论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0414-02

胃癌 gp96 多肽复合物树突状细胞疫苗对 Th1/ Th2 平衡的影响

赵永亮,余佩武,吴 森,唐 波,钱 锋,石 彦,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 多肽复合物树突状细胞(dendritic cells, DCs)疫苗对 Th1/ Th2 平衡的影响。**方法** 从胃癌组织中提取 gp96 多肽复合物负载从外周血单个核细胞诱导培养的 DCs,用 gp96 多肽复合物 DC 疫苗诱导同一患者 Th0 淋巴细胞, ELISA 检测培养上清中 IFN-γ 和 IL-10 的水平;以胃癌细胞裂解物负载的 DC 疫苗作对照。**结果** gp96 多肽复合物 DC 疫苗诱导的 T 细胞分泌 IFN-γ 的量为(2 875 ± 177.66) pg/ml,显著高于对照组(1 765 ± 289.07) pg/ml ($P < 0.01$);分泌 IL-10 的量为(36 ± 6.72) pg/ml,显著低于对照组(90 ± 11.26) pg/ml ($P < 0.05$),二者之间存在显著的负相关($r = -0.915$, $P < 0.01$)。**结论** gp96 多肽复合物 DC 疫苗可诱导 Th1/ Th2 平衡向 Th1 漂移,显示了 gp96 多肽复合物 DC 疫苗可显著提高机体的免疫能力,为临床免疫干预治疗奠定基础。

关键词: gp96 多肽复合物;树突状细胞;疫苗;Th1 细胞;Th2 细胞

中图法分类号: R341.6; R392.12; R730.23 **文献标识码**: A

Effect of gp96 polypeptide complex dendritic cell vaccine on Th1/ Th2 balance

ZHAO Yong-liang, YU Pei-wu, WU Miao, TANG Bo, QIAN Feng, SHI Yan, 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-dendritic cell vaccine on Th1/Th2 balance. **Methods** gp96 polypeptide complex was purified from gastric cancer tissues and cocultured with mononuclear cells derived from peripheral blood. DCs from above process were mixed with autogenic Th0 lymphocytes and the level of IL-10 and IFN-γ in supernant was determined using ELASA. DC loaded with autologous gastric cancer cells lysates was as control. **Results** The level of IFN-γ secreted by T lymphocytes induced by DCs vaccine loaded with gp96 polypeptide complex was (2 875 ± 177.66) pg/ml, higher than (1 765 ± 289.07) pg/ml of control ($P < 0.01$), and the level of IL-10 was (36 ± 6.72) pg/ml, lower than (90 ± 11.26) pg/ml of control ($P < 0.05$), suggesting a negative correlation between IL-10 and IFN-γ by linear correlation analysis ($r = -0.915$, $P < 0.01$). **Conclusion** gp96 polypeptide complex-dendritic cell vaccine could induce Th0 differentiate to Th1, indicating its capability against tumuor.

Key words: gp96 polypeptide complex; dendritic cells; vaccine; Th1; Th2

热休克蛋白(heat shock protein, HSP) gp96 是 1 种高度保守的糖蛋白,具有分子伴侣功能,它能够和细胞内的抗原性多肽非共价结合形成复合物,负载 gp96 多肽复合物的树突状细胞(dendritic cells, DCs)疫苗在抗肿瘤免疫应答中的作用已成为人们目前研究的热点[1]。本研究从胃癌组织中提取 gp96 多肽复合物体外诱导培养 DCs, 探讨 gp96 多肽复合物 DCs 疫苗对 Th1/ Th2 平衡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

主要试剂:人 IFN-γELISA 试剂盒、人 IL-10(P70) ELISA 试剂盒、CD4 、CD45RA 单抗(晶美生物公司),IL-4、GM-CSF(Promega, English), RPMI1640 培养基(Gibco, USA),鼠抗人 HLA-DR-PE、CD80-PE、CD1a-PE、CD83-FITC 单克隆抗体(Immunotech, French)。gp96 多肽复合物和胃癌粗提抗原均临床胃癌患者胃癌组织中提取,病理诊断为胃低分化腺癌。外周血来自同一胃癌患者。

1.2 gp96 多肽复合物 DC 疫苗的制备

抽取胃癌患者自体外周血用淋巴细胞分离单个核细胞,加 GM-CSF200 ng/ml, IL-4 50 ng/ml,在 1640 完全培养基中诱导培养。将体外培养的 DCs 从第 3 天开始分为 3 组,A 组:继续加入 GM-CSF200 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 天收集细胞进行表型鉴定。

1.3 Th0 细胞分离

取胃癌患者自体外周血,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液梯

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

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

度离心，取界面细胞，洗涤 3 次，贴壁培养吸取非贴壁细胞，加入 CD4 单抗，4 ℃冰箱孵育 30 min，按磁珠和细胞数 5∶1 比例加入抗体包被磁珠，继续 4 ℃孵育 20 min，磁场分离，解离液解离得 $CD4^+$ TC。加入 CD45RA 单抗同上步骤分离得到 $CD4^+CD45RA^+$ 的 Th0 细胞。

1.4　DC 诱导 Th0 细胞分化

将上述制备的各组 DC 调整其浓度为 1×10^6，按照 1∶5 的比例分别与分离的 Th0 细胞混合，在含有 10% 小牛血清、IL-2 200 U/ml 的 RPMI1640 完全培养基中培养，第 3 天补加 1 次，继续培养 5 d，收集上清进行细胞因子检测。

1.5　ELISA 法检测 IL-10、IFN-γ 的浓度

实验准备及操作步骤按照试剂盒说明操作。

1.6　统计学处理

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 11.0 统计软件包进行，两组均数比较采用 t 检验，IL-10 与 IFN-γ 的相关性采用线性相关分析。

2　结果

2.1　gp96 多肽复合物 DC 疫苗的鉴定

从外周血分离的单个核细胞培养第 3 天，细胞出现不规则形态，表面逐渐伸出不规则突起，加入经 Western blot 证实的 gp96 多肽复合物后，DC 细胞表面有大量“树枝状”突起出现，呈现典型的树突状细胞形态。经流式细胞仪检测其表面分子的表达为 CD1a(79.3 ± 4.1)%、CD80(84.3 ± 2.4)%、CD83(85.7 ± 3.2)% 和 HLA-DR(83.4 ± 2.9)%。

2.2　gp96 多肽复合物 DC 诱导 Th0 分化产生的细胞因子检测

2.2.1　IL-10 浓度检测　　gp96 多肽复合物和肿瘤粗提抗原 DC 诱导的 Th0 细胞培养上清中，IL-10 的含量明显下降，分别为(36 ± 6.72)、(90 ± 11.26) pg/ml，以 gp96 多肽复合物 DC 诱导的 Th0 细胞上清中含量最少。未负载肿瘤抗原的 DC 诱导的 Th0 细胞分泌较高水平的 IL-10(253 ± 54.83) pg/ml，与负载肿瘤抗原相比，差异显著($P<0.01$)。

2.2.2　FN-γ 浓度检测　　gp96 多肽复合物和肿瘤粗提抗原 DC 诱导的 Th0 细胞均可释放 IFN-γ，分别为(2 875 ± 177.66)、(1 765 ± 289.07) pg/ml，gp96 多肽复合物 DC 组显著性高于肿瘤细胞粗提抗原 DC 组($P<0.01$)；未负载肿瘤抗原的 DC 诱导的 Th0 细胞均无明显 IFN-γ(47 ± 11.51) pg/ml 分泌。

2.3　IL-10 和 IFN-γ 的相关性

根据 gp96 多肽复合物 DC 诱导 Th0 分化产生的 IL-10、IFN-γ 的水平，对其进行线性相关分析($r=-0.915$，$P<0.01$)，结果显示二者之间存在显著的负相关。

3　讨论

在免疫应答过程中，Th 细胞的功能之一便是有效控制免疫反应的发生。Th0 通过分化为不同比例 Th1 和 Th2 型细胞，分泌不同比例的 Th1 和 Th2 型细胞因子发挥作用。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[3,4]。因此，选择性激活 Th1 和 Th2 是许多免疫反应发生的关键。

研究表明，在肿瘤状态下 Th2 处于优势地位，表现为 Th1 向 Th2 漂移，机体免疫功能受到抑制[5]。因此，增强 Th1 细胞功能，将会改善机体的免疫状态，提高机体的免疫能力，对肿瘤的治疗具有重要意义。本实验结果显示，负载肿瘤抗原 DC 疫苗诱导的 T 细胞均可释放 IFN-γ，同时抑制了 IL-10 的产生，以 gp96-多肽复合物 DC 疫苗最强。表明 gp96-多肽复合物 DC 疫苗通过提高 IFN-γ 的分泌，抑制 IL-10 的产生，使 Th1/ Th2 平衡向 Th1 漂移，增强了机体的抗肿瘤能力。

DC 是体内功能最强的抗原提呈细胞，Th0 的分化由 DC 所控制，DC 的成熟状态对 Th0 细胞的分化具有重要影响。本研究用从胃癌组织中提取的 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，表明 gp96 多肽复合物可诱导 DCs 成熟。DC 成熟后不但能有效提呈抗原，而且通过提高 IL-12 的分泌水平促进 T 细胞分泌 IFN-γ，从而抑制 Th2 增殖，使 Th1/ Th2 平衡向 Th1 漂移。

以上结果及分析说明，gp96 多肽复合物 DC 疫苗可诱导 Th1/ Th2 平衡向 Th1 漂移，具有显著的抗肿瘤能力，这为 gp96 多肽复合物 DC 疫苗在胃癌临床免疫干预治疗中的应用奠定了基础。关于 gp96 多肽复合物 DC 疫苗的抗肿瘤机制及临床应用效果尚需进一步研究。

参考文献：

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

[2] 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.

[3] KIDD P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease[J]. Altern Med Rev, 2003, 8(3): 223 - 246.

[4] KANAZAWA M, YOSHIHARA K, ABE H, *et al*. Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients [J]. Anticancer Res, 2005, 25(1B): 443 - 449.

[5] KANAZAWA M, MORI Y, YOSHIHARA K, *et al*. Effect of DC therapy combined with chemotherapy in advanced cancer cases[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2003, 30(11): 1655 - 1660.

[6] 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）