

榄香烯复合抗肿瘤疫苗免疫的效应机制

金梅, 白雪, 胡景慧

(辽宁师范大学生命科学院, 大连 116029)

摘要: 以小鼠 H22 腹水型肝癌和 L615 白血病为实验模型, 采用榄香烯或 / 和热休克等为应激原 (stressor), 对小鼠 H22 腹水型肝癌细胞和 L615 白血病细胞进行不同浓度榄香烯、不同时间热休克处理, 用透射电镜观察肿瘤细胞的形态变化; 采用直接免疫荧光法流式细胞术 (FCM) 检测肿瘤细胞凋亡百分率及对肿瘤细胞膜 HSP70、HSP90 表达的影响; 进而分离纯化不同应激原 (榄香烯、丝裂霉素-C) 诱导的 H22 和 L615 肿瘤细胞的 HSP70-肽复合物, 并用之免疫 Balb/c 和 615 小鼠, 进行体内抗肿瘤免疫效应的研究。透射电镜显示, 榄香烯或热休克处理都能引起 2 种肿瘤细胞的凋亡和坏死, L615 白血病细胞较 H22 肝癌细胞更敏感, 形态学变化更剧烈; 流式细胞术检测进一步证明, 榄香烯与热休克都能诱导 2 种肿瘤细胞发生凋亡, 两者复合作用更能促进肿瘤细胞的凋亡, 在一定范围内 L615 细胞凋亡与榄香烯的浓度和热休克的时间呈明显的依赖关系; 用榄香烯或 MMC 诱导的 2 种肿瘤细胞分离纯化的 HSP70-肽复合物给 Balb/c 和 615 小鼠进行主动免疫, 免疫组小鼠在 1 个月内全部存活。而 buffer D 免疫对照组小鼠无一存活。

关键词: 榄香烯; 凋亡; 热休克蛋白; 抗肿瘤疫苗

Immunity Effects Mechanism Treated with Elemene-Combo Tumor Vaccine

JIN Mei, BAI Xue, HU Jing-hui

(Institute of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029)

Abstract: The possible relationship between heat shock protein (HSP) and the molecular mechanisms of active immunization of elemene-combo tumor cell vaccine (TCV) was studied by using murine H22 ascitic hepatic carcinoma and L615 leukemia as the experimental models. Stressors, such as elemene or/and heat shock, were applied to study the following items: treated with different concentrations of elemene and different time course of heat shock, transmission electron microscopy were used to observe the morphological influence on tumor cells. Direct immunofluorescent flow cytometry (FCM) was used to detect the apoptotic rate of H22 and L615 tumor cells and influence on the expression of membrane HSP70 and HSP90. The membrane HSP70-peptide complex was separated and purified from H22 and L615 tumor cells induced by different stressors (elemene, MMC) and then a preliminary *in vivo* active immunoprophylaxis experiment was carried out using those isolated HSP70-peptide complex against H22 on Balb/c mice and L615 on 615 mice. Under transmission electron microscope, the influence of elemene or heat shock on the two kinds of tumor cells is, to some extent, the same or almost the same, which means the apoptosis and necrosis of the cells. The extent of the influence on the two kinds of tumor cells is different, and L615 leukemia was more sensitive and undergoing bigger morphological changes than H22 hepatic carcinoma. It's further proved by FCM that both elemene and heat shock alone can induce the apoptosis of mice H22 hepatic carcinoma or L615 leukemia cells, with the intensifying of this effect by combining use of the two, the apoptosis of cells from mice L615 leukemia relates closely to the concentration of elemene and the time course of heat shock at 42°C. By separating and purifying Balb/c and 615 mice immunized by HSP70-peptide compound of H22 and L615 tumor cell induced by elemene or MMC, the results showed that all mice survived within one month, while none of the mice in control immunized by buffer D survived.

Key words: Elemene; Apoptosis; Heat shock protein; Tumor vaccine

收稿日期: 2003-09-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371027) 和辽宁省自然科学基金资助项目 (2002211)

作者简介: 金梅 (1966-), 女, 辽宁大连人, 副教授, 博士, 主要从事畜牧兽医方面的研究。Tel: 0411-4240028; Fax: 0411-4258681; E-mail: jm6688210@hotmail.com

榄香烯 (elemene) 不仅对肿瘤细胞具有明显的直接细胞毒作用, 而且能提高肿瘤细胞的免疫原性, 诱导机体主动免疫, 有抗癌效应^[1]; 热休克使细胞热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 合成增加, 热休克蛋白的主要功能是增加细胞对致死性刺激的防御和适应能力^[2, 3], HSP 在抗肿瘤免疫特别是主动特异性免疫应答中有重要作用^[4~8]。动物疫苗在畜牧养殖业上具有广泛的应用前景。为研究榄香烯复合抗肿瘤细胞疫苗 (elemene-cobo-TCV) 主动免疫抗癌效应及其分子机制, 特别是与热休克蛋白之间的关系, 笔者对榄香烯或/和热休克作用后肿瘤细胞的凋亡和坏死生物学特性、榄香烯复合瘤苗诸因素单独或复合作用对肿瘤细胞膜热休克蛋白 (HSP70、HSP90) 表达的影响进行了检测, 并用榄香烯和 MMC 处理后 H22、L615 肿瘤细胞的 HSP70 肿瘤复合物肽, 进行体内主动免疫试验, 观察其免疫保护效应。为动物疫苗在畜牧业中的合理使用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物和瘤株 Balb/c 近交系小鼠 (H-2^d) 和小鼠腹水型肝癌 H22 (H-2) 高淋巴转移亚系^[9], 615 近交系小鼠 (H-2^d) 和 L615 白血病-615 系小鼠的 1 株 T 淋巴细胞性白血病, 由津 638 病毒诱发, 用细胞在 615 系小鼠上同系移植建株而成^[10]。上述动物和瘤株引进后均在本室按常规进行繁殖传代、保种。小鼠体重 20~26 g, 性别不拘。

1.1.2 肿瘤细胞悬液的制备 H22 腹水肝癌细胞由常规腹腔传代保种。接种后 12~16 d 抽取 H22 腹水瘤细胞, 离心、洗涤后用 RPMI 1640 全培养基调至试验所需细胞浓度。L615 白血病细胞则按常规取接种后 5~6 d 的 L615 白血病小鼠脾, 置尼龙网上用注射器针芯在 Hanks 液中研磨, 用 120 目尼龙网过滤, 1 500 r/min 离心 5 min, 去上清, 打匀细胞, Hanks 液洗 3 次, 再用全培养基调细胞至适当浓度, 即得 L615 白血病细胞悬液。

1.1.3 药品、试剂和仪器 1%榄香烯注射液、MMC 和 RPMI 1640 全培养基。5%PI (碘化丙啶) 染料 (Sigma), APO2.7 单抗及德国 BOEHRINGER 提供的细胞凋亡检测用 Kit, DNA 荧光染液 (Coulter 公司), 小牛血清为杭州四季青生物工程材料公司产品, 其余为进口试剂或国产分析纯试剂。兔抗人 HSP90 多克隆抗体 (中国医学科学院肿瘤研究所黄常志教授赠), FITC 标记的山羊

抗兔 IgG 和山羊抗小鼠 IgG (北京中山生物制品有限公司), 小鼠抗 HSP70 单克隆抗体 (美国 ABR 公司), 抗小鼠碱性磷酸酶-BCIP/NBT 试剂盒 (美国 NEOMARKER 公司), 碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG (中科院上海生物化学研究所)。常规电泳试剂; 硝酸纤维素膜 (NC, Hybond-c, Amersham, Life Science); 分子量 Marker (Sigma); 考马斯亮蓝染色液 (R 250)。CO₂ 培养箱 (Model 2300, Sheldon), 流式细胞仪 (美国, COULTER EPICS XL 型), 电镜 (日产 JEM-2000EX), LKB-V 型超薄切片仪 (美国)。电泳仪, 转膜电泳仪 (LKB-2117-250 NOVABLOT, BROMMA, Pharmacia), 超速离心机 (BECKMAN, L7-55, 美国产), SHB-III 循环水式多用真空泵等。

1.2 方 法

1.2.1 透射电镜观察经不同处理后肿瘤细胞的形态学变化^[11] 2 种肿瘤细胞分别以 20.0 μg·ml⁻¹ 榄香烯处理 (30min) 或 42℃ 处理 (H22: 1 h; L615: 45 min), 收集细胞, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 以 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定, 用 Epon812 常规方法包埋, 制成半薄切片, 甲苯胺蓝染色, 光镜下定位, LKB-5 型超薄切片仪切片, 铀-铅双染色, 观察, 照相。

1.2.2 细胞凋亡的检测 参照文献 [12] 采用直接免疫荧光法流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 进行检测。基本方法为: 取榄香烯或/和热休克处理后的 2 种肿瘤细胞每毫升 10⁶ 个, PBS 洗 2 次, 移入已硅化的玻璃管。于室温下加 100 μg·ml⁻¹ 毛地黄苷 (digitonin) 100 μl 后加藻红素 (R-phycoerythrin) 标记的 APO 2.7 单抗 (APO2.7PE-CY5), 于流式细胞仪 (EPISC XL, Coulter) 上进行荧光检测, 并给出相应的凋亡细胞百分率。测定前, 均用 Coulter 标准荧光微球校准仪器, 使 HPCV < 2.0。用正常人外周血淋巴细胞作外参定标。每份标本测定 50 000 个细胞, Multicycle 软件分析。

1.2.3 间接免疫荧光法流式细胞术检测 HSP70、HSP90 膜蛋白表达^[13, 14] 以不同浓度榄香烯或/和不同时间热休克 (42℃) 以及榄香烯复合瘤苗诸因素 (榄香烯、丝裂霉素-C、戊二醛) 单独或复合处理 H22、L615 肿瘤细胞和小鼠正常脾细胞, 然后分别收集 0.5~1.0 × 10⁶ 个细胞, PBS 洗 2 次, 弃上清, 加冷毛地黄苷 (digitonin, 100.0 μg·ml⁻¹) 100.0 μl 4℃ 孵育 15 min, PBS 洗 1 次, 弃上清, 加用 PBS 稀释 (1:100) 的第一抗体 (兔抗人 HSP90, 或小鼠抗 HSP70 单克隆抗体) 20.0 μl, 室温避光 30 min, PBS 洗 1 次, 将沉淀混匀, 加入 PBS 稀释 (1:500) 的 FITC 标记的山羊抗兔

或山羊抗小鼠第二抗体, 室温避光作用 30 min, PBS 洗 1 次, 于流式细胞仪上进行荧光检测。每份样品作 3 管, 每次测定 10 000 个细胞, 并给出相应的阳性表达率。同时用不加荧光二抗的肿瘤细胞作阴性对照, 去除本底荧光。测试之前 DNA-check 校准仪器, 使 HPCV < 2.0 。

1.2.4 榄香烯或丝裂霉素-C(MMC)诱导的肿瘤细胞的制备 抽取 2 种肿瘤细胞悬液 1 500 r/min 离心 5 min, 得 10 ml 细胞团块。分别加入榄香烯 ($50.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 或 MMC ($50.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 40ml 后在 37°C 水浴箱中温浴 45 min, 用肿瘤细胞培养液洗 3 次, 即得榄香烯或 MMC 诱导的肿瘤细胞。

1.2.5 HSP70-肽复合物的提取 参照文献[15]略有改变。在榄香烯或 MMC 诱导的肿瘤细胞中加入 40 ml 低渗液 ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaHCO}_3$, $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{PMSF}$ pH7.1), 振荡后 100 000 g 离心获得上清。用缓冲液 D ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Tris-HCl}$, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl}$, $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{B-mercaptoethanol}$, $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$, $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{PMSF}$ pH 7.5), 40 ml 平衡 PD-10 柱 (Sephadex G-25, Pharmacia Biotech, Piscataway NJ) 后, 把上清加入 PD-10 柱, 接收上清流下的样品。ADP-agarose 柱 (5 ml) 经缓冲液 D 50 ml 平衡后, 把接收的样品加入 ADP-agarose 柱, 先经过含 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 的缓冲液 D 30 ml 冲洗后, 再用缓冲液 D 冲洗直到没有蛋白被检测出为止。把 ADP-agarose 柱用含 $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ADP}$ 的缓冲液 D 在室温下孵育 30 min, 用 25 ml 同样

的缓冲液冲洗, 接收溶液。

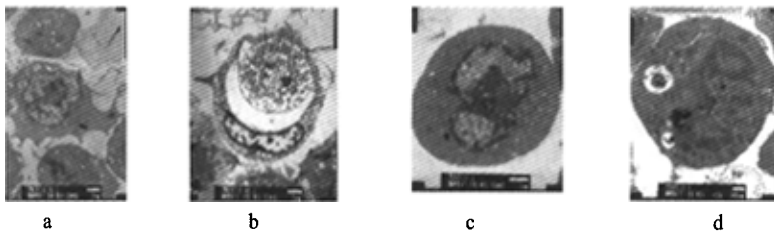
1.2.6 纯化蛋白及对蛋白浓度的鉴定 把纯化和未经纯化的样品与 SDS 样品缓冲液一起煮沸 5min, 用 10% SDS-PAGE 电泳, 电泳后以考马斯亮蓝染色或转膜, 用小鼠抗 HSP70 单克隆抗体杂交。具体方法参照文献[16]。考马斯亮蓝法检测蛋白浓度^[16]。

1.2.7 HSP70-肽复合物主动免疫试验 Balb/c 和 L615 小鼠随机分为 3 组, 每组 20 只, 雌雄各半。第一组为缓冲液 (Buffer D) 免疫阴性对照组, 第二组为榄香烯诱导纯化的 HSP70-肽复合物免疫组, 第三组为 MMC 诱导纯化的 HSP70-肽复合物免疫组。第一次右肢皮下免疫后 7 d 进行第二次免疫, 所用 HSP70 的剂量都是每只 0.2 ml (根据测定结果蛋白为 $24.8 \mu\text{g}$)。第二次免疫后 10d 每 0.1ml 每只鼠用 5.6×10^4 个肿瘤细胞。进行腹部皮下攻毒。观察各组小鼠 30 d 的存活率。

2 结果与分析

2.1 榄香烯和热休克处理后 H22 和 L615 肿瘤细胞形态学的变化

透射电镜显示: 低浓度 ($2.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 榄香烯处理后, H22 肝癌细胞和 L615 白血病细胞和未经处理的对照组肿瘤细胞相比形态学未见明显变化。经较高浓度 ($20.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 榄香烯处理后的 2 种肿瘤细胞线粒体饱满, 细胞质内质粒密集, 糖原颗粒明显减少, 脂质空泡增多。2 种肿瘤细胞都出现凋亡和坏死现象 (图)。



a. H22 腹水肝癌细胞凋亡的电镜照片 (37°C , $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 榄香烯处理, 0.5 h) $\times 3000$; b. H22 腹水肝癌细胞坏死的电镜照片 (37°C , $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 榄香烯处理, 0.5 h) $\times 3000$; c. L615 白血病细胞凋亡的电镜照片 (37°C , $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 榄香烯处理, 0.5 h) $\times 8000$; d. L615 白血病细胞坏死的电镜照片 (37°C , $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 榄香烯处理, 0.5 h) $\times 10000$

a. Electron micrograph of apoptosis of H22 ascitic hepatic cancer cell (treated with 37°C , $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ elemene. 0.5 h) $\times 3000$; b. Electron micrograph of necrosis of H22 ascitic hepatic cancer cell (treated with 37°C , $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ elemene. 0.5 h) $\times 3000$; c. Electron micrograph of apoptosis of L615 leukemia cell (treated with 37°C , $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ elemene. 0.5 h) $\times 8000$; d. Electron micrograph of necrosis of L615 leukemia cell (treated with 37°C , $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ elemene. 0.5 h) $\times 10000$

图 肿瘤细胞凋亡和坏死的电镜照片

Fig. Electron micrograph of apoptosis and necrosis of tumor cell

高浓度榄香烯 (50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 处理, 形态学变化更明显, 凋亡和坏死的细胞更多。在相同条件下, L615 白血病细胞比 H22 肝癌细胞对榄香烯的敏感性高, 产生较多的凋亡和坏死细胞。

2.2 榄香烯或和热休克对 H22 及 L615 细胞凋亡的诱导

从表 1 可知: 不同浓度榄香烯处理 H22 和 L615 肿瘤细胞, 都能诱导此 2 种肿瘤细胞的凋亡且呈榄香烯浓度依赖性。在相同处理条件下, L615 白血病细胞比 H22 腹水肝癌细胞的凋亡细胞率明显增高 ($P < 0.01$)。低浓度 (2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 榄香烯和 42°C 热休克复合处理, 不论是榄香烯在热休克之前、后或与热休克同时处理均未见 H22 肿瘤细胞的凋亡率增加 ($P > 0.05$), 但均能使 L615 细胞的凋亡率明显升高 ($P < 0.01$ 同单独榄香烯或单独热休克处理相比)。

2.3 榄香烯或热休克处理对 H22 和 L615 肿瘤细胞膜 HSP70 与 HSP90 表达的影响

榄香烯能够明显增加 H22 肝癌细胞 HSP70 与 HSP90 膜蛋白的表达, 也能增加 L615 白血病细胞 HSP70 的表达 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 并呈浓度依赖性 (表 2)。

热休克处理后, L615 白血病细胞生成较多 HSP70 ($P < 0.01$), H22 肝癌细胞生成较多 HSP90 ($P < 0.01$)。L615 白血病细胞在较短的时间 (1 h) 内 HSP70 就能达到饱和程度, 而 H22 肝癌细胞的 HSP90 需要较长时间 (8 h) 才达到饱和程度; 至于 H22 的 HSP70 即使是 42°C 8h 也远远未达到饱和程度。

2.4 纯化的 H22 和 L615 HSP70-肽复合物对 Balb/c 和 615 小鼠的主动免疫保护

从表 3 可知: 无论是用榄香烯还是用 MMC 诱导 肿瘤细胞所纯化的 HSP70-肽复合物去免疫 Balb/c 和 615 小鼠, 均能使 HSP70-肽复合物免疫组小鼠在致死剂量活 H22 细胞或 L615 攻击后 30d 时 100% 存活; 而 buffer D 对照组小鼠却无一存活。

表 1 榄香烯或和热休克对 H22 及 L615 肿瘤细胞凋亡的诱导

Table 1 Induction of apoptosis of H22 and L615 tumor cells by elemene or/and 42°C heat shock (X \pm SD)

处理 ¹⁾ Treatment	剂量 Dose ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	时间 Time (h)	凋亡细胞百分率 ²⁾ (%) Apoptotic cell	
			H22	L615
Control			0	0
E	2.0	0.5	2 \pm 2.3	38.6 \pm 3.8** ^{OO}
E	20.0	0.5	11.2 \pm 0.6**	42.1 \pm 2.7** ^{OO}
E	50.0	0.5	20.2 \pm 4.4**	98.7 \pm 3.1** ^{OO}
H		0.5	1.5 \pm 2.1	5 \pm 1.9*
H		1	2.3 \pm 4.8	21.7 \pm 1.2** ^{OO}
H		1.5	2.6 \pm 3.2	34.7 \pm 2.7** ^{OO}
H		2	2.8 \pm 3.6	40.6 \pm 4.3** ^{OO}
After E+H	2.0	0.5(E) 1(H)	4.7 \pm 1.9*	67.4 \pm 0.4** ^{OO} ^{AA}
E+H	2.0	1	3.3 \pm 0.5**	70 \pm 2.9** ^{OO} ^{AA}
After H+E	2.0	1(H) 0.5(E)	2.2 \pm 1.4	55.6 \pm 4.2** ^{OO} ^{AA}

¹⁾ E. 榄香烯; H. 42°C 热休克 E. Elemene; H. 42°C Heat shock 下同 T he same as below

²⁾ * 差异显著 $P < 0.05$; **, ^{OO}, ** 差异极显著 $P < 0.01$; *, ** 同对照组比较; ^{OO} 同 H22 处理组比较; ^{AA} 同单独热休克或榄香烯处理组比较。下同 * Significant difference, $P < 0.05$; **, ^{OO}, ** Extremely significant difference; *, ** Compared with control; ^{OO} Compared with H22; ^{AA} Compared with heat shock or elemene treatment alone. The same as below

表 2 榄香烯或热休克对 H22 和 L615 肿瘤细胞膜 HSP70 与 HSP90 表达的影响

Table 2 Expression of membrane HSP70 and HSP90 on H22 and L615 tumor cells after treatment with elemene or heat shock (42°C) (X \pm SD)

药物 Drugs ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	时间 Time (h)	热休克 Heat shock (h)	膜蛋白表达百分率 Positive rate (%)							
			H22				L615			
			HSP70		HSP90		HSP70		HSP90	
E	H	E	H	E	H	E	H			
Control		Control	3.7 \pm 1.10	3.7 \pm 1.10	12.4 \pm 0.02	12.4 \pm 0.02	34.7 \pm 2.30	34.7 \pm 2.30	5.3 \pm 1.32	5.3 \pm 1.32
E(2.0)	0.5	1	-	-	26.0 \pm 0.14**	9.7 \pm 2.30	42.4 \pm 1.86*	96.6 \pm 1.41**	10.6 \pm 3.12	5.0 \pm 0.92
E(20.0)	0.5	2	9.1 \pm 2.03**	10.5 \pm 2.30**	81.3 \pm 1.05**	57.5 \pm 3.21**	47.3 \pm 0.32**	97.0 \pm 1.50**	4.4 \pm 0.80	8.9 \pm 1.42*
E(50.0)	0.5	4	44.2 \pm 1.87**	13.2 \pm 1.52**	97.0 \pm 0.92**	68.3 \pm 1.03**	58.4 \pm 0.56**	93.2 \pm 2.40**	7.4 \pm 1.32	6.0 \pm 1.02
		6		24.2 \pm 0.81**		76.0 \pm 0.67**		97.1 \pm 1.20**		9.0 \pm 1.20**
		8		36.5 \pm 2.32**		95.0 \pm 1.57**				

表 3 纯化 H22 或 L615 HSP70-肽复合物主动免疫保护¹⁾

Table 3 Comparison of immunoprotective effect of purified H22 or L615 HSP70-peptide complex induced by elemene or MMC

小鼠数 No. of mice	免疫 Immunization			存活率(%) Survival rate (30 days)	
	Buffer D	HSP70 by elemene	HSP70 by MMC	H22	L615
20	✓			0	0
20		✓		100	100
20			✓	100	100

¹⁾ 用 5.6×10^4 个 H22 或 L615 肿瘤细胞攻击

Challenge with 5.6×10^4 viable H22 or L615 tumor cells

3 讨论

榄香烯对肿瘤细胞凋亡的诱导与热休克有相似之处, 热休克处理肿瘤细胞作为抗原诱导出肿瘤特异 T 细胞受体 $\gamma\delta$ 表型淋巴细胞 ($\gamma\delta$ T 细胞), 产生抗自身肿瘤特异性免疫不是通过主要组织相容性复合体 I 类抗原 (MHC-I) 分子介导的, 而可能是通过 HSP70 分子介导的^[15], 但不同肿瘤细胞对榄香烯或/和热休克的热休克应答 (heat shock response, HSR) 可能有明显的不同。这将为榄香烯或/和热休克-应激-HSP-细胞凋亡诱导的调控提供某些理论线索和思路^[17]。

对膜的 HSPs 检测表明, 榄香烯或/和热休克疫苗主动免疫对 L615 白血病比 H22 肝癌细胞的免疫防护效应强, 这可能与 L615 肿瘤细胞本身 HSP70 表达较高, 同时通过外界因素处理后比 H22 肿瘤细胞生成较多的 HSP70 有关。因为有资料表明 HSP70 的免疫原性要比 HSP90 高 10 倍^[18]。这就为目前正进行的榄香烯复合疫苗抗癌免疫分子机理的研究提供了理论线索和试验依据, 支持了笔者关于该疫苗主动免疫的榄香烯-MMC-戊二醛-应激-HSP-肿瘤肽-T 细胞激活这一初步设想。L615 和 H22 肿瘤细胞 HSP70 和 HSP90 表达的增加, 可能与肿瘤细胞的免疫原性有关。正常细胞虽然也有较小幅度的 HSPs 表达变化, 但由于正常细胞对自身机体一般没有免疫原性^[16], 而起免疫作用的是 HSP-肿瘤肽的复合物。所以, HSP-肿瘤肽复合物在疫苗主动免疫效应中起着关键作用, 因而从榄香烯复合疫苗诸因素诱导的肿瘤细胞分离提取 HSP-肽复合物进行主动免疫试验就有着重要的意义。

通过体内主动免疫试验说明经过上述方法分离纯化的 HSP70-肽复合物仍具有肿瘤的抗原信息, 能够诱导明显的主动免疫保护效应。研究证实, 经过 elemene、MMC 作为应激原刺激 H22、L615 后分离纯化的 HSP70-肿瘤肽复合物同样具有免疫原性, 说明 elemene、MMC 疫苗免疫效应的机制可能和热休克应答

的机制有相同或相似之处, 很可能也是通过 HSP70 分子途径实现的。诱导纯化 HSP-肿瘤肽主动免疫交叉攻击及其免疫特异性试验, 尚有待进行。

References

- 钱振超, 王大庆, 金成钢. 瘤苗特异性主动免疫治疗及其机制的实验研究. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1995, 2(2):120-126.
Qian Z C, Wang D Q, Jin C G. Experiment study on specificity active immunization treat and its mechanism of tumor vaccine. *China Journal of Cancer Biotherapy*, 1995, 2(2):120-126. (in Chinese)
- Lindquist S. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 1986, 55: 1 151-1 191.
- Lindquist, Craig E A. The shock protein. *Annual Review of Genetics*, 1988, 22: 631-677.
- Grover A. Molecular biology of stress responses. *Cell Stress & Chaperones*, 2002, 7(1):1-5.
- Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin S A, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger J M, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biology*, 2001, 3(9):839-843.
- Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 286 (3):433-442.
- Menoret A, Patry Y, Burg C. Co-segregation of tumor immunogenicity with expression of inducible but not constitutive HSP70 in rat colon carcinoma. *Journal of Immunology*, 1995, 155: 740-747.
- Wei Y Q, Zhao X, Kariya Y. Induction of autologous tumor killing by heat treatment of fresh human tumor cell: Involvement of r87 cells and heat shock protein 70. *Cancer Research*, 1996, 56: 1 104-1 110.
- 凌茂英, 王明辉, 郭伶伶. 小鼠肝癌(HCa)两株克隆细胞系转移表型的比较. 大连医学院学报, 1994, 16: 124-129.
Ling M Y, Wang M H, Guo L L. Compare with two cloning cell strains shift phenotype of murine hepatic carcinoma (Hca). *Journal of Institute of Dalian Medicine*, 1994, 16:124-129. (in Chinese)
- 中国医学科学院白血病协作组. 可移植性小鼠白血病(L615)的实验

- 研究. 肿瘤防治研究, 1974, 4: 81-83.
- Chinese Medicine Academy of Sciences Leukaemia Cooperation Group. Experiment study on transplant character murine leukaemia(L615). *Tumor Prevent Study*, 1974, 4: 81-83. (in Chinese)
- [11] 姜 泊. 分子生物学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 1996: 175-176.
- Jiang B. *Molecule Biology Common Experiment Method*. Beijing: People Military Surgeon Press, 1996:175-176. (in Chinese)
- [12] Zhang C, Ao Z, Seth A. Mitochondrial membrane antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *Journal of Immunology*, 1996, 157: 3 980-3 987.
- [13] Lesley J, Hyman R, Schulte R. Expression of transferrin receptor on murine hematopoietic progenitors. *Cell Immunology*, 1984, 83: 14-25.
- [14] Segal D M, Titus J A, Stephany D A. Fluorescence flow cytometry in the study of lymphoid cell receptors. *Methods Enzymology*, 1987, 150: 478-492.
- [15] Ping P, Antoine M, Pramod K. Purification of immunogenic heat shock protein 70-peptide complexes by ADP-affinity chromatography. *Journal of Immunological Methods*, 1997, 204: 13-21.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金东雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1993: 880-898.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Translated by Jin D Y, Li M F. *Molecule Cloning Experiment Guide* (2nd edition). Beijing: Science Press, 1993: 880-898. (in Chinese)
- [17] 周 纯. 热休克蛋白 90 与肿瘤. 国外医学·肿瘤学分册, 1997, 24(5): 258-259.
- Zhou C. Heat shock protein 90 and tumor. *Tumor of Foreign Medicine*, 1997, 24(5): 258-259.(in Chinese)
- [18] Hartl F U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* (review), 1996, 381: 57.

(责任编辑 林鉴非)