DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.029

博士生论文摘要

重组人 TGFβ1诱导免疫耐受及其对 Hela细胞 MHC抗原表达的实验研究

Experimental study of immunological tolerance induced by recombinant human TGF-β1 in rat and the influence of TGF-β1 on the expression of Hela cell MHC antigen

李 勇 韩本立 王会信* (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆,630038

1.重组人 TGFβ1诱导成年小鼠免疫耐受的研究

转化生长因子β1(Transforming growth factor, TGFβ1)是一种具有多功能的细胞生长调节蛋白,它参与了胚胎的发育,损伤组织的修复、肿瘤的发生等病理生理过程,在免疫系统表现出负调节因子效应;近年 TGFβ1用于器官移植免疫抑制的研究是较为活跃的一个方面,使其有希望成为新一代免疫抑制药物。鉴于天然 TGFβ1来源有限,本研究借助真核质粒表达载体 pMAMneo在 NIH/3T3细胞中重组人 TGFβ1并应用其重组品首次开展了 TGFβ1诱导成年小鼠免疫耐受的初步研究。

依据报告基因β半乳糖酐酶基因在 NIH/3T3细胞中转移后表达比较,选取高转染率的脂质体基因转移方法,将人 TGFβ1、反义人 TGFβ1基因转移入 NIH/3T3细胞中,经 G418(450μg/ml)筛选,随机挑选 13个表达克隆,经测定克隆表达 TGFβ1量均超过每百万个细胞 ρ_B/100 ng·ml^{-1}(48 h)$^{-1}$,最高达每 ρ_B/(156 ng·ml^{-1}·48 h^{-1});对高表达克隆扩增后分别进行 Southern blot、Northern blot鉴定,结果表明了 TGFβ1及反义 TGFβ1基因在 NIH/3T3细胞基因组中的稳定重组和 mRNA水平的表达;PCR RT-PCR以及细胞内 RT-PCR肯定基因整合结果的同时,证实了 NIH/3T3细胞系基因组中不含有人 TGFβ1同源序列。经水貂肺上皮细胞(CCL-64)生长抑制法对克隆细胞分泌 TGFβ1蛋白进行活性检测,其结果与流式细胞仪免疫荧光测定结果一致,均证实了转染有人 TGFβ1基因的克隆细胞,表达 TGFβ1蛋白水平显著高于正常组和转染有反义人 TGFβ1基因的克隆细胞组,提示基因转移人 TGFβ1在 NIH/3T3细胞中蛋白水平的稳定表达。我们同时对转基因后的 NIH/3T3克隆细胞分裂周期变化进行了观察,流式细胞仪 DNA水平检测显示,基因水平的 TGFβ1有促 NIH/3T3增殖分化作用倾向,此结果与活性蛋白水平给予 TGFβ1诱导 NIH/3T3分化的结果是一致的,而反义 TGFβ1基因转移则表现了相反的结果。

将重组后的活性 TGFβ1用于成年小鼠皮肤移植(Balb/c→DXB/c)免疫耐受诱导实验,证实 TGFβ1结合异基因抗原诱导免疫耐受有其独特的优越性,其中结合环磷酰胺(CP)的诱导组,使异基因小鼠皮肤移植长期存活(59.2± 4.76) d,植皮区长出异基因鼠毛。对其诱导耐受机理初步研究得出,TGFβ1广泛的免疫抑制功能是成功诱导免疫耐受的基础,而 TGFβ1抑制 CTLp的增殖分裂可能是诱导成功的关键因素。TGFβ1诱导的免疫耐受小鼠同样存在再植皮存活较正常植皮存活时间为长的现象,此现象可能与 TGFβ1诱导的中枢免疫耐受有关。总之,包括 TGFβ1对器官缺血的保护作用在内的众多功能机理,都有可能在不同水平上参与了移植物排斥的保护,TGFβ1及其联合用药用于免疫排斥治疗及诱导免疫耐受的机理有必要进一步深入研究。

2. TGFβ1对 Hela细胞 MHC抗原表达的影响

TGFβ1在机体免疫系统中的广泛免疫抑制作用,表现在对细胞免疫、体液免疫以及主要参与免疫反应的一些细胞因子功能的干扰,而 TGFβ1对组织细胞 MHC表达的下调作用,则是其在免疫系统中的另一重要抑制功能,是近期 TGFβ功能研究热点之一。

γ-IFN是免疫反应的重要参与者和调节者之一,γ-IFN可诱导 MHCⅠ、Ⅱ型抗原,特别是 MHCⅡ型抗原在许多细胞中表达。器官移植过程中,激活的 T淋巴细胞大量释放的γ-IFN,诱导 MHC抗原强效表达是加强免疫排斥反应的主要方面。免疫应答过程中,T细胞对细胞表面抗原的反应,不仅是对特异性抗原的识别,也必须识别细胞自身抗原或 MHC分子,否则反应即不会发生,此即 MHC限制现象(MHC restriction);可见,只有在抗原呈递细胞(APC)连同自身 MHC编码分子一起呈递时,T细胞才识别抗原,其中 MHC的表达变化,直接影响着免疫反应的强弱。MHC在移植免疫中的重要性表现在:下调或封闭移植组织细胞 MHC的表达是减弱免疫排斥反应的手段之一。

TGFβ1下调靶细胞 MHC抗原的表达在器官移植、免疫性疾病治疗和肿瘤学研究中均具有重要的意义。既往国外研究报道,均以外源给予天然或重组人 TGFβ1作为研究方法,证实其阻抑γ-IFN诱导的靶细胞 MHC表达,认为其作用机理可能与 TGFβ1受体参与的信号传递有关。本研究通过基因转移人 TGFβ1、反义 TGFβ1观察了基因水平 TGFβ1对 Hela细胞 MHC抗原表达的影响,同时对转基因细胞形态学亦作了初步观察,结果表明:Southern blot和 Northern blot分别证实了外源人 TGFβ1稳定重组和 mRNA水平的表达;PCR则证实了重

* 军事医学科学院基础医学研究所 北京,100850

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

组后人 TGFβ1基因的完整性。基因转移人 TGFβ1并未使 Hela 细胞自身表达 MHC有较大影响,但经γ-IFN(150U/ml)诱导48 h后发现,TGFβ1基因水平明显阻抑 Hela细胞 HLA-DR和β2-M 的表达;其形态学初步观察发现,基因水平 TGFβ1仍有阻制 Hela增殖分裂的特性。反义 TGFβ1基因的转移得出了与 TGFβ1作用相反的结果。该结论对启迪移植免疫排斥治疗新思路,解释肿瘤免疫逃逸机理,寻找肿瘤治疗新方法以及自身免疫性疾病的研究均具有重要的临床意义。

关键词 转化生长因子;重组;免疫耐受;移植;基因转移;主要组织相容性抗原

中图法分类号 R392.1

(收稿: 1996-07-18;修回: 1996-08-22)

(编辑 王 红、沈锡庚)

个案与短篇

恶性神经鞘膜瘤转移2例报告

Report of 2 cases of metastasis of malignant schwannoma

李胜难* 梁智勇 (第三军医大学附属西南医院病理科)重庆,630038

恶性神经鞘膜瘤起源于雪旺氏细胞,好发于头颈部、臀部、四肢,少数可发生于内脏,一般为低度恶性肿瘤,发生转移者少见,近年本院收治2例,报告如下:

例1 患者女性,30岁,1994年8月左踝内侧出现一鸡蛋大包块,行单纯包块切除,当地医院病理诊断为"左踝内侧梭形细胞肉瘤"。至1995年8月15日,左踝内侧肿瘤先后复发4次,第4次在我院行病检。

病理检查:肿块组织呈灰白色,表面呈分叶状,切面均质,质中等。镜检:瘤细胞呈短梭形,核大,深染,核两端稍尖锐,呈"S"状,可见核分裂象,胞浆丰富,嗜酸性。瘤细胞呈条索状排列,纵横交错。免疫组化染色结果:肿瘤细胞 Keratin(-),Desmin(-),Vimentin(±),S-100(+)。

病理诊断:左踝内侧神经鞘膜瘤(低度恶性)

患者术后35 d,发现左腹股沟淋巴结肿大,切除送病检。

病理检查:淋巴结组织呈灰褐色,大小为3.5 cm×2 cm×2 cm,切面可见一灰白色区域,直径1.0 cm,质中等,周边可见一囊腔,囊壁厚约0.2 cm,直径1.0 cm,腔内有咖啡色粘稠物。镜检:淋巴滤泡大部分已被破坏,代之以大片短梭形细胞,核呈圆形,卵圆形,核分裂象易见,胞浆多少不一,嗜酸性。瘤细胞排列成小漩涡状,部分呈波浪状排列。嗜银染色:瘤细胞间嗜银纤维丰富;免疫组化染色:肿瘤细胞 S-100(+),Keratin(-)。

病理诊断:左腹股沟淋巴结转移性恶性神经鞘膜瘤。

例2 患者男性,62岁,1991年3月至1994年8月期间先后因"小肠肿瘤"、"降结肠肿瘤"行单纯手术治疗。术后病检诊断均为"高分化平滑肌肉瘤。"患者于1995年9月中旬常规 B超复查时发现"左肝占位性病变",AFP 448 ng/ml,于9月底行剖腹探查术,术中见肝左外叶与内叶交界处有一5 cm×4 cm×4 cm大小之包块,边界清楚,行肝左外叶及部分内叶切除术。

病理检查:切除的肝组织大小为12 cm×10.5 cm×3.5 cm,切面可见一囊腔,囊腔直径4.5 cm,囊腔内被灰白色肿物所填塞,质地均匀,细腻,部分区域可见出血坏死。镜检:瘤细胞呈梭形,核大,深染,核钝圆,两端稍尖,可见核分裂象,胞浆中等,嗜酸性。瘤细胞呈编织状排列,部分呈栅栏排列,与肝细分界清楚。免疫组化染色:Desmin(-),Keratin(-),S-100(+)。

病理诊断:肝左叶转移性恶性神经鞘膜瘤

复习前两次病理切片,发现组织象与此次相似,并补做免疫组化染色:肿瘤细胞 Desmin(-),Keratin(-),S-100(+),最后诊断:小肠及降结肠恶性神经鞘膜瘤。

讨论

恶性神经鞘膜瘤往往是在此瘤复发、多发的基础上发生转移。转移的程度、快慢、侵袭性往往决定于复发次数、时间间隔及瘤体数目的多少、大小等。恶性神经鞘膜瘤多经淋巴管、血管转移。本组例1是从淋巴管转移的,例2则是从肠系膜上、下静脉经门静脉及其分支转移。由于此瘤恶性程度较低,一般生长速度慢,侵袭力较弱,若能及时手术治疗,术后进行放疗及化疗,预后一般较好。

此瘤应与平滑肌肉瘤相鉴别,免疫组化 S-100及 Desmin染色即可区分二者,恶性神经鞘膜瘤 S-100阳性,Desmin阴性,平滑肌肉瘤 Desmin阳性,S-100阴性。另外,此瘤分化低时应与脂肪肉瘤相鉴别,恶性神经鞘膜瘤组织象也可出现大的空泡细胞,这点极易与脂肪肉瘤相混淆,作苏丹III染色即可鉴别。

关键词 恶性神经鞘膜瘤;转移

中图法分类号 730.264

参考文献

1 冯本澄,戴奕然,肖振德. S-100蛋白在软组织肿瘤病理诊断中的价值.癌症,1987;6(3):159

2 蔡文琴,王泊 .实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社,1994 231~240

(收稿: 1995-12-20;修回: 1996-08-26)

(编辑 王 红、沈锡庚)

* 进修生,长寿县医院 重庆,631220

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