

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0090-04

肿瘤热休克蛋白 70 对荷瘤鼠 Th1 型细胞因子表达的影响

傅庆国, 孟凡东, 郭仁宣 (中国医科大学第一附属医院普外二科, 沈阳 110001)

[摘要] **目的:** 研究应用肿瘤来源的热休克蛋白 70 治疗后荷瘤小鼠外周血中几种主要 Th1 型细胞因子水平的动态变化, 探讨其打破荷瘤机体的免疫耐受、诱导抗肿瘤免疫的机制, 为其应用于治疗人类的恶性肿瘤提供有价值的参考依据。**方法:** 细胞培养、蛋白质纯化技术、电泳技术、Western-blot 法、毛细管电泳、动物实验、ELISA 等。**结果:** 肿瘤来源的热休克蛋白 70 具有明显的抑瘤作用, 并且能够诱升荷瘤小鼠外周血中几种主要的 Th1 型细胞因子(IL-2, TNF- β , IFN- γ)的水平, 随 HSP70 的应用频次增加而逐渐升高, 在最后治疗的 2 周后仍未见下降趋势, 与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.01$)。**结论:** 肿瘤来源的 HSP70 对荷瘤小鼠 Th1 型细胞因子有明确的诱升作用, 进而诱导机体产生并维持有效的抗肿瘤免疫效应, 该作用是其抗肿瘤免疫效应的一个重要方面。

[关键词] 肿瘤; 热休克蛋白; 细胞因子

[中图分类号] R730.51 [文献标识码] A

The Influence of Tumor-Derived Heat Shock Protein 70 on the Expression of Th1 Type Cytokines of Tumor-Bearing Mice

FU Qing-guo, MENG Fan-dong, GUO Ren-xuan (The Second Surgery General Department of the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the successive fluctuation of some Th1 type cytokines in the peripheral blood of tumor-bearing mice treated with tumor-derived heat shock protein 70(HSP70), explore the mechanism of HSP 70 in breaking through the tumor-immunity tolerance of the organism with tumor-burden and in inducing effective anti-tumor immune response, and provide valuable reference for tumor-derived HSP70 administration in treating human cancer. **Methods:** Cell culture, techniques for protein extraction and purification, SDS-PAGE, Western-blot, capillary electrophoresis, ELISA technique and animal experiment were applied. **Results:** HSP70 could result in apparent tumor-inhibitory effect and upregulate some Th1 type cytokines(IL-2, TNF- β , and IFN- γ) in the peripheral blood of the treated mice gradually to the frequency of HSP70 administration, and showed no reduction trend in two weeks after the final treatment. Statistically significant difference was observed contrasted with those of the control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Tumor-derived HSP70 could dramatically upregulate the Th1 type cytokines of tumor-bearing mice to trigger and maintain effective immunological activity against tumor, which is an important aspect of its anti-tumor activity.

[**Key words**] neoplasm; heat shock protein70; cytokines

* 恶性肿瘤自身能够或诱导宿主表达免疫抑制因子, 促进 Th2 型免疫漂移, 导致抗肿瘤免疫低下, 肿瘤进展加快, 加速机体的死亡。很多学者尝试用 Th1 型细胞因子的输注扭转 Th2 型漂移, 虽有一定的治疗作用, 但仍不能从根本上改变机体的免疫状态, 而且输注的细胞因子在整个免疫调节网络中不能维持长久, 且作用单一, 故疗效不理想。因此, 如何使荷瘤机体的免疫功能转向 Th1 型的抗肿瘤免疫状态是肿瘤免疫治疗中的一个重要方面; 热休克蛋白 70(heat shock pro-

tein70, HSP70)是一种分子伴侣^[1], 由于许多恶性肿瘤组织细胞表达的 HSP70 结合多种肿瘤的多肽抗原, 形成 HSP70 多肽复合物(HSP70-peptide complexes, HSP70-PC), 且动物实验证明, HSP70-PC 对荷瘤鼠有较好的治疗作用, 为研究其对荷瘤鼠几种主要 Th1 型细胞因子的诱导表达及促进 Th1 型免疫漂移效应, 作

* [基金项目] 沈阳市科委社发基金项目资助 20004903200
[作者简介] 傅庆国(1966-), 男, 沈阳市人, 讲师, 博士, 主要从事恶性肿瘤的免疫治疗及综合治疗方面研究。

者以近交系 615 小鼠及其同种的肝癌细胞株 HcaF 进行了该项研究,证明:HSP70 可促进 Th1 型细胞因子的表达,打破荷瘤机体的免疫耐受状态,促进 Th1 型免疫漂移,诱导有效的抗肿瘤免疫应答。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性近交系 615 小鼠(6 周龄)购自中国医科大学实验动物繁育中心,于中国医科大学实验动物中心饲养。

1.2 肿瘤细胞株

小鼠肝癌细胞株 HcaF 购自大连医科大学病理教研室。在 37℃,5% CO₂ 条件下,于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养、扩增。

1.3 色谱器材

Con A-Sepharose, Mono Q 柱及快蛋白液相色谱(FPLC)系统均购自瑞典 Pharmacia 公司;ADP-agarose 购自美国 Sigma 公司。

1.4 抗体

抗小鼠 HSP70 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 生物技术公司;碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.5 ELISA 试剂盒

小鼠 IL-2, IFN- γ , TNF- β 的 ELISA 试剂盒购自北京邦定泰克生物技术公司。

1.6 HcaF 肿瘤细胞中 HSP70 的纯化

将 5×10^9 个 HcaF 细胞置于 40 ml 低渗缓冲液(30 mmol/L NaHCO₃, 0.5 mmol/L 苯甲基酰磺酰氟, pH7.2)中,以超声粉碎机破碎,4℃ 100 000 g 超速离心 2 h,取上清过 ConA-Sepharose 柱,收集未结合组分,4℃ 缓冲液 A(20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L NaCl, 15 mmol/L β -巯基乙醇,3 mmol/L MgCl₂, pH7.5)中透析过夜,然后将样品加到 ADP-agarose 柱上,用含 3 mmol/L ADP 的缓冲液 A 进行洗脱,将洗脱液加于 Mono Q 柱,用 FPLC 系统进行分离,200 ~ 500 mmol/L 梯度 NaCl 洗脱,分别收集各洗脱峰蛋白,4℃ 缓冲液 B(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5)中透析过夜。

1.7 HSP70 分子量测定及免疫印迹分析

将各色谱柱分离的样品及 Mono Q 柱的各洗脱峰样品在 10% SDS-PAGE 上进行分子量及纯度测定,银染色,再转印至硝酸纤维素膜上,以抗 HSP70 单抗为一抗,碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 IgG 为二抗,进行免疫印迹(Western-blot)分析,再以毛细管电泳进行纯度分析。

1.8 HSP70-PC 对荷瘤鼠 Th1 型细胞因子的诱升作用

动物分组:取近交系 615 小鼠 40 只,每组 5 只,分为实验对照组(1~3 组)、治疗组(4~8 组)。每组均于左背部皮下接种活的 HcaF 细胞 1×10^6 个/只,活细胞率 > 96%。1 周后,治疗组于右腋部皮下注射 HSP70 10 μ g(0.1 ml)每周 1 次,实验对照组皮下注射 PBS 0.1 ml。每周处死 1 组小鼠取血,测量血清中 IL-2, TNF- β 及 IFN- γ 的浓度。1 组:接种肿瘤后 1 周;2 组:接种肿瘤后 2 周;3 组:接种肿瘤后 3 周;4 组:HSP70 10 μ g 治疗 1 次后 1 周;5 组:HSP70 10 μ g 治疗 2 次后 1 周;6 组:HSP70 10 μ g 治疗 3 次后 1 周;7 组:HSP70 10 μ g 治疗 4 次后 1 周;8 组:HSP70 10 μ g 治疗 4 次后 2 周。

2 结果

2.1 HSP70 的纯化

经过 2 次亲和层析和 Mono Q 柱的分离后,得到纯度较高的分子量约为 70 kD 的蛋白质,经免疫印迹分析证实该蛋白质即为 HSP70(图 1)。经毛细管电泳分析纯度达 100%(图 2)。

图 1 HSP70 的 SDS-PAGE 及 Western-blot 结果

Fig. 1 SDS-PAGE and Western-blot of HSP70

M: Marker; 1: After ADP-agarase chromatography;

2: After Mono Q chromatography; 3: Western-blot of the protein

图 2 提取的 HSP70 纯度的毛细管电泳分析

Fig. 2 Purity analysis of extracted HSP70

by capillary electrophoresis

2.2 HSP70-PC 的抑瘤作用及对 Th1 型细胞因子表达的影响

小鼠在接种肿瘤细胞后,所有对照组的肿瘤生长迅速,实验对照组于 3 周内全部死亡,而应用 HSP70-PC 治疗后,肿瘤生长明显被抑制,且无一出现腹水,且有 1 只小鼠在 4 次治疗后 1 周肿瘤已完全消退(表 1),抑瘤作用与对照组相比差异显著($P < 0.01$)。

接种肿瘤细胞后,小鼠体内 IL-2, TNF- β , IFN- γ 水平逐渐下降,至死亡时下降至最低点,但应用 HSP70 治疗后,各细胞因子水平均开始上升,其中 IL-2, TNF- β 在第 1 次治疗后即逐渐升高,随治疗的频率增加持续上升,IFN- γ 在第 2 次治疗后开始上升。且这些细胞因子的水平在用 HSP70-PC 第 4 次治疗后仍未见下降(表 2),与对照组相比差异具有显著性($P < 0.01$)。

表 1 10 μ g HSP70 对荷瘤小鼠的治疗作用
Tab. 1 Therapeutic effect of 10 μ g HSP70 to the tumor-bearing mice

Items	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
Tumor size ($\bar{x} \pm s$ cm)	0.81 \pm 0.52	1.53 \pm 0.21	1.94 \pm 2.17	0.42 \pm 0.18	1.03 \pm 0.39	0.92 \pm 0.47	0.63 \pm 0.33	0.24 \pm 0.12
Tumoe weight ($\bar{x} \pm s$ g)	0.93 \pm 0.47	2.54 \pm 1.38	3.58 \pm 2.71	0.04 \pm 0.02	1.07 \pm 0.33	0.97 \pm 0.53	0.058 \pm 0.039	0.019 \pm 0.010
Incidence of ascites (%)	—	60	100	—	—	—	—	—
Mean survival time ($\bar{x} \pm s$ d)	killed	killed	19.4 \pm 3.1	killed	killed	killed	killed	6 week (killed)

Therapeutic groups vs control groups $P < 0.01$

表 2 HSP70 对荷瘤鼠细胞因子的影响($\bar{x} \pm s$ pg/ml)
Tab. 2 The effect of HSP70 to cytokines of tumor-bearing mice ($n = 5$)

Cytokines	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
IL-2	42.3 \pm 3.5	32.1 \pm 4.5	26.3 \pm 0.5	28.2 \pm 2.5	32.3 \pm 3.5	52.3 \pm 3.9	60.3 \pm 7.5	78.9 \pm 9.5
TNF- β	51.3 \pm 6.1	41.3 \pm 6.0	21.3 \pm 3.0	45.3 \pm 3.8	55.2 \pm 6.36	67.2 \pm 3.8	77.2 \pm 5.6	102.3 \pm 9.7
IFN- γ	70.2 \pm 9.6	66.9 \pm 7.6	23.3 \pm 3.4	36.6 \pm 5.6	80.3 \pm 6.5	105.5 \pm 8.5	110.5 \pm 6.5	128.9 \pm 12.3

3 讨论

机体的免疫功能状态对肿瘤的发生、发展及预后具有重要影响,由于进展期的肿瘤能通过多种机制抑制机体的免疫功能,所以肿瘤能够进展较快,而至晚期,宿主的免疫功能十分低下。肿瘤免疫治疗的核心是如何使机体产生有效的抗肿瘤免疫,打破免疫耐受或抑制状态,产生对肿瘤细胞的免疫杀伤,抑制肿瘤的进展甚至根除肿瘤。大量的研究证明^[2-3],肿瘤细胞自身或/及通过介导激活免疫抑制细胞分泌免疫抑制因子,促进免疫功能向 Th2 型漂移。Th1 型细胞因子分泌减少,是机体抗免疫功能下降的一个重要原因,通过向荷瘤宿主体内输注 Th1 型细胞因子,可缓解 Th1 型细胞因子的减少,在一定程度上提高抗肿瘤免疫效应,但无助于从根本上逆转 Th2 型漂移状态,故治疗效果不显著。随着肿瘤特异性抗原的发现及研究的深入,很多学者研究证明,诱导机体产生主动的抗肿瘤免疫功能有助于打破抗肿瘤免疫耐受或抑制,促进 Th1 型漂移。

肿瘤细胞表达的 HSP70-PC 结合着肿瘤的多肽抗原,作者的研究证明,HSP70-PC 不但能够赋予健康小鼠较强的特异性抗肿瘤保护作用,而且对荷瘤动物亦有明确的治疗作用。

本研究中,小鼠在接种肿瘤细胞后,其 IL-2, TNF- β , IFN- γ 水平逐渐下降,至死亡时下降至最低点,表明肿瘤进展后,机体的免疫功能处于 Th2 型漂移状态,对肿瘤耐受或抗肿瘤免疫被抑制,但应用 HSP70-PC 治疗后,各细胞因子水平均开始上升,其中用 IL-2, TNF- β 在第 1 次治疗后即逐渐升高,随治疗的频率增加持续上升,用 IFN- γ 在第 2 次治疗后开始上升。这些细胞因子水平的提高提示:1)HSP70 能够激活机体的免疫系统产生抗肿瘤效应,刺激 Th1 型细胞因子的分泌,产生对肿瘤细胞的免疫杀伤,治疗组小鼠的肿瘤生长受到抑制;2)IL-2, TNF- β 在免疫诱导期即开始表达,而 IFN- γ 在免疫应答期增高,IFN- γ 一般由活化的 T 淋巴细胞分泌,所以 IFN- γ 水平的升高,证明了 HSP70-PC 对 T 淋巴细胞的活化和抗肿瘤免疫效应的产生。

IL-2, TNF- β , IFN- γ 本身既具有很强的抗肿瘤活性, 并且能调节免疫系统, 促进 T 淋巴细胞的增殖、分化, 增强免疫效应细胞的杀伤功能, 促进肿瘤细胞表达 MHC 分子等。

用 HSP70-PC 治疗后, 荷瘤小鼠的肿瘤生长缓慢, 于第 4 次治疗 1 周后, 有 1 只小鼠的肿瘤完全消退, 而且治疗组细胞因子的水平较对照组明显升高, 证明 HSP70-PC 已完全激活机体的免疫系统, 打破了肿瘤产生的免疫抑制状态, 产生了对肿瘤细胞的杀伤, 有效地抑制了肿瘤的进展。

其他抗原(如 BCG 等)也能够促进 Th1 型细胞因子的表达, 但不能产生 HSP70-PC 所诱导的特异性抗肿瘤免疫作用, 因 HSP70-PC 能够诱导产生肿瘤特异性的细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)^[4], 这些活化的 CTL 对肿瘤细胞的杀伤是其抗肿瘤作用的主要机理, 当然诱导 Th1 型细胞因子的产生也是其机理的一个重要方面, 本研究进一步证明肿瘤来源的 HSP70-PC

是一有良好作用的抗肿瘤免疫制剂, 能够诱发机体产生特异性的抗肿瘤免疫效应^[5], 促进 Th1 型细胞因子的表达, 打破荷瘤机体的免疫耐受状态, 全面地激活免疫系统而产生良好的治疗作用。本研究对于应用 HSP70-PC 治疗人类的恶性肿瘤有重要的参考意义。

[参考文献]

- [1] 魏征人. 分子伴侣疫苗抗肿瘤的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(1): 70-70.
- [2] 刘杰, 魏海明, 田志刚. Th1/Th2 漂移与抗肿瘤免疫[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1997, 24(3): 168-170.
- [3] Romagnani S. The Th1/Th2 Paradigm [J]. Immunol Today, 1997, 18(6): 263-266.
- [4] 傅庆国, 郭仁宣, 姚振宇, 等. 肿瘤热休克蛋白 70 多肽复合物诱导特异性细胞毒 T 淋巴细胞产生的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 80(4): 301-303.
- [5] 傅庆国, 郭仁宣, 宋茂民, 等. 热休克蛋白 70 诱导的抗肿瘤免疫效应与机制研究[J]. 中华现代医学杂志, 2001, 1(1): 1-5.

[收稿日期] 2001-12-06

[修回日期] 2002-02-08

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0093-01

抗原肽冲击 Angiostatin 修饰淋巴细胞对 Siha 细胞的体内外作用

张菊¹, 阎小君¹, 程虹², 李丁¹, 陈蕊¹, 赵锦荣¹(1. 第四军医大学全军基因诊断研究所, 西安 710032; 2. 第四军医大学病理学教研室)

抗原呈递不充分导致缺乏免疫应答及局部血管增生及人乳头瘤病毒 HPV 感染相关癌肿的发生发展。以 HPV16 抗原肽冲击、重组血管生长抑制因子逆转录病毒 pLXSN-Angiostatin 转染的淋巴细胞对 HPV16 阳性宫颈癌 Siha 细胞作用, 可能会提供一种新的生物治疗方法。

pBS-Angiostatin, Siha 细胞株由本室保存。PCR 引物由上海生工公司合成。HPV16L2 抗原肽由美联公司合成。采用分别酶切载体 pLXSN, pBS-Angiostatin, 回收 pLXSN 与 Angiostatin, 构建 pLXSN-Angiostatin, 转染 PA317 细胞的方法, 获重组病毒, 感染含 IL-2 的抗原肽致敏孵育诱导的淋巴细胞。对数生长期 Siha 细胞 2×10^4 /孔接种, 置 37℃, 5% CO₂ 孵箱培养, 将抗原肽致敏的重组逆转录病毒转染淋巴细胞 2×10^4 /孔接种, 使其与 Siha 细胞共培养。设未致敏及转染的淋巴细胞与 Siha 细胞共培养为阴性对照。镜下观察, 72 h 后用 MTT 法检测细胞杀伤率。同时, 新鲜传代 Siha 细胞接种裸小鼠, 瘤块长大后随机分组, 分别予瘤内注射经抗原肽冲击、重组逆转录病毒转染及未经抗原肽冲击、未转染淋巴细胞, 每只裸鼠 3 d 注射 1 次, 剂量为 10^5 /次, 共治疗 3 次, 3 d 后处死小鼠, 切取瘤组织作病理检查。结果 pLXSN-Angiostatin 构建成功, Western-blot 证实 Angiostatin 在转染淋巴细胞中获瞬间表达。重组逆转录病毒转染淋巴细胞与 Siha 细胞共培养

后, 见多数贴壁靶细胞亮度降低, 漂浮, 呈粗糙颗粒状, 淋巴细胞显著趋向集中于瘤细胞周围。以未经抗原肽冲击未转染之淋巴细胞组为对照, 细胞杀伤率达 32.6%, 有所增高。抗原肽冲击、转染淋巴细胞治疗组裸鼠肿瘤体积较其它组显著缩小, 病灶局部病理切片显示瘤组织坏死, 瘤细胞周围大量淋巴细胞浸润, 局部血管数量减少。

Angiostatin 对新生血管的特异抑制作用, 可用于肿瘤及其它伴血管增生疾病的治疗。HPV16 L2 序列 PMDTFIVSTNPNTVSSSTPI 为暴露于病毒颗粒表面的多型共同抗原活性肽。本研究将 Angiostatin 基因克隆至 pLXSN, 获重组病毒, 转染淋巴细胞, 表达 Angiostatin 蛋白, 同时以病毒抗原肽 HPV16 L2 体外致敏淋巴细胞, 分别从 2 个途径达到既加强淋巴细胞靶向性又抑制局部血管生长, 并对 HPV16 感染相关的肿瘤的杀伤及抑制的目的。我们观察到, 以病毒抗原肽 HPV16 L2 体外致敏、转染的淋巴细胞与对照组比较, 对体外培养宫颈癌细胞具有显著的趋向及杀伤作用; 体内实验证实了对局部血管生长及肿瘤的抑制作用。

[关键词] 人乳头瘤病毒抗原肽; 血管生长抑制因子; 淋巴细胞; 宫颈癌; Siha 细胞

[中图分类号] R 969.3

[文献标识码] D

[收稿日期] 2001-12-03

[修回日期] 2002-01-15