论著

文章编号:1000-5404(2011)15-1576-06

TLR4/MyD88信号通路在树突状细胞-肾癌786-0细胞株融合瘤苗中的作用

谭小军,胡自力,刘 富 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院泌尿外科)

[摘要] **目的** 探讨TOLL样受体4(toll-like receptor 4,TLR4)/髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88,MyD88)信号通路在树突状细胞(dentric cell,DC)-肾癌786-0细胞融合瘤苗中的变化及作用。**方法** 用正常人外周血诱导不成熟的树突状细胞(immature dentric cell,imDC),利用聚乙二醇法(PEG)制成imDC-肾癌-786-0细胞融合瘤苗;用透射电镜观察imDC融合前后变化情况;RT-PCR检测单纯imDC组,肾癌786-0细胞组,imDC-肾癌-786-0融合瘤苗组在6、12、24、48 h中TLR4及MyD88 mRNA变化情况;用激光共聚焦检测imDC中核因子-κB(nuclear factor kappa B,NF-κB)在融合前后转位情况;流式细胞仪检测imDC在融合前后CD86、HLA-DR变化;噻唑盐(MTT)法检测各组体外刺激T淋巴细胞的增殖能力及刺激的细胞毒性T淋巴细胞(CTLs)的杀瘤活性。**结果** 透射电镜显示融合细胞中imDC转变为mDC;TLR4及MyD88 mRNA在肾癌中不表达,在单纯imDC中呈低表达(TLR4/β-actin灰度比值0.40±0.03,MyD88/GAPDH灰度比值0.33±0.03),在融合瘤苗组中6 h表达最强(TLR4/β-actin灰度比值0.73±0.18,MyD88/GAPDH灰度比值为0.45±0.18),明显强于各组($P<0.05$),此后在融合细胞中逐渐减弱,48 h基本不表达;激光共聚焦显示NF-κB在融合前位于imDC细胞质,融合后转移至细胞核;流式细胞仪提示融合瘤苗HLA-DR、CD86表达分别为81%、80%,明显高于imDC组(63%、59%)及肾癌细胞组($P<0.05$);MTT法示融合疫苗在体外刺激T淋巴细胞增殖能力[D(570)值(1.95±0.22)]强于imDC组(1.31±0.35)及肾癌786-0组(1.28±0.33)($P<0.05$),并且其诱导产生的CTLs对自体肾癌细胞具有显著的杀伤活性。**结论** TLR4/MyD88-NF-κB信号通路在imDC与肾癌786-0细胞融合过程中促使树突状细胞成熟发挥了非常重要的作用,并且此信号通路能促使树突状细胞功能发生转变。

[关键词] TOLL样受体4;树突状细胞;肾癌;融合瘤苗;核转录因子;半定量RT-PCR
[中图法分类号] R73-35; R730.23; R737-11 [文献标志码] A

Role of TLR4/MyD88 signal transduction pathway in fusion vaccine by peripheral blood dendritic cells and renal cell carcinoma 786-0 cells

Tan Xiaojun, Hu Zili, Liu Fu (Department of Urinary Surgery, Second Affliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the change and function of toll-like receptor 4 (TLR4)/Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) signal transduction pathway in fusion vaccine by peripheral blood dendritic cells and renal cell carcinoma 786-0 cells. **Methods** Peripheral blood sample of healthy volunteers was used to induce immature dendritic cells (imDCs), which were further induced to fuse with renal cell carcinoma (RCC) 786-0 cells with aid of polyethylene glycol (PEG). Transmission electron microscopy (TEM) was employed to observe the changes of imDCs before and after fusion. Semi-quantitative RT-PCR was used to detect the mRNA changes of TLR4 and MyD88 in pure imDCs, RCC 786-0 cells, and imDC-RCC 786-0 fusion vaccine in 6, 12, 24, and 48 h after fusion. The transposition of nuclear fac-torkappa B (NF-κB) in imDCs before and after fusion was detected by laser scanning confocal microscopy (LSCM). The changes of CD86 and HLA-DR in imDCs before and after fusion were detected by flow cytometry. The abilities of the fusion vaccine to stimulate T lymphocytes proliferation and CTL cells-mediated antitumor response were measured by MTT assay. **Results** Transmission electron microscopy showed imDCs were transformed to mDCs after fusion. The mRNA of TLR4 and MyD88 was not expressed in RCC-786-0 cells, mildly expressed in imDCs, but was significantly strongly expressed in fusion vaccine in 6 h after fusion ($P<0.05$), then their mRNA expression was decreased gradually till undetectable in 48 h after fusion. LSCM displayed that NF-κB existed in the cytoplasm of pure imDC, and then translocated in the nucleus of fusion vaccine. The expressions of CD86 and HLA-DR in fusion

[通信作者] 胡自力,E-mail:huzili6767@163.com

vaccine were significantly upregulated compared with the pure imDC control group ($P<0.05$). The functions of dendritic cell-tumor fusion vaccine to stimulate the proliferation of T lymphocytes were stronger than that of imDCs, RCC 786-0 cells ($P<0.05$), and CTLs stimulated by the fusion vaccine showed distinct activity *in vitro* to kill autologous tumor cells. **Conclusion** TLR4/MyD88-NF-κB signal transduction pathway exhibits an very significance role in fusion vaccine to promote imDCs to shift mDCs, and the signal pathway prompts dendritic cells function changes.

[**Key words**] toll-like receptor 4; dendritic cells; renal cell carcinoma; fusion vaccine; nuclear transcription factor; semi-quantitative RT-PCR

Corresponding author: Hu Zili, E-mail: huzili6767@163.com

肾癌(renal cell carcinoma,RCC)是肾脏中最常见的恶性肿瘤,其中肾透明细胞癌最为常见,占肾细胞癌的90%。肾细胞癌是免疫原性极强的肿瘤,对放化疗均不敏感,因此免疫治疗成为治疗肾细胞癌的热点。树突状细胞(dentric cell,DC)是目前发现的人体内功能最强的抗原提呈细胞,能有效活化人体初始型T淋巴细胞。由于DC具有很强的激活T细胞的功能,在机体抗肿瘤免疫中发挥重要的作用,人们开始尝试利用各种方式修饰DC以增强DC抗肿瘤的能力,主要有肿瘤抗原肽或肿瘤裂解物致敏DC、肿瘤抗原基因或细胞因子基因修饰DC、肿瘤细胞与DC融合等方式负载肿瘤抗原[1]。其中利用细胞融合技术将DC和肿瘤细胞融合制备融合瘤苗修饰DC的方式因其高效、独特的优点而备受瞩目[2]。DC激活初始型T淋巴细胞的能力取决于它的成熟状态,成熟的DC(mature dentric cell,mDC)能表达更高水平的共刺激分子和黏附分子[3]。DC的成熟状态由许多因素决定,TLR4就是其中之一,过往研究发现TLR4/MyD88信号通路在DC成熟过程中发挥着重要作用。TLR4是发现的人类第1种Toll同源变体,TLR4位于许多免疫细胞膜上,如树突状细胞等。大多数树突状细胞属于未成熟树突状细胞,表达于DCs表面的TLRs当其接受抗原配体刺激后,向胞内传递信息,首先传给MyD88蛋白[4],使其活化,活化后的MyD88使下游相关蛋白磷酸化,促使NF-κB进入细胞核,导致相关基因发生转录,诱导DCs成熟,并促使其分泌共刺激分子及相关细胞因子,活化T细胞,诱导特异性免疫应答,增强抗肿瘤免疫。

本实验应用健康志愿者来源外周血诱导成imDC[5],通过PEG法制备成imDC-肾癌786-0细胞融合疫苗,探查TLR4/MyD88信号通路在树突状细胞-肾癌786-0细胞株融合瘤苗中的变化及作用,为肾癌的免疫治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

细胞因子GM-CSF、IL-4购于美国PeproTech公司,单抗PE-CD86、PE-HLA-DR购于美国eBioscience公司,淋巴细胞分离液购于天津TBD公司,聚乙二醇(polyethy-leneglvcol,PEG相对分子质量6 000,进口分装)购于天津天泰化学品有限公司,RNA提取试剂盒及RT-PCR试剂盒购自Promega公司,PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成,一抗兔抗人NF-κB/p65及FITC标记二抗IgG羊抗兔购自北京博奥森公司,肾癌786-0细胞株购于重庆医科大学超声研究所。

1.2 方法

1.2.1 树突状细胞体外诱导培养 按淋巴细胞分离液说明书操作,利用密度梯度离心法,用淋巴细胞分离液分离健康人外周血单个核细胞,加RPMI1640完全培养基(含15%标准胎牛血清),同时加入rhGM-CSF 100 ng/ml,IL-4 50 ng/ml的终浓度细胞因子,在37 ℃,5% CO_2条件下培养。在第3、5天分别半量换液,并半量添加细胞因子,于第7天收集半悬浮及悬浮imDC。

1.2.2 肾癌786-0细胞培养 用含10%新生牛血清的RPMI1640培养液培养肾癌786-0细胞,在传代培养第4、5天,细胞处于对数期增殖时收集细胞。

1.2.3 树突状细胞与肾癌786-0细胞融合 按文献[6]操作并稍作改进。将上述收集的imDC与肾癌786-0细胞按1∶5的比例混匀,1 000 r/min离心8 min。用PBS洗涤3次后去上清,使混合沉淀细胞中尽量少含水分,轻弹管底使细胞团松散,在56 ℃水浴中缓缓加入50% PEG溶液(含5% DMSO),在1 min内加完,并充分混匀,静置5 min,使2种细胞充分融合,在8 min内缓缓加入完全RPMI1640培养基40 ml,离心,去上清,加入含20%标准胎牛血清的RPMI1640培养基,并按rhGM-CSF 100 ng/ml,IL-4 50 ng/ml终浓度加入细胞因子继续培养。在6、12、24、48 h收集融合细胞。

1.2.4 透射电镜观察细胞形态 分别收集体外诱导培养后第7天的imDC及细胞融合后48 h的融合细胞,1 000 r/min离心10 min后弃上清,加入2.5%戊二醛溶液固定30 min后送检,后期标本制作及摄像由重庆医科大学电镜室完成。

1.2.5 半定量RT-PCR检测TLR4/MyD88 mRNA表达变化

参照试剂盒操作手册提取细胞总RNA(略有改进),用凝胶电泳分析RNA纯度并用紫外分光光度计测量RNA浓度,并反转录为cDNA。按M-Mulv Reverse Transcriptase说明进行反应。根据文献[7]的TLR4、MyD88 cDNA设计合成特异的正义和反义引物。TLR4上游引物5′-GGATACGTTTCCTTATAAG-3′,下游引物5′-GAAATGGAGGCACCCCTTC-3′,扩增大小507 bp;内参照β-actin上游引物5′-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-

3′,下游引物5′-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3′,扩增大小261 bp。RT反应条件:42 ℃ 15 min;95 ℃ 5 min;4 ℃ 5 min。PCR反应条件件:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s;60 ℃ 30 s;70 ℃ 30 s循环35次,70 ℃延伸10 min。MyD88上游引物5′-CCTTTATCTGCTACTGCCCCAACGA-3′,下游引物5′-GTGATGAACCGCAGGATACTGGGAAA-3′,扩增大小328 bp;内参照GAPDH上游引物5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游引物5′-TCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,扩增大小232 bp。PCR反应条件件:94 ℃ 30 s;53 ℃ 30 s;72 ℃ 1 min;56 ℃ 30 s;循环25次,70 ℃延伸10 min。电泳条带经Quantity one软件处理,各组的TLR4、MyD88条带分别与β-actin、GAPDH条带灰度值比值作为TLR4及MyD88 mRNA的相对表达量。

1.2.6 激光共聚焦显微镜检测imDC融合前后NF-κB转位情况 收集诱导培养第7天的imDC及融合后48 h的融合细胞,1 000 r/min离心10 min,多聚甲醛固定30 min,0.1% Triton打孔,加入1∶100的NF-κB/p65单抗后,置37 ℃孵育1 h,再4 ℃过夜,PBS洗涤3次后加入FITC标记羊抗兔IgG,置室温2 h后甘油封片,激光共聚焦显微镜观察。

1.2.7 共刺激分子表达情况 分别收集培养7 d的imDC、肾癌786-0、imDC-肾癌786-0融合细胞各3支,离心,重悬后加入3 μl PE-CD86、PE-HLA-DR,1支不加作空白对照,4 ℃避光静置30 min,PBS洗涤2次,流式上机分析。

1.2.8 刺激T淋巴细胞增殖能力 取人外周血分离的单个核细胞,培养4 h后收集悬浮细胞,过无菌的尼龙毛柱,收集所得液富含T淋巴细胞,每空以1.5×10^5细胞数加入96孔板,使其分别与imDC、肾癌786-0、imDC-肾癌786-0融合细胞按10∶1比例混合,另设单纯T淋巴细胞组和培养基空白对照组,每组4复孔,培养7 d后,加入0.5% MTT 20 μl/孔,继续孵育4 h,离心,弃上清,每孔加入DMSO 100 μl,在酶标仪570 nm波长处测光密度值$D(570)$。

1.2.9 体外诱导CTL杀伤肾癌786-0细胞的细胞毒效应 按1.2.8方法收集的T淋巴细胞分别与imDC、肾癌786-0、imDC-肾癌786-0融合细胞按10∶1比例混合,在含100 ng/ml GM-CSF、15% FCS的RPMI1640中,共同培养7 d,用尼龙毛柱分离法收集的细胞即所得细胞毒性T淋巴细胞(CTLs)。将上述收集的各组CTLs及单纯T淋巴细胞与肾癌-786-0细胞按10∶1比例混合作为反应组,另设各组CTLs作效应细胞组,单纯肾癌786-0组作为靶细胞组,每组4复孔,培养2 d后,加入0.5% MTT 20 μl/孔,继续孵育4 h,离心,弃上清,每孔加入DMSO 100 μl,在酶标仪570 nm波长处测光密度值$D(570)$。并按以下公式计算杀伤率:杀伤率=｛靶细胞孔$D(570)$值-[反应细胞孔$D(570)$值-效应细胞孔$D(570)$值]｝/靶细胞孔$D(570)$值×100%。

1.3 统计学方法

所有实验取得数据取平均值,以$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS 17.0软件进行分析,均数的比较采用t检验和方差分析。

2 结果

2.1 透射电镜观察细胞形态

诱导培养imDC后第7天,透射电镜示不成熟的树突状细胞成不规则形态,表面粗糙,有少量不规则树突样突起,细胞质中富含线粒体(图1);imDC与肾癌786-0细胞融合后48 h透射电镜示2种细胞融合为一体,树突状细胞表面见许多不规则样突起,肾癌细胞表面光滑无突起,两细胞融合连接部位紧密,两细胞核紧靠(图2)。

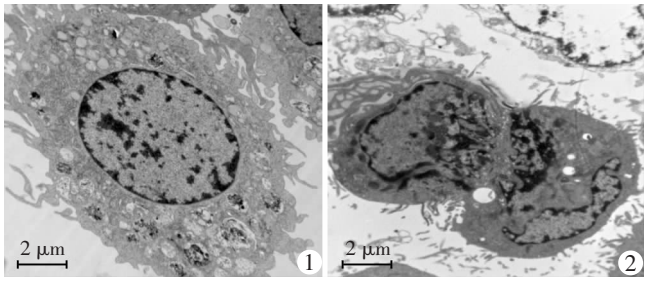
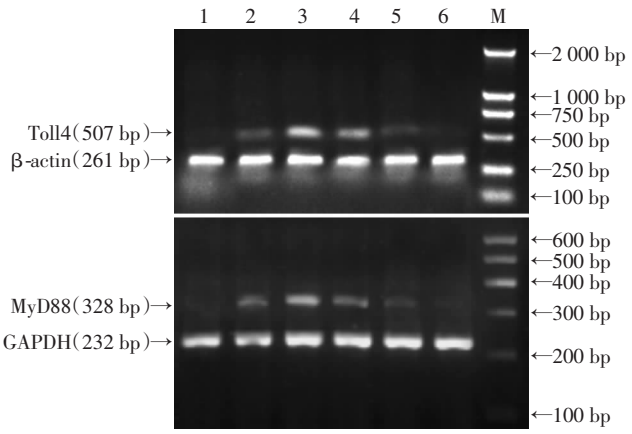


图1 imDC诱导培养第7天透射电镜观察

图2 融合瘤苗培养48 h后透射电镜观察

2.2 半定量RT-PCR检测TLR4、MyD88 mRNA的变化

各组细胞的RNA抽提后由1.2%琼脂糖电泳结果显示出28S、18S、5S三带明显,且28S>18S。在紫外光栅分光光度仪测定$D(260)$、$D(280)$,计算$D(260)/D(280)>1.9$,说明提取的各组细胞RNA的完整度和纯度满足实验要求。经RT-PCR扩增后,其各组电泳条带无明显变化;TOLL4条带在融合6 h组最强(TLR4/β-actin灰度比值0.73±0.18),强于其余各组($P<0.05$);其中肾癌细胞组、融合48 h组最弱(TLR4/β-actin灰度比值均为0.00±0.00),imDC组、融合12 h组、融合24 h组TLR4/β-actin灰度比值分别为0.40±0.03、0.65±0.17、0.18±0.04,差异有统计学意义($P<0.05$)。MyD88条带在融合6 h组最强(MyD88/GAPDH灰度比值为0.45±0.18),强于其余各组($P<0.05$);其中肾癌细胞组、融合48 h组最弱(MyD88/GAPDH灰度比值为0.00±0.00、0.08±0.04);imDC组、融合12 h组、融合24 h组MyD88/GAPDH灰度比值分别为0.33±0.03、0.34±0.17、0.10±0.04,3组间差异有统计学意义($P<0.05$)。见图3。

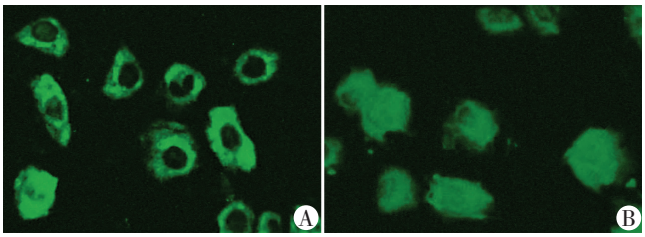


1:肾癌细胞组;2:imDC组;3:融合6 h组;4:融合12 h组;5:融合24 h组;6:融合48 h组;M:标准

图3 RT-PCR检测不同时间TLR4、MyD88 mRNA在融合瘤苗中的变化

2.3 DC 细胞融合前后 NF-κB 转位情况

利用激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)可以看到 imDC 细胞质中呈阳性反应,细胞核呈阴性反应;融合 48 h 后,融合细胞中树突状细胞核呈强阳性反应,细胞质为弱阳性反应。标志着融合后 TLR4 将抗原信息进一步传导给 NF-κB,使其转位,激活下游免疫基因,也标志着融合瘤苗中树突状细胞进一步成熟。见图 4。



A:imDC 诱导培养 7 d;B:融合瘤苗培养 48 h

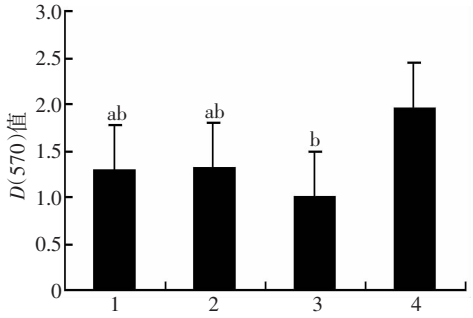
图 4 激光扫描共聚焦显微镜观察 imDC 融合前后 NF-κB 在细胞核内外的分布 (×1 000)

2.4 共刺激分子的表达

流式细胞仪检测肾癌 786-0 细胞中基本不表达 CD86、HLA-DR,在 imDC 表达 CD86 为(59.17±1.01)%,HLA-DR 为(63.07±2.03)%;imDC-肾癌 786-0 融合细胞融合 48 h 后,CD86 表达率为(80.14±1.11)%,HLA-DR 为(81.25±0.95)%,均明显高于 imDC 中的表达($P<0.05$),见图 5。说明融合细胞在融合过程中能促进不成熟的树突状细胞向成熟的树突状细胞转化。

2.5 刺激 T 淋巴细胞的增殖能力

MTT 法检测结果示,imDC-肾癌 786-0 细胞融合疫苗能有效刺激 T 淋巴大量增殖[$D(570)$值为 1.95±0.22,$P<0.05$],而单独 imDC 与肾癌 786-0 细胞促进 T 淋巴增殖能力远低于融合疫苗[$D(570)$值分别为 1.31±0.35、1.28±0.33],且其 2 组之间无统计学意义。见图 6。



1:肾癌细胞;2:imDC;3:单纯 T 淋巴细胞;4:imDC-RCC 融合瘤苗
a:$P<0.05$,与单纯 T 淋巴细胞比较;b:$P<0.05$,与 imDC-RCC 融合瘤苗比较

图 6 MTT 法检测各组细胞刺激 T 淋巴细胞的增殖能力

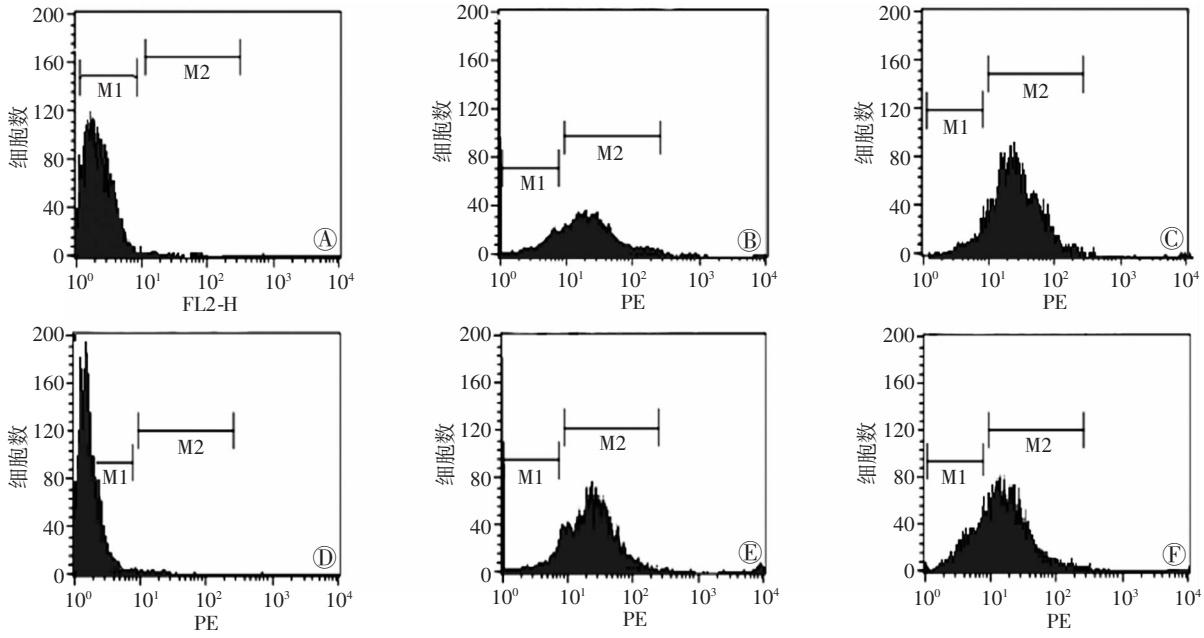
2.6 体外诱导 CTL 杀伤肾癌 786-0 细胞的细胞毒效应

融合瘤苗组产生的 CTL 与单纯培养 imDC、肾癌 786-0 细胞刺激后的 CTL 和未经刺激的 T 淋巴细胞体外杀伤肾癌 786-0 靶细胞的细胞毒活性差异显著($P<0.05$);单纯培养 imDC 及肾癌 786-0 细胞刺激后的 CTL 细胞和未经刺激的 T 淋巴细胞体外杀伤肾癌 786-0 靶细胞无明显差异,见表 1。

表 1 MTT 法检测各组体外诱导的 CTL 杀伤肾癌 786-0 细胞的细胞毒效应($\bar{x}\pm s$)

组别	$D(570)$值	杀伤率(%)
单纯 T 细胞组	0.082±0.003	17.36±0.73
imDC 组	0.092±0.002	18.42±0.41[ab]
肾癌 786-0 组	0.118±0.007	20.02±0.89[ab]
imDC-RCC 融合组	0.472±0.015	75.85±2.56

a:$P<0.05$,与单纯 T 淋巴细胞组比较;b:$P<0.05$,与 imDC-RCC 融合组比较



A:RCC CD86 表达;B:imDC CD86 表达;C:imDC CD86 表达;D:RCC HLA-DR 表达;E:imDC HLA-DR 表达;F:imDC HLA-DR 表达

图 5 流式细胞仪检测肾癌 786-0、imDC、肾癌 786-0 融合细胞细胞表型 CD86 与 HLA-DR 的表达

3 讨论

近年来以DC为基础的抗肿瘤免疫成为治疗肾癌的热点。融合瘤苗就是通过树突状细胞与肿瘤融合，希望肿瘤细胞能提供全部抗原信息，许多肿瘤抗原，包括识别的和尚未被识别的抗原，可同时被内源性加工处理并得以表达，更充分使树突状细胞提呈更丰富的抗原肽，使树突状细胞更充分成熟活化，表达更多共刺激分子，从而诱导一系列多克隆CTL的抗肿瘤免疫效应。DC的状态直接影响其功能发挥，不成熟的树突状细胞(imDC)表达低水平CD86、HLA-DR等共刺激分子[8]，而成熟的树突状细胞(mDC)表达高水平的共刺激分子。正常情况下大多数的DCs处于不成熟状态，体外激发混合白细胞反应(mixed hukocyte reacfion, MLR)能力相对较弱，但具有极强的抗原内吞和加工处理能力，这类不成熟DCs在摄取抗原或接受到某些刺激因素，可以分化为成熟DCs，其MHC分子、辅助刺激分子和黏附分子的表达显著提高，体外激发MLR能力增强，但其摄取抗原能力却大大降低[9]。影响DC成熟的因素众多，TLR4/MyD88信号通路为其中一个。TLR4是人类最早鉴定的TOLL样受体[10]，它能选择性识别抗原相关分子模式[11]，它广泛的表达于DC等抗原提呈细胞，能识别多种外源及内源性抗原，提呈相关信息，通过MyD88依赖途径，激活转录因子NF-κB[12-13]，启动相关细胞活化进程，使DC产生更多的CD86、HLA-DR等共刺激分子，从而充分活化T细胞，更充分的抗肿瘤免疫[14]。

本实验用PEG法诱导imDC与肾癌786-0细胞融合，探讨融合过程中TLR4/MyD88-NF-κB通路的变化情况及融合前后树突状细胞的功能转变。结果透射电镜提示imDC与肾癌786-0细胞能制成融合细胞，融合后48 h的DC突触更长，细胞核更大，内质网更多，说明融合使imDC转变成mDC，也说明可能是融合瘤苗中肾癌细胞提供了相关抗原信息，促使其成熟。RT-PCR提示TLR4、MyD88的mRNA在肾癌细胞中不表达，在imDC呈低表达，在融合6 h时表达最强($P<0.05$)，此后开始减弱，48 h时基本无法检测到，和国外报道有相同点[15]，但国内外大多数报道24 h后TLR4受体消失，本实验TLR4存在时间较长，可能是融合瘤苗能长时间、不断地提供抗原信息所致，这为持续活化树突状细胞，长时间产生共刺激分子提供可能，也提示TLR4及MyD88的变化可能与DC的功能转变有关，推测树突状细胞在融合之初主要功能是识别、提呈抗原信息，融合48 h后功能主要是激活T细胞。NF-κB在正常形式是以无活性的蛋白存在于细胞质中，接收相关抗原信息后，可是其由细胞质转移至胞核，启动一系列免疫基因mRNA转录的激活[16]；本实验激光共聚焦显示融合后NF-κB明显转位于细胞核，说明其能接收相关抗原信息，并启动下游基因活化，促进DCs活化，使imDC转变为mDC，上述结果均提示TLR4/MyD88的信号通路在促进树突状细胞成熟方面扮演着重要的角色，在细胞功能方面imDC-肾癌786-0融合瘤苗表达共刺激分子HLA-DR、CD86分别为81%、80%，明显高于imDC组的63%、59%($P<0.05$)，也显示出融合瘤苗能促使imDC转变为mDC，并有更强激活初始T细胞的能力。MTT也提示融合细胞组较单纯imDC组及肾癌细胞更能激活初始T细胞($P<0.05$)，为T细胞介导的免疫治疗提供了基础。融合瘤苗体外诱导CTL杀伤肾癌786-0细胞的细胞毒效应明显强于imDC及肾癌细胞所诱导的CTL，充分说明融合瘤苗在刺激T细胞增殖及体外杀肿瘤作用优于单纯的树突状细胞。

目前国内外学者大都主要着眼于TLRs配体的识别方式及其引发的免疫应答的关系，而对TLR4/MyD88信号通路的深入了解将更有助于我们进一步了解DCs在免疫应答中的作用及其分子基础。本实验说明融合瘤苗通过TLR4/MyD88-NF-κB信号通路能更长时间识别已知和未知的肿瘤抗原信息，能更长时间活化树突状细胞，这样能更有效、更长时间进行肿瘤免疫治疗；也说明TLR4/MyD88-NF-κB信号通路在imDC与肾癌786-0细胞融合过程中促使树突状细胞成熟发挥了非常重要的作用，并且此信号通路能促使树突状细胞功能发生转变，由提呈抗原转变为发挥免疫作用。本实验为进一步研究肾癌细胞的免疫治疗提供了理论基础，为今后在相应疾病的治疗提供新的切入点。

参考文献：

[1] Koido S, Hara E, Homma S, *et al*. Dendritic/pancreatic carcinoma fusions for clinical use: comparative functional analysis of healthy-versus patient-derived fusions[J]. Clin Immunol, 2010, 135(3): 384-400.

[2] Groux H, Fournier N, Cottrez F. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells[J]. Semin Immunol, 2004, 16(2): 99-106.

[3] 初晓霞，黄葆华，陈丽明，等. 树突细胞及其Toll样受体4在特发性血小板减少性紫癜发病中的作用[J]. 中华血液学杂志，2010，31(9)：613-616.

[4] Tanaka T, Legat A, Adam E, *et al*. DiC14-amidine cationic liposomes stimulate myeloid dendritic cells through Toll-like receptor 4[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(5): 1351-1357.

[5] Moldenhauer A, Nociari M M, Dias S, *et al*. Optimized culture conditions for the generation of dendritic cells from peripheral blood monocytes[J]. Vox Sang, 2003, 84(3): 228-236.

[6] 张坤，余佩武，高朋芬，等. 胃癌细胞-树突状细胞融合疫苗肿瘤细胞杀伤活性研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(5)：404-407.

[7] Zhang F X, Kirschning C J, Mancinelli R, *et al*. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 sig-

naling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes[J]. J Biol Chem, 1999, 274(12): 7611-7614.
[8] Cools N, Van-Tendeloo V F, Smits E L, *et al*. Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells[J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(2): 690-700.
[9] Kim G Y, Chae H J, Kim K H, *et al*. Dendritic cell-tumor fusion vaccine prevents tumor growth *in vivo*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(1): 215-221.
[10] Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells[J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(1): 25-31.
[11] Kogut M H, Iqbal M, He H, *et al*. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils[J]. Dev Comp Immunol, 2005, 29(9): 791-807.
[12] Marshak-Rothstein A, Rifkin I R. Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease[J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 419-441.
[13] Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, *et al*. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades[J]. Int Immunol, 2000, 12(1): 113-117.
[14] Tanaka S, Koizumi S, Masuko K, *et al*. Toll-like receptor-dependent IL-12 production by dendritic cells is required for activation of natural killer cell-mediated Type-1 immunity induced by Chrysanthemum coronarium L[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(2): 226-232.
[15] Akira S, Takada K. Toll-like receptor signalling[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(7): 499-511.
[16] Yan Z Q. Regulation of TLR4 expression is a tale about tail[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(12): 2582-2584.

(**收稿**:2011-01-27;**修回**:2011-02-19)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2011)15-1581-01

个案与短篇

替吉奥胶囊联合多西他赛治疗铂类失败晚期胃癌的临床观察

颜 芳,傅 强 (200433 上海,第二军医大学长海医院肿瘤科)

[**关键词**] 晚期胃癌;化学治疗;多西他赛;替吉奥胶囊
[**中图法分类号**] R735.2 [**文献标志码**] B

虽然近年来随着新药的发展,胃癌的治疗取得了一些进步,但晚期胃癌的总体疗效却不令人满意,特别是对于含铂方案治疗失败的患者,迄今其治疗仍是个难题。本研究收集我院2009年5月至2010年5月含铂类方案治疗失败晚期胃癌22例,予以DS方案化疗,疗效较好,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集2009年5月至2010年5月我院肿瘤科住院晚期胃癌患者22例,其中男性13例,女性9例。年龄30~67岁,平均52岁。其中腹腔、腹膜后淋巴结转移15例,肝脏转移13例,锁骨上淋巴结转移3例,骨转移2例,卵巢转移1例,肺转移1例,有10例同时有2个以上部位转移。所有入选患者符合以下标准:①有明确病理组织学诊断;②有可经影像学评估测量的病灶;③既往接受过含铂方案(包括顺铂和奥沙利铂)化疗且未使用过紫杉类药物,化疗失败至本次入组时间至少4周以上;④PS评分≤2分;⑤血常规及肝肾功能基本正常,无化疗禁忌证。

1.2 治疗方案

多西他赛(江苏恒瑞医药公司生产)70 mg/m^2,第1天,静脉滴注2 h;替吉奥胶囊(山东新时代药业有限公司生产)60 mg/(m^2·d),第1~14天,餐后30 min分2次服用;21 d为1个周期。至少完成2个周期后进行评价,用药至疾病进展或毒性不能耐受,最多完成6个周期。使用多西他赛前,均严格按说明书予以地塞米松等抗过敏预处理。每次化疗前后复查血常规及肝肾功能,若发生Ⅲ~Ⅳ度骨髓抑制,立即予以G-CSF、EPO等支持治疗。

[**通信作者**] 傅 强,电话:(021)81873304,E-mail:fumaye66@163.com

1.3 疗效和不良反应评估

疗效评定根据实体瘤的客观疗效评价RECIST标准分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)和疾病进展(PD)。客观有效率(RR)为CR+PR病例占可评价病例的百分数,CR或PR患者需经4周后再证实;疾病控制率(DCR)为CR+PR+SD病例占可评价病例的百分数。疾病进展时间(TTP)定义为本方案化疗开始至出现疾病进展时间,OS定义为本方案开始至死亡或失访时间。按NCI-CTC3.0评估不良反应,常见毒副反应分为0~Ⅳ度。

2 结果

2.1 疗效

22例患者均可行疗效评价。其中PR 5例(22.7%),SD 9例(40.9%),PD 8例(36.4%),RR 22.7%,DCR 63.6%。随访至2010年12月,有18例患者死亡,与肿瘤进展有关。中位疾病进展时间(TTP)为2.9个月,中位生存期(MST)为5.1个月。

2.2 不良反应

本方案主要的不良反应有骨髓抑制、脱发、消化道反应、手足综合征和肝肾功能损害。最常见的不良反应是骨髓抑制,以白细胞总数及中性粒细胞减少最为明显,发生率在75%以上,经G-CSF治疗后均能按计划完成治疗,其中有1例因骨髓抑制将多西他赛减量至原剂量的80%,无低白性发热和化疗相关死亡病例。消化道反应主要表现为恶心、呕吐、腹泻、口腔炎,但多为Ⅰ~Ⅱ度,经及时对症治疗后均可缓解。

3 讨论

晚期胃癌治疗预后差,5年生存率小于15%,中位生存期一般只有8~12个月。与最佳支持治疗相比,化疗治疗可以明

(下转1585页)