文章编号:1000-5404(2006)05-0391-03

论著

gp96 多肽复合物对树突状细胞成熟及功能的影响

赵永亮,余佩武,汪 灏,雷 晓,王自强,曾冬竹,饶 芸 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨 gp96 多肽复合物对树突状细胞(dendritic cells, DCs)成熟及功能的影响。**方法** 应用液相层析技术从胃癌组织中提取 gp96 多肽复合物,用 SDS-PAGE 和 Western blot 进行性质鉴定,将提取的 gp96 多肽复合物加入外周血来源的单个核细胞诱导培养 DCs,采用流式细胞技术检测 DCs 的表型变化,用^{3}H-TdR 掺入法检测 DCs 诱导的混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)。**结果** 从 1 g 湿重的胃癌组织中可提取 gp96 多肽复合物 30 ~ 50 μg,用 gp96 多肽复合物诱导培养的 DCs 其表面分子的表达明显增高,并具有更强的刺激 T 淋巴细胞增殖的能力。**结论** 从胃癌组织中可以提取出 gp96 多肽复合物,gp96 多肽复合物可促进 DCs 分化成熟,使其具有更强的抗原提呈能力。

关键词: gp96 多肽复合物; 树突状细胞; 成熟; 功能; 胃癌
中图法分类号: R329.24; R341.6; R392.1 **文献标识码**: A

Effect of gp96 polypeptide complex on maturation and function of dendritic cells

ZHAO Yong-liang, YU Pei-wu, WANG Hao, LEI Xiao, WANG Zi-qiang, ZENG Dong-zhu, RAO Yun (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of gp96 polypeptide complex on the maturation and function of dendritic cells (DCs). **Methods** Con A sepharose affinity chromatography and mono Q ion exchange chromatography were applied to purify gp96 polypeptide complex from gastric cancer tissues. The identification of the purified protein was controlled by Western blotting with anti-human gp96. DCs derived from peripheral blood mononuclear cell were cultured with purified gp96. The phenotype changes of DCs were analyzed by fluorescence-activated cell sorter (FACS) and MLR was detected by ^{3}H-TDR. **Results** About 30 – 50 μg gp96 polypeptide complex was purified successfully from 1 g wet gastric cancer tissues. DCs stimulated with gp96 polypeptide complex had higher expression rates of surface molecules and had stronger ability to induce T cells proliferation. **Conclusion** gp96 polypeptide complex from gastric cancer tissues could promote DCs maturation and make DCs have stronger ability to present antigen.

Key words: gp96 polypeptide complex; dendritic cells; maturation; function; gastric cancer

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是体内功能最强的专职抗原提呈细胞,在刺激 T 细胞增殖,抗肿瘤免疫中起重要作用[1]。近年来热休克蛋白 gp96 诱导的抗肿瘤排斥反应成为人们研究的热点,用来源于肿瘤的 gp96 多肽复合物负载 DCs 制备 DCs 瘤苗已成为一种备受瞩目的肿瘤主动性免疫治疗策略[2]。本研究从胃癌组织中提取 gp96 多肽复合物在体外诱导培养 DCs ,探讨 gp96 多肽复合物对 DCs 成熟及功能的影响,为制备高效、特异性胃癌 DCs 疫苗提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Con A sepharose 亲和层析介质、Mono Q 离子交换层析柱(amersham Pharmacia biotech, USA),山羊抗人 gp96 多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, USA),生物素化的兔抗山羊 IgG(博士德,武汉),鼠抗人 HLA-DR-PE 单克隆抗体、鼠抗人 CD80-PE 单克隆抗体、鼠抗人 CD1a-PE 单克隆抗体、鼠抗人 cd83-FITC 单克隆抗体(Immunotech, French),IL-4、GM-CSF(Promega, English),RPMI1640 培养基(Gibco, USA),^{3}H-TdR(1mCi/ml)(中国同位素公司北京原子能研究所)。

1.1.2 标本来源 胃癌标本来自患者手术切除的胃癌组织,病理诊断为胃低分化腺癌;DCs 从胃癌患者外周血获得。

作者简介:赵永亮(1969 -),男,山东省泰安市人,博士,主治医师,讲师,主要从事胃肠道肿瘤外科及生物治疗方面的研究。电话:(023)68773171,E-mail: yongliang166@sohu.com
通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail: yupeiwu01@sina.com
收稿日期:2005-06-13;修回日期:2005-09-20

1.2 方法

1.2.1 胃癌组织 gp96 的提取及鉴定[3] 新鲜胃癌组织切下后，取湿重约 15 g，在超净工作台上将组织切碎，加入 30 mmol/L $NaHCO_3$（pH 7.0，含有 1 mmol/L PMSF）缓冲液，低温下进行匀浆，低温超速离心机离心，5 000 × g 离心 30 min，100 000 × g 离心 90 min。两步硫酸铵沉淀（50%、80%）后，沉淀物溶解于 20 mmol/L Tris-HCl（pH 7.4，含有 500 mmol/L NaCl，1 mmol/L $MnCl_2$，1 mmol/L $CaCl_2$，1 mmol/L PMSF）缓冲液中。用 Con A sepharose 亲和层析，10% α-甲基甘露糖缓冲液洗脱，洗脱物再经 Mono Q 柱离子交换层析，0 ~ 1 mol/L NaCl 作线性梯度洗脱。SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定。

1.2.2 胃癌粗提抗原的制备 将同一患者的胃癌组织切碎后，在 100 目滤网上反复挤滤，收集胃癌细胞悬液，反复置于液氮中，取出自然解冻，冻融液离心，0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得到胃癌粗提抗原。

1.2.3 外周血单个核细胞的分离培养 抽取患者外周血 80 ml，用 20 U/ml 肝素抗凝，用淋巴细胞分离液分离白膜，离心、反复洗涤后，以含 10% 小牛血清的 1640 培养基悬浮细胞，加入 24 孔培养板，每孔 1×10^6 细胞/ml 培养基，37 ℃，5% CO_2 孵箱培养 2 h，吸弃培养上清，去除非贴壁细胞，获得贴壁的单个核细胞，加 GM-CSF、IL-4 使其终浓度为 GM-CSF200 ng/ml，IL-4 50 ng/ml，1640 完全培养基培养。

1.2.4 gp96 诱导培养 DCs 将体外培养的 DCs 从第 3 天开始分为 3 组，A 组：继续加入 GM-CSF 200 ng/ml，IL-4 50 ng/ml 培养，为无抗原诱导组，B 组：在 A 组基础上，再加入反复冻融的胃癌粗提抗原 25 μg，为粗提抗原诱导组，C 组：在 A 组基础上，再加入 gp96 多肽复合物 25 μg，为 gp96 多肽复合物诱导组。继续 37℃，5% CO_2 孵箱培养，每 3 天换液，加入上述刺激因子及抗原，于第 10 天收集细胞进行形态观察、表型鉴定。

1.2.5 表面分子检测 收集培养各组的 DCs，PBS 离心洗涤，各管分别加入 100 μl 荧光标记抗体（PE-CD1a、PE-HLA-DR、PE-CD80、FITC-CD83）重悬细胞，震荡使充分混匀，4 ℃、30 min 避光孵育，加入 PBS 稀释，充分震荡悬起细胞，上机进行检测。

1.2.6 分离 T 淋巴细胞 取健康人外周血，淋巴细胞分离液密度梯度离心后获取 PBMC，37 ℃，5% CO_2 孵箱培养 3 h；收集悬浮的细胞并调细胞浓度为 1×10^7/ml；过尼龙毛柱，1640 培养基洗柱，收集 T 淋巴细胞。

1.2.7 混合淋巴细胞反应（mixed leukocyte reaction，MLR）

收集各组 DCs 用 RPMI1640 培养液调整浓度为 1×10^6 细胞/ml，加入丝裂霉素 25 μg/ml，温育 45 min；在 96 孔培养板中加入不同组的 DCs 悬液 10 μl、100 μl；每孔再加入浓度为 1×10^7/ml 的健康人 T 淋巴细胞 100 μl，每孔终体积为 200 μl。在 37 ℃培养 5 d；于培养结束前 18 h 加入 ^3H 标记的胸腺嘧啶核苷（^3H-TdR），2 μCi/孔；用细胞收集器收集细胞于玻璃纤微滤纸上，用双蒸水反复冲洗；滤片以 60 ℃烘干后放入盛有闪烁液的计数瓶中，液闪计数仪测量 cpm 值，结果用 3 孔的均值来表示。以培养基作为 DCs 的阴性对照。

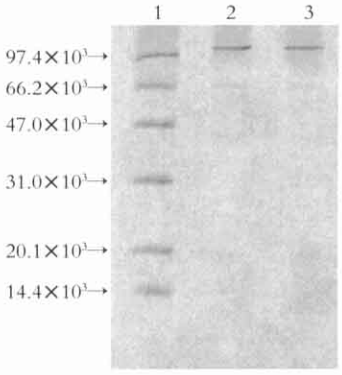
1.3 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 11.0 统计软件包对原始数据作方差齐性检验后行方差分析。

2 结果

2.1 gp96 多肽复合物的纯化、鉴定

经 SDS-PAGE 电泳银染及 Western blot 证明从胃癌组织提取的物质为 gp96 多肽复合物。蛋白浓度测定显示每 1 g 湿重胃癌组织可提取 gp96 多肽复合物约 30 ~ 50 μg。见图 1、2。



M：标准；1：gp96；2：gp96

图 1 gp96 SDS-PAGE 电泳结果

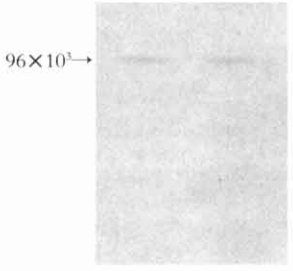


图 2 gp96 Western blot 杂交

2.2 DCs 表面分子表达

从外周血获得的单个核细胞用 gp96 多肽复合物诱导培养后，DCs 呈现典型的树突状细胞形态。在培养早期，DCs 表面分子的表达均较低，第 3 天时（只用 GM-CSF 和 IL-4 培养）表面分子的表达分别为：CD1a（14.6 ± 4.1）%、HLA-DR（27.3 ± 3.8）%、CD80（34.2 ± 3.5）%、CD83（17.5 ± 3.2）%。当加入各种刺激因素后，其表面分子的表达逐渐增高。第 6 天与第 10 天负载 gp96 多肽复合物表面分子与表达率具有非常显著的差异，分别为 CD1a（70.57 ± 2.51）*vs*（79.3 ± 4.1）%，（$P < 0.01$）；CD83（72.2 ± 2.5）% *vs*（85.7 ± 3.2）%，（$P < 0.01$）；HLA-DR（74.0 ± 4.4）% *vs*（83.4 ± 2.9）%，（$P < 0.01$）；CD80（78.3 ± 1.8）% *vs*（84.3 ± 2.4）%，（$P < 0.05$）。第 10 天时各组表面分子的表达以 C 组表达最高，成熟 DCs 特异性标志 CD83 的表达为（85.7 ± 3.2）%，与 B 组相比表达明显增高（$P < 0.05$），与 A 组相比差异非常显著（$P < 0.01$）。见表 1。

表 1　体外培养第 10 天时各组 DCs 表面分子表达率 [($\bar{x} \pm s$) %]

组别	CD1a	CD80	CD83	HLA-DR
A	49.4 ± 2.5	60.2 ± 3.1	50.5 ± 3.8	57.7 ± 2.1
B	70.7 ± 2.1	78.1 ± 2.5	80.9 ± 1.9	78.6 ± 1.0[a]
C	79.3 ± 4.1[b]	84.3 ± 2.4[b]	85.7 ± 3.2[b]	83.4 ± 2.9[ab]

a：$P<0.01$，与 A 组比较；b：$P<0.05$，与 B 组比较

2.3　混合淋巴细胞反应(MLR)

用不同抗原刺激的各组 DCs 在体外刺激 T 淋巴细胞增殖结果显示，gp96 多肽复合物诱导培养的 DCs 刺激 T 淋巴细胞增殖的能力最强，在低浓度时就可刺激 T 淋巴细胞明显增殖，而相同量的胃癌粗提抗原诱导培养的 DCs 其刺激作用则较弱，未负载抗原的不成熟 DCs 则无明显刺激作用，见表 2。

表 2　各组 DCS 体外刺激同种 T 淋巴细胞增殖的能力(cpm，$\bar{x} \pm s$)

组别	DCs	
	5×10^3	5×10^4
A	1436 ± 214	3004 ± 255
B	6040 ± 423[b]	12437 ± 489[b]
C	9593 ± 202[a]	15113 ± 246[a]

a：$P<0.01$，与 B 组比较；b：$P<0.01$，与 A 组比较

3　讨论

gp96 是内质网中最丰富的蛋白质之一，它可结合其他新生或异常蛋白质分子，起着分子伴侣作用。DCs 表面有 CD91 等 gp96 受体，gp96 通过受体与 DCs 相互作用，诱导 DCs 成熟，使伴侣抗原肽经 MHC Ⅰ类分子再递呈，直接激活 $CD8^+$ T 细胞，杀伤肿瘤细胞[4,5]。

胃癌组织中高表达 gp96[6]，我们从胃癌组织中成功地提取了 gp96 多肽复合物，用 gp96 多肽复合物负载 DCs 后结果显示其表面分子的表达明显提高。DCs 高表达 CD83 是人 DCs 成熟的标志，本研究显示 CD83 的表达率比其他组明显提高，表明 gp96 多肽复合物具有较强的促进 DCs 成熟的能力。负载胃癌粗提抗原的 DCs 其表面 CD83 的表达较低，表明用这种方法培养的 DCs 并没有完全成熟。

DCs 参与免疫反应的基础是其具有的抗原提呈功能，因此，抗原提呈功能的强弱是判断 DCs 功能的尺度。未成熟 DCs 有极强的摄取抗原的能力，但其抗原提呈能力很弱。DCs 成熟以后便失去了摄取抗原的功能，但抗原提呈能力明显提高。本研究用 gp96 多肽复合物负载 DCs 后，经同种混合淋巴细胞反应显示，少量 DCs 即可引起显著的刺激 T 淋巴细胞增殖效应，说明 gp96 通过受体与 DCs 相互作用，明显提高了其抗原提呈能力。肿瘤细胞破碎后内质网中 gp96 可被释放出来，肿瘤细胞冻融后其粗提物中也有一定量的 gp96 多肽复合物，但用其负载 DCS 后并没有象纯化的 gp96 多肽复合物那样刺激 DCs 成熟，其原因可能是这种粗提物中 gp96 多肽复合物的含量较少，另一方面也可能是由于肿瘤细胞裂解后 VEGF、IL-10、TGF-β 等肿瘤抑制性细胞因子被释放出来，抑制了 DCs 的成熟[7]。这种现象也说明既往用各种肿瘤裂解物制备 DCs 疫苗时，DCs 的成熟在某种程度上也与 gp96 多肽复合物的作用有关。

DCs 只有成熟后，才能高表达 MHC 分子及共刺激分子，才能获得高效的抗原呈能力。本研究从胃癌组织中提取的 gp96 多肽复合物可诱导 DCs 成熟，并使其抗原提呈能力明显增强，这为制备高效、特异性胃癌 DCs 疫苗提供了基础。

参考文献：

[1] 赵永亮，余佩武，蔡志民. gp96 与肿瘤免疫研究进展[J]. 中国肿瘤临床与康复，2005，12(2)：181－183.

[2] LIU C, EWING N, DEFILIPPO M. Analytical challenges and strategies for the characterization of gp96-associated peptides[J]. Methods, 2004, 32(1): 32－37.

[3] MENG S D, SONG J, RAO Z, *et al.* Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides[J]. J Immunol Methods, 2002, 264(1－2): 29－35.

[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] 赵永亮，余佩武，蔡志民，等. 胃癌组织 gp96 表达的临床意义[J]. 世界华人消化杂志，2004，12(8)：1969－1971.

[7] KIERTSCHER S M, LUO J, DUBINETT S M, *et al.* Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells[J]. J Immunol, 2000, 164(3): 1269－1276.

[8] 赵永亮，余佩武，蔡志民，等. 胃癌组织中 gp96 和增殖细胞核抗原的表达及其临床意义[J]. 第三军医大学学报，2004，26(16)：1485－1487.

(编辑　陈聪连)