维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)04-0513-05

肾癌冻融抗原致敏树突状细胞介导的 CTL 对肾癌 786-0 细胞株的体外杀伤作用研究

胡自力，麦选诚

（重庆医科大学附属第二医院泌尿外科，重庆 400010）

【摘 要】目的：研究肾癌冻融抗原负载树突状细胞（DCs）诱导的特异性细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）对肾癌 786－0 细胞株的体外杀伤效应；方法：利用人外周血体外经重组人粒细胞－巨噬细胞集落刺激因子（rhGM-CSF）、人白介素－4（rhIL-4）和肿瘤坏死因子（TNF-α）诱导产生的 DCs 负载肾癌冻融裂解物后诱导产生特异性 CTL，观察杀伤后肿瘤细胞的形态变化，MTT 法测定细胞毒性试验，ELISA 测定细胞因子的分泌。结果：（1）负载肾癌抗原的 DCs 能促进 T 细胞的增殖；（2）诱导产生的特异性 CTL 对肾癌细胞具有高杀伤率，显著高于非特异性 T 细胞（$P<0.05$）；(3)肾癌冻融抗原能够上调 DCs 人白介素－12（rhIL-12）的分泌，提高抗肿瘤的作用。（4）杀伤后的肾癌细胞发生明显凋亡。结论：由肾癌冻融抗原致敏的 DCs 所诱导产生的抗原特异性 CTL 对肾癌 786-0 细胞株有明显的杀伤效应，提示 DCs 瘤苗具有为肾癌患者进行特异性过继免疫治疗的临床应用前景。

【关键词】肾细胞癌；树突状细胞；抗肿瘤免疫；CTL

【中国图书分类法分类号】R737.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-04-07

The study of killing effect by T-lymphocytes after activiated by dendritic cells loaded with RCC 786-0 cell line freeze thawing antigen in vitro

HU Zili,et al

(Department of Urology,the Second Affiliated Hospital,Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective:* To study the immune responses of cytotoxic T-lymphocytes against Renal carcinoma cell 786-0 (RCC) after activiated by dendritic cells(DCs) loaded with RCC freeze thawing antigen. *Methods:*DCs were obtained by cultured plastic-adherent monocytes isolated from health human peripheral blood with granulocyte-monocyte colony-stimulating factor(GM-CSF) and interleukin-4(IL-4) and Tumor necrosis factor （TNF） for 9 days.Host lymphocytes were stimulated with freeze thawing antigen of RCC 786-0 under the culture medium containing interleukin-2(IL-2) for 5 day. Killing activity and cytokine release were measured by MTT assay and ELISA. *Results:* The immune response of CTL activiated by DCs loaded with tumor soluble antigen was demonstrated by the following facts:（1）DCs loaded with tumor antigen could induce the growth of CTL.（2）The cyotoxicity of obtained specific CTL against RCC-7860 was highly enhanced with a significant difference from that of non-specific CTL.（3）The interleukin-12 release/secretion was increased by tumor antigen,which suggest an improved anti-tumor effect.（4）Apoptosis was observed in the RCCs after treated with CTL obtained. *Conclution:* These findings indicate that specific CTL induced by DCs sensibilized by RCC freeze thawing antigen exerts a remarkable killing activity on RCC 786-0. It is suggestd that DCs antitumor vaccines poses a clinically useful prospect with RCC.

【Key words】Renal carcinoma cell; Dendritic cells; Antitumor immune; CTL

肾癌是泌尿系统较常见的恶性肿瘤，由于其发病隐匿以及对化疗、放疗和目前的过继免疫治疗方法效果不理想，死亡率较高[1-3]，中晚期肾癌的 2 年生存率仅为 10%~20%[4]，因而寻求一种更为有效的非手术治疗方法成为近年来的研究热点。

树突状细胞（Dendritic Cells,DCs）是体内功能最强的抗原提呈细胞，能有效摄取、加工肿瘤抗原，表达高水平的 MHC-Ⅰ、MHC-Ⅱ类分子(MHC,Major Histocompatibitity Complex, 主要组织相容性复合物)及多种共刺激分子，并能分泌多种细胞因子，诱导抗原特异性 CTL，直接或间接影响 B 淋巴细胞增殖活性，活化体液免疫应答，在机体抗肿瘤免疫中发挥重要作用[5-7]。但由于人体内 DCs 数量少，而且肿

作者介绍：胡自力(1963-)，男，副教授，
主要研究方向：泌尿男生殖系肿瘤。

基金项目：重庆市卫生局项目(编号 05-2-024)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

瘤可导致 DCs 功能失常、凋亡以及免疫功能低下，使肿瘤逃避机体免疫监视机制，导致肿瘤的增长、浸润和转移[8-10]。因此应用抗原修饰 DCs 产生特异性 CTL 增强机体抗肿瘤能力将是治疗中晚期肾癌及预防术后肿瘤复发的一条有效途径[11]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂和仪器 重组人粒细胞－巨噬细胞集落刺激因子（rhGM-CSF）、人白介素－4（rhIL-4）、人白介素－2（rhIL-2）和肿瘤坏死因子（TNF-α）均购于美国 Sigma 公司；胎牛血清购于杭州四季青生物工程公司；RPMI-1640 培养基购于美国 Hyclone 公司；四甲基偶氮盐(MTT)购于华美生物工程公司；人白介素－12 (rhIL-12)、酶联免疫吸附实验（ELISA）检测试剂盒购于深圳晶美生物工程有限公司；细胞培养设备由解放军第三军医大学野战外科研究所提供；电子显微镜观察由第三军医大学电子显微镜室协助完成。

1.1.2 肿瘤细胞系 肾癌 786-0 细胞株购于重庆医科大学超声医学研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 DCs 的培养 取正常人外周抗凝血 20ml，PBS 液等倍稀释后注入相同体积的淋巴细胞分离液表面，以 2000r/min 离心 20min，取界面细胞；PBS 洗 2 次，RPMI-1640 培养基洗 1 次后用 RPMI-1640 培养基重悬细胞，调整浓度为 2×10^6/ml，分别加入 6 孔版，每孔 2ml，置于 37℃5%CO_2 孵箱内孵育 3h；吸弃悬液，RPMI-1640 清洗 2 次，按 rhGM-CSF100ng/ml，rhIL-4 50ng/ml 浓度加入细胞因子，隔日半量补加细胞因子 rhGM-CSF、rhIL-4，并加入少量的含 10%胎牛血清的 RPMI-1640；第 5 日起加入 TNF-α 100ng/ml，第 9 天收获 DCs 行形态学鉴定、混合淋巴细胞反应（MLR）及细胞毒性实验。

1.2.2 DCs 的电子显微镜观察及 MLR 培养 9 天时收集 DCs，离心后用 PBS 液重悬计数，细胞总数不少于 1×10^6/ml，制成细胞滴片，固定、脱水、染色后用电子显微镜观察并摄片。取异体正常人抗凝静脉血 10ml，梯度离心法分离外周血单核细胞，尼龙毛柱法分离得到 T 淋巴细胞，用含浓度 200μ/m1，rhIL-2 的 RPMI-1640 培养液培养 5 天，作为同种异体效应细胞。将培养 6 天的 DCs 按 4×10^3/孔、2×10^3/孔、1×10^3/孔、5×10^2/孔加入 96 孔板，再加入 T 淋巴细胞 2×10^4/孔进行混合淋巴细胞反应，同时设置 T 淋巴细胞组、上述 4 个浓度 DCs 空白实验组，每组 6 个复孔，在 37℃ 5%CO_2 培养箱中孵育 72h。离心后吸弃上清，加入 MTT 20μl 及无血清 RPMI640 培养液 150μl，继续孵育 4~5h，终止培养，每孔加入 DMSO150μl，震荡混匀 10min 后，用 570nm 波长酶联免疫吸附仪上测定吸光度，结果用 3 孔均值表示。据公式[12]：刺激指数（SI）=（反应组 A 值－淋巴细胞组 A 值－DCs 组 A 值）/淋巴细胞组 A 值分别计算各组刺激指数(表 1)。

1.2.3 肿瘤抗原的制备 取对数生长期的肾癌 786-0 细胞（2×10^7/ml），用 0.25%的胰酶消化、离心后 -160℃－42℃反复冻融 5 次。将裂解物以 4000r/min 离心 20min，收集上清液，冻融上清液经 0.22μm 的无菌滤器过滤除菌，并用紫外分光光度计测定抗原蛋白含量。

1.2.4 抗原致敏 DCs 诱导的特异性 CTL 对肾癌 786-0 细胞的杀伤效应 将培养 9 天的 DCs 与肿瘤抗原共同孵育 3 天后，收集 DCs，加入培养 5 天的 T 细胞培养瓶内，再共同培养 24h，所获细胞即为 CTL[13]。按每孔 2×10^5/ml，1×10^5/ml，5×10^4/ml 100μl 加入到 786-0 细胞接种 24h 的 96 孔板内（5×10^4/ml 100μl），共同培养 24h 后加入 5mg/ml 的 MTT10μl 共同培养 4h，2000r/min 离心 5min，吸弃上清液，每孔加 DMSO100ul 按效靶比例为 1:10、1:20、1:40 加入到肾癌 786-0 细胞接种 24h 的 96 孔板内，共同培养 24h 后加入 5mg/ml 的 MTT10ul 共同培养 4h，2000r/min 离心 5min，吸弃上清液，每孔加 DMSO100ul，用酶标检测仪 570nm 测定吸光度 A 值，按公式[14]：杀伤率 =（靶细胞 A－试验组 A 值）/靶细胞 A 值 × 100%计算出杀伤率。应用方差分析统计方法进行各试验组间的比较，SPSS13.0 统计软件进行数据处理（表 2）。

1.2.5 杀伤后肾癌 786-0 细胞的形态学变化 取效靶比 20:1 时的肾癌细胞离心后进行形态学观察；收集杀伤后的肾癌细胞行常规脱水、包埋、切片、染色、固定处理，透射电子显微镜观察、拍照。

1.2.6 ELISA 测定 DCs 培养过程中及 DCs 活化后不同时间培养上清液中 rhIL-12 含量 随机收集 DCs 培养 1、3、6、9、12 天时培养上清及 DCs 活化后 1、3 天淋巴细胞培养上清进行 ELISA 检测。按 ELISA 试剂盒使用说明进行操作，测定得到 OD_{450} 值。用 CurveExpert1.3 软件进行曲线拟合，求标准曲线拟合公式，据测定的 OD_{450} 计算出 rhIL-12 的含量。

2 结 果

2.1 DCs 培养过程中形态学观察

20ml外周血分离来的白膜层细胞浓度约为 2×10^5/ml，贴壁培养 3h 后收获粘附细胞（图 1），加入细胞因子培养 2~3 天后可见贴壁细胞有明显的集落形成并逐渐出现较多的悬浮细胞，聚集成团状，培养 5~6 天时大部分细胞集落散开，细胞明显增大变圆或呈多形性，细胞膜外可见毛刺状或根须状突起。倒置相差显微镜下，树突状细胞悬浮生长，大小不等，形态极不规则，向四周伸出不同数量的粗细不一、形态迥异的胞质突起，培养至 7~9 天时 DCs 细胞体积进一步增大、毛刺状突起增多，同时可见培养细胞大多数呈集束样悬浮或散在生长，呈多边

维普资讯 http://www.cqvip.com

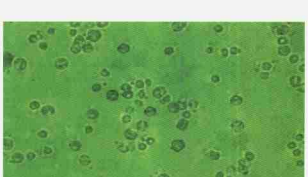


图 1 DCs 培养第 1 天，PBMC 开始悬浮生长(2×10^5/ml LM×200)



图 3 扫描电子显微镜下的成熟 DC，可见细胞突起明(EM×3360)



图 2 DCs 培养第 9 天，细胞突起明显(7.6×10^6/ml LM×200)

形，长的突起增多(图 2)。在扫描电子显微镜下，可见 DCs 细胞膜表面呈丝状、花瓣状伪足样突起(图 3)。因为分离的单核细胞经诱导生成 DCs 数量有限，DCs 在培养两周后约占分离单核细胞的 25%。经过细胞计数每 20ml 外周血可以获得 DCs 的浓度约 7×10^6/ml。并且继续培养细胞数量未见进一步增加。

2.2 混合淋巴细胞反应(MLR)

从表 1 可以看出，在 DCs 与 T 淋巴细胞比例在 1:20 时具备最强的刺激能力，SI 为 8.86；当 DC 与淋巴细胞间的比例为 1:40 时，刺激指数为 4.85，说明 DCs 在数量极少的情况下仍具有刺激 T 淋巴细胞增殖的能力，具有 DCs 典型的生物学特点。

2.3 致敏 DCs 介导的 CTL 对肾癌 786-0 细胞的杀伤效应

由肾癌 786-0 细胞冻融裂解物致敏 DCs 介导的 CTL 对肾癌 786-0 细胞具有明显的杀伤作用(表 2)，在 1:10、1:20 和 1:40 不同比例时的杀伤率

表 1 DCs 刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖反应($\bar{x}\pm s$)

GROUPS	A值($\bar{x}\pm s$)	SI
1:5	0.83004 ± 0.01559	5.98
1:10	0.85074 ± 0.02575	6.22
1:20	1.08106 ± 0.01713	8.86
1:40	0.73097 ± 0.01819	4.85
$DC_{1:5}$	0.22079 ± 0.03593	——
$DCell_{1:10}$	0.08725 ± 0.4669	——
$DCell_{1:20}$	0.09709 ± 1.3201	——
$DCell_{1:40}$	0.10519 ± 1.1307	——
TCell	0.08720 ± 0.00036	——

分别为 44.69%、55.31%和 45.77%，未经 DCs 介导的直接由肿瘤抗原致敏的 T 淋巴细胞对肾癌 786-0 细胞的杀伤效应分别为 0.71%、8.21%、11.32%，显示了由肿瘤抗原冲击致敏的 DCs 介导生成的 CTL 体外对肿瘤细胞具有较高的特异性杀伤效应，而未经 DC 介导的肿瘤抗原致敏的 T 淋巴细胞仅有微弱的杀伤效应。从表 2 可以看出，当 DCs 介导的 T 淋巴细胞与肿瘤细胞之比为 1:20 时最为明显。运用 SPPS13.0 统计软件进行方差分析，由 DCs 诱导的 CTL 体外对肾癌细胞 786-0 的杀伤率与肿瘤抗原直接负载的 T 细胞、单纯 T 细胞、及 DCs 刺激的 T 淋巴细胞对肾癌 786-0 细胞的杀伤率具有显著性差异，$P<0.05$；而由肿瘤抗原致敏的 T 淋巴细胞组与单纯 T 淋巴细胞组无显著性差异，$P>0.05$；DCs 刺激的 T 淋巴组与肿瘤抗原直接负载的 T 细胞、单纯 T 细胞具显著性差异，$P<0.05$。

2.4 杀伤后肾癌 786-0 细胞的形态学变化

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 DCs 诱导的 CTL 对肾癌 786-0 细胞株的杀伤效应($\bar{x}\pm s$)

组 别	靶细胞	杀伤细胞A值			杀伤率(%)		
		1:10	1:20	1:40	1:10	1:20	1:40
Ag-DC-CTL*	786-0	0.2925±0.0128	0.2363±0.0252	0.2868±0.0203	44.6963±2.4321	55.3160±4.760	45.7675±3.8291
Ag-T**	786-0	0.5263±0.0079	0.4855±0.0207	0.4690±0.0181	0.7055±0.55308	8.2055±3.9183	11.3200±304241
T	786-0	0.5258±0.0611	0.5253±0.0305	0.5246±0.0131	0.7485±0.3467	0.8428±0.3083	0.9685±0.6165
DC-T***	786-0	0.5108±0.0158	0.5059±0.0186	0.5005±0.0180	3.8943±2.4824	4.5109±3.5117	5.5301±3.3946
786-0	——		0.5289±0.1023				——

*Ag-DC-CTL与 Ag-T、T、DC-T 比较,$P<0.05$;**Ag-T 与 T 比较,$P>0.05$;

***DC-T 与 Ag-T、T 比较,$P<0.05$。

效靶比 20:1 24h 后的肾癌细胞离心后进行形态学发现肾癌 786-0 细胞形态进一步缩小,可见死亡细胞悬浮;瑞氏染色发现 DC-Ag-T 组可见部分细胞变圆脱落,细胞间隙明显,表现为细胞核染色质致密固缩,呈凋亡细胞形态学改变聚集于细胞核核膜呈周边化、而对照组细胞贴壁良好其间隙不明显。透射电子显微镜可见细胞发生凋亡或死亡,凋亡的细胞可见核染色质高度浓缩,呈块状,相互分裂。细胞核外形消失,仅见有核膜包绕的凋亡小体(图 4)。

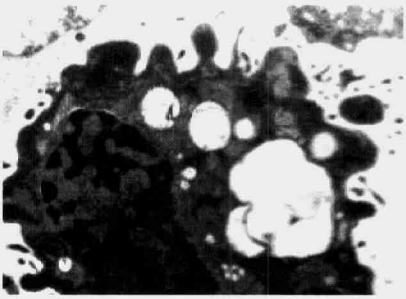


图 4 杀伤后肾癌 786-0 细胞的变化(EM×8000)

2.5 DCs 培养过程中及 DCs 活化后淋巴细胞培养上清液分泌细胞因子 rhIL-12 变化情况

随机收集 DCs 培养 1、3、6、9、12 天时培养上清内细胞因子 IL-12 分泌变化曲线如下图。分别为:98.9547pg/ml,112.7689pg/ml,141.0246pg/ml,172.6828pg/ml,148.013pg/ml。DCs 活化后 1、3 天淋巴细胞培养上清进行 ELISA 检测分别为 169.9935pg/ml 及 204.0385pg/ml。

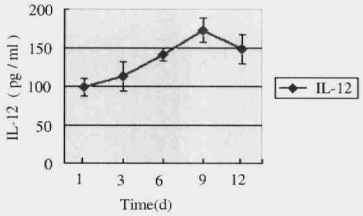


表 1 DC 在培养过程中分泌的细胞因子 IL-12 的变化曲线

3 讨 论

树突状细胞是人体内功能最强的抗原提呈细胞,但在血液中含量极低。自 90 年代 steinman 成功建立 DCs 体外扩增方法后,已广泛用于抗病毒、抗肿瘤免疫的研究。我们在借鉴以往培养 DCs 经验的基础上[15],根据 DCs 的粘附性不同,利用 PBMC 粘附法特性进行扩增的方法从外周血中获取 PBMC,采用"贴壁法"培养得到贴附的单核细胞,经 2 次孵育,加入 rhGM-CSF 和 rhIL-4 诱导产生出未成熟 DCs,在培养后期加入炎性因子 TNF-α 进一步促进 DCs 的成熟,培养出的 DCs 具有典型的形态学特征和生物活性。实验中我们的经验是:各种淋巴细胞的粘附能力从高到低依次为巨噬细胞、DCs、B 细胞、T 细胞。3h 换液时,可通过轻轻冲洗培养板,使 T 细胞、B 细胞和死亡细胞悬浮,吸弃全部的培养基,可去除全部的悬浮细胞,此步对 DCs 的纯化至关重要。原因在于:(1)培养板晃动的力度过大,使粘附的 DCs 聚集体脱壁,影响 DCs 的产量。(2)力度过小,不能清除沉淀的 T 细胞、B 细胞和一些碎裂的细胞。(3)适当冲洗不会影响细胞的密度。应用贴壁及 2 次孵育方法可以在血源较少的情况下扩增得到 DCs,实验结果与目前国内研究的结果基本一致。

rhGM-CSF 和 rhIL-4 是树突状细胞培养早期中最为重要的细胞因子,rhGM-CSF 作为一种细胞因

维普资讯 http://www.cqvip.com

子，具有促进 DCs 增殖及分化，并能增强其表面多种免疫分子表达功能。而 rhIL-4 具有选择性地抑制巨噬细胞增殖及分化功能，有利于 DCs 优势增殖[16]。但如果只应用 rhGM-CSF 与 rhIL-4 联合培养，所诱生的树突状细胞在形态和功能方面都表现为未成熟型细胞的特点，这类树突状细胞在功能上能通过受体的介导有效地摄取抗原，但刺激初始型 T 细胞的功能很弱。所以我们在培养后期加入如 rhTNF-α 可进一步诱导 rhGM-CSF 和 rhIL-4 胎牛血清培养的 DCs 终末分化[17]，实验证明 3 个细胞因子联合诱导扩增的 DCs 具有典型的形态及生物学特性。

从不同比例 MLR 实验中看出，当 DC 与淋巴细胞间的比例为 1:40 时刺激指数为 4.85，说明 DCs 在体外具有极强的免疫活性。当 DCs 与 T 细胞之比在 1:20 时增值刺激指数达到最高为 8.86（表 1），提示 DCs 与 T 淋巴细胞可能存在一个适当的比例，这可能会对临床的治疗起到一个指导性的作用。通过 MLR 实验，说明本研究所收获的 DCs 具有激活初始型 T 淋巴细胞的能力，表现了 DCs 的基本的生物学特性。

人肾癌中 T 细胞确切的表位至今仍未证实，缺乏有效、明确的肿瘤抗原[18]，难以制成有效的肿瘤疫苗。我们应用了冻融的肿瘤裂解物致敏 DCs，该方法简便易行、无需明确肿瘤抗原，回避了鉴定肿瘤特异性抗原的难题，可以激发多个肿瘤相关抗原的 T 细胞免疫，诱发机体多重免疫反应，提高抗肿瘤作用。本实验结果证实单独用肿瘤冻融裂解物诱导的 CTL 产生非特异杀伤肾癌细胞作用轻微，各组杀伤率均低，与单纯 T 淋巴细胞各实验组比较无明显差别。而负载肿瘤裂解物的 DCs 诱导的 CTL 对肾癌细胞杀伤率显著高于单独肿瘤裂解物诱导的 CTL 和单纯 T 淋巴细胞实验组，经统计分析，$P<0.05$，有显著性差异。表明单独肿瘤裂解物作为抗原不能直接呈递给 T 淋巴细胞，因此很少或不被 T 细胞识别，仅能刺激产生 T 淋巴细胞非特异反应。当肿瘤裂解物负载于 DCs 时，肿瘤裂解物能被 DCs 加工呈递，提高了免疫原性，使 T 细胞识别并诱导多克隆 CTL 活化，包括抗原特异的 CTL 和非特异 CTL，极大地提高了抗肿瘤作用。

在 DCs 的不断成熟过程中，DCs 可以分泌细胞因子 rhIL-12。rhIL-12 是一种 Th-1 型细胞因子，具有协同诱导 CTL 的分化，促进 CTL 反应；刺激 PHA 活化 $CD3^+$T 细胞(包括 $CD4^+$ 和 $CD8^+$)增殖；上调 rhIL-2 的分泌；促进 IgM 向 IgG 转换等生物学功能[19]。通过测定 DCs 在培养过程中 rhIL-12 的分泌，可见 rhIL-12 逐渐增加，9 天达到最高峰为 172.6828pg/ml，12 天后有所下降，这可能是 DCs 在培养后期逐渐凋亡，分泌功能下降所致。而肿瘤裂解物能够诱导 DCs 分泌 rhIL-12 增加，在第 1、3 天时测定分别为 169.9935pg/ml 及 204.0385pg/ml，明显高于同期单纯 DCs 分泌含量，表明肿瘤抗原可以上调 DCs 分泌 rhIL-12 的水平，通过增加 rhIL-12 能提高 CTL 杀伤活性，协同抗肿瘤效应。

本研究结果表明，负载肿瘤裂解物的 DCs 具有很强的抗原递呈作用，采用负载冻融肿瘤裂解物的 DCs 为基础制作疫苗和诱导产生抗原特异性 CTL 对晚期肾癌患者进行主动免疫和过继性细胞免疫治疗具有临床应用前景，可为 DCs 瘤苗临床治疗中晚期肾癌以及预防肾癌手术后复发和转移提供理论依据。

参 考 文 献

[1] Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM, et al.Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer[J].Journal of clinical oncology,2003;21:3127-3132.

[2] Stenzel, A. DeKernion, JB. Pathology,biology,and clinical staging of renal cell carcinoma[J].Seminars in oncology,1989;(1):3-11.

[3] Motzer RJ,Bander NH,Nanus DM.Renal-cell carcinoma[J].The New England journal of medicine,1996;335(12):865-875.

[4] Campbell SC, Flanigan RC, Clark JI. Nephrectomy in metastatic renal cell carcinoma[J].Curr Treat Options Oncol.2003;(4):363-372.

[5] Di Nico M, Emo RM. Dendritic cells: specialized antigen presenting cells[J]. Haematologica,2000;85:202-207.

[6] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity[J]. Nature,1998;392:245-252.

[7] Banchereau J, Briere F,Caux C,et al.Immunobiology of dendritic cells [J].Annual review of immunology,2000;18:767-811.

[8] 陈 彤，郑少斌，谭万龙，等.癌组织树突状细胞浸润与肾癌预后及转移的关系[J].第一军医大学学报,2002;22(9):833-834.

[9] Kakeji Y, Maehara Y, Korenga D, et al.Prognostic significance of tumor-host interaction in clinical gastric.relationship between DNA ploidy and dendritic cell infiltration [J].Journal of surgical oncology,1993;52:207-212.

[10] Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, et al. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen bybone marow-derive dendritic cell[J].European journal of immunology,1997;27:280-288.

[11] Marten A, Flieger D, Renoth S. Therapeutic vaccination against

（下转第 551 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

统退行性改变的共同致病原因。线粒体是主要的能量器官，同时，机体内 90%的自由基也由它产生。这些自由基中的 80%在线粒体内由 SOD2 转化解毒，剩余部分进入细胞浆由 SOD 或胞浆中其它酶清除。线粒体的结构特征决定其所存在的 DNA 极易受到自由基和超氧阴离子的攻击而发生突变，并最终诱发神经元退行性变[14]。因此，在本实验中 SOD、SOD2 活性在第 3 月下降，而总蛋白量反有增高趋势可能提示，铝负荷致氧化应激增强，自由基生成增加可能导致线立体 DNA 产生突变，表达功能下降的或无功能的 SOD 和 / 或 SOD2，是其诱导神经元退行性变的原因之一。有报道在转基因小鼠 SOD 基因突变可形成脊髓侧索性硬化神经元退变模型，而采用 RNAi 干涉技术可阻遏退变[15]。这一事实映证了我们的假设。有关的研究尚在进行中。

（通讯作者：周歧新，教授，博士生导师）

参 考 文 献

[1] Paolo Zatta, Roberto Lucchini, Susan J. van Rensburg, et al. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc [J]. Brain Research Bulletin, 2003;62:15-28.

[2] Kathleen J.S. Griffioen, Othman Ghribi, Nena Fox, et al. Aluminum Maltolate-Induced Toxicity in NT2 Cells Occurs Through Apoptosis an42-kDa Protein Includes Cytochrome c Release[J]. NeuroToxicology, 2004;25:859-867.

[3] 葛圣蕾.自由基氧化应激损伤在老龄化神经变性疾病中的作用[J].国外医学，老年医学分册，2002;23 (6):271-276.

[4] 刘燕池，蒋云娜，张沁园. 益智防呆汤防治口服三氯化铝所致痴呆小鼠作用机制的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志，2000;6 (4):15-20.

[5] 陈世铭，薛政国. 福定碱对大鼠学习和记忆的作用[J]. 药学学报，1987;22(1):801-806.

[6] 俞在芳，胡本荣，程冠军. GABA 受体拮抗剂对小鼠学习记忆的促进作用[J]. 药学学报，2000;6 (4): 15-20.

[7] 唐焕文，韦小敏，庄志雄，等. 铝致大鼠中枢神经系统病理形态学改变的研究[J].中国公共卫生，2002;18(8): 902-904.

[8] Campbell A, Becaria A, Lahiri DK, et al. Chronic exposure to aluminum in drinking water increases inflammatory parameters selectively in the brain[J]. J Neurosci Res, 2004;75(4):565-572.

[9] 陈灶火，王 力.老年痴呆、帕金森病和脑梗死患者的记忆损伤特征[J]. 中国行为医学科学，2005;14 (7): 60 - 62.

[10] 何百成，杨俊卿，周歧新. 黄连总碱对铝负荷导致小鼠学习和记忆障碍保护作用的研究[J]. 中国药理通讯，2003;20 (3):37-37.

[11] Hugo Peluffo, Laia Acarin, Maryam Faiz, et al. Cu/Zn superoxide dismutase expression in the postnatal rat brain following an excitotoxic injury[J]. J Neuroinflammation, 2005;2(1):12.

[12] Omar Rawhi A., Chyan Y.-J., Andorn Anne C.,et al. Increased Expression but Reduced Activity of Antioxidant Enzymes in Alzheimer's Disease[J].Journal of Alzheimer's Disease, 1999;1(3):139-145.

[13] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ.Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression[J]. Free Radic Biol Med, 2002;33(3):337-349.

[14] Leonard J V, Schapira A H V. Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects [J]. The Lancet, 2000;355(9201):389-394.

[15] Raoul C, Terki TA, Bensadou JC, et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS[J]. Nat Med, 2005;11 (4):423-428.

（上接第 517 页）

metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells:preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial [J].Cancer Immunol Immunother,2002;51:637-644.

[12] 沈关心，周汝麟.现代免疫学实验技术[M].武汉：湖北科学技术出版社，1998.302-303.

[13] Bachleitner-Hofmann T, Stift A, Friedl J, et al.Stimulation of Autologous Antitumor T-Cell Responses Against Medullary Thyroid Carcinoma Using Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells[J].The Journal of clinical endocrinology and metabolism,2002;87(3):1098-1104.

[14] 贾 英，孔凡兵，唐良苔，等.负载宫颈癌肿瘤裂解物的树突状细胞诱导的 CTL 杀伤效应[J].实用妇产科杂志，2005;21(7):416-419.

[15] 朱学军，曹雪涛，于益芝，等.人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定[J].中国肿瘤生物治疗杂志，1997;4(4):302-306.

[16] Syme R, Gluck S. Generation of dendritic cells:role of cytokines and potential clinical applications[J].official journal of the European Society for Haemapheresis,2001;24:117-124.

[17] O' Doherty U, Peng M, Gezelter S, et al.Human blood contains two subsets of dendritic cells,one immunologically mature and the other immature[J]. Immunology,1994;82:487-493.

[18] Pan CC, Chen PC, Tsay SH,et al. Differential immunoprofiles of hepatocellular carcinoma,renal cell carcinoma,and adrenocortical carcinoma:a systemic immunohistochemical survey using tissue array technique [J].Applied immunohistochemistry and molecular morphology,2005;13:347-352.

[19] Panther E, Corinti S, Idzko M,et al.Adenosine affects expression of membrane molecules,cytokine and chemokine release,and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells [J].Blood,2003;101:3985-3990.