论著

文章编号:1000-5404(2009)11-1024-05

sCD40L 联合 TB. HSP70-H22 肽刺激树突状细胞诱导特异性抗肿瘤免疫的研究

罗善明[1],高 建[1],彭明利[2] (重庆医科大学附属第二医院:[1]消化内科,[2]病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨受 sCD40L 与结核杆菌 HSP70(mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70,TB. HSP70)-H22 肽联合刺激的树突状细胞(dendritic cell,DC)在体内外的特异性抗肿瘤免疫。**方法** 取小鼠骨髓于培养第 7 天分为未刺激组、sCD40L 组、TB. HSP70-H22 肽组、sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组,共 4 组,分别给予相应干预,24 h 后取上清,ELISA 法检测 IL-12、IL-10,流式细胞术检测 CD40、CD80,混合淋巴细胞反应(MRL)检测淋巴细胞增殖,MTT 法检测对肿瘤细胞的杀伤率;建立小鼠肝癌模型,完全随机分为 5 组(分别给予生理盐水和以上 4 种干预获得的 DC 干预),Ⅰ组:生理盐水对照组,Ⅱ组:未刺激 DC 治疗组,Ⅲ组:sCD40L DC 治疗组,Ⅳ组:TB. HSP70-H22 肽 DC 治疗组,Ⅴ组:sCD40L + TB. HSP70-H22 肽 DC 治疗组,于第 21 天测瘤质量,ELISA 法测血清 IL-10、IFN-γ。**结果** sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的各项指标与其他各组相比,IL-10 显著降低,其他指标均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Ⅴ组与其他各组相比,IL-10 和瘤质量均显著降低,IFN-γ 显著上升,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 受 sCD40L 与 TB. HSP70-H22 肽复合物联合刺激后的 DC 被充分激活,能诱导强有力的特异性抗肿瘤细胞免疫,对 H22 瘤细胞产生强大的杀伤作用,显著抑制肿瘤的生长。

关键词: 热休克蛋白 70-H22 肽;肝癌;树突状细胞;sCD40L;肿瘤免疫

中图法分类号: R392-33; R392.3; R73-362 **文献标识码:** A

Inducement of specific anti-hepatoma immunity of DC activated by HSP70-H22 peptide complexes and sCD40L

LUO Shan-ming[1], GAO Jian[1], PENG Ming-li[2] ([1]Department of Gastroenterology, [2]Department of Institute for Viral Hepatitis, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To study the specific anti-tumor immunity of dendritic cell (DC) modified by HSP70-tumor peptide complexes and sCD40L *in vitro* and *in vivo*. Methods The murine marrow cells were cultured for 7 d, and then randomized to 4 groups: control, only HSP70-H22 peptide complexes, sCD40L, and HSP70-H22 peptide complexes combined with sCD40L. After intervention for 24 h, IL-12 and IL-10 in the supernatant were detected by ELISA assay, CD40 and CD80 of DC by FACS, and the proliferation of spleen lymphocytes by MRL. The ability of spleen lymphocytes activated by DC to H22 cells *in vitro* was investigated by MTT. The models of murine hepatoma were established, and then randomized to 5 groups (Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ), followed by interference with normal saline and DC respectively. At 21 d, mice were sacrificed and the weight of tumor was measured. The levels of IL-10 and IFN-γ in blood serum were detected by ELISA assay. Results Compared with that in the groups of control, only sCD40L, and HSP70-H22 peptide complexes, the level of IL-10 in the group stimulated by HSP70-H22 peptide complexes combined with sCD40L decreased significantly, but other indexes in this group increased significantly ($P<0.05$). Compared with that in groups Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ, the level of IL-10 and the tumor weight in group Ⅴ decreased significantly, but the level of IFN-γ increased significantly ($P<0.05$). Conclusion Sufficient activation of DC modified by HSP70-tumor peptide complexes and sCD40L can induce powerful specific antitumor immunity, strong killing effect against H22 cells, and efficient inhibition of tumor growth.

Key words: HSP70-H22 peptide complexes; hepatoma; dendritic cell; sCD40L; anti-tumor immunity

近年来,以肿瘤疫苗为基础的主动免疫治疗成为治疗恶性肿瘤新的希望和重点方向之一。肿瘤组织来源的热休克蛋白(heat shock protein,HSP)-肽复合物能激发特异性抗肿瘤免疫。同时,CD40/CD40L 能促进树突状细胞(dendritic cell,DC)的成熟并分泌大量的 IL-12,提高 DC 激发同种混合淋巴细胞反应并将抗原

基金项目: 重庆市自然科学基金(2004-54);重庆市卫生局基金(2008-2-214) Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2004-54) and the Foundation of Chongqing Health Bureau (2008-2-214)

作者简介: 罗善明,男,四川省绵竹市人,硕士研究生,主要从事肝癌免疫治疗方面的研究。E-mail:luoshanming123@163.com

通信作者: 高 建,E-mail:g6j6@sohu.com

收稿日期: 2008-10-22;**修回日期:** 2008-12-19

递呈给细胞毒 T 细胞的能力。因此,我们在前期研究基础上[1-3],体外合成结核杆菌 HSP70(mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70,TB. HSP70)-H22 肽,使用分泌型 CD40L(sCD40L)与此复合物联合刺激 DC,以期能更有效地激活 DC,促进 DC 的成熟,增强 DC 诱导产生特异性抗肿瘤免疫效应的能力,从而找到一种有效的肿瘤疫苗。

1　材料与方法

1.1　材料和试剂

6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,体质量 18~20 g,由重庆医科大学实验动物中心提供;H22 小鼠肝癌细胞株(重庆医科大学病理生理教研室传代保种),胎牛血清(PAA 和 TBD 公司),重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、白细胞介素-4 和分泌型 CD40 配体(rmGM-CSF、rmIL-4、rmsCD40L,Peprotech 公司),RPMI1640 培养基(HyClone 公司),ELISA 检测试剂盒(抗小鼠 IL-10、IL-12、IFN-γ,购于 Biosouce 公司,进口分装),PE-anti mouse CD40 抗体、FITC-anti mouse CD80 抗体、PE-cy5-anti mouse $CD11c^+$ 抗体(eBioscience 公司),TB. HSP70(重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所彭明利教授馈赠),MTT(惠利试剂公司)。

1.2　H22 抗原肽的制备

收集小鼠腹腔传代生长的 H22 细胞,冻融 2 次,低渗振荡,离心后将上清置沸水浴 10 min,冰浴 30 min,离心,调上清 pH 至 3,离心,上清再调 pH 至 7,用 BCA 法测定蛋白浓度,过滤,-80 ℃保存备用。

1.3　HSP70-H22 抗原肽复合物的体外合成

参照文献[4],将 H22 肽与 TB. HSP70 在体外结合,反应体系含 1 mmol/L ADP,1 mmol/L $MgCl_2$,75 mg/L 抗原肽,250 mg/L TB. HSP70,37 ℃水浴 2 h,-80 ℃保存备用(本研究中 TB. HSP70-H22 肽的剂量及浓度均按复合物中所含 HSP70 的量进行计算)。

1.4　小鼠骨髓来源的树突状细胞培养及扩增

颈椎脱臼处死小鼠后,取出其股骨和胫骨,RPMI1640 冲洗骨髓腔,红细胞裂解液裂解红细胞,RPMI1640 洗 3 次。以含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液(含 20 ng/ml GM-CSF 和 10 ng/ml IL-4),调整细胞数为 2×10^6/ml,6 孔板培养 2 d 后细胞换液,并补充 GM-CSF 和 IL-4,隔日半天换液补充细胞因子,第 7 天收获的细胞为不成熟的 DC。

1.5　体外刺激 DC

将上述收集的 DC 调整细胞数为 1×10^6/ml,24 孔板中培养,分为 4 组(每组 6 个复孔)并予以相应处理:未刺激组、sCD40L 组、TB. HSP70-H22 肽组、sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组;所加的 sCD40L 和 TB. HSP70-H22 肽终浓度分别为 1、10 μg/ml。24 h 后收集 DC,进行流式细胞术(FACS)检测、混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction,MLR)和肿瘤细胞杀伤实验。ELISA 法检测上清中 IL-12、IL-10。

1.6　FACS 分析

收集各组 DC,分别加入标记抗体:PE-cy5-CD11c、PE-CD40、FITC-CD80,4 ℃孵育 30 min,PBS 洗 2 遍,PBS 重悬,Becton-Dickinson 公司 FACS 双标检测 DC 的表型,以 CD11c 设门,CellQuest 软件分析。

1.7　混合淋巴细胞反应

取小鼠脾淋巴细胞悬液,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液(含终浓度为 40 ng/ml 的 rmIL-2)调整细胞数为 2×10^6/ml,每孔 100 μl 细胞悬液接种 96 孔板,分为 5 组(每组 6 个复孔):只有淋巴细胞的阴性对照组、未刺激组、sCD40L 组、TB. HSP70-H22 肽组、sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组;每组加入相应的 DC 予以干预(10^4/孔,终体积 200 μl),培养 48 h,离心,取细胞上清,ELISA 法检测 IFN-γ 的浓度水平,补足 DC、IL-2 和培养液继续培养 5 d,在 560 nm 处用 MTT 法检测吸光度值[D(560)],并按下列公式计算刺激指数(SI),以表达淋巴细胞的增殖程度。

SI = 实验组 D(560)值/阴性对照组 D(560)值

1.8　肿瘤细胞杀伤实验

收获上述传代培养 7 d 的淋巴细胞作为效应细胞,调整细胞数为 2×10^6/ml,加入 96 孔板,每孔 100 μl,以 H22 细胞为靶细胞。设单一靶细胞组、单一效应细胞组、1640 空白对照组、实验组(未刺激组、sCD40L 组、TB. HSP70-H22 肽组和 sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组),每组设 6 个复孔。按效应细胞∶靶细胞 =40∶1(终体积为 200 μl)混合,37 ℃、5% CO_2 孵育 68 h,在 560 nm 处用 MTT 法检测吸光度值[D(560)],以下列公式计算淋巴细胞对 H22 瘤细胞的杀伤率。

杀伤率(%) = {靶细胞 D(560)值 - [效/靶细胞孔 D(560)值 - 效应细胞 D(560)值]}/靶细胞 D(560)值 ×100%

1.9　动物体内抑瘤实验

取 6~8 周雌性 BALB/c 小鼠,于小鼠右后腿根部进行 H22 细胞接种,每只小鼠接种 10^5 H22 细胞,完全随机分为 5 组(n = 7):生理盐水对照组(Ⅰ组),第 2 天在肿瘤细胞接种部位注射生理盐水;未刺激 DC 治疗组(Ⅱ组),注射未刺激的 DC,余同Ⅰ组;sCD40L DC 治疗组(Ⅲ组),注射 sCD40L 刺激的 DC,余同Ⅰ组;TB. HSP70-H22 肽 DC 治疗组(Ⅳ组),注射 TB. HSP70-H22 肽刺激的 DC,余同Ⅰ组;sCD40L + TB. HSP70-H22 肽 DC 治疗组(Ⅴ组),注射 sCD40L + TB. HSP70-H22 肽刺激的 DC,余同Ⅰ组(每只 5×10^5 DC)。以后每隔 2 d 免疫 1 次,连续 5 次。第 21 天取眼静脉血 ELISA 法检测 IFN-γ 和 IL-10,解剖小鼠称肿瘤湿质量。

1.10　统计学处理

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,根据资料性质进行方差分析和组间 t 检验,所有数据统计分析采用 SAS 9.0 统计软件完成。

2　结果

2.1　DC 的形态变化

细胞培养 48 h 后,去除未贴壁细胞及碎片,可见贴壁的单个核细胞聚集成均匀散布的细胞团,体积小,多为圆形;第 3 天,可见贴壁的单核巨噬细胞,其周围有半贴壁细胞,体积变大,形状不规则,呈星状、蝌蚪状、梭形,有大量突起,即为 DC;第 4~7 天可见部分细胞脱壁,细胞数渐增,形状也趋典型,即特征性树突状。有 2~5 个不等的突起,有的较长,但仍见梭形,第 7 天 DC 树突状分支增加,变得更加粗大,大部分释放悬浮于培养液中,少数疏松贴壁生长。

2.2　DC 表面标志物检测

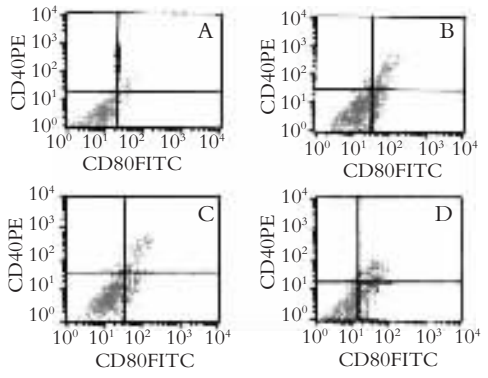
将收集培养 8 d 的 DC 荧光抗体染色,流式细胞仪检测,结

果显示:与未刺激组比较,其他各组的 CD40、CD80 均显著上升($P<0.05$);与 sCD40L 组比较,TB. HSP70-H22 肽组的 CD40、CD80 无明显上升($P>0.05$),sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的 CD40、CD80 显著上升($P<0.05$);与 TB. HSP70-H22 肽组比较,sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的 CD40、CD80 显著上升($P<0.05$,表1,图1)。

表1 刺激后各组 DC 表面 CD40 和 CD80 表达的比较(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	CD40	CD80
未刺激组	16.63 ± 2.96	20.23 ± 1.52
sCD40L 组	22.78 ± 3.59[a]	34.23 ± 6.44[a]
TB. HSP70-H22 肽组	23.97 ± 1.95[a]	35.18 ± 5.43[a]
sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组	27.95 ± 3.81[abc]	45.52 ± 6.91[abc]

a: $P<0.05$, 与未刺激组比较; b: $P<0.05$,与 sCD40L 组比较; c: $P<0.05$, 与 TB. HSP70-H22 肽组比较



A:未刺激组; B:sCD40L 组; C:TB. HSP70-H22 肽组; D:sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组

图1 刺激后各组 DC 表面分子 CD40 和 CD80 的流式细胞术检测结果

2.3 各组 DC 上清中 IL-10 和 IL-12 的浓度检测

收集刺激 24 h 后 DC 细胞上清,ELISA 法测定结果显示:与未刺激组比较,其他组的 IL-10 均显著降低,IL-12 均显著升高($P<0.05$)。与 sCD40L 组比较,TB. HSP70-H22 肽组的 IL-10 显著降低($P<0.05$),IL-12 变化不明显($P>0.05$),sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的 IL-10 显著降低,IL-12 显著升高($P<0.05$);与 TB. HSP70-H22 肽组比较,sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的 IL-10 显著降低,IL-12 显著升高($P<0.05$,表2)。

表2 刺激后各组 DC 细胞上清中 IL-10 和 IL-12 浓度的比较(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	IL-10	IL-12
未刺激组	741.5 ± 50.9	52.7 ± 14.9
sCD40L 组	647.1 ± 15.3[a]	407.1 ± 11.8[a]
TB. HSP70-H22 肽组	546.8 ± 25.3[ab]	403.8 ± 21.8[a]
sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组	466.3 ± 19.9[abc]	641.7 ± 16.6[abc]

a: $P<0.05$, 与未刺激组比较; b: $P<0.05$,与 sCD40L 组比较; c: $P<0.05$, 与 TB. HSP70-H22 肽组比较

2.4 各组 DC 刺激后淋巴细胞增殖的程度及其分泌的 IFN-γ 水平

与未刺激组比较,sCD40L 组的 SI 及 IFN-γ 差异均无统计学意义($P>0.05$),TB. HSP70-H22 肽组和 sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的 SI 及 IFN-γ 均显著升高($P<0.05$);与 sCD40L 组比较,TB. HSP70-H22 肽组和 sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的 SI 及 IFN-γ 均显著升高($P<0.05$);与 TB. HSP70-H22 肽组比较,sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的 SI 及 IFN-γ 均显著升高($P<0.05$,表3)。

表3 各组 DC 刺激后淋巴细胞增殖程度和 IFN-γ 的分泌水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	SI	IFN-γ(pg/ml)
未刺激组	1.01 ± 0.02	105.1 ± 10.8
sCD40L 组	1.04 ± 0.03	107.2 ± 20.7
TB. HSP70-H22 肽组	1.64 ± 0.05[ab]	575.6 ± 23.1[ab]
sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组	2.07 ± 0.08[abc]	752.2 ± 20.7[abc]

a: $P<0.05$, 与未刺激组比较; b: $P<0.05$,与 sCD40L 组比较; c: $P<0.05$, 与 TB. HSP70-H22 肽组比较

2.5 肿瘤细胞杀伤实验结果

与未刺激组相比,sCD40L 组的淋巴细胞对 H22 细胞的杀伤率差异无统计学意义[分别为(11.93 ± 4.23)%、(12.66 ± 3.97)%,$P>0.05$],TB. HSP70-H22 肽组和 sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的淋巴细胞对 H22 细胞的杀伤率均显著升高[分别为(60.67 ± 5.06)%、(72.95 ± 3.21)%,$P<0.05$];与 sCD40L 组比较,TB. HSP70-H22 肽组和 sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的淋巴细胞对 H22 细胞的杀伤率均显著升高($P<0.05$);与 TB. HSP70-H22 肽组相比,sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的淋巴细胞对 H22 细胞的杀伤率显著升高($P<0.05$)。

2.6 动物体内抑瘤实验结果

与Ⅰ组比较,Ⅱ、Ⅲ组肿瘤湿质量差异无统计学意义($P>0.05$),Ⅳ、Ⅴ组的肿瘤湿质量均显著降低($P<0.05$);与Ⅱ组比较,Ⅲ组肿瘤湿质量差异无统计学意义($P>0.05$),Ⅳ、Ⅴ组肿瘤湿质量均显著降低($P<0.05$);与Ⅲ组比较,Ⅳ、Ⅴ组肿瘤湿质量均显著降低($P<0.05$);与Ⅳ组比较,Ⅴ组肿瘤湿质量显著降低($P<0.05$)。

与Ⅰ组比较,Ⅱ、Ⅲ组 IL-10、IFN-γ 差异均无统计学意义($P>0.05$),Ⅳ、Ⅴ组的 IL-10 显著降低,IFN-γ 显著升高($P<0.05$);与Ⅱ组比较,Ⅲ组的各项指标差异均无统计学意义($P>0.05$),Ⅳ、Ⅴ组的 IL-10 显著降低,IFN-γ 显著升高($P<0.05$);与Ⅲ组比较,Ⅳ、Ⅴ组的 IL-10 显著降低,IFN-γ 显著升高($P<0.05$);与Ⅳ组比较,Ⅴ组的 IL-10 显著降低,IFN-γ 显著升高($P<0.05$,表4)。

表4 治疗后各组小鼠体内抑瘤实验结果的比较($n=7$, $\bar{x}\pm s$)

组别	肿瘤湿质量(g)	IL-10(pg/ml)	IFN-γ(pg/ml)
Ⅰ组	3.14 ± 0.40	68.7 ± 5.6	14.7 ± 3.1
Ⅱ组	3.19 ± 0.43	66.7 ± 6.2	13.5 ± 3.4
Ⅲ组	3.24 ± 0.35	65.9 ± 4.8	15.2 ± 3.3
Ⅳ组	1.61 ± 0.26[abc]	31.3 ± 3.4[abc]	58.4 ± 3.6[abc]
Ⅴ组	0.79 ± 0.27[abcd]	18.7 ± 3.7[abcd]	78.6 ± 6.2[abcd]

a: $P<0.05$, 与Ⅰ组比较; b: $P<0.05$,与Ⅱ组比较; c: $P<0.05$, 与Ⅲ组比较; d: $P<0.05$,与Ⅳ组比较

3 讨论

DC 是目前功能最强的抗原提呈细胞,能有效诱导抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞,在机体抗肿瘤免疫

中发挥重要作用。肝癌细胞能够分泌产生 IL-10、TGF-β、甲胎蛋白等,使 DC 细胞数量减少和功能缺失,无法有效地处理和提呈肿瘤抗原,这也是肝癌细胞逃避机体免疫监视和免疫攻击的重要原因[5,6]。因此,如何以合适的手段充分激活并发挥 DC 的活性,增强肝癌肿瘤抗原免疫原性,诱导真正特效的抗肿瘤免疫反应,将成为肝癌抗肿瘤免疫疗法中的关键。

肿瘤组织来源的 HSP70-肽复合物能诱导机体产生针对特定肿瘤细胞的特异性细胞免疫[7,8],但由于纯化复杂、来源受限,大大限制了其应用。本实验从小鼠腹腔生长传代的 H22 细胞中提取蛋白抗原肽,再将其与重组所得 TB. HSP70 在体外结合形成复合物,并以此复合物刺激 DC。体外实验结果显示与未刺激组相比,TB. HSP70-H22 肽组 CD40 和 CD80 的表达、IL-12 的分泌、淋巴细胞增殖程度和 H22 瘤细胞杀伤率升高;动物体内抑瘤实验中,与Ⅰ组相比,Ⅲ组的 IFN-γ 升高,肿瘤湿质量降低,说明体外重组的 TB. HSP70-H22 肽复合物能促进 DC 活化成熟,DC 表面的协同刺激分子 CD40、CD80、CD86 表达明显上调(流式细胞检测结果也显示 TB. HSP70-H22 肽组的 DC 表面 CD40 和 CD80 的表达比未刺激组的的表达增高),介导外源抗原进入内源递呈途径,通过 MHC-Ⅱ/MHC-Ⅰ通路活化 $CD4^+$/$CD8^+$T 细胞,诱导机体产生特异性的抗肿瘤细胞免疫,从而有效地抑制肿瘤在小鼠体内的生长,与文献[9]报道相符。而且 TB. HSP70 的纯化简便,肿瘤抗原肽来源不受限制,体外合成 TB. HSP70-H22 肽复合物的操作过程简单易行,克服了肿瘤组织来源的 HSP70-肽复合物的不足,从而有利于其在抗肿瘤免疫治疗中的广泛使用。

CD40/CD40L 的相互作用能促进 DC 进一步活化成熟,且对 DC 激活初始 T 淋巴细胞、诱导特异性抗肿瘤细胞免疫有增强效应。sCD40L 组与未刺激组相比,sCD40L 组的 DC 表面 CD40、CD80 表达升高,IL-12 的分泌增多,这与文献[10]报道相符;但淋巴细胞增殖程度和 H22 瘤细胞杀伤率无明显差异,这可能是由于此组未加 H22 抗原刺激,DC 不能摄取到 H22 抗原,因而不能诱导特异性抗 H22 肿瘤细胞免疫。目前尚少 CD40L 和 HSP70-肽复合物共同用于抗肿瘤免疫的相关报道,本研究使用 sCD40L 与 TB. HSP70-H22 肽复合物联合刺激 DC,以期找到一种更有效、可行的抗肝癌免疫治疗的途径。体外实验结果显示,与 sCD40L 组和 TB. HSP70-H22 肽组相比,sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组 CD 细胞表面 CD40、CD80 的表达明显上调,IL-12 分泌明显增多,体外刺激淋巴细胞的增殖程度、淋巴细胞上清中的 IFN-γ 和对 H22 瘤细胞的杀伤率均明显升高;体内抑瘤实验结果显示,与Ⅲ、Ⅳ 组比较,Ⅴ组的血清 IFN-γ 水平明显升高,肿瘤湿质量明显降低。说明 sCD40L 与 TB. HSP70-H22 肽复合物联合运用较单用 sCD40L 或 TB. HSP70-H22 肽能更好地刺激 DC,促进 DC 的成熟,并显著上调 DC 表面 CD40、CD80、CD86 等协同刺激分子的表达(流式细胞检测结果也显示 sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组 DC 表面 CD40 和 CD80 的表达比 sCD40L 组和 TB. HSP70-H22 肽组的表达增高),从而更有效地激活 T 细胞诱导特异性抗 H22 肿瘤细胞免疫,对 H22 瘤细胞产生强大的杀伤作用,有效地抑制 H22 肿瘤在小鼠体内的生长,并增强了小鼠的抗肿瘤免疫;与单用 sCD40L 或 TB. HSP70-H22 肽比较,sCD40L 与 TB. HSP70-H22 肽复合物联合运用,能显著促进 DC 分泌大量的 IL-12,从而促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化,有利于诱导特异性的细胞毒性淋巴细胞效应,在肿瘤的免疫应答中发挥作用。

体外实验结果显示,与不成熟组、sCD40L 组、TB. HSP70-H22 肽组比较,sCD40L + TB. HSP70-H22 肽组的 IL-10 显著降低,CD40、CD80、IL-12、SI 和 H22 细胞杀伤率均显著上升,而不成熟 DC 通过自分泌 IL-10 的方式作用于自身从而使 DC 维持于不成熟阶段[11]。由此,我们推测 sCD40L 与 TB. HSP70-H22 肽联合刺激 DC,能显著抑制 IL-10 的分泌,从而显著削弱了IL-10 对 DC 成熟的抑制作用,使 DC 得以充分地活化成熟,分泌大量的 Th1 型细胞因子 IL-12,有利于诱导出更强的特异性的抗肿瘤细胞免疫,在肿瘤的免疫应答中起了重要作用。体内抑瘤实验结果显示,与Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组相比,Ⅴ组血清 IL-10 水平显著降低,而 IL-10 是一种单核细胞失活因子,肝癌细胞通过分泌 IL-10 抑制 DC 的成熟和抗原提呈作用,使之不能有效的处理提呈肿瘤抗原诱导特异性抗肿瘤细胞免疫,形成适合肝癌细胞生长的微环境,而逃避免疫的攻击。由此,我们可以推测 TB. HSP70-H22 肽复合物刺激的 DC 免疫小鼠后,能明显削弱 IL-10 对抗肿瘤免疫的抑制作用,通过破坏肿瘤细胞生长的微环境,减少肿瘤细胞免疫逃逸的可能,从而更有效地遏制 H22 肝癌细胞在小鼠体内的生长。

根据以上实验结果,我们认为 sCD40L 与TB. HSP70-H22 肽复合物联合使用能充分地激活 DC,增强 DC 的抗原提呈作用和肝癌抗原的免疫原性,高效地激活初始型 T 淋巴细胞诱导强力的特异性抗肿瘤细胞免疫。同时 TB. HSP70-H22 肽复合物所携带的蛋白肽包含了个体肿瘤的抗原肽库,因而 sCD40L 与 TB. HSP70-H22 肽复合物联合刺激所得的 DC 成为了一种多价疫苗,可以更好地诱导针对肿瘤细胞抗原肽的免疫效应,回避了鉴定肿瘤特异性抗原的困难,并可以激发针对多个已知的或未知的肿瘤相关抗原的 T 细胞免疫[12],同

时通过降低IL-10水平,破坏肿瘤细胞生长的微环境,从2个不同的方面减少肿瘤免疫逃逸的可能性,从而达到更好的治疗效果;且TB.HSP70纯化简便,抗原来源不受限,复合物的体外合成简单易操作,为肝癌的免疫治疗提供了一条有效可行的途径。

参考文献:

[1] 彭明利,凌 宁,任 红,等.结核杆菌热休克蛋白70在毕赤酵母中的分泌表达与鉴定[J].生物工程学报,2003,19(3):286-290.

[2] 高 建,陈 敏,任 红.肝癌细胞裂解物致敏的树突状细胞瘤苗预防肝癌术后转移复发[J].中华肝脏病杂志,2005,13(6):432-435.

[3] Peng M, Chen M, Ling N, *et al*. Novel vaccines for the treatment of chronic HBV infection based on mycobacterial heat shock protein 70 [J]. Vaccine, 2006, 24(7):887-896.

[4] Blachere N E, Li Z H, Chandawarkar R Y, *et al*. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity[J]. J Exp Med, 1997,186(8):1315-1322.

[5] Lee W C, Chiang Y J, Wang H C, *et al*. Functional impairment of dendritic cells caused by murine hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Immunol,2004,24(2):145-154.

[6] Beckebaum S, Zhang X, Chen X, *et al*. Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(21):7260-7269.

[7] Todryk S M, Gough M J, Pockley A G. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential[J]. Immunology, 2003,110(1):1-9.

[8] Shin B K, Wang H, Yim A M, *et al*. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function [J]. J Biol Chem, 2003, 278(9):7607-7616.

[9] 黄 波,冯作化,张桂梅.HSP70-肿瘤抗原肽复合物修饰的DC疫苗体内外特异性抗瘤作用[J].中国免疫学杂志,2002,18(9):614-617.

[10] Murugaiyan G, Agrawal R, Mishra G C, *et al*. Differential CD40/CD40L expression results in counteracting antitumor immune responses[J]. J Immunol, 2007, 178(4):2047-2055.

[11] Corinti S, Albanesi C, la-Sala A, *et al*. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions[J]. J Immunol, 2001, 166(7):4312-4318.

[12] 张 坤,余佩武,高朋芬,等.SGC7901-DC融合细胞疫苗表型变化特点的研究[J].第三军医大学学报,2006,28(2):163-165.

(编辑 吴培红)

个案与短篇

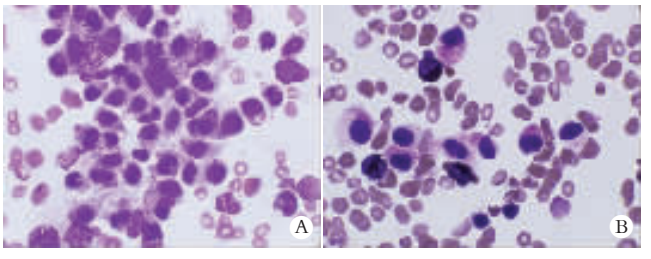
文章编号:1000-5404(2009)11-1028-01

肥大细胞白血病1例

兰会华[1],彭志刚[2],莫武宁[1],马 劼[2],韦 巍[1] (广西医科大学第一附属医院:[1]临床医学实验部,[2]血液科,南宁 530021)

1 临床资料

患者,女性,80岁,因"反复发热、腹泻7个月"入院。患者7个月前无明显诱因出现发热、哮喘,继而出现皮肤片状皮疹,伴瘙痒,同时有恶心、呕吐、腹痛、腹泻。当地医院诊断为"慢性结肠炎",给予消炎对症治疗,但无缓解,故来我院进一步诊治。查体:双侧颈部、腋窝、腹股沟可触及多个肿大淋巴结,最大约食指头大小,质中,边缘清楚,无压痛。血常规:WBC 8×10^9/L,Hb 61 g/L,PLT 6.0×10^9/L,中性粒细胞0.61,淋巴细胞0.14,单核细胞0.04,肥大细胞0.21;肝功:总蛋白36.8 g/L,白蛋白13.1 g/L,球蛋白25.7 g/L,转氨酶、胆红素、肾功能均在正常范围;B超示脾轻度肿大;胃镜检查:十二指肠溃疡并出血,胃黏膜急性炎症病变。骨髓检查:增生明显活跃,肥大细胞占59%,瑞氏染色(图1A)可见大量成群或散在的肥大细胞,形态多不规则,易见拖尾、棱形等改变,细胞核呈圆形、类圆形,易见核凹陷、切迹、扭曲、折叠,核染色质网状,核仁隐显不一,细胞质较丰富,淡蓝或淡红,部分细胞有伪足,含有大量粗大颗粒,常遮盖细胞核;肥大细胞POX染色(图1B)呈阴性,PAS呈阳性和甲苯胺蓝染色呈弱阳性,考虑肥大细胞白血病。确诊后临床给予对症治疗,症状好转后患者自动要求出院。



A:瑞氏染色;B:POX染色

图1 肥大细胞白血病骨髓片染色结果 (×1 000)

2 讨论

肥大细胞白血病(mast cell leukemia,MCL)又名组织嗜碱细胞白血病。Efrati等在1957年首先提出MCL的诊断,之后陆续有少量案例报告。MCL平均发病年龄为56(43~80)岁,好发于女性(女性:男性为2.3:1),通常累及肝、脾、淋巴结等脏器,心、肺、肾脏较少受累。大多数患者对化疗药物反应性差,生存期不足1年[1]。

(下转1031页)

作者简介:兰会华,女,广西壮族自治区柳城县人,硕士研究生,主要从事临床检验诊断学方面的研究。E-mail:lanhh1984@163.com

通信作者:莫武宁,E-mail:mown163@163.com

收稿日期:2008-08-05;**修回日期**:2008-10-12