亡细胞抗原,制备好的抗原与未成熟的 DC 细胞混合培养获得成熟的 DC 疫苗。热休克脑胶质瘤细胞负载的 DC 疫苗具有较好的凋亡率。且采用热休克法负载制备得到的 DC 疫苗成熟度高,可用于诱导免疫应答。

[0004] 具体的,所述的制备工艺包括如下步骤:

[0005] S1. 热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备和检测:

[0006] 人脑胶质瘤细胞株 U251 引自美国 ATCC,按常规方法传代培养。用 RPMI1640 培养基调整细胞浓度至 $10^6/\text{ml}$,将细胞置于 40°C , $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中 3h,取出细胞培养瓶,加入白桦酯酸至终浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$,将细胞培养瓶移至 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱继续培养诱导细胞凋

亡。收获凋亡细胞,加入无菌 PBS 洗涤 4 次,获得凋亡肿瘤细胞抗原。

[0007] 肿瘤细胞经 40℃处理 3h 后用 FITC-Annexin-V 和 PI 双标细胞后进行流式检测计算凋亡率结果。

[0008] 软琼脂克隆法检测细胞抗原体外成瘤能力,结果显示凋亡细胞中无肿瘤细胞克隆生长;内毒素检测按《中华人民共和国药典》2005 版第三部规定的方法进行;取制备抗原进行内毒素检测。

[0009] S2. DC 肿瘤疫苗的制备和检测

[0010] 采集 3 个自愿者外周血,采用人工肝素抗凝采集的外周血,置于冰上运输至实验室,2,000r/min,10min,20℃获得血细胞,稀释 2 倍后,Ficoll 分离法分离血细胞获取一次新鲜的外周血单个核细胞。用培养基重悬新鲜制备的 PBMC 后铺于六孔细胞培养板中,放置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中 90min 后,洗去未贴壁细胞,于培养板内加入含 100ng/mL GM-CSF, 50ng/mL IL-4 的 RPMI 1640 完全培养基,第 3d 进行换液,第 5d 收获未成熟 DC(imDC),加入凋亡肿瘤细胞抗原(DC 与靶细胞抗原的比例为 3 : 1),至 37℃,5% CO₂ 培养箱共同培育 48h,收获 DC 细胞,苔盼蓝染色进行细胞计数与表型检测。

附图说明

[0011] 通过下面结合附图的详细描述,本发明前述的和其他的目的、特征和优点将变得显而易见。其中:

[0012] 图 1 所示为本发明的热休克凋亡脑胶质瘤负载树突状细胞肿瘤疫苗的制备工艺的步骤流程示意图。

具体实施方式

[0013] 如图 1 所示的本发明的热休克凋亡脑胶质瘤负载树突状细胞肿瘤疫苗的制备工艺的步骤流程示意图,所述实施例的具体步骤如下:

[0014] S1. 热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备和检测:

[0015] 人脑胶质瘤细胞株 U251 引自美国 ATCC,按常规方法传代培养。用 RPMI1640 培养基调整细胞浓度至 10⁶/ml,将细胞置于 40℃,5% CO₂ 培养箱中 3h,取出细胞培养瓶,加入白桦酯酸至终浓度为 10 μg/ml,将细胞培养瓶移至 37℃,5% CO₂ 培养箱继续培养诱导细胞凋亡。收获凋亡细胞,加入无菌 PBS 洗涤 4 次,获得凋亡肿瘤细胞抗原。

[0016] 肿瘤细胞经 40℃处理 3h 后用 FITC-Annexin-V 和 PI 双标细胞后进行流式检测计算凋亡率结果显示,凋亡率平均值为 66.23%。

[0017] 软琼脂克隆法检测细胞抗原体外成瘤能力,结果显示凋亡细胞中无肿瘤细胞克隆生长。内毒素检测按《中华人民共和国药典》2005 版第三部规定的方法进行。取制备抗原进行内毒素检测。

[0018] S2. DC 肿瘤疫苗的制备和检测

[0019] 采集 3 个自愿者外周血,采用人工肝素抗凝采集的外周血,置于冰上运输至实验室,2,000r/min,10min,20℃获得血细胞,稀释 2 倍后,Ficoll 分离法分离血细胞获取一次新鲜的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell PBMC)。用 RPMI 1640 培养基重悬新鲜制备的 PBMC 后铺于六孔细胞培养板中,放置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中 90min

后,洗去未贴壁细胞,于培养板内加入含 100ng/mL GM-CSF,50ng/mL IL-4 的 RPMI 1640 完全培养基,第 3d 进行换液,第 5d 收获未成熟 DC(imDC),加入凋亡肿瘤细胞抗原(DC 与靶细胞抗原的比例为 3 : 1),至 37℃,5% CO₂ 培养箱共同培育 48h,收获 DC 细胞,苔盼蓝染色进行细胞计数与表型检测。进行流式检测 HLA-DR⁺CD11c⁺、CD11c⁺CD86⁺、CD11c⁺CD83⁺。经流式细胞仪 FACS 分析显示,DC 的公认标志 HLA-DR⁺CD11c⁺ 的平均值凋亡组为 90.90%,DC 的成熟标志 CD11c⁺CD83⁺ 的平均值凋亡组为 73.03%,DC 的成熟标志 CD11c⁺CD86⁺ 的平均值凋亡组为 86.04%。

[0020] 本研究方法采用先将肿瘤细胞处于热休克状态,诱导细胞高表达热休克蛋白(HSP),再用化学药物诱导细胞凋亡进而制备成富含热休克蛋白的凋亡细胞抗原,制备好的抗原与未成熟的 DC 细胞混合培养获得成熟的 DC 疫苗。热休克脑胶质瘤细胞负载的 DC 疫苗具有较好的凋亡率,经流式细胞术检测,DC 疫苗具有成熟 DC 的表型特征,DC 的公认标志 HLA-DR⁺CD11c⁺ 的平均值为 90.90%,DC 的成熟标志 CD11c⁺CD86⁺ 的平均值为 73.03%,CD11c⁺CD83⁺ 的平均值为 86.04%,高表达 CD83、CD86。显示采用热休克法负载制备得到的 DC 疫苗成熟度高,可用于诱导免疫应答。

[0021] 本发明并不局限于所述的实施例,本领域的技术人员在不脱离本发明的精神即公开范围内,仍可作一些修正或改变,故本发明的权利保护范围以权利要求书限定的范围为准。

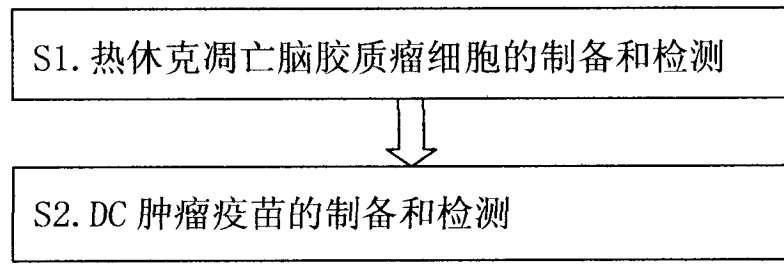


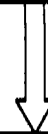
图 1

专利名称(译)	热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备与检测方法		
公开(公告)号	CN102559598A	公开(公告)日	2012-07-11
申请号	CN201110448122.3	申请日	2011-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	陆华		
申请(专利权)人(译)	陆华		
当前申请(专利权)人(译)	陆华		
[标]发明人	陆华		
发明人	陆华		
IPC分类号	C12N5/09 C12Q1/02 G01N15/10 G01N33/53 A61K39/00 A61P35/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提出一种热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备与检测方法，其应用于热休克凋亡脑胶质瘤负载树突状细胞肿瘤疫苗的制备工艺，所述制备工艺采用先将肿瘤细胞处于热休克状态，诱导细胞高表达热休克蛋白(HSP)，再用化学药物诱导细胞凋亡进而制备成富含热休克蛋白的凋亡细胞抗原，制备好的抗原与未成熟的DC细胞混合培养获得成熟的DC疫苗。本发明采用热休克法负载制备得到的DC疫苗成熟度高，可用于诱导免疫应答。

S1. 热休克凋亡脑胶质瘤细胞的制备和检测



S2. DC 肿瘤疫苗的制备和检测