

rhHSP70联合冻融抗原修饰树突状细胞诱导的抗乳腺癌作用*

李 斌^① 陈 鹏^② 郑建云^③

摘要 目的:利用 rhHSP70 联合树突状细胞递呈肿瘤抗原的特性提高细胞毒 T 淋巴细胞(CTLs)对乳腺癌细胞的杀伤活性。**方法:**外周血单个核细胞体外经 GM-CSF 和 IL-4 诱导产生树突状细胞,负载冻融抗原肽的同时加入新型热休克蛋白(rhHSP70),不同分组分别诱导自体 CTLs 产生。ELISA 测定 CTLs 杀伤活性和细胞因子的分泌。**结果:**冻融抗原肽致敏的 DCs 促进 CTLs 增殖,上调 CTLs 中 CD3⁺和 CD8⁺T 细胞群及 Th1 型细胞因子的分泌;体外实验中具有对人乳腺癌细胞 MCF-7 的杀伤活性,在加入 rhHSP70 后效果更加明显,并能显著增强 CTLs 对肿瘤细胞的杀伤率。**结论:**rhHSP70 联合肝癌冻融抗原修饰 DCs,能够促进 DCs 的成熟,增强 DCs 刺激淋巴细胞增殖的能力,诱导的 CTLs 在体外对乳腺癌细胞能产生高效杀伤力。rhHSP70 增强 DCs 抗肿瘤能力的机制可能与其促进 DCs 成熟有关。

关键词 乳腺癌 T 淋巴细胞 热休克蛋白 树突状细胞 肿瘤裂解物

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.15.003

Specific anti-tumor immune responses of dendritic cells pulsed with recombinant human rhHSP70 and freeze-thaw cellular lysates derived from breast cancer

Bin LI¹, Peng CHEN², Jianyun ZHENG¹

¹Department of Surgical Oncology, The Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, China

²Department of Biochemistry, Xi'an Medical College, Xi'an 710021, China

³Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, China

This work was supported by the grants from the Shaanxi Province Education Department Foundation (No. 2010JK806) and Xian Medical College Foundation (No. 2007FZ11).

Abstract Objective: This work aims to use the characteristics of dendritic cells (DCs) pulsed with recombinant human HSP70, which can present and process tumor antigens, to enhance the killing activity of cytotoxic t lymphocytes (CTLs) against breast neoplasms. **Methods:** Autologous DCs were isolated from peripheral blood mononuclear cells and then stimulated in vitro with granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interleukin-4. The DCs were loaded with A549 tumor cell freeze-thaw lysate, and rhHSP70 was added as an immune adjuvant. The specific groups were subjected to tumor-specific cytotoxic assay, enzyme-linked immunosorbent assay, and fluorescence-activated cell sorting. **Results:** DCs pulsed with A549 tumor cell lysate enhanced the growth expansion of CTLs, upregulated CD40 and CD80 populations in CTLs, and augmented Th1 cytokines. In addition, the cytotoxicity of specific CTLs against A549 was highly enhanced. The above indications became more obvious after the addition of rhHSP70. **Conclusion:** DCs pulsed with freeze-thaw cell lysates derived from breast cancer can enhance growth expansion of lymphocytes. They may serve as an effective tumor antigen to stimulate the proliferation of specific CTLs, which are very effective in activating specific T-cell responses against breast cancer cells in vitro. The improved anti-tumor immunity response by DC-based vaccines may be related to the maturation of the DCs promoted by rhHSP70.

Keywords: breast cancer, T lymphocytes, heat shock protein, dendritic cell, tumor lysate

乳腺癌是危害妇女健康的主要恶性肿瘤,占女性全部肿瘤的 18%。人们一直在努力发展新的治疗策略以降低乳腺癌的复发和转移,提高患者生活质量并可能延长乳腺癌患者的生存期^[1]。免疫治疗是近年来发展迅猛的治疗措施,主要目的在于诱导和提高免疫反应来杀伤肿瘤细胞。树突状细胞(dendritic cells, DCs)可高效递呈抗原且具有诱导初始免

疫反应对抗肿瘤的能力。目前动物实验^[2]和临床试验^[3]显示基于树突状细胞的疫苗能诱导抗肿瘤特异性 T 细胞反应使肿瘤消退。本研究利用树突状细胞这一特点诱导产生的细胞毒 T 淋巴细胞(CTLs)在体外实验中具有对人乳腺癌细胞 MCF-7 明显的杀伤活性,特别是在加入免疫佐剂新型热休克蛋白后效果更加明显。

作者单位:①西安医学院附属医院肿瘤外科(西安市 710077);②西安医学院生化教研室;③西安医学院附属医院病理科

*本文课题受陕西省教育厅课题(编号:2010JK806)和西安医学院校级课题(编号:2007FZ11)资助

通信作者:李斌 lichenchang@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 重组粒细胞巨嗜细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)购于美国先灵葆雅公司;重组人白细胞介素4(rhIL-4)购于美国Promega公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠抗人单克隆抗体CD1a、CD40、CD83、HLA-DR均购于美国Pharmingen公司;人IL-12、TNF- α 、IL-2和新型热休克蛋白rhHSP70购于深圳晶美生物工程有限公司;淋巴细胞分离液(Histopaque, 1.077 μ g/mL)及四甲基偶氮唑盐(MTT)购于天津灏扬生物有限公司。

1.1.2 肿瘤细胞系 人乳腺癌细胞系MCF-7细胞系购于中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 方法

1.2.1 DCs的培养 健康女性志愿者,流式取静脉血100 mL,分离单个核细胞(PBMC),培养获得贴壁的DC前体细胞,接种于96孔细胞培养板中培养。吸弃未贴壁的PBMC待用(供分离淋巴细胞用),贴壁细胞内按rhGM-CSF 50 μ g/mL, rhIL-4 10 μ g/mL终浓度加入细胞因子。隔天加细胞因子(首次浓度的半量)并半量换培养液,培养6 d,收集细胞的细胞即为未致敏DCs,台盼蓝染色,计数。进一步通过形态学、流式细胞仪及混合淋巴细胞反应进行鉴别。

1.2.2 人乳腺癌MCF-7细胞冻融抗原的制备 乳腺癌MCF-7细胞常规培养,细胞悬液装冻存管,快冻慢融反复5次,肿瘤细胞裂解物加入15 mL Falcon离心管,1 500 r/min离心20 min,收取上清。倍比稀释后用BCA法测定蛋白浓度,并于-80 $^{\circ}$ C保存作为抗原备用。

1.2.3 DCs的修饰 于培养的第6天收集上述DCs培养上清液用于检测细胞因子。并将DCs分为4组(DCs的终浓度为 5×10^5 /mL)。A组:单独DCs;B组:DCs+冻融抗原(Ag);C组:DCs+冻融抗原Ag+rhHSP70;D组:DCs+rhHSP70。所加肿瘤冻融抗原蛋白浓度为100 μ g/mL, rhHSP70浓度为1 mg/mL。于6孔板中继续培养24 h,第8天分别收集4组DCs,部分用于下一步实验,部分冻存。ELISA检测试剂盒所示方法分别检测抗原刺激前后细胞因子的分泌。

1.2.4 DCs细胞表型分析 于培养第6天及第8天即与肿瘤抗原共孵育前后24 h收获部分DCs洗涤重悬后加入FITC标记的CD1a、CD40、CD83单抗,4 $^{\circ}$ C孵育30 min,流式细胞仪检测DCs细胞表型。

1.2.5 淋巴细胞的获得及混合淋巴细胞反应 获得PBMC,培养箱中静止培养,收集不透明的培养液,含有的细胞为T淋巴细胞,细胞计数板计数。将培养8 d 6孔板内的4组DCs, PBS洗涤重悬,与T淋巴细胞按1:20置入6孔细胞培养板中混合培养48 h,收集悬浮

细胞,部分细胞加入96孔细胞培养板,每孔加入MTT,温箱育4 h,弃上清,再加入二甲基亚砷,并设对照孔,用酶标仪于570 nm波长测OD值,重复3次取平均值,分别计算各组(增殖率, Proliferation rate)。PR=(实验组OD值-对照组OD值)/对照组OD值 \times 100%

1.2.6 细胞毒实验 4组刺激培养诱导的CTLs分别同A549细胞和肿瘤细胞共培养。靶细胞 1×10^3 /孔,按不同效靶比(10:1, 20:1, 50:1)加入效应细胞,37 $^{\circ}$ C孵育24 h,加入10 μ L/孔MTT工作液(5 mg/mL),37 $^{\circ}$ C培养4 h,加入0.04 mmol/L酸化异丙醇200 μ L/孔后过夜,使其充分裂解。在酶标仪上测定各组吸光度OD值,计算其细胞杀伤率。

1.2.7 CTLs分泌Th1型细胞因子的检测 取上述不同分组的DCs诱导的CTLs上清,按ELISA检测试剂盒所示方法测定细胞因子含量。

1.3 统计学方法

用SAS 8.0软件包进行数据处理,实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 描述。单反应变量数据,用单因素方差分析(one-way ANOVA)及组间两两比较(Student-Newman-Keuls法)进行数据分析;多个反应变量数据,用单因素多元方差分析(MANOVA)及组间两两比较(Wilks' Lambda法)进行数据分析,差异水平 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DCs的产生

分离的外周血单个核细胞在显微镜下呈散在的表面光滑的球形细胞,培养24 h后可见有少数细胞悬浮;3~4 d悬浮细胞较多,聚集成团,细胞体积增大,胞体表面出现短突起;培养6~7 d时细胞体积增大明显,细胞呈集束样悬浮,长的突起增多, PBMC培养第6天及抗原刺激后细胞表型变化显示抗原刺激后CD1a、CD40、CD83分子表达明显增加,符合成熟DCs表型变化。结果显示,Ag(B组)、rhHSP70(D组)以及Ag+rhHSP70(C组)均可刺激DCs的CD1a、CD40、CD83分子表达增加,刺激强度依次为Ag+rhHSP70(C组) $>$ Ag(B组) $>$ rhHSP70(D组),组间差异有统计学意义($P<0.05$,表1,图1)。

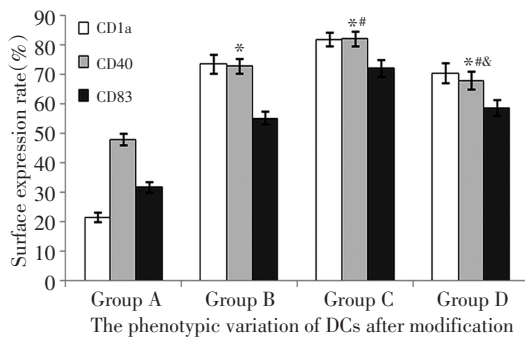
2.2 不同组别DCs对T细胞增殖作用的影响

各组DCs均可刺激淋巴细胞增殖,Ag+rhHSP70刺激的DCs(C组)刺激淋巴细胞增殖的能力最强,PR(增殖率)值大于单用Ag(B组)或rhHSP70(D组)刺激的DCs组,差异有统计学意义($P<0.05$);单用Ag(B组)或rhHSP70(D组)刺激的DCs刺激淋巴细胞增殖的能力相当,PR相近,差异无统计学意义($P>0.05$,表2,图2)。

表1 修饰DCs前后细胞表型的变化 (% , $\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Phenotypic variation of DCs after modification (% , $\bar{x}\pm s, n=10$)

Group	CD1a	CD40	CD83	Between every two groups	F	P
A(only DCs)	21.4±1.7	47.8±2.1	31.7±1.8	A vs. B	425.96	<0.0001
B(DCs+ Ag)	73.4±3.1	72.7±2.4	55.1±2.2	A vs. C	640.86	<0.0001
C(DCs+Ag+rhHSP70)	81.8±2.3	82.0±2.5	72.1±2.9	A vs. D	351.10	<0.0001
D(DCs+rhHSP70)	70.4±3.5	67.8±3.0	58.7±2.7	B vs. C	39.50	<0.0001
				B vs. D	10.97	0.0006
				C vs. D	49.70	<0.0001



Multivariate analysis of variance. Comparison between the two groups, compared with group A, * $P<0.05$; compared with group B, # $P<0.05$; compared with group C, @ $P<0.05$

图1 修饰DCs前后细胞表型的变化

Figure 1 Phenotypic variation of DCs after modification

2.3 抗原刺激前后DCs上清液中细胞因子的分泌

采用ELISA法检测不同形式刺激前后DCs培养液上清中细胞因子的变化,按照试剂盒说明书进行操作,每组实验均重复3次。结果表明,Ag(B组)、rhHSP70(D组)以及Ag+rhHSP70(C组)均可刺激DCs分泌两种细胞因子IL-12(p70)和TNF- α 的增加,与单独DCs(A组)相比,差异具有统计学意义($P<0.05$),刺激强度依次为Ag+rhHSP70(C组)>rhHSP70(D组)>Ag(B组),组间差异具有统计学意义($P<0.05$,表3,图3)。

2.4 DCs呈递肿瘤抗原诱导产生CTLs杀伤

结果显示,Ag+rhHSP70(C组)诱导的CTLs对A549细胞杀伤率高于其他三组,组间差异有统计学意义($P<0.05$);DCs(A组)与DCs+rhHSP70(D组)对A549细胞杀伤率相当,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表3 抗原冲击DCs前后细胞因子的分泌 (pg/mL, $\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Secretion of cytokines before and after vaccination with tumor antigen-pulsed DCs (pg/mL, $\bar{x}\pm s, n=10$)

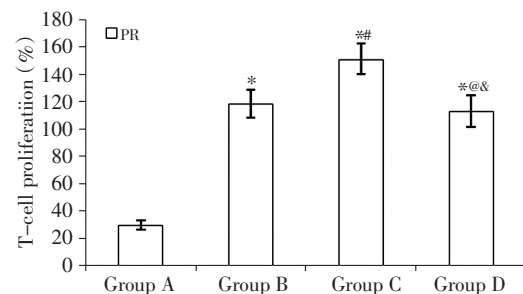
Group	IL-12	TNF- α	Between every two groups	F	P
A(only DCs)	30.9±2.0	238.6±9.3	A vs. B	8 294.68	<0.0001
B(DCs+ Ag)	155.8±6.9	1 842.6±17.5	A vs. C	25 450.30	<0.0001
C(DCs+Ag+rhHSP70)	250.9±13.7	3 049.6±32.8	A vs. D	8 162.36	<0.0001
D(DCs+rhHSP70)	177.5±6.0	1 855.5±8.7	B vs. C	4 686.29	<0.0001
			B vs. D	9.72	0.002 0
			C vs. D	4 801.85	<0.0001

rhHSP70(D组)虽可有效致敏DCs诱导特异性T细胞表型变化,但不能产生特异性杀伤,而未负载抗原的DCs(A组)也不能产生特异性杀伤,表明冻融抗原被DCs呈递,增强了免疫刺激作用,表现为对肿瘤细胞的高亲和杀伤,同时加入rhHSP70杀伤效果更为显著(图4,表4)。

表2 不同组别DCs对T细胞增殖作用的影响 (% , $\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of DCs on T-cell proliferation in various groups (% , $\bar{x}\pm s, n=10$)

Group	PR	Between every two groups	q	P
		A vs. B	-20.071	<0.000 1
A(only DCs)	29.1±3.4	A vs. C	-27.497	<0.000 1
B(DCs+ Ag)	118.2±10.3	A vs. D	-18.893	<0.000 1
C(DCs+Ag+rhHSP70)	151.1±11.2	B vs. C	-7.426	<0.000 1
D(DCs+rhHSP70)	112.9±11.4	B vs. D	1.178	0.416 9
		C vs. D	8.604	<0.000 1



The influence of DCs in different groups on the proliferation of T cells

One-way ANOVA and SNK test. Comparison between the two groups, compared with group A, * $P<0.05$; compared with group B, # $P<0.05$, @ $P>0.05$; compared with group C, & $P<0.05$

图2 不同组别DCs对T细胞增殖作用的影响

Figure 2 Effect of DCs on T-cell proliferation in various groups

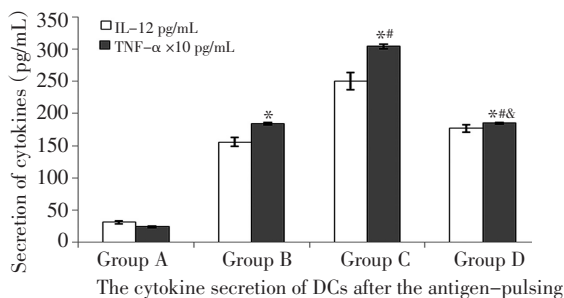


图3 抗原冲击DCs前后细胞因子的分泌
Figure 3 Secretion of cytokines before and after vaccination with tumor antigen-pulsed DCs

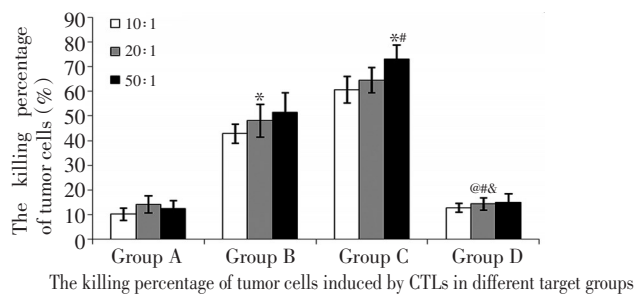


图4 不同效靶比下各组CTLs对肿瘤细胞的杀伤百分率比较
Figure 4 Comparison of percentage of CTLs' lethal effect on tumor cells among the groups based on various multiplicities of infection

表4 不同效靶比下各组CTLs对肿瘤细胞的杀伤百分率 (% , $\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Comparison of percentage of CTLs' lethal effect on tumor cells among the groups based on various multiplicities of infection (% , $\bar{x} \pm s, n=10$)

Group	10 : 01	20 : 01	50 : 01	Between every two groups	F	P
A(only DCs)	10.21±2.58	14.21±3.32	12.40±3.20	A vs. B	86.57	<0.000 1
B(DCs+ Ag)	42.94±3.85	48.17±6.60	51.55±7.95	A vs. C	199.80	<0.000 1
C(DCs+Ag+rhHSP70)	60.70±5.45	64.55±5.12	73.24±5.57	A vs. D	0.35	0.786 3
D(DCs+rhHSP70)	12.79±1.89	14.42±2.51	14.86±3.50	B vs. C	23.44	<0.000 1
				B vs. D	78.23	<0.000 1
				C vs. D	186.71	<0.000 1

3 讨论

树突状细胞是体内最强的专职抗原递呈细胞^[4-5], 具有独特的抗原递呈和免疫激发作用,是介导T淋巴细胞抗肿瘤效应的中心环节^[6]。以此为基础的肿瘤疫苗在一些肿瘤治疗中获得了较好疗效^[7-8]。使用肿瘤细胞裂解物作为肿瘤抗原的来源用于树突状细胞冲击具有许多潜在的优势:首先模仿体内生理条件下的加工过程,无须提供新鲜肿瘤细胞和体外建立肿瘤细胞系。同时也避免了为产生更有效免疫接种而去了解肿瘤抗原分子的特征^[9];肿瘤裂解物是多价抗原,可能含有未被发现的重要肿瘤表位。多价抗原负载于DCs有可能诱导CTLs多克隆放大,提高抗肿瘤作用;此法易获取和制备抗原,有较广泛的临床应用潜力^[10]。以DC为基础构建的乳腺癌DC疫苗已经取得了很大进展,部分用于临床试验也取得了较好效果^[11-12]。

本实验结果证实负载冻融抗原肽的DCs诱导的CTLs能产生特异性杀伤(杀伤率E/T=50:1时为51.55%),在加入免疫佐剂rhHSP70后,能诱导多克隆CTLs活化,从而进一步提高杀伤效果(杀伤率E/T=50:1时为73.24%)。表明rhHSP70作为分子肽的伴侣能增强DCs负载抗原的能力,促进DCs成熟,诱导

更强烈的免疫应答反应^[13]。而且诱导的T细胞培养液上清中TNF- α 、IL-12分泌增加, rhHSP70+DCs和抗原肽的DCs+rhHSP70均可明显刺激CTLs增殖, DCs培养上清中细胞因子的分泌量和T细胞培养上清中细胞因子的分泌量也显著升高。但由于rhHSP70+DCs未负载肿瘤抗原并不能产生特异性杀伤反应,而负载抗原肽的DCs则能产生特异性CTLs,说明rhHSP70增强DCs抗肿瘤能力的机制可能与其促进DCs成熟有关, rhHSP70只是发挥其免疫佐剂作用。热休克蛋白的佐剂效应正在多个临床试验中进行验证^[14-15]。HSPs/肽复合物作为肿瘤疫苗具有如下优点:含有多种肿瘤相关的异常抗原肽,有多个T细胞表位,免疫后可以激活多个CTL克隆,从而实现同一肿瘤内所有细胞产生杀伤效果的可能;抗原递呈细胞(AEC)表面存在HSP受体, nmoL水平的HSPs/肽复合物就足以诱导很强的CTL反应,因此HSPs/肽复合物的免疫剂量低;HSP本身具有免疫佐剂的作用,用作疫苗时省略了常规蛋白免疫需要添加人工赋形剂的麻烦;HSPs/肽复合物来自于患者肿瘤组织再用于免疫同一患者,避免了病毒性疾病的导入和转化DNA的传播。本文采用rhHSP70作为佐剂,在抗原致敏阶段少量加入即可产生明显的免疫

放大效应,进一步验证了rhHSP70作为免疫佐剂的应用前景。但DC相关肿瘤疫苗研究也存在不足:难以确定最佳刺激剂量,抗原成分复杂,可能诱发自身免疫性疾病,所用的抗原多肽不一定能诱导最佳的抗肿瘤免疫反应,刺激剂量难以确定等。但以DC为基础的肿瘤免疫疗法已经显现出临床应用前景,是未来抗肿瘤治疗很有前景的手段之一。

参考文献

- 1 戚晓军,赵卫红,王怀瑾.乳腺癌的分子靶向治疗研究进展[J].中国处方药,2008,73(4):82.
- 2 Wolfgang H, Elena R, Walter O, et al. Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte responses[J]. Blood, 2000, 96(5):1857-1864.
- 3 Salgaller ML. Prostate cancer immunotherapy at the dawn of the new millennium[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2000, 9(6):1217-1229.
- 4 Jones T, Stem A, Lin R. Potential role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as vaccine adjuvant[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1994, 13(2):47-53.
- 5 Jacques B, Francine B, Christophe C, et al. Immunobiology of dendritic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18(1):767-811.
- 6 Nair SK, Synder D, Rouse BT, et al. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed tumor extract[J]. Int J Cancer, 1997, 70(6):706-715.
- 7 马腾,李宝江,叶欣.树突状细胞在乳腺癌治疗中的研究进展[J].国际肿瘤学杂志,2011,38(7):521-524.
- 8 Soliman H. Developing an effective breast cancer vaccine[J]. Cancer Control, 2010, 17(3):183-190.
- 9 Cohen PA, Cohen PJ, Rosenberg SA, et al. CD4⁺T-cells from mice immunized to syngeneic sarcomas recognize distinct, non-shared tumor antigens[J]. Cancer Res, 1994, 54(4):1055-1058.
- 10 Hartman ZC, Wei J, Osada T, et al. An adenoviral vaccine encoding full-length inactivated human Her2 exhibits potent immunogenicity and enhanced therapeutic efficacy without oncogenicity[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(5):1466-1477.
- 11 Soliman H. Developing an effective breast cancer vaccine[J]. Cancer Control, 2010, 17(3):183-190.
- 12 巩新建,刘军权,李玺,等.进展期胃癌术后自身CIK细胞和树突状细胞联合治疗的临床观察[J].中国肿瘤临床,2007,34(14):803-806.
- 13 Wolfgang H, Elena R, Walter O, et al. Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte responses[J]. Blood, 2000, 96(5):1857-1864.
- 14 刘玉侠,于鸿,张振武,等.热休克蛋白70激发树突状细胞抗肝癌作用的实验研究[J].中国试验诊断学,2012(12):1969-1971.
- 15 朱传东,郑勤,张全安.树突状细胞在肿瘤免疫治疗中的应用与进展[J].实用癌症杂志,2011(01):108-110.

(2013-04-25 收稿)

(2013-06-12 修回)

(本文编辑:贾树明)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

科技论文引言的撰写要求

引言作为一篇科技论文的开篇,是向读者交代本研究的来龙去脉。科技论文的引言要求短而精,写作上要开门见山、言简意赅、突出重点。应按照以下的逻辑顺序展开:1)本研究的学术价值,主要是作者的研究目的;2)本研究的学术背景,研究的理论基础及有关研究领域里国内外学者的研究历史和现状;3)本研究的切入点和创新点,对他人的研究成果进行介绍;4)作者拟解决的关键问题。

引言的撰写应注意以下几点:1)引言的篇幅大小虽无硬性的统一规定,但应精炼,突出重点,一般应控制在1 000字以内,根据刊物字数平衡,避免内容过于简单;2)摘要已经交代清楚的内容,勿在引言中重复;3)避免描述同行熟知的、教材上能找到的基本理论或知识;4)在回顾前人的研究时,不应面面俱到,应引用“最相关”的文献以指引读者,优先引用相关研究中经典、重要、最新和最具说服力的文献;5)图、表、公式等在引言中不宜列出;6)对不常用的专门术语或缩写词,应进行解释或定义,以帮助编辑、审稿人和读者阅读稿件;7)引言的关键在最后部分,即要明确地陈述该研究的目的和假设。读者在阅读后面的内容时,会思索作者是否最终达到了预期的目的,假设是否成立?以什么研究材料和研究方法验证了这些假设?逻辑结构上是否合理?这将是整个研究是否科学、严谨的核心。