文章编号:1000-5404(2006)05-0381-03

专家论坛

树突状细胞抗肿瘤作用研究进展

余佩武,赵永亮 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

树突状细胞(dendritic cell, DCs)是体内最有效的专职抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC),是识别病原侵入的第一道防线。机体的免疫识别首先由DCs捕获、加工和处理抗原,再将抗原递呈给T、B淋巴细胞,从而引发一系列免疫应答,在体内发挥强大的免疫监视功能[1]。近年来,DCs在抗肿瘤免疫中所发挥的重要作用日益受到人们的重视。随着对DCs肿瘤抗原识别、摄取、加工处理及提呈的分子基础和作用机制的进一步阐明,以DCs为基础的肿瘤疫苗治疗得到快速发展。目前在DCs疫苗抗肿瘤实验研究和临床研究方面已取得了令人振奋的进展,显示了广泛的应用前景。

1 树突状细胞的来源与功能

根据DCs来源的外周血前体细胞的表型不同,主要分为髓系DCs(myeloid, DC1)和淋巴系DCs(lymphoid, DC2)两大类,即来源于外周血单个核细胞的前体细胞(pDC1)和来源于血液或扁桃体中浆细胞样的前体细胞(pDC2)。其中pDC1主要分布于胸腺髓质和脾脏,可分化为髓系DCs;pDC2则可分化为淋巴系DCs[2]。两类DCs均起源于体内多能造血干细胞。文献中关于DCs的分类方法众多,尚未取得一致看法。由于对人体DCs来源的研究多局限于离体细胞培养的方法,因而可能与实际情况并不完全符合,要真正搞清DCs的起源可能还需要较长的时间。

DCs由于来源于不同的前体细胞,在成熟过程的不同阶段具有不同的功能。骨髓中的DCs前体细胞从血循环中迁移至外周非淋巴组织,成为未成熟的DCs,此时DCs具有很强的抗原摄取能力,能有效地俘获入侵的病原体,经输入淋巴管引流迁移至次级淋巴器官。在迁移过程中,表面标志及功能均发生改变,主要表现为DCs捕获抗原的能力降低;而另一方面,DCs的抗原提呈能力则明显增强,表达高水平的MHC Ⅰ、Ⅱ类分子和共刺激分子,成为成熟的DCs。在次级淋巴器官的T细胞区,DCs将抗原递呈给抗原特异性的T淋巴细胞,从而激活静止状态的T细胞。

DCs的成熟状态与其诱导的免疫反应的程度和类型均有密切关系。一般认为,成熟的DCs主要诱导免疫激活,因为其高表达多种共刺激分子和粘附分子包括CD86(B7-1)和CD80(B7-2)等,B7-1和B7-2均能与配体CD28及CTLA-4结合而发挥共刺激作用。非成熟DCs倾向于诱导免疫耐受,其在诱导免疫耐受治疗免疫相关性疾病如抑制排斥、自身免疫性疾病等方面具有重要作用。研究表明,在一些趋化因子的作用下,某些未成熟DCs很可能也能迁移到淋巴结,在缺乏第二信号的情况下,T细胞可能通过识别表达于未成熟DCs表面的MHC-自体多肽复合体而诱导机体产生免疫耐受[3]。

DCs的分化成熟可受到许多因素的影响。研究表明,肿瘤细胞自身可产生、释放一系列抑制性因子,如TGF-β、IL-10等直接参与宿主的免疫抑制,抑制DCs的迁移、生长速度和活性,从而使T细胞应答无能。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)、脂多糖(LPS)、CD40L等可诱导DCs成熟。树突状细胞表面有HSP受体,如CD91、toll-like受体(TLRs)等,HSP通过细胞表面的受体与DCs细胞相互作用,引发了一系列反应,上调表面分子的表达,提高IL-12和TNF-α的分泌水平,促进DCs的成熟,并明显提高抗原提呈效率[4,5]。对小鼠B细胞淋巴瘤38C13进行研究发现,采用38C13分离出的肿瘤独特型Id连接CD40L刺激DCs后能够使DCs所表达的CD40、CD80、CD86、MHC Ⅱ表达上调,IL-12的分泌量增加,抗Id抗体应答水平提高,抗38C13肿瘤的活性明显增强;而单独采用Id负载DCs却无此种现象发生[6]。说明CD40L可促使DCs成熟。

2 树突状细胞对T细胞的活化作用

负载抗原的DCs作用于T细胞或T细胞接受特定抗原信号,上调T细胞表面CD40L,然后与DCs的CD40结合,激活DCs同时上调B7-1、B7-2和ICAM的表达,并产生其他活化因子如IL-12。其次,B7分子经CD28/CTLA-4途径和TCR共同作用活化T细胞。DCs表面CD40被触发后可诱导其自身CD40L表达增加。CD40和CD40L在T细胞活化中发挥了重要作用。

Th0细胞据其产生的细胞因子不同而分为Th1和Th2细胞,在免疫应答过程中,其功能之一便是有效控制免疫反应的发生。Th1主要分泌IL-2和IFN-γ,介导细胞免疫应答,与机体抗肿瘤作用密切相关;Th2主要分泌IL-4、IL-5、IL-6和IL-10,主要介导体液免疫。Th1分泌的IFN-γ可抑制Th2细胞的增殖,相反,Th2细胞分泌的IL-10等因子能促进Th2增殖而抑制Th1增殖,二者相互调节,相互制约,在正常情况下处于一种动态平衡状态[6]。因此,选择性激活Th1和Th2是许多免疫反应发生的关键。

在T细胞分化过程中,IL-12是DCs的关键性产物。无论是从IL-12产生能力,还是IL-12产生水平上,对Th0的分化都具有重要影响。IL-12诱导T细胞分化为Th1细胞,而IL-4诱导分化为Th2细胞。有人提出提呈抗原给初始T细胞的DCs亚群不同,会导致不同的T细胞反应。DC1经CD40L激活能产生大量的IL-12,促使Th0细胞分化为Th1细胞,DC2刺激初始T细胞产生IL-4,有利于T细胞分化为Th2细胞。DC1/DC2的诱导分化直接影响Th1/Th2的平衡,可以通过调

作者简介:余佩武(1961-),男,湖北省麻城市人,博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事胃肠道肿瘤的外科治疗及生物治疗方面的研究,发表论文50余篇。电话:(023)68754161

收稿日期:2005-07-11;修回日期:2005-09-20

节 DC1/DC2 的诱导分化来调节 Th1/Th2 的平衡。

DCs 除了作为 A PC 刺激 T 细胞活化，还可以诱导它们凋亡[7]。DCs 诱导活化 T 细胞的凋亡，不仅是机体维持免疫自稳、防止免疫反应过度的机制之一，而且在机体消除自身反应性 T 细胞，保证自身耐受中可能也发挥作用。

3 树突状细胞疫苗的种类

DCs 必须负载肿瘤抗原才能建立抗肿瘤免疫应答，目前负载不同肿瘤抗原制备的 DCs 疫苗常见的有以下几种：①全细胞抗原负载 DCs；②肿瘤抗原基因转染 DCs；③细胞因子基因修饰 DCs；④肿瘤细胞与 DCs 融合；⑤合成或纯化的肿瘤抗原多肽（TAA 或 TSA）负载 DCs；⑥热休克蛋白负载 DCs 等。研究显示这些负载肿瘤抗原的 DCs 疫苗均可以诱导出特异性免疫应答，具有强大的诱导抗肿瘤能力，也有不少观察到了肿瘤的消退，这在许多动物及部分临床实验中已经得到证实。

尽管这些 DCs 疫苗在很多临床试验中显示了显著的抗肿瘤作用，但不同性质的肿瘤抗原负载 DCs 所诱导的抗肿瘤效应强弱不等，并有各自的优缺点。全细胞抗原 DCs 疫苗是目前广泛采用的方法，是用反复冻融、超声破碎、放射线照射等方法获得肿瘤细胞裂解物，直接负载 DCs。它包括了所有已知和未知的肿瘤抗原，不需要鉴定分离肿瘤 TAA 或 TSA，制备方法简便。但由于肿瘤分泌大量的抑制性细胞因子如 VEGF、IL-10、TGF-β 等，可诱导产生耐受型 DCs 及造成的 DCs 功能缺陷。另外由于抗原中包含了机体自身的抗原，可能会诱发自身免疫反应。相对于全细胞类疫苗，多肽类疫苗就有较大的选择性，不易产生自身免疫反应。但大多数 MHC 限制性肿瘤抗原肽的半衰期仅 2～10 h；若要诱导出高水平持久的抗肿瘤免疫效应，则要反复多次回输负载肿瘤抗原多肽的 DCs。肿瘤抗原基因转染的 DCs 疫苗可使 DCs 持续以合适的方式将肿瘤抗原的表位与 MHC 结合，表达于 DCs 的表面，从而更有效的激活 T 细胞产生抗肿瘤免疫应答反应，但目前仅有少数几种肿瘤如黑色素瘤、卵巢癌、乳腺癌鉴定了能被 T 细胞表位识别的肿瘤抗原决定簇，多数肿瘤缺乏明确的 TSA、TAA，因此，用已知少数的几种特异抗原转染 DCs 治疗肿瘤，其免疫效力较差；当肿瘤细胞发生突变而丧失其特异抗原时，这种单一肿瘤抗原负载的免疫细胞将无法有效识别，而且可能产生与宿主细胞基因组整合的危险。从肿瘤组织中纯化的 HSP 结合有多种肿瘤细胞特有的抗原肽，可通过 DCs 表面的受体直接使伴侣抗原肽经 MHC Ⅰ类分子递呈，激发机体产生抗肿瘤特异的多个和多种 CTL 克隆（αβCTL 和 γδCTL），杀伤肿瘤细胞，但其提取、纯化过程复杂，限制了它的临床应用。

4 树突状细胞疫苗抗肿瘤作用

在肿瘤免疫治疗领域 10 年来的研究中，DCs 疫苗是研究的热点，应用 DCs 疫苗治疗恶性肿瘤的尝试，目前已在恶性淋巴瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、乳腺和卵巢癌、肺癌、结直肠癌等患者中进行了研究并取得了部分成功。在许多肿瘤中 DCs 疫苗已进入Ⅰ、Ⅱ期临床实验。

Hsu 等[8]开创了人类肿瘤免疫治疗先例，研究者们从滤泡性淋巴瘤患者外周血中纯化 DCs，然后将病人自身淋巴瘤单克隆免疫球蛋白负载于 DCs，由静脉给病人输注，所有病人均产生了治疗前所没有的可测定的抗肿瘤细胞免疫，并均伴有临床好转。其中有 1 例患者病变完全消退。Lau 等[9]采用 gp100 作为抗原肽负载 DCs 进行Ⅰ期临床实验治疗晚期恶性黑色素瘤，以 1×10^7、3×10^7 或 1×10^8 静脉注射，2 周 1 次，共 1～2 次，结果治疗的 16 例患者中，1 例完全缓解（complete remission，CR），2 例病情稳定（stable disease，SD），2 例产生混合反应（MR），无任何毒副反应发生。

Heiser 等[10]采用自体前列腺癌特异性抗原（prostate specific antigen，PSA）RNA 转染 DCs 诱导 CTL 治疗晚期前列腺癌，其Ⅰ期临床实验证实，PSA-mRNA 转染 DCs 治疗晚期前列腺癌安全、有效；Ⅱ期临床研究结果显示，治疗的 13 例患者中 6 例 PSA 直线下降，3 例在分子水平上证实，循环中的肿瘤细胞被清除。Marten 等[11]采用自体肿瘤细胞冻融抗原刺激 DCs 制备 DCs 瘤苗的Ⅰ、Ⅱ期临床实验治疗了 15 例晚期肾癌患者，结果 1 例部分缓解（partial remission，PR），7 例 SD，7 例病情恶化（progression disease，PD），3 例迟发性超敏反应（delayed type hypersensitivity，DTH）反应阳性，未见不良反应发生。

自 1998 年以来，我们对 DCs 疫苗的抗胃癌作用进行了一系列基础与临床研究，结果显示，胃癌患者外周血和肿瘤组织中 DCs 数量显著减少，功能显著降低[12]，且与肿瘤临床病理分期密切相关。我们建立了外周血和骨髓分离培养 DCs 的方法，制备了 4 种不同形式的 DCs 疫苗[13,14]，包括：胃癌组织反复冻融液致敏的 DCs、胃癌组织酸洗抗原负载的 DCs、胃癌组织提取的热休克蛋白 gp96 负载的 DCs 以及胃癌细胞与 DCs 制备的融合细胞疫苗，观察了其生物学效应。研究了 DCs 疫苗体外对胃癌细胞的杀伤效率，结果显示负载胃癌抗原的 DCs 疫苗具有显著的抗胃癌特异性，能显著抑制裸鼠胃癌移植瘤的生长，抑制肿瘤的增殖，并促进肿瘤细胞的凋亡[15]。

我们用 DCs 疫苗对 25 例胃癌患者进行了临床初步疗效观察：25 例胃癌患者术后应用 DCs 疫苗后与对照组相比其外周血 T 淋巴细胞亚群（$CD4^+/CD8^+$）比值、NK 细胞的活性及血清 IFN-γ 的水平显著升高，其中有 16 例诱导出了针对自体肿瘤抗原的 DTH 反应，且未见明显毒副反应。疫苗治疗组患者外周血 IL-12 及 IFN-γ 水平在疫苗治疗后明显提高，与同期正常对照组相比差异有显著意义[16]。T 细胞是机体重要的免疫效应细胞，是反映机体细胞免疫状态的较好指标。一般认为 CD4 分布在辅助和抑制（Th/Ti）性细胞亚群，且以辅助成分为主，分泌 IL-2 和 IFN-γ，并与 NK 细胞有显著协同作用，对防御肿瘤有重要作用；CD8 细胞分布在抑制和杀伤（Ts/Tc）性 T 淋巴细胞表面，以抑制为主，具有与 Th 细胞相反的作用，可导致正常免疫应答的抑制。在正常情况下，二者相互诱导和制约形成 T 细胞网络，对调节和维持免疫平衡具有重要意义；当免疫功能增强时，$CD4^+$ 细胞上升，$CD8^+$ 细胞下降，$CD4^+/CD8^+$ 比值升高。由于随访时间较短，远期疗效尚需进一步随访观察[14]。我们的研究表明 DCs 疫苗可作为胃癌生物治疗的有效方法之一。

关键词：树突状细胞；疫苗；肿瘤

中图法分类号：R730.51　　**文献标识码**：A

参考文献：

[1] 汪　灏，李艳秋，余佩武. 树突状细胞疫苗在肿瘤免疫治疗中的作

用[J]. 免疫学杂志, 2001, 17(3): S45-S48.
[2] Munn D H, Sharma M D, Lee J R, *et al*. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2, 3-dioxygenase[J]. Science, 2002, 297(5588): 1867-1870.
[3] HIRAO M, ONAI N, HIROISHI K, *et al*. CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes [J]. Cancer Res, 2000, 60(8): 2209-2217.
[4] RIVOLTINI L, CASTELLI C, CARRABBA M, *et al*. Human tumor-derived heat shock protein 96 mediates *in vitro* activation and *in vivo* expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells[J]. J Immunol, 2003, 171(7): 3467-3474.
[5] MAZZAFERRO V, COPPA J, CARRABBA M G, *et al*. Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(9): 3235-3245.
[6] KIDD P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease[J]. Altern Med Rev, 2003, 8(3): 223-246.
[7] LIU S, YU Y, ZHANG M, *et al*. The involvement of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-beta-stimulated human dendritic cells to tumor cells[J]. J Immunol, 2001, 166(9): 5407-5415.
[8] HSU F J, BENIKE C, FAGNONI F, *et al*. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells [J]. Nat Med, 1996, 2(1): 52-58.
[9] LAU R, WANG F, JEFFERY G, *et al*. Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma [J]. J Immunother 2001, 24(1): 66-78.
[10] HEISER A, COLEMAN D, DANNULL J, *et al*. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors[J]. J Clin Invest, 2002, 109(3): 409-417.
[11] MARTEN A, FLIEGER D, RENOTH S, *et al*. Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial [J]. Cancer Immunol Immunother, 2002, 51(11-12): 637-644.
[12] 张 坤, 余佩武, 高朋芬, 等. 胃癌患者外周血DCs细胞表型变化研究[J]. 第三军医大学学报, 2004,26(13): 1207-1209.
[13] 汪 灏, 余佩武, 郝 群, 等. 临床用的抗肿瘤树突状细胞疫苗的制备及保存[J]. 第三军医大学学报, 2004,26(14): 1314-1316.
[14] 赵永亮, 余佩武, 蔡志民, 等. gp96多肽复合物树突状细胞疫苗诱导的体外抗胃癌实验研究[J]. 中华普通外科杂志, 2005, 20(12): 786-788.
[15] 雷 晓, 余佩武, 石 彦, 等. 树突状细胞肿瘤疫苗诱导抗胃癌作用的实验研究[J]. 中华胃肠外科杂志, 2002,5(1): 45-48.
[16] 汪 灏, 余佩武, 郝 群, 等. 树突状细胞疫苗对胃癌患者术后免疫功能影响的初步观察[J]. 中华胃肠外科杂志, 2004,7(4): 301-304.

(编辑 陈聪连)

文章编号:1000-5404(2006)05-0383-01

个案与短篇

慢性马兜铃酸肾病大鼠模型肾组织中差异蛋白质的筛选

孙世石[1], 宁晓晖[2], 陈 威[1] (第四军医大学西京医院:[1]肾脏内科,[2]老年病科,西安 710032)

马兜铃酸肾病(aristolochic acid nephropathy, AAN)在临床上十分常见,对人们的身体健康带来很大的危害.目前马兜铃酸导致肾损害的分子机制不清楚[1],其早期诊断尚无法解决,更谈不上有效的药物治疗[2]. 因此,为了阐明马兜铃酸肾损害的分子机制,我们通过建立慢性马兜铃酸肾病模型,用双向电泳技术筛选和比较模型动物肾组织中马兜铃酸诱导的差异蛋白质分子,为进一步确定马兜铃酸导致肾损害的分子靶点奠定基础.

1 材料与方法

1.1 慢性马兜铃酸肾病动物模型的建立

20~24周龄Wistar雌性大鼠35只,体质量190~210 g,由第四军医大学实验动物中心提供.将大鼠分为马兜铃酸组($n=30$):每天腹腔注射马兜铃酸5 mg/kg体重.对照组($n=5$),每天大鼠腹腔内注射生理盐水2 ml[3].

1.2 蛋白质样品的准备

在用药开始后第12周处死大鼠,取其肾脏,制备蛋白样品.

1.3 双向电泳(2-D PAGE)

首先进行等电聚焦,然后进行SDS-PAGE电泳,最后用硝酸银染色方法对凝胶染色.凝胶通过Imagescanner扫描仪以及LabScan扫描软件进行扫描获取图像,利用PDQUEST图像分析软件对电泳结果进行分析.

2 结果

2.1 慢性马兜铃酸肾病模型的建立

马兜铃酸组用药后8周,肾小球、肾小管-间质、肾血管均未见损害;用药后12周,肾小球未见改变,部分肾小管上皮细胞发生空泡变性;用药后16周,肾脏近曲小管上皮细胞明显肿

(下转386页)

基金项目:西京医院科技创新基金资助课题(XJZ05M04)
Supported by the Research Foundation for Sci & Tech Innovation of Xijing Hospital(XJZ05M04)
作者简介:孙世石(1971-),男,甘肃省静宁县人,硕士,主治医师,讲师.主要从事肾小管-间质病变病理临床与基础方面的研究,发表论文10余篇.电话:(029)84775197,E-mail:qingsun@fmmu.edu.cn
收稿日期:2005-03-17;修回日期:2005-09-12