

# 体外构建的 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub> 冲激的树突状细胞疫苗的抗肿瘤作用

孙光<sup>1</sup>, 郭连英<sup>2</sup>, 沈洁<sup>2</sup>, 刘丹丹<sup>3</sup>, 施广霞<sup>2</sup>, 钱振超<sup>2</sup>

## Antitumor Effects Induced by Dendritic Cell Vaccine Pulsed with H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub> Complex Reconstituted in Vitro

SUN Guang<sup>1</sup>, GUO Liang-ying<sup>2</sup>, SHEN Jie<sup>2</sup>, LIU Dan-dan<sup>3</sup>, SHI Guang-xia<sup>2</sup>, QIAN Zhen-chao<sup>2</sup>

1. Hematology Department, First Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China; 2. Institute of Tumor Biotherapy, Dalian Medical University, 3. Laboratory Center for Diagnostics

**Abstract Objective** To investigate antitumor effects induced by dendritic cells (DCs) pulsed with complex of tumor antigen from elemene-combo tumor cell vaccine-heat shock protein 70 of BCG (H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>). **Methods** Tumor antigen peptides from elemene-combo Hca-F cell (H<sub>TA</sub>) combined with HSP70<sub>BCG</sub> into H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub> in vitro. DCs were induced in medium with GM-CSF and IL-4 and pulsed with H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>, H<sub>TA</sub> and HSP70<sub>BCG</sub>, respectively. The proliferation stimulating effects on un-separated splenocytes and the cytotoxicity of the splenocytes activated with DCs were evaluated with MTT assay. The expression of CD40 and CD86 on the surface of DCs was assessed by flow cytometer. **Results** Pulsing of H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub> resulted in DCs maturation, characterized by up-regulation of CD86 and CD40. Proliferation index of un-separated splenocytes from H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub> group was significantly increased as compared with H<sub>TA</sub> group. Un-separated splenocytes from DCs pulsed with H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub> revealed the cytotoxicity against Hca-F, The H<sub>TA</sub> failed to reveal the cytotoxicity against Hca-F. **Conclusion** H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub> could induce DCs maturation and the mature DCs could activate splenocytes to generate more potent specific antitumor effect.

**Key words:** Heat shock protein70; Dendritic cell; Tumor vaccine; Antitumor effects

**摘要:**目的 观察体外构建的榄香烯复合瘤苗抗原-卡介苗热休克蛋白 70 复合物(H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>)诱导的树突状细胞疫苗的抗肿瘤效应。方法 来源于小鼠的肝癌 Hca-F 榄香烯复合疫苗的抗原(H<sub>TA</sub>)与卡介苗来源的 HSP70(HSP70<sub>BCG</sub>)在体外构建成 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>复合物,用 GM-CSF 和 IL-4 诱导树突状细胞(DCs),分别用 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>、H<sub>TA</sub>和 HSP70<sub>BCG</sub>对其冲激。用 MTT 法检测该 DCs 刺激的全脾细胞的增殖活性及被刺激的脾细胞的细胞毒活性。用流式细胞仪检测 DCs 表面 CD86 和 CD40 的表达。结果 体外构建 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>可以诱导 DCs 成熟,表现为 DCs 表达 CD86 和 CD40 上调,该 DCs 可以刺激全脾细胞增殖并使其产生特异性杀瘤活性,其强度明显大于 H<sub>TA</sub>。结论 体外构建 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>复合物可以诱导 DCs 成熟,该 DCs 可以激活脾细胞产生较强的特异性抗肿瘤效应。

**关键词:**热休克蛋白 70;树突状细胞;肿瘤疫苗;抗癌效应

中图分类号:R730.5 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)01-0083-03

## 0 引言

热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)是细胞受到应激时新合成或合成增加的一组蛋白质,被称为分子伴侣,在细胞抗原的加工和提呈方面起重

要作用<sup>[1]</sup>。分枝杆菌 HSPs 与相关抗原形成融合蛋白可诱导特异性 T 细胞反应,分枝杆菌 HSP70 富含 T、B 细胞表位,是细胞免疫的重要靶点,可被用来作为疫苗的载体<sup>[2]</sup>。现已证明,从肿瘤细胞来源的 HSPs-肿瘤肽复合物可诱导抗肿瘤免疫应答<sup>[3,4]</sup>,HSP70<sub>BCG</sub>能通过树突状细胞(Dendritic cell, DC)表面 TLR4 途径诱导 DC 成熟<sup>[5]</sup>。本实验采用榄香烯处理的 Hca-F 肿瘤抗原(Tumor antigen of Hca-F treated with elemene, H<sub>TA</sub>)在体外与卡介苗热休克蛋白 70(HSP70<sub>BCG</sub>)构建成肿瘤疫苗 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>,探讨其抗癌效应及机制。

收稿日期:2005-11-24;修回日期:2006-09-12

基金项目:教育部高等学校骨干教师资助计划

作者单位:1. 116011 辽宁大连医科大学附属第一医院血液科;2. 大连医科大学肿瘤生物治疗研究所,3. 诊断学实验中心

作者简介:孙光(1962-),男,博士,教授,主要从事恶性肿瘤的生物治疗

### 1 材料

#### 1.1 实验动物与瘤株

BALB/C 近交系小鼠,引自中国医学科学院北京药物研究所。Hca-F 肝癌细胞株由本校凌茂英教授惠赠。L<sub>929</sub> 小鼠成纤维细胞瘤细胞系,由中国医学科学院肿瘤研究所张友会教授惠赠。

#### 1.2 主要试剂

RPMI 1640 (GIBCO, USA);胎牛血清、rmr-IL-4、rmr-GM-CSF (Sigm); FITC-抗小鼠 CD40、PE-抗小鼠 CD86 抗体 (San Diego, CA); ADP (Trinity Biotech, Ireland)。

### 2 方法

#### 2.1 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>的体外构建

按本室常规方法制备榄香烯复合瘤苗,细胞浓度调至 1 × 10<sup>8</sup>/ml,用电动匀浆器研磨制成细胞匀浆,超速离心100 000g,取上清组分为粗制肿瘤抗原(H<sub>TA</sub>)。超声碎 BCG 菌,超速离心后取上清,用 ADP 亲和层析法<sup>[6]</sup>分离卡介苗 HSP70,提取物经 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 鉴定。分别用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。按比例将两类成分混合加 ADP,使之相互作用形成复合物。

#### 2.2 DC 的诱导及冲激

按本室常规方法获得小鼠骨髓细胞,用含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640(含 20ng/ml IL-4 和 20ng/ml GM-CSF) 培养液将其浓度调到 1 × 10<sup>6</sup>/ml,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,第 3 天换液,第 6 天收集不粘附细胞为骨髓树突状细胞(不成熟树突状细胞),将其浓度调至 1 × 10<sup>6</sup>/ml,分别加入 HSP70<sub>BCG</sub>、H<sub>TA</sub>、H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>至终浓度 25μg/ml,培养 24h,收集细胞做细胞表型分析和冲激全脾细胞。

#### 2.3 DC 对全脾细胞的刺激作用

按本室常规方法获取全脾细胞,全脾细胞浓度调至 4 × 10<sup>6</sup>/ml,不同处理的 DC 浓度为 4 × 10<sup>5</sup>/ml,各取 100μl 加入 96 孔板培养,于 72h 以 MTT 法测定增殖活性,以刺激指数为指标,其计算公式为:刺激指数(SI) = 实验组 OD<sub>595</sub> / 对照组 OD<sub>595</sub>

#### 2.4 刺激后的脾细胞的细胞毒活性

将不同处理的 DC(浓度为 4 × 10<sup>5</sup>/ml)与全脾细胞(浓度为 4 × 10<sup>6</sup>/ml)共同培养 5 天,收集该细胞为效应细胞,细胞浓度调为 4 × 10<sup>6</sup>/ml,以 Hca-F、L<sub>929</sub> 为靶细胞,细胞浓度调为 4 × 10<sup>5</sup>/ml,各取 100μl 加入 96 孔板(E<sub>T</sub> = 10<sup>1</sup>),并设单纯效应细胞和靶细胞组,培养 72h,在终止实验前 4h,加 MTT(5μg/ml) 20μl,于 OD<sub>595</sub> 测光密度值,计算细胞

毒效应:细胞毒效应(%) = [1 - (OD<sub>E+T</sub> - OD<sub>E</sub> / OD<sub>T</sub>)] × 100%

#### 2.5 统计学处理

实验数据均用( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 11.5 软件处理,进行 *t* 检验。

### 3 结果

#### 3.1 DC 经 HSP70<sub>BCG</sub>、H<sub>TA</sub>、H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>冲激后表型的变化

骨髓细胞经 GM-CSF 和 IL-4 诱导 6 天获得 DC(不成熟 DC),该 DC 经 HSP70<sub>BCG</sub> 和 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>冲激后,其表面 CD86、CD40 表达上调,但 H<sub>TA</sub>冲激仅 CD86 上调,对 CD40 影响不大,见图 1。

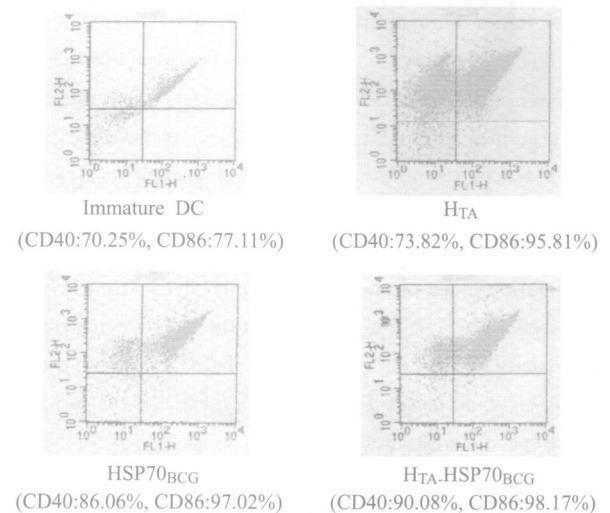


图 1 DCs 的 CD86 和 CD40 的表达

#### 3.2 冲激后的 DC 对脾淋巴细胞的刺激作用

将不同 DC 与小鼠脾淋巴细胞培养 3 天, H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>和 HSP70<sub>BCG</sub>冲激的 DC 加脾细胞组的增殖指数大于 H<sub>TA</sub>冲激的 DC 加脾细胞组 (*P* < 0.05), 见表 1。

表 1 全脾细胞与不同 DC 培养 72h 时的细胞增殖活性测定

Treatment	Stimulation Index (SI ±SD)
H <sub>TA</sub>	1.21 ±0.14
HSP70 <sub>BCG</sub>	1.78 ±0.10*
H <sub>TA</sub> -HSP70 <sub>BCG</sub>	1.88 ±0.07*

*P* > 0.05, compared with control; \* *P* < 0.05, compared with H<sub>TA</sub>

#### 3.3 刺激后脾细胞的细胞毒作用

脾淋巴细胞经 H<sub>TA</sub>冲激的 DC 刺激后,对 Hca-F 和 L<sub>929</sub> 细胞无明显杀伤作用(与各自对照相比 *P* > 0.05), HSP70<sub>BCG</sub>冲激的 DC 致敏的脾淋巴细胞均能杀伤 Hca-F 和 L<sub>929</sub> 细胞(与各自对照相比 *P* <

0.01)。而经 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>复合物冲激的 DC 刺激的脾细胞对 Hca-F 细胞有较强的杀瘤活性(与对照和 H<sub>TA</sub>相比  $P < 0.01$ ),对 L<sub>929</sub>细胞仅有微弱的杀伤活性(与对照和 H<sub>TA</sub>相比  $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 DC 刺激的全脾细胞的细胞毒作用

Groups	Cytotoxicity (%)	
	Hca-F	L <sub>929</sub>
Control	12.38 ±2.33	30.53 ±2.71
H <sub>TA</sub>	15.12 ±1.79	30.29 ±3.11
HSP70 <sub>BCG</sub>	47.66 ±4.13 **	51.97 ±4.65 **
H <sub>TA</sub> -HSP70 <sub>BCG</sub>	49.08 ±3.15 **	38.57 ±3.78 *

$P > 0.05$ , compared with control; \*  $P < 0.05$ , compared with control and H<sub>TA</sub>; \*\*  $P < 0.01$ , compared with control and H<sub>TA</sub>

#### 4 讨论

肿瘤细胞由于主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC)- 类分子表达低下及共刺激分子的缺乏,导致自身提呈抗原能力低下,肿瘤特异性 T 细胞的激活必需依赖于抗原提呈细胞的帮助。DC 是体内最重要的抗原提呈细胞,能够有效摄取、加工肿瘤抗原,再经 MHC- 类分子、MHC- 类分子提呈给 T 细胞使之激活,产生特异性的抗肿瘤免疫反应<sup>[7]</sup>,它在免疫系统中占有中心枢纽的作用<sup>[8]</sup>。肿瘤抗原肽是一类小分子物质,难以被 DC 捕获。热休克蛋白作为一种分子伴侣,可以结合抗原肽,在 DC 膜表面有其高亲和力受体,可将抗原肽提呈给 DC<sup>[9]</sup>。这些发现为在体外构建肿瘤抗原肽—热休克蛋白疫苗提供了理论基础。

我们从榄香烯处理的 Hca-F 肝癌细胞提取肿瘤抗原 (H<sub>TA</sub>),从卡介苗中提取 HSP70 (HSP70<sub>BCG</sub>),根据 HSP70 与蛋白质/多肽结合与解离的特性,在 H<sub>TA</sub> 与 HSP70<sub>BCG</sub>混合物中加入 ADP 使它们形成 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>复合物,以期 HSP70<sub>BCG</sub>能将 H<sub>TA</sub>提呈给 DC,再由 DC 将 H<sub>TA</sub>加工、处理后提呈给 T 细胞,并使之激活,产生特异性杀瘤效应。结果显示, H<sub>TA</sub> 与 HSP70<sub>BCG</sub>结合成复合物 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>后,可以诱导 DC 成熟,表现为 CD86 和 CD40 的上调,该 DC 可进一步活化淋巴细胞,使淋巴细胞产生增殖反应并诱导出杀瘤活性,在体外证实了 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>抗肿瘤的有效性。选择肿瘤抗原肽携带物具有重要意义, HSPs 是一组进化上高度保守的蛋白质,是病原微生物的重要抗原之一,可为宿主的免疫系统识别,是一个较为理想的抗原肽携带物。卡介苗 (BCG) 在临床上早已广泛用于结核

病的预防和肿瘤的非特异性免疫治疗,其安全性和有效性均有保障,因而 HSP70<sub>BCG</sub> 优于其他微生物来源的 HSPs。HSP70<sub>BCG</sub>组淋巴细胞对 Hca-F 和 L<sub>929</sub>细胞均产生较强的细胞毒性,其机制可能在于 HSP 可起超抗原的作用,把抗原直接提呈给 T 细胞,使其活化、增殖、发挥细胞毒功能<sup>[10,11]</sup>,是一种非特异性的免疫应答。而 H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>对 Hca-F 细胞有较强的杀伤能力,对 L<sub>929</sub>细胞有微弱的杀伤能力,其机制可能由于 HSP70<sub>BCG</sub>结合了 Hca-F 细胞中的肿瘤抗原肽所引起的特异性免疫应答(这是主要方面),不排除由于该复合物中含有 HSP 引起一定程度的非特异性的免疫应答成分, H<sub>TA</sub>-HSP70<sub>BCG</sub>组对 Hca-F 细胞有较强的杀伤能力及对 L<sub>929</sub>细胞有微弱的杀伤能力(明显低于 HSP70<sub>BCG</sub>组)支持此推断。该机制不仅为 HSP70<sub>BCG</sub>的非特异性抗瘤机制提供实验室依据,还为应用 HSPs 作为载体在体外构建具有 MHC 非限制性的 HSP 多肽疫苗,诱导机体特异性免疫打下理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Wells AD, Malkovsky M. Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view [J]. Immunology Today, 2000, 21 (3): 129-132.
- [2] Tamura Y, Pong P, Liu K, et al. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations [J]. Science, 1997, 278(5335): 117-120.
- [3] 王洪琦, 张正, 赵燕平. 热休克蛋白在肿瘤应用基础领域中的研究进展 [J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23 (1): 93-95.
- [4] 朴花, 金梅, 祁连英, 等. 榄香烯复合疫苗的 HSP70 表达及其主动免疫预防效应 [J]. 上海免疫学杂志, 2002, 22 (4): 230-234.
- [5] Berwin B, Nicchitta C V. To find the road traveled to tumor immunity: the trafficking itineraries of molecular chaperones in antigen presenting cells [J]. Traffic, 2001, 2 (10): 690-697.
- [6] Peng P, Menoret A, Srivastava P K. Purification of immunogenic heat shock protein70-peptide complexes by ADP-affinity chromatography [J]. J Immunol Methods, 1997, 204 (1): 13-21.
- [7] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity [J]. Nature, 1998, 392(6673): 245-252.
- [8] Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, et al. Ikkepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway [J]. Nat Immunol, 2003, 4 (5): 491-496.
- [9] Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, et al. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin [J]. Immunity, 2001, 14 (3): 303-313.
- [10] Rhodes SG, Buddle BM, Hewinson RG, et al. Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease [J]. Immunology, 2000, 99 (2): 195-202.
- [11] Multhoff G, Pfister K, Gehrman M, et al. A 14-mer HSP70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity [J]. Cell Stress Chaperones, 2001, 6 (4): 337-344.

[编辑:安 凤]