DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.023
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
1388 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)15-1388-03

HPV16 E7多肽冲击的树突状细胞治疗尖锐湿疣的临床初步观察

黄伟峰,郝 飞,刁庆春,钟白玉 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察人乳头瘤病毒16型(HPV16)E749-57多肽冲击的树突状细胞(DCs)治疗复发性尖锐湿疣的疗效。方法 32例复发3次以上的尖锐湿疣患者,治疗组11例(HPV16$^+$、HLA-A2$^+$)给予HPV16 E7多肽冲击的树突状细胞免疫治疗,对照组21例给予干扰素治疗。所有患者随访6个月,观察治疗前后皮损的病理变化、外周血T淋巴细胞亚群的变化及治疗效果。结果 抗原肽冲击的树突状细胞治疗后,部分尖锐湿疣皮损变小或消退,局部空泡细胞减少,真皮内有中等密度淋巴细胞浸润。治疗前后外周血T淋巴细胞亚群未见明显变化。复发率由常规治疗的61.9%降至18.2%。结论 运用抗原肽冲击的树突状细胞对复发性尖锐湿疣进行治疗,可以改善病变局部的免疫状态,并能够显著降低复发率。

关键词:乳头状瘤病毒,人;树突状细胞;尖锐湿疣
中图法分类号:R392.11;R457.2;R752.53 文献标识码:A

Clinical study of the therapy of condyloma acuminate by HPV16 E7 peptide-pulsed dendritic cells

HUANG Wei-feng, HAO Fei, DIAO Qing-chun, ZHONG Bai-yu (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic efficacy of HPV16 E7 peptide-pulsed dendritic cells (DCs) in recurrent condyloma acuminate (CA). Methods A total of 32 cases of recurrent CA (more than 3 times) were divided into the treatment group and the control group. Patients (11 cases, HPV16$^+$ and HLA-A2$^+$) in the treatment group received treatment with DCs, while the other 21 cases in the control group were treated with interferon. A follow-up of 6 months was conducted in all patients. The pathological lesions, the peripheral T-cell subpopulations of the patients, and the therapeutic efficacy before and after treatment were observed. Results The size of the lesions became smaller or disappeared in the treatment group. The infiltrated lymphocytes increased, but the koilocytotic cells decreased in the lesions. No significant change in the peripheral T-cell subpopulations was found before and after therapy. The recurrence rates in the treatment group and the control group were 18.2% and 61.9%, respectively. Conclusion The therapy by E7 peptide-pulsed dendritic cells can improve the local immune status in the skin and reduce the recurrence rate significantly in patients with recurrent CA.

Key words: papillomavirus; human; dendritic cell; condyloma acuminate

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染在人群中十分常见。慢性感染和反复发作患者的皮损局部易形成癌前病变或癌变。尖锐湿疣作为HPV感染常见的性传播疾病,目前常规治疗后复发率均较高。病毒感染局部细胞免疫功能缺陷,难以建立有效的免疫应答反应,致使常规治疗后病毒感染细胞残存是复发的主要原因[1]。我们用HPV16 E7多肽冲击的树突状细胞(dendritic cells, DCs)对感染HPV16复发性尖锐湿疣患者进行了治疗,通过加强局部免疫应答,达到对病毒感染细胞的有效清除,降低治疗后复发率。现将临床治疗初步观察结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 患者来源

根据知情同意的原则及卫生部防疫司制订的诊断标准选取我院门诊尖锐湿疣复发患者。分别通过微量淋巴细胞毒实验和荧光定量PCR进行HLA-A2$^+$、HPV16$^+$治疗组患者的筛选。治疗组11例,男4例,女7例,平均年龄(27.3±3.5)岁,病程(6±2.3)个月,皮损积分为(7.27±1.55)分。对照组21例,男4

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070698)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070698)
作者简介:黄伟峰(1972-),男,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人,硕士,讲师,主要从事性传播疾病方面的研究,现在新疆乌鲁木齐军区总医院皮肤科。电话:(0994)4513191
通信作者:郝 飞,电话:(023)68754416;E-mail:haofei@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-07-04;修回日期:2003-11-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

例, 女 13 例, 平均年龄(30.1±4.3)岁, 病程(5±3.1)个月, 皮损积分为(6.29±1.52)分。患者皮损的严重程度按照疣体大小和数量评分, 每个疣体< 1 mm 计 1 分, 1~5 mm 计 2 分, > 5 mm 计 3 分[2]。所有患者复发均在 3 次以上, 1 个月内未接受过各种免疫治疗, 排除自身免疫性疾病和严重系统性疾病。

1.2　治疗方法

两组患者均先行电凝治疗, 烧除大部分皮损。治疗组保留 1~2 颗皮损观察治疗情况。治疗组抽取外周血 50 ml, 分离 PBMC, 诱导 DCs 并用 HPV16 E749-57 多肽致敏[3]。7 d 后收获培养的 DCs, 在原发病部位及周围皮下注射, 1 次/周, 3 次为 1 个疗程。对照组常规电凝治疗后重组 IFN-α 300 万 U/次隔天肌肉或局部注射, 14 d 为 1 个疗程。所有患者治疗后均随访 6 个月。

1.3　观察指标

观察治疗组保留的靶皮损在治疗过程中变化。治疗前后分别切取皮损行 HE 染色, 石蜡包埋, 观察皮损病理变化。两组病人治疗前后通过免疫荧光法检测外周血 T 淋巴细胞亚群的变化。通过随访观察治疗后各组的复发率、复发程度。

1.4　统计学处理

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件行。配对和两样本均数 t 检验, 计数资料用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　临床病情变化

两组患者治疗后均随访 6 个月。治疗组 11 例中复发 2 例, 占 18.2%, 分别在治疗结束后第 3、5 周, 复发程度较轻, 仅长出 2~3 个较小的疣体, 皮损严重程度评分为 2 分和 3 分。对照组中 21 例复发 13 例, 占 61.9%, 分别在治疗结束后第 10 天至 4 周内复发, 疣体生长快, 数目多且体积大, 皮损严重程度评分在 4~8 分, 平均为 5.2 分。治疗组复发率明显低于对照组, 差异显著($\chi^2 = 5.542$, $P = 0.02$)。治疗组保留的靶皮损在治疗过程中 5 例出现皮损变小, 3 例皮损消退, 3 例未见明显变化。

2.2　治疗组靶皮损治疗前后病理学改变

治疗前皮损病理显示表皮呈乳头瘤样增生, 伴明显角化不全, 表皮浅层可见大量凹空细胞, 真皮内无明显淋巴细胞浸润(图 1)。治疗后保留的靶皮损部分变小或消退, 病理显示真皮内可见中等密度淋巴细胞浸润(图 2)。



图 1　尖锐湿疣皮损治疗前　(× 100)

Fig 1　Condyloma acuminata before treatment　(× 100)

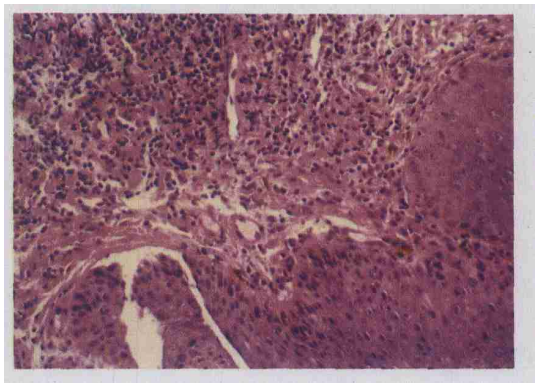


图 2　尖锐湿疣皮损治疗后　(× 200)

Fig 2　Condyloma acuminata after treatment　(× 200)

2.3　治疗前后外周血 T 淋巴细胞亚群检测

患者于治疗前后 1 周内检测外周血 T 淋巴细胞亚群分类, 结果显示两组患者治疗前后 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$ 细胞数及 $CD4^+/CD8^+$ 比值无显著差异($P > 0.05$), 两组之间也无显著差异($P > 0.05$)。

3　讨论

HPV 感染有严格的组织特异性, 选择性感染皮肤或粘膜上皮细胞, 极少或不入血, 机体对感染细胞的有效清除以局部细胞免疫为主。但感染局部免疫系统不能充分接触病毒抗原[4]。

此外, 感染局部主要的免疫介导细胞 DCs 数量、功能发生改变, 抗原递呈障碍, 功能性杀伤细胞无法激活, 造成病毒感染细胞免疫逃避, 导致病毒感染的持续存在及肿瘤发生[5]。因此, 对 HPV 感染的治疗通过加强病毒抗原与免疫细胞接触, 提高对病毒抗原的提呈效率, 激活功能性杀伤细胞, 激发机体特别是感染局部特异性细胞免疫应答, 对病毒感染细胞有效清除, 将最大限度地降低复发率和肿瘤形成。

DCs 作为体内最有效的抗原提呈细胞, 能够激活"纯真型"T 细胞(Naive T cells), 诱导初次免疫反应, 是机体免疫应答的始动者[6]。1998 年 Ludewing 等[7] 用淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒特异性肽 GP33-41 致敏 DCs 后免疫小鼠, 诱导出特异性抗病毒免疫, 为 DCs 在病毒感染疾病治疗中的应用提供了新思路。目前 DCs 多肽疫苗在前列腺癌、恶性黑素瘤等疾病的临床治疗中显示出了较好的效果[8, 9]。

HPV16 E7 抗原作为转化蛋白及肿瘤排斥抗原从病毒感染早期到肿瘤形成期均持续表达, 是免疫治疗理想的靶抗原[10]。体外制备具有高效免疫刺激能力的 DCs 并负载 HPV16 E7 多肽, 能够对特定的靶细胞产生特异性杀伤。当我们在病毒感染局部注射这种抗原刺激的 DCs 后, 将改善局部抗原递呈环境, 诱导抗原特异性 CTL 产生, 通过有效清除病毒感染细胞, 提高

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

临床治疗效果。临床治疗结果显示:应用该方法治疗后,患者 6 个月内的复发率明显低于对照组,差异显著。同时在 DC 治疗过程中,靶皮损明显变小,个别甚至消失。治疗后变小的靶皮损及皮损消退处病理均显示真皮内可见中等密度的淋巴细胞浸润,提示体外诱导并负载抗原的 DC 在局部可以激发抗原特异性的免疫应答,对病毒感染细胞产生杀伤作用,对尖锐湿疣可能有一定的治疗作用,并能够显著降低常规治疗后的复发率。但长期的疗效还需大样本的观察。

实验中我们还观察到治疗前后两组患者外周血 T 淋巴细胞亚群无明显变化,这一结果与文献[11]报道不同。我们认为这种差异可能与样本数少有关,同时也可能与检测方法不同、HPV 类型不同及疾病不同时期相关。但治疗前外周血 T 淋巴细胞亚群的降低究竟是患者感染 HPV 前已存在还是因机体感染了 HPV 导致免疫抑制,尚待进一步的研究。

总之,HPV 感染复发是多因素决定的,但基于局部细胞免疫在病毒清除中的重要作用,而感染局部存在细胞免疫功能缺陷,所以应用 DC 治疗,加强局部免疫应答,有效清除病毒感染细胞,将有助于降低降低复发率及慢性感染导致的肿瘤形成。

参考文献:

[1] Giannini S L, Hubert P, Doyen J, *et al*. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix[J]. Int J Cancer, 2002, 97(5): 654—659.

[2] 杨 健. 尖锐湿疣的复发与细胞免疫功能[J]. 中华皮肤科杂志, 1999, 32(3): 174—175.

[3] Rudolf M P, Fausch S C, Silva D M, *et al*. Human dendritic cells are activated by chimeric human papillomavirus type-16 virus-like particles and induce epitope-specific human T cell responses *in vitro*[J]. J Immunol, 2001, 166(10): 5917—5924.

[4] Frazer I H, Thomas R, Zhou J, *et al*. Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity[J]. Immunol Rev, 1999, 168: 131—132.

[5] Mota F, Rayment N, Chong S, *et al*. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus(HPV)-related premalignant cervical epithelium[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 116(1): 33—40.

[6] Steinman R M, Inaba K, Turley S, *et al*. Antigen capture, processing, and resentation by dendritic cells: recent cell biological studies[J]. Hum Immunol, 1999, 60(7): 562—567.

[7] Ludewig B, Ehl S, Karrer U, *et al*. Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity[J]. J Virol, 1998, 72(5): 3812—3818.

[8] Nestle F O, Alijagic S, Gilliet M, *et al*. Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells[J]. Nat Med, 1998, 4(3): 328—332.

[9] Lotze M T, Shurin M, Esche C, *et al*. Interleukin-2: developing additional cytokine gene therapies using fibroblasts or dendritic cells to enhance tumor immunity[J]. Cancer J Sci Am, 2000, 6 Suppl 1: S61—66.

[10] De Bruijn M L, Schuurhuis D H, Vierboom M P, *et al*. Immunization with human papillomavirus type 16(HPV16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV16-induced tumor cells[J]. Cancer Res, 1998, 58(4): 724—731.

[11] 尹光文, 于建斌, 贺付成, 等. 尖锐湿疣患者外周血 T 淋巴细胞亚群及血清白细胞介素 2 水平的检测[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2001, 17(1): 17—18.

(编辑 刘洪娥)

(上接 1387 页)

3 讨论

闭合性颅脑损伤的症状病理学改变与 ABR 关系:轻型颅脑损伤主要是指单纯脑震荡,发生机制一般认为是超强刺激引起皮层超限阻抑的结果,也有认为是脑细胞分子紊乱,传导路径阻滞所致[2]。中型闭合性颅脑损伤是指轻型脑挫裂伤,其病理改变在脑表层或深层有散在的点状出血灶,并有静脉淤血及脑组织的水肿、肿胀,如有软脑膜血管及脑组织的断裂者称脑裂伤[3],根据本组 ABR 的结果,伤后 72 h ABR 异常,除 15 例 CT 异常,ABR 均异常外,亦有 CT 正常,ABR 显示异常,说明脑组织虽无结构改变,但其生理功能出现障碍,任何听传导通路上的损害,都可影响 ABR 结果。基于 ABR 波Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ波的发生分别与脑干、桥脑、中脑有关,其中Ⅰ~Ⅲ波波间期异常,提示桥—延脑损害,Ⅲ~Ⅴ波潜伏期和波间期异常,提示桥脑中下段损伤。一侧或双侧的Ⅰ~Ⅲ、Ⅲ~Ⅴ波间期异常,提示脑干内有多处损害。因此闭和性颅脑外伤患者在排除了听觉系统损伤外,ABR 可以在一定程度上反映脑干的损伤程度。

闭合性颅脑损伤 CT 改变与 ABR 结果对比:在本组观察的病例中,伤后 72 h CT 改变的 15 例,ABR 测试结果均异常,表现为Ⅰ~Ⅲ、Ⅰ~Ⅴ延长为主,其余 75 例 CT 正常;ABR 异常 54 例,占 60%,主要表现:Ⅰ~Ⅲ、Ⅰ~Ⅴ延长,Ⅰ波潜伏期延长,闭合性颅脑损伤在 CT 结构学有改变的 ABR 均异常,提示其生理功能有损害与 CT 吻合。而在 CT 尚未检出的闭合性颅脑损伤病人 ABR 亦出现异常提示,即使其在结构上尚未被 CT 辨认,但其生理功能已出现障碍,为脑震荡或细小的损伤提供了客观依据,能否将 ABR 结果作为法医学的鉴定尚待进一步研究。

综合上述研究表明 ABR 结果可为确定脑震荡提供客观数据。临床上 CT 无改变,ABR 异常这一现象脑震荡相关,因目前尚无更完善的辅助检查为脑震荡的诊断提供客观数据,所以尚需进一步的研究。

关键词:颅脑损伤;ABR;脑功能结构及生理
中图法分类号:R741.04 文献标识码:B

参考文献:

[1] 姜泗长, 顾 瑞. 临床听力学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1999. 274—292.

[2] Wilson W J, Penn C, Saffer D, *et al*. Improving the prediction of outcome in severe acute closed head injury by using discriminant function analysis of normal auditory brainstem response latencies and amplitudes[J]. J Neurosurg, 2002, 97(5): 1062—1069.

[3] Cevette M J, Bielek D. Transient evoked and distortion product otoacoustic emissions in traumatic brain injury[J]. J Am Acad Audiol, 1995, 6(3): 225—229.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net