短篇论著

文章编号:1000-5404(2011)16-1764-03

乳酸杆菌增强树突状细胞诱导的CTL细胞抗宫颈癌移植瘤作用

逯彩虹[1],李保红[2],周艾琳[1],孙富国[3],戴卫红[4],王海波[1],刘丽宁[2],李秀娟[1] (050041 石家庄,白求恩军医学院附属260医院:妇产科[1],院办公室[2],泌尿外科[3];050000 石家庄,解放军白求恩国际和平医院药检室[4])

[摘要] **目的** 探讨乳酸杆菌在树突状细胞(dendritic cell,DC)诱导的CTL细胞抑制宫颈癌移植瘤中的作用及其机制。**方法** 30只雌性裸鼠移植瘤模型采用单纯随机抽样分为3组,①Lb-DC疫苗组:瘤旁注射乳酸杆菌宫颈癌细胞冻融抗原致敏的CTL细胞(1×10^6/200 μl);②DC疫苗组:瘤旁注射宫颈癌细胞冻融抗原致敏的CTL细胞(1×10^6/200 μl);③对照组:注射PBS液200 μl。FCM检测肿瘤细胞凋亡率以及Fas膜蛋白的含量;免疫组化法观察移植瘤Survivin蛋白的表达。**结果** Lb-DC疫苗组移植瘤治疗后体积明显小于治疗前($P<0.01$),抑瘤率为85.6%;DC疫苗组可明显抑制瘤体的生长,抑瘤率为57.4%。Lb-DC疫苗组肿瘤细胞凋亡率及Fas膜蛋白含量均高于DC疫苗组与对照组($P<0.01$)。Survivin蛋白在肿瘤细胞中的表达:Lb-DC疫苗组大部分为阴性;对照组大部分为强阳性,DC疫苗组为弱阳性。**结论** 乳酸杆菌辅佐DC疫苗可以明显抑制裸鼠宫颈癌HeLa移植瘤的生长,通过上调Fas膜蛋白,下调Survivin蛋白增强DC疫苗促进肿瘤细胞凋亡。

[关键词] 乳酸杆菌;宫颈癌移植瘤;树突状细胞;CTL细胞;肿瘤免疫;流式细胞技术

[中图法分类号] R73-362;R737.33 [文献标志码] A

目前,生物免疫治疗因其独特的优势成为肿瘤最有前景的治疗模式。肿瘤免疫逃逸最重要的原因是肿瘤患者体内树突状细胞(dendritic cell,DC)功能的缺陷、肿瘤细胞表面与T细胞识别和T细胞活化有关的MHC抗原、共刺激分子等表达明显降低不能导致特异性细胞毒T淋巴细胞(CTL)产生[1]。研究显示DC疫苗(癌细胞冻融抗原致敏的CTL细胞)对宫颈癌有治疗作用[2-4],但其效果还不能满足临床的要求。乳酸杆菌有很好的抗肿瘤作用,体外研究证明乳酸杆菌可明显增强DC的抗原提呈功能,增强宫颈癌DC疫苗对HeLa细胞的免疫杀伤作用。但肿瘤患者体内的免疫调节非常复杂,乳酸杆菌能否增强DC疫苗免疫作用尚不清楚。本研究采用裸鼠宫颈癌移植瘤模型探讨乳酸杆菌在DC疫苗抑制宫颈癌移植瘤中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和实验动物

HeLa-luc细胞由美国Zongmed公司惠赠。嗜酸乳酸杆菌粉:ProMD biotech Co,Lid公司生产。rhGM-CSF、rhIL-4、rhIL-2、rhTNF-α均购于美国PeproTech公司。

SPF级4周龄雌性BALB/c裸鼠30只,许可证编号:SCXK(京)2005-0013。购自中国医学科学院实验动物研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 裸鼠宫颈癌模型的建立 对数生长期的HeLa-luc细胞(2×10^7/0.2 ml)皮下注射接种于裸鼠右侧胸背部。按公式计算移植瘤体积:$V=1/6\pi abc$(abc分别为肿瘤互相垂直的直径),每4天测量1次,绘制移植瘤生长曲线。

1.2.2 宫颈癌细胞冻融抗原制备 将装有HeLa-luc细胞(2×10^5/ml)的EP管置于液氮中10 min,再迅速放入37 ℃水浴中溶解,反复3次。离心后取上清液过滤除菌后作为冻融抗原,4℃保存备用。乳酸杆菌(2×10^7/ml)65 ℃水浴箱灭活30 min。与宫颈癌HeLa-luc细胞(1×10^5/ml)共同培养24 h;反复冻融制备乳酸杆菌宫颈癌冻融抗原。

1.2.3 乳酸杆菌、宫颈癌细胞冻融抗原致敏DC 收集脐带血中单核细胞(2×10^6/ml),加入rhGM-CSF(1 000 U/ml)及rhIL-4(500 U/ml),隔天半量换液并半量补充细胞因子培养DC。培养第5天,调整细胞数为1×10^6/ml。将细胞分别用乳酸杆菌宫颈癌细胞冻融抗原(100 μl/孔)和宫颈癌细胞冻融抗原(100 μl/孔)致敏(DC:宫颈癌细胞=1:10)。同时向培基中加入rhTNF-α(终浓度为100 U/ml),继续培养2 d。

1.2.4 致敏DC细胞活化后CTL细胞制备 将1.2.3中致敏的DC分别与同种异体T淋巴细胞以1:10混合,加入含rhGM-CSF、rhIL-4、rhIL-2(1000 U/ml)的完全培养基,培养3 d获得DC激活的CTL。

1.3 实验分组及观察指标

待裸鼠移植瘤体积长至4 cm^3左右,采用单纯随机抽样分为3组,乳酸杆菌宫颈癌细胞致敏的DC活化CTL治疗组(Lb-DC疫苗组):瘤旁注射乳酸杆菌宫颈癌细胞冻融抗原(100 μl/孔)致敏的CTL细胞(1×10^6/200 μl);宫颈癌细胞冻融抗原致敏DC活化CTL治疗组(DC疫苗组):瘤旁注射宫颈癌细胞冻融抗原(100 μl/孔)致敏的CTL细胞(1×10^6/200 μl);对照组:即未致敏组,瘤旁注射PBS 200 μl。每8天接种1次,连种3次。每天观察1次裸鼠移植瘤生长情况及裸鼠生存期。每次治疗后7 d用活体成像技术观察肿瘤大小及光子数。免疫治疗结束后10 d处死裸鼠。

[通信作者] 逯彩虹,电话:(0311)87970772,E-mail:lwjgmz@126.com

1.4 乳酸杆菌增强DC疫苗抑制裸鼠宫颈癌观察指标

1.4.1 肿瘤组织凋亡率的测定 取1×10^6/ml的单细胞悬液0.1 ml,加入碘化啶(PI)1 ml,4℃冰箱染色30 min,500目铜网过滤,流式细胞仪检测。

1.4.2 移植瘤细胞Fas膜蛋白的表达 取单细胞悬液1×10^6/ml,依次加入鼠抗人Fas单克隆抗体、PBS 10 ml洗涤、羊抗鼠FITC-IgG二抗工作液100 μl。流式细胞仪检测。

1.4.3 肿瘤细胞Survivin蛋白的表达 采用S-P免疫组化法,肿瘤细胞内有棕褐色颗粒为阳性。每张切片中阳性细胞数≥75%,为强阳性"+++";阳性细胞数50%~75%,为中度阳性"++";阳性细胞数25%~50%,为弱阳性"+";阳性细胞数<25%,未见明显颗粒者定为阴性"-"。

1.5 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SAS 8.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 乳酸杆菌增强DC疫苗对宫颈癌的抑瘤效果

对照组宫颈癌移植瘤呈持续生长状态[治疗前体积(3.92±0.78)cm^3;治疗后体积(14.56±1.67)cm^3],在接种42 d死亡1只。治疗后10 d,DC疫苗组肿瘤生长速度开始减慢,尽管没有萎缩,但是肿瘤体积明显小于对照组[治疗前体积(4.15±0.84)cm^3;治疗后体积(6.19±1.36) cm^3, $P<0.01$],抑瘤率为57.4%;而Lb-DC疫苗组治疗后肿瘤体积较治疗前明显萎缩[治疗前体积(4.05±0.53)cm^3;治疗后体积(2.10±0.60)cm^3],抑瘤率为85.6%;各组肿瘤体积差异有统计学意义($F=206.24$, $P<0.01$)。治疗组随着瘤体成长速度的减慢与萎缩,瘤体的光子数也逐渐减少,肿瘤细胞的活力逐渐减弱($F=156.91$, $P<0.01$)。

2.2 各组肿瘤细胞凋亡率的变化

Lb-DC疫苗组肿瘤细胞的凋亡率[(38.26±3.45)%]明显高于DC疫苗组与对照组[(21.68±3.26)%、(3.77±0.99)%, $P<0.01$];两治疗组凋亡率高于对照组($P<0.01$)。

2.3 各组移植瘤细胞Fas膜蛋白的表达

Lb-DC疫苗组HeLa细胞Fas膜蛋白表达(570.42±66.72)高于DC疫苗组与对照组[(400.50±86.05)、(247.32±54.06), $P<0.01$];两治疗组Fas膜蛋白表达明显高于对照组($P<0.01$)。

2.4 各组肿瘤细胞移植瘤中Survivin蛋白的表达

Survivin蛋白阳性染色颗粒主要定位于肿瘤细胞胞浆及胞核,细胞膜以及周围间质亦见少量阳性染色。Lb-DC疫苗组肿瘤细胞大部分不着色,染色强度为阴性;DC疫苗组肿瘤细胞大部分染色为棕黄色,染色强度为弱阳性;而对照组肿瘤细胞大部分染色为棕褐色,染色强度为强阳性。

3 讨论

3.1 乳酸杆菌可辅佐DC疫苗抗宫颈癌作用

本研究发现乳酸杆菌宫颈癌细胞DC疫苗治疗对宫颈癌肿瘤的抑制最明显:生长缓慢、抑瘤率高,抑瘤起效时间早,瘤体缩小快。可见乳酸杆菌可作为DC疫苗很好的免疫辅佐剂,增强DC疫苗对宫颈癌肿瘤的免疫生物治疗作用。其主要作用机制是通过增强宫颈癌细胞肿瘤的免疫原性与DC细胞的抗原提呈能力后诱发强大功能CTL细胞,有效杀伤肿瘤细胞[5]。本研究还发现瘤体积越小,治疗作用越明显;随着瘤体增大,抑瘤率也逐渐下降。考虑DC疫苗治疗对于微小病灶的效果更好。

乳酸杆菌宫颈癌细胞DC疫苗治疗组裸鼠宫颈癌移植瘤凋亡率明显高于宫颈癌细胞DC疫苗治疗组和对照组。尽管NK细胞、巨噬细胞等免疫细胞在抗肿瘤免疫中也有一定作用[6-7],但成熟DC中NK细胞、巨噬细胞的比例很低,而且单纯成熟DC或未经激活的T细胞对肿瘤细胞无细胞毒作用。所以DC疫苗活化的CTL才是诱导移植瘤凋亡过程的主要原因。有研究认为乳酸杆菌本身也可以诱导肿瘤细胞的凋亡[8]。可见乳酸杆菌是经过多种机制发挥增强传统DC疫苗的抗肿瘤作用。曾建华等[9]研究认为:地塞米松也影响宫颈癌肿瘤细胞的生长与凋亡,进一步证实肿瘤生长与免疫调节有关。

3.2 乳酸杆菌增强DC活化的CTL诱导宫颈癌细胞凋亡的作用机制

Fas是重要的肿瘤细胞凋亡蛋白之一,李芙蓉等[10]研究认为:双歧杆菌可增强荷瘤小鼠Fas/FasL表达。本研究结果显示乳酸杆菌辅佐宫颈癌细胞抗原致敏的DC疫苗可以明显上调Fas膜蛋白的表达,且该组肿瘤细胞的凋亡率较高,与宫颈癌细胞抗原活化DC疫苗以及对照组均有统计学意义($P<0.01$)。可见乳酸杆菌增强DC疫苗抗宫颈癌凋亡作用与Fas/FsaL途径有关。研究证实冻融抗原致敏DC活化的CTL培养的上清液中有IFN-γ存在,IFN-γ可以通过提高Fas表达使细胞对FasL更为敏感。本结果还显示乳酸杆菌宫颈癌细胞DC疫苗治疗组大多数宫颈癌组织中没有Survivin表达,个别有Survivin表达,但为弱阳性。宫颈癌细胞DC疫苗治疗组宫颈癌组织Survivin表达也较弱;而对照组宫颈癌组织中Survivin表达相对较高。可见乳酸杆菌也有可能增强宫颈癌细胞DC疫苗下调宫颈癌组织中Survivin的表达,解除其高表达对促凋亡蛋白Fas表达的抑制作用,从而促进肿瘤细胞凋亡。

参考文献:

[1] Li Y L, Wu Y G, Wang Y Q, *et al*. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor lysates induce anti-tumor immunity against gastric cancer *ex vivo* [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(46): 7127-7132.

[2] Dell K, Klein C, Gissmann L. Comparison of DNA- and mRNA-transfected mouse dendritic cells as potential vaccines against the human

papillomavirus type 16 associated oncoprotein E7 [J]. Antivir Ther, 2008, 13(4): 495-509.
[3] Bubenik J. Genetically modified cellular vaccines for therapy of human papilloma virus type 16 (HPV 16)-associated tumours [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(3): 180-186.
[4] Santin A D, Bellone S, Palmieri M, *et al*. Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial [J]. J Virol, 2008, 82(4): 1968-1979.
[5] 王红艳, 贾继辉, 邢咏梅, 等. 乳酸杆菌对HeLa细胞免疫标志表达和效应影响的初步研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(9): 737.
[6] Wang L, Yang C L, Or T C, *et al*. Differential effects of Radix Paeoniae Rubra (Chishao) on cytokine and chemokine expression inducible by mycobacteria[J]. Chin Med, 2011, 6(1): 14.
[7] 宁燕, 王智彪, 伍烽, 等. 高强度超声对荷宫颈癌小鼠腹腔巨噬细胞分泌TNF-α的影响[J]. 中国超声医学杂志, 2007, 23(6). 414-416.
[8] 刘彤, 唐立, 张婵, 等, 乳酸杆菌发酵滤液对人宫颈癌细胞株HeLa细胞的细胞周期和细胞凋亡的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(10): 880-882.
[9] 曾建华, 钟玲, 徐波. 地塞米松对宫颈癌移植瘤生长及凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(20): 1985-1987.
[10] 李芙蓉, 王跃. 双歧杆菌脂磷壁酸对B16荷瘤小鼠Fas/FasL表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(12): 1308-1311.

(**收稿**:2011-03-06;**修回**:2011-05-09)
(编辑 汪勤俭)

短篇论著

文章编号:1000-5404(2011)16-1766-03

醋酸/碘染色法在宫颈癌筛查中运用评价

邱 惠[1],王 冬[2],何 美[1],张 艳[1],周 琦[2] (400030 重庆,重庆市肿瘤研究所:流行病学室[1],妇瘤科[2])

[**摘要**] **目的** 评价基层医生采用醋酸/碘染色后肉眼观察法(VIA/VILI)在农村地区筛查子宫颈癌及癌前病变的效果。**方法** 采用醋酸染色法(acetic acid,VIA)和碘染色法(lugol's iodine,VILI)对重庆市涪陵区30~59岁的的已婚妇女进行人群为基础的子宫颈癌筛查,VIA或VILI阳性者行阴道镜检查,在异常病变处取活检并进行病理组织诊断;通过连续2年筛查的结果,评价该筛查方案的效果。**结果** 2006-2010年对10 279人连续筛查2次,VIA/VILI阳性率14.50%,阳性者中1 487人行阴道镜检查,阴道镜转诊率14.47%,32.28%在病变处取活检;首次病理确诊61例子宫颈上皮内瘤变(intraepithelial neoplasia,CIN)Ⅰ、15例CIN Ⅱ、25例CIN Ⅲ、2例早浸/浸润性子宫颈癌,第2轮筛查病理确诊26例CIN Ⅰ、11例CIN Ⅱ、3例CIN Ⅲ、0例早浸/浸润性子宫颈癌;经2轮筛查后CIN Ⅰ、CIN Ⅱ、CIN Ⅲ、早浸/浸润性宫颈癌的检出率分别为0.85%、0.25%、0.27%、0.02%。**结论** 经济欠发达的农村地区,由经过培训的基层医生采用肉眼观察,以阴道镜检查作为技术保障,对30~59岁妇女进行子宫颈癌及癌前病变的筛查是可行的。

[**关键词**] 子宫颈癌;醋酸染色法;碘染色法;筛查
[**中图法分类号**] R446;R446.8;R737.33 [**文献标志码**] A

发达国家宫颈癌筛查是降低子宫颈癌的发病率和死亡率的重要途径[1],细胞学的筛查需要专业的技术人员,而经济欠发达地区缺乏经过正规培训的细胞学诊断医师,不能实现细胞学筛查。本研究通过总结防治基地2006-2010年的人群子宫颈癌早诊早治工作结果,评价基层医生采用醋酸染色法(acetic acid, VIA)和碘染色法(lugol's iodine,VILI)在农村地区筛查子宫颈癌及其癌前病变的效果。

1 对象与方法

1.1 筛查对象

2006-2010年采用整群抽样方法对重庆市涪陵区江东镇、蔺市镇、马武镇、李渡镇30~59岁,有本地乡镇户口,无子宫颈手术史,筛查当时未怀孕、无骨盆放射治疗史及有性行为史的妇女进行子宫颈病变筛查。

1.2 筛查方法

1.2.1 醋酸试验 采用5%冰醋酸涂抹宫颈,1 min后肉眼直接观察宫颈的颜色变化。如特征是出现较慢、消退较快,薄的或不致密的白色,边界清楚但不规则,透明且边界模糊的白色反应,远离转化区出现白色反应,或涂抹醋酸后无白色区域,则诊断VIA阴性。如在宫颈转化区或邻近鳞柱交界处发现边界清楚的白色区域,且特征是出现快、消退慢,厚白、致密的粉笔样白色或灰白色,边界规则清楚,则诊断VIA阳性。

1.2.2 碘试验 采用Lugol's液涂抹于宫颈表面使其染色,然后用肉眼直接观察宫颈着色情况。正常宫颈的鳞状上皮吸碘呈棕褐色或赤褐色,柱状上皮不变色,仍为淡白色,诊断VILI

[**通信作者**] 周 琦,电话:(023)65327788