

· 论著摘要 ·

# 口腔癌患者外周血树突状细胞的体外诱导培养及鉴定

张素欣, 王士杰, 段玉芹, 许彦枝

关键词: 口腔癌; 树突细胞; 表型

中图分类号: R739.8 文献标识码: D

文章编号: 1000-8578(2007)10-0811-02

## 0 引言

目前临床对口腔癌的治疗是以手术为主的综合治疗, 控制癌变的发展, 提高生存率, 是口腔癌治疗的趋势。树突状细胞(Dendritic cell, DC)作为功能最强的专职抗原提呈细胞(Antigen-presenting cell, APC), 在机体免疫应答中的作用受到高度关注。本实验采集口腔癌患者外周血, 通过体外培养, 诱导扩增获取大量具有典型特征的 DC, 分析其形态及表型特点, 以期为口腔癌的生物治疗建立通路。

## 1 材料与方法

无菌采集口腔癌患者外周全血 50 ml, 提取单个核细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^7$  个/ml, 接种于 6 孔板, 加入含 1000 U/ml rhGM-CSF 和 500 U/ml rhIL-4 的 RPMI1640 完全培养基进行培养, 中间适量换液并补充细胞因子。5 d 后, 将细胞分为两组, 其中一组每孔加入 TNF- $\alpha$  200 U/ml, 另一组换液后继续用 GM-CSF、IL-4 培养。7 d 收集 DC 细胞, 观察细胞形态, 用流式细胞术鉴定细胞表型, 并用 MTT 法检测自体混合淋巴细胞反应。

## 2 结果

成熟 DC 有明显树突状突起, 见图 1; 表面粗糙, 胞体向周围伸出大量树枝状或裙褶状不规则突起, 见图 2; 细胞表面伸出长短不一的突起, 线粒体致密化, 粗面内质网扩张成池状, 溶酶体较

DC, 表面共刺激分子和 MHC 类分子表达率低, 与加入 TNF- $\alpha$  48 h 后的成熟 DC 相比, 细胞表型的表达有显著性差异, 说明口腔癌患者外周血中的 DC 大多为 imDC, 经体外培养扩增后可成熟, 从而导致免疫功能的改变, 这种改变在 DC 成熟后得到保持并趋于稳定。另外我们观察到这种成熟状态在不加任何干扰因素的情况下能维持近三周。

我们发现在口腔癌患者 DC 培养早

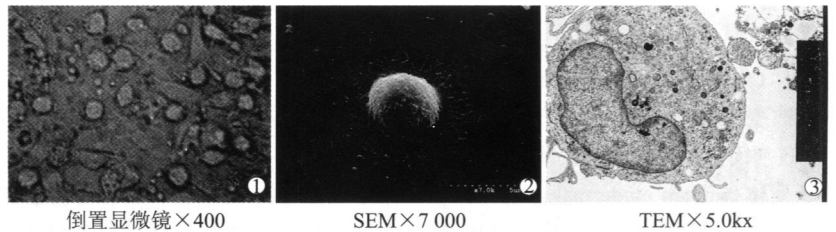


图 1~3 DC 培养第 7 d 形态观察

少, 见图 3。两组 DC 诱导培养第 5、7 d 细胞表面分子表达比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。混合淋巴细胞反应实验结果: 培养至第 5 d 的 A 组 DC 与 B 组 DC 在刺激 T 细胞增殖的能力上略有差别, 差别无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 培养至第 7 d 的 A 组 DC 与 B 组 DC 在刺激 T 细胞增殖的能力上有明显差别, 差别有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

DC 在肿瘤免疫中发挥着重要作用, 不成熟 DC(imDC) 摄取、加工抗原能力很强, 成熟(mDC) 抗原处理能力减弱, 但抗原提呈功能明显增强, 从而诱导 T 细胞产生特异性 CTL 效应<sup>[1]</sup>。但是 DC 在血液中仅占单个核细胞总数的 0.5% ~ 1.0%, 大量体外扩增 DC 的研究正在开展, 本实验选用 GM-CSF、IL-4 和 TNF- $\alpha$  来培养口腔癌患者外周血来源的 DC<sup>[2]</sup>, 在 GM-CSF 和 IL-4 联合体外培养 DC 的第 5~6 d 加入 TNF- $\alpha$ <sup>[3]</sup>, 继续孵育 24~96 h 促进 DC 成熟<sup>[4,5]</sup>。在本实验中, 我们发现培养外周血 DC 的前 5 d, 其数量有不断增长, 但多为 im-

期, CD83、HLA-DR、CD80、CD86 表达率均低, 加入 TNF- $\alpha$  后所有 DC 表面成熟标记水平明显提高, 而且这种提高以 CD83、HLA-DR 表现最为明显。

本实验在 DC 培养过程中加入 GM-CSF、IL-4 和 TNF- $\alpha$ , 结果获得具有典型形态学及细胞表面分子表达特征的 DC, 且细胞数量较多, 平均  $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6$  /ml, 为进一步研究口腔癌患者外周血 DC 的功能和可利用性奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] Alessio Nencioni, Martin R Muller, Frank Grunebach, et al. Dendritic cells transfected with tumor RNA for the induction of antitumor CTL in colorectal cancer [J]. Cancer Gene Therapy, 2003, 10 (10): 209-214.
- [2] Dauer M, Obermaier B, Herten J, et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors [J]. J Immunol, 2003, 170 (8): 4069-4076.
- [3] Um HD, Cho YH, Kim do K, et al. TNF-alpha suppresses dendritic cell death and the production of reactive oxygen intermediates induced by plasma withdrawal [J]. Exp Dermatol, 2004, 13 (5): 282-288.
- [4] Jorg Westermann, Ida J Korner, Joachim Kopp. Cryopreservation of mature monocyte-derived human dendritic cells for vaccination: influence on phenotype

收稿日期: 2006-09-25; 修回日期: 2007-03-15  
基金项目: 河北省高校强势学科肿瘤学基金资助项目 (2006-2010)  
作者单位: 050011 石家庄, 河北医科大学第四医院口腔科  
通讯作者: 王士杰, E-mail: zhangsuxin1@yahoo.com.cn  
作者简介: 张素欣 (1972-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤免疫学研究

· 短篇个案 ·

# FHIT 基因与 HER<sub>2</sub> 在非小细胞肺癌中的表达

邱丹, 黄毅, 刘建英, 钟丽萍

关键词: 脆性组氨酸三联体基因; 人表皮生长因子受体 2; 肿瘤; 肺  
中图分类号: R734.2 文献标识码: D  
文章编号: 1000-8578 (2007) 10-0812-02

## 0 引言

在多种恶性肿瘤中常有脆性组氨酸三联体 (fragile histidine traid, FHIT) 基因的改变。人类表皮生长因子受体基因 (erbB 基因) 家族是编码人体表皮生长因子受体 (human epidermal-growth-factor receptor, HER) 的癌基因。erbB<sub>2</sub> 基因是编码 HER<sub>2</sub> 的癌基因, 文献报道 HER<sub>2</sub> 参与恶性肿瘤的发生、发展过程。我们探讨了 FHIT 基因及 HER<sub>2</sub> 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 的表达意义与临床病理特征的关系。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 我院经肺穿刺、纤维支气管镜活检的肺癌标本 38 例, 胸外科手术切除的肺癌标本 12 例。经病理确诊, 鳞癌 27 例、腺癌 18 例、腺鳞癌及大细胞癌 5 例。其中男 32 例, 女 18 例, 年龄 35~78 岁, 中位年龄 53.3 岁。对照组为手术切除的正常肺组织共 21 例。

1.2 方法 免疫组化 Envision 法。石蜡切片, 厚 4 μm, 常规脱蜡至少, 严格按试剂盒操作, 苏木素复染、脱水、透明、封片。免疫组化染色结果判定标准如下: FHIT 基因表达产物 (FHIT 蛋白) 定位于细胞质, 阳性呈棕黄色颗粒, 散在分布, 弱到强染色。每张切片在光镜下随机选取高倍视野计数 500 个细胞, 按染

色强度和阳性细胞百分率计分, (-): 无染色或阳性细胞 10% 为阴性; (+): 阳性细胞 > 10% 为阳性。HER<sub>2</sub> 定位于细胞膜和细胞浆。(-): 所有细胞均未出现棕黄色; (±): 25% 的细胞出现棕黄色; (+): > 25% 的细胞出现棕黄色; (++) : > 50% 的细胞出现棕黄色; (+++) : > 75% 的细胞出现棕黄色。肺癌组织 HER<sub>2</sub> 染色与癌旁非癌上皮组织染色 HER<sub>2</sub> 相差 (++), 则为过度表达。

## 2 结果

50 例非小细胞肺癌中, 经免疫组化检测 FHIT 蛋白有 35 例阳性, 表达率为 30.0%, 与正常肺组织 80.95% 比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。非小细胞肺癌组织中的 FHIT 蛋白表达率鳞癌为 18.5%、腺癌为 44.40%, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。有淋巴结转移组 FHIT 蛋白表达率 15.79%; 无淋巴结转移组 FHIT 蛋白的表达率为 38.71%, 两者差异有统计学意义 (P < 0.05)。在肺癌 TNM 分期中, I 期 21.88% 与 II 期 44.44% FHIT 蛋白表达率比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。50 例肺癌中非小细胞肺癌组织中, HER<sub>2</sub> 的过度表达率为 56.0%, HER<sub>2</sub> 的过度表达与肺癌的病理类型不相关 (P > 0.05); 而 HER<sub>2</sub> 的过度表达与肺癌淋巴结转移及

TNM 的分期相关, HER<sub>2</sub> 的过度表达率在有淋巴结转移组与无淋巴结转移组比较差异有统计学意义 (P < 0.05)。HER<sub>2</sub> 的过度表达率随 TNM 的分期增加而增加。肺癌组织中 FHIT 基因表达与 HER<sub>2</sub> 的过度表达存在负相关关系 (r = - 0.38, P < 0.05)。

## 3 结论

FHIT 基因定位于 3p 14.2, 跨越脆性位点 FRA3B, 总长 > 500 Kb, cDNA 只有 1 kb 左右, 其含 10 个外显子。FHIT 基因失活方式主要为基因缺失<sup>[1]</sup>, 基因突变, 小片段 DNA 的插入<sup>[2]</sup>, 与 CPG 区域的甲基化, 基因的失活导致蛋白表达下调。本研究结果表明: 在肺癌组织中存在 FHIT 基因表达显著下降。鳞癌中 FHIT 基因的表达率低于腺癌, 其差异有统计学意义, FHIT 基因是烟草中致癌物作用的靶点, 而鳞癌中 FHIT 基因表达下降高于腺癌, 可能跟吸烟与肺鳞癌关系更为密切有关。erbB 基因是在研究禽成红细胞增生病毒 (avian erythroblastosis virus, AEV) 的过程中发现的癌基因, erbB<sub>1</sub>、erbB<sub>2</sub> 是其中两个主要成员之一, erbB<sub>2</sub> 基因的编码 HER<sub>2</sub> 的癌基因, HER<sub>2</sub> 与配体结合后, 通过自动磷酸化参与细胞的信号传递, 信号在细胞内通过蛋白激酶级联传递, 最终调节细胞的生长及分裂。本研究结果表明, 肺癌中存在的 HER<sub>2</sub> 过度表达, 而 HER<sub>2</sub> 的过度表达与肺癌的病理类型不相关。有淋巴结转移肺癌组织 FHIT 基因表达低于未发现淋巴结转移肺癌组织, 这提示 FHIT 基因在肺癌进展中可能起一定作用, 与肺癌侵袭转移癌的发生有关, TNM 临床分期早的 I 期、II 期比 III 期、IV 期 FHIT 基因表达率低, 说明在肺癌中 FHIT 基因的失表达早期发挥作用, 多数学者推测在肺癌发生的多步过程中, FHIT 基因改变早于 p53 基因的突变<sup>[3]</sup>。因而免疫组化分析肺穿刺、纤维支气管镜活检的肺癌活组织中

收稿日期: 2006-09-11; 修回日期: 2006-12-14  
基金项目: 遵义市科研基金资助项目 (遵市科合 2004)  
作者单位: 563002 贵州省遵义医院呼吸内科  
作者简介: 邱丹 (1965-), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事肺癌的早期诊断及治疗

and functional [J]. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52 (3): 194-198.

[5] Martin R Muller, Frank Grunebach, Alessio Nencioni, et al. Transfection of

Dendritic Cells with RNA Induces CD4+ and CD8-Mediated T Cell Immunity Against Breast Carcinomas and Reveals the Immunodominance of

Presented T Cell Epitopes [J]. J Immunol, 2003, 170 (12): 5892-5896.

[编辑: 周永红; 校对: 马福元]

