

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0133-04

热休克蛋白受体的研究进展

陈晓虹¹, 厉永建²综述, 曹雪涛², 余海¹审阅(1. 浙江大学免疫学研究所, 杭州 310006; 2. 第二军医大学免疫学研究所, 上海 200433)

[摘要] 热休克蛋白(HSP)肽复合物可以激活肿瘤特异性 CTL 反应, HSP 受体的发现为阐明其作用机理提供了有力的证据。HSP 通过与抗原提呈细胞(APC)上的受体结合而内化, 经 MHC I 类呈递途径诱导特异的抗肿瘤免疫应答。HSP 受体具有饱和性、竞争性、特异性。HSP 与树突状细胞(DC)上的受体结合后可促使 DC 成熟、分泌细胞因子和趋化因子并下调 DC 上 HSP 受体的表达。

[关键词] 热休克蛋白; 热休克蛋白受体; MHC I 类呈递途径; 抗原提呈细胞

[中图分类号] R730.3 [文献标识码] A

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一类高度保守的应激蛋白, 广泛存在于真核和原核生物体内。正常条件下, HSP 占细胞内蛋白组分的 5%, 在压力条件下, HSP 的表达可高达 15% 以上。HSP 可分为 10 个家族, 每个家族包括 1 ~ 5 个紧密相关的蛋白。主要的 HSP 家族有: 小分子 HSP 家族、HSP40 家族、HSP47 家族、Calreticulin 家族、HSP60 家族、HSP70 家族、HSP90 家族、HSP100 家族等。HSP 的功能包括参与细胞内蛋白质的折叠、装配、转运和降解, 维持细胞热耐受, 调节细胞内突变蛋白的表达等。

近年来, HSP 肽复合物激活特异性免疫应答的研究得到广泛关注。来自于肿瘤组织或病毒感染细胞的 HSP, 免疫同系小鼠后可以激活特异的抗肿瘤或抗病毒的 CTL 反应^[1,2]。进一步研究表明 HSP 的免疫特异性是由 HSP 伴随的小分子肽所决定, 甚至只需要 1 ~ 2 ng 的抗原肽就能有效地激活特异性免疫应答^[3]。将目的蛋白与分枝杆菌 HSP 融合后制成热休克融合蛋白, 同样可以激活特异的抗目的蛋白的 CTL 反应^[4]。如何解释这种高效、特异的免疫作用? 抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)表面 HSP 受体的鉴定为阐述其作用机理提供了有力的证据, HSP 通过与 APC 上的受体结合而内化, 经 MHC I 类途径将抗原肽呈递在 APC 表面, 诱导特异的抗肿瘤免疫应答。

1 HSP 肽复合物的递呈

已知外源性抗原蛋白进入机体后通常是经 MHC II 类途径呈递抗原肽。外源性抗原蛋白在内体(endosome)中被酶切成短肽片段, 与新合成的 MHC II 类分子结合, 运输到细胞膜表面, 激活 CD4⁺ T 细胞。内源性抗原蛋白(如细胞感染病毒后的病毒蛋白)通常是通过 MHC I 类分子途径呈递。内源性抗原蛋白在胞浆内产生, 由蛋白酶体(proteasome)酶切成短肽片段, 经 TAP 运输到内质网, 与 MHC I 类分子结合, 最终激活 CD8⁺ T 细胞。此外, 一些外源性抗原进入机体后, 可以由内源性抗原呈递途径而被提呈, 这种呈递方式称为交叉提呈。HSP 肽复合物对于机体免疫系统而言是外源性蛋

白, 又是如何进入 MHC I 类途径而被提呈的?

最早有关 HSP 肽复合物的递呈研究来自 Srivastava 的研究小组。以口腔疱疹病毒(VSV)转染细胞的 gp96 与小鼠的腹腔巨噬细胞(Mφ)共孵育, 后者能刺激 VSV 特异的 CTL 细胞释放肿瘤坏死因子(TNF-α), 该 CTL 能特异裂解共孵育后的腹腔 Mφ。而以 BFA(一种 Mφ 抑制剂)预处理 Mφ 后则阻断了抗原提呈, 但氯喹(抑制酸性微环境的作用)预处理 Mφ 后不影响实验结果, 提示外源性的 gp96 伴随有 VSV 表位, 通过 Mφ 细胞内非酸性小室的处理而进入内质网, 经内源性抗原呈递途径激活 CD8⁺ T 细胞, 而属于酸性小室的内体很可能不参与该过程。同时发现 gp96-VSV 八肽复合物刺激 Mφ 的作用效率是 VSV 八肽复合物的 200 ~ 400 倍, 提示 gp96 有免疫佐剂的作用^[5]。

此后, 很多研究采用标记的热休克蛋白来观察 HSP 肽复合物在 APC 上的呈递过程。金标的 gp96、HSC70 可以与 P388D1 细胞(单核细胞系)、D2SC/1 细胞(树突状细胞系)特异结合, 37℃ 进一步孵育后膜结合信号内化。同时还观察到 HSC70 并不能竞争抑制 gp96 与受体的结合, 提示 APC 上可能存在两种不同的受体, 分别与 gp96、HSC70 结合^[6]。FITC 标记的 gp96 可以与 D1 细胞(DC 细胞系)、D2SC/1 特异结合, 具有可饱和性, 可以被未标记的 gp96 竞争抑制。内化后的 gp96 定位在细胞的内体。含有 Ad5 E1B 表位的 gp96 与 DC D1 共同作用后, 后者可以刺激 Ad5 E1B 表位特异的 CTL 活化, 表明 gp96 确实是进入了 MHC I 类呈递途径。而非特异的 gp96 摄取并不导致 gp96 伴随的抗原肽进入 MHC I 类呈递途径^[7]。

Castellino 等报道 HSP70 肽复合物可以通过两条途径被呈递, 一条是依赖蛋白酶体的 TAP 转运途径, 另一条是不依赖蛋白酶体和 TAP 的由内体参与的抗原递呈途径, 最终抗原肽通过 MHC I 类途径被呈递在 APC 表面^[8]。在 Srivastava 的进一步研究中发现蛋白酶体抑制剂可以完全抑制 gp96 抗原肽的呈递, 而 TAP 缺失小鼠的 DC 则完全丧失了递呈 gp96 抗原肽的作用。因此提出 gp96、HSP90 和 HSP70 伴随的抗原

肽呈递需要蛋白酶体和 TAP 的参与^[9]。这些研究结果表明, HSP 的抗原递呈通路可能具有多样性, 但均能进入 MHC I 类呈递途径。此外有证据表明一小部分通过受体内化的 HSP 肽复合物可在酸性小室内与 MHC II 类分子结合, 激活 CD4⁺ T 细胞^[10]。

2 HSP 受体的鉴定

HSP 肽复合物能够特异地结合 APC, 提示这些细胞表面存在 HSP 受体。Castellino 报道 M ϕ 表面存在 HSP70 受体, 以过量的 HSP70-biotin 去做结合实验时, 该受体具有饱和性, 当 M ϕ 与未标记的 HSP70 预孵育后, 可以适度抑制受体与 HSP70-biotin 的结合^[8]。以 FITC 标记 gp96、HSP90 和 HSP70, 以小鼠腹腔 CD11b⁺ 细胞作为实验对象, 结果 HSP90 的结合能力是 gp96 的 5 倍, HSP70 不能抑制 FITC-gp96 与 CD11b⁺ 细胞的结合, 提示两者的受体可能是不同的。当以非固定的 CD11b⁺ 细胞进行实验时, 则观察到内化后胞内荧光的存在。由此可见 HSP 与 CD11b⁺ 细胞的作用具有典型的受体结合特性: 饱和性、竞争性、特异性^[11]。相似的结果还见于: FITC 标记的 HSP70 与 ANA-1 细胞(M ϕ 系) 的特异性结合具有可饱和性, 每个 ANA-1 细胞表面大约有 10 000 个 HSP70 受体, 同时还发现只有哺乳动物的 HSP70 可以特异性结合 ANA-1 细胞^[12]。

Binder 等确定 gp96 的受体是 CD91 分子, 也称为 α_2 巨球蛋白(α_2 M)受体。CD91 是低密度脂蛋白受体的一个相关蛋白, 包含一个 420 kD 的 α 亚单位、一个 85 kD 的 β 亚单位和一个 39 kD 紧密相关的分子。CD91 存在于 APC 表面, 直接与 gp96 结合导致 gp96 的内化。 α_2 M 和 CD91 抗体可以抑制 gp96 肽复合物的递呈^[13]。进一步研究认为 CD91 是 gp96, HSP70, HSP90 和 calreticulin 的共同受体, gp96, HSP70, HSP90 均能特异结合小鼠腹腔 M ϕ 、骨髓培养的 DC 和 RAW264.7, 单一的 HSP 的抗原递呈可以被其他的 HSP 所抑制^[9]。外源性的 HSP70 能与单核细胞特异性结合, 研究发现这种作用是由 TLR2(Toll like receptor 2)和 TLR4 所介导的^[14]。但也有研究认为 HSP70 能激活 TLR4 阴性的单核细胞来源的 DC, 在单核来源的 DC 上人 HSP70 和 HSP60 的受体是共同的^[15]。荧光标记的人 HSP60 能够与小鼠巨噬细胞系 J774A.1, RAW264.7 以及骨髓来源的巨噬细胞特异性结合, 这种结合作用具有可饱和性, 可以被非标记的 HSP60 所抑制, 但不受 gp96, HSP70, HSP90 的干扰, 表明 HSP60 的受体不同于 CD91^[16]。最近有文章报道 CD40(TNF 受体家族成员)是分支杆菌 HSP70 的受体, 而不是人 HSP70 的受体^[17], 该结果提示 CD40 对原核和真核生物 HSP70 的作用是有差异的, 不同来源的 HSP 在先天性免疫中的作用可能是不同的。在 HSP 激活细胞的过程中, 不同的 HSP 可能通过不同的受体而发挥作用。除了 APC 外, HSP 也可能与其它细胞相互作用。因此对 HSP 受体的研究仍然有待于进一步的深入探讨。

从热休克融合蛋白同样可以诱导特异的抗目的蛋白的 CTL 反应, 推测其作用模式与 HSP 肽复合物很可能是相似的,

也是通过 HSP 受体介导而内吞, 但尚需要进一步的实验证实。

3 HSP 与受体作用后的细胞效应

3.1 诱导 DC 成熟

已知 DC 的成熟可以被 LPS、细菌或病毒、CpG 寡核苷酸、CD40 配体等信号分子所诱导, 那么 HSP 是否也具有相似的功能? Singh-Jasuja 等报道 gp96 可以诱导人 DC 的成熟, 如上调 CD86、CD83 分子的表达。gp96 同样可以诱导鼠 DC 的成熟, 上调 CD86 和 MHC II 类分子的表达, 并诱导分泌 IL-12、TNF- α 。激活后成熟的 DC 不能进一步被 gp96 所活化, 提示 gp96 受体表达下调, 活化后的 DC 可以有效地刺激 T 细胞增殖^[18]。HSP70 也可促使不成熟 DC 更有效地摄取抗原, 最终激活 T 细胞。

细胞的坏死可将胞内物质(包括 HSP)释放到细胞外环境, 当不成熟 DC 暴露于坏死细胞的环境中时可以被有效地激活, 提示不成熟 DC 可能通过与 HSP 的作用而成熟, 而凋亡细胞的外环境不能激活 DC^[19]。在动物模型中发现因凋亡而消退的肿瘤对肿瘤细胞再次攻击的保护作用弱于因坏死诱导的肿瘤消退。当易凋亡的肿瘤细胞转染了 Bcl-2 后, 可观察到 HSP70 的表达水平升高, 细胞由凋亡的死亡模式进入坏死^[20]。相似报道还见于坏死细胞可以释放 HSP, 激活 M ϕ 和骨髓来源的 DC, 使其分泌细胞因子, 上调共刺激分子, 激活 NF- κ B 通路^[21]。但是没有直接的证据表明坏死细胞的上清可以激活 M ϕ 和骨髓来源的 DC。另外还存在一些相反的研究结论, 如认为 DC 的激活与细胞的死亡方式无关, 只与支原体的污染有关^[22]。Albert 等则报道不成熟 DC 可以有效地摄取凋亡小体并促使 DC 成熟^[23]。

3.2 分泌细胞因子和趋化因子

HSP 与受体结合后可诱导细胞因子的产生, 如 HSP70 与 DC 作用后可诱导 IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 的产生^[24]。人 HSP60 与外周血单核细胞共培养后诱导分泌 IL-6, 而 CD14 抗体可阻断该过程, 提示 CD14 参与信号激活过程^[25]。人 M ϕ 细胞与 HSP60 作用后诱导 IL-12、IL-15、TNF- α 的产生, 鼠 M ϕ 细胞与 HSP60 作用后则分泌 TNF- α 和 NO^[26]。HSP70 和 HSP65 还可以刺激 DC 分泌 β 趋化因子 RANTES, MIP-1 β , MIP-1 β ^[27]。

3.3 激活信号传导通路

一部分研究表明 HSP 的信号传导涉及 CD14、NF κ B、TLR4 等。将人单核细胞与 HSP70 孵育后可引起钙内流、NF- κ B 通路激活, 细胞分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 。以 CD14 转染野生型 U373 细胞后再与 HSP70 作用, 结果发现 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 分泌增加, 表明 CD14 信号传导通路参与 HSP70 的激活^[28]。在 Ohashi 的研究中发现 HSP60 可以激活野生型 C3H/HeN 小鼠的 M ϕ , 而 TLR4 点突变的 C3H/HeJ 小鼠的 M ϕ 则不能被 HSP60 激活, 提示 TLR4 参与 HSP60 的信号传导过程^[29]。

热休克融合蛋白同样可以刺激不成熟 DC 上调 MHC I、MHC II 和共刺激分子 B7.2 的表达, DC 与热休克融合蛋

白孵育过夜后再与 2C T 细胞作用,可引起细胞表达 CD69,分泌 IL-2、IFN- γ ,刺激 T 细胞增殖。当以 CD4 细胞缺陷的小鼠,或 CD4 抗体封闭的小鼠重复实验时,对结果并无影响,表明该特异性免疫反应不依赖 CD4⁺T 细胞的参与^[4]。

4 HSP 激活免疫系统的作用机理

Matzinger^[30]的免疫危险理论认为免疫功能的激活除了识别自我和非我物质外,还需要危险信号的存在。当细胞正常死亡或凋亡时,由于没有压力信号的产生,因而没有免疫反应。而当细胞由于感染、局部缺血或其它原因引起坏死时,细胞经历了压力反应而产生 HSP,因细胞裂解而释放到胞外。静息的 T 细胞由于获得 APC 呈递的抗原和危险信号的双重刺激而活化。因此 Moseley^[31]认为 HSP 肽复合物启动免疫反应有两方面的因素:① HSP 肽复合物与 APC 作用而呈递抗原;② HSP 本身传递一个危险信号给 T 细胞。静息的 T 细胞受双重刺激而活化。免疫系统的激活同时还涉及到 HSP 介导的细胞因子的产生。

Wells^[32]对 HSP 激活免疫反应提出了三个可能的机理:① HSP 是一个免疫危险信号,从坏死的肿瘤细胞中释放出来,直接将危险信号传递给免疫细胞而产生炎症反应。② 从死亡的肿瘤细胞中释放的 HSP 伴随有肿瘤抗原肽,通过与专职 APC 相互作用将抗原肽呈递给 APC,通过抗原提呈而激活肿瘤特异性 T 细胞;③ HSP 本身可以增强肿瘤细胞处理和呈递内源性肿瘤抗原的能力,直接将抗原呈递给肿瘤特异的 T 细胞。因为将 HSP72 转染黑色素瘤细胞后可以增加细胞表面的 MHC I 分子的表达,通过构象特异的抗体证实这些 MHC 分子上结合有多肽^[33]。

Basu 等认为 HSP 激活免疫反应是由于:① HSP 具有分子伴侣作用,因此带有多个肿瘤抗原。② HSP 通过受体与 APC 相互发生作用,将抗原肽呈递给 APC。③ HSP 可以刺激 APC 分泌炎症细胞因子和趋化因子,促进免疫反应的发生。④ HSP 可以诱导 DC 成熟,DC 是机体最有效的免疫佐剂细胞,从而启动一连串的免疫反应^[34]。

5 结语

HSP 与 HSP 融合蛋白激活机体特异的免疫应答是通过与 APC 表面的 HSP 受体结合而发挥作用,HSP 与受体结合内化后可能进入两条处理途径,一条与早期内体相关;另一条与蛋白酶体相关,最终伴随肽与 MHC I 分子结合,运送到细胞表面。HSP 与受体的结合激活细胞信号传导通路,分泌细胞因子和趋化因子。HSP 本身可能是一个危险信号,可以加剧炎症反应。虽然对 HSP 肽复合物免疫作用的研究渐渐深入,但 HSP 除了 CD91、CD40、TLR4、TLR2 外,是否还有其它受体,HSP 与受体作用后还激活细胞的哪些信号通路,HSP 在 APC 内的具体处理方式,凋亡与坏死在其中承担何种角色等问题仍然有待于进一步的实验研究。

[参考文献]

[1] Srivastava P K, Menoret A, Basu S, *et al.* Heat shock proteins

come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world[J]. *Immunity*, 1998; 8(6):657-665.

- [2] Arnold D, Wahl C, Faath S, *et al.* Influences of transporter associated with antigen processing(TAP) on the repertoire of peptides associated with the endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96[J]. *J Exp Med*, 1997, 186: 461.
- [3] Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, *et al.* Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity[J]. *J Exp Med*, 1997, 186(8): 1315-1322.
- [4] Cho BK, Palliser D, Guillen E, *et al.* A proposed mechanism for the induction of cytotoxic T lymphocyte production by heat shock fusion proteins[J]. *Immunity*, 2000, 12(3): 263-272.
- [5] Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides[J]. *Science*, 1995, 269(5230): 1585-1588.
- [6] Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D, *et al.* Cutting edge: Receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells[J]. *J Immunol*, 1999, 162(7): 3757-3760.
- [7] Singh-Jasuja H, Toes RE, Spee P, *et al.* Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(11): 1965-1974.
- [8] Castellino B F, Boucher PE, Eichelberg K, *et al.* Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways[J]. *J Exp Med*, 2000, 191(11): 1957-1964.
- [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] Matsutake T, Srivastava PK. CD91 is involved in MHC class II presentation of gp96-chaperoned peptides. *Cell Stress Chaperones*, 2000, 5: 378.
- [11] Binder RJ, Harris ML, Menoret A, *et al.* Saturation, competition and specificity in interaction of heat shock proteins(hsp) gp96, hsp90 and hsp70 with CD11b⁺ cells[J]. *J Immunol*, 2000, 165(5): 2582-2587.
- [12] Sondermann H, Becker T, Mayhew M, *et al.* Characterization of a receptor for heat shock protein 70 on macrophages and monocytes [J]. *Biol Chem*, 2000, 381(12): 1165-1174.
- [13] Binder R J, Han D K, Srivastava PK. CD91: A receptor for heat shock protein gp96[J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(2): 151-155.
- [14] Asea A, Rehli M, Kabingu E, *et al.* Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(17): 15028-15034.
- [15] Lipsker D, Ziyilan U, Spehner D, *et al.* Heat shock proteins 70 and 60 share common receptors which are expressed on human monocyte-derived but not epidermal dendritic cells. *Eur J Immunol* 2002, 32(2): 322-332.
- [16] Habich C, Baumgart K, Kolb H, Burkart V. The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins[J]. *J Immunol*, 2002, 168(2): 569-576.
- [17] Wang Y, Kelly CG, Karttunen JT, *et al.* CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines[J]. *Immunity*, 2001, 15(6): 971-983.
- [18] Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, *et al.* The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor[J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(8): 2211-2215.
- [19] Sauter B, Albert ML, Francisco L, *et al.* Consequences of cell

death: Exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells[J]. J Exp Med, 2000, 191(3): 423-434.

[20] Melcher A, Todryk S, Hardwick N, *et al.* Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression[J]. Nature Med, 1998, 4(5): 581-587.

[21] Basu S, Binder RJ, Suto R, *et al.* Necrotic but not apoptotic cell death release heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF κ B pathway[J]. Int Immunol, 2000, 12: 1539-1546.

[22] Salio M, Cerundolo V, Lanzavecchia A. Dendritic cell maturation is induced by mycoplasma infection but not by necrotic cells[J]. Eur J Immunol, 2000, 30(2): 705-708.

[23] Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class-I restricted CTLs[J]. Nature, 1998, 392(6671): 86-89.

[24] Moroi Y, Mayhew M, Treka J, *et al.* Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(7): 3485-3490.

[25] Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, *et al.* Cutting edge: Heat shock protein(HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells[J]. J Immunol, 2000, 164(1): 13-17.

[26] Chen W, Syldath U, Bellmann K, *et al.* Human 60 kD heat shock protein: A danger signals to the innate immune system[J]. J Im-

munol, 1999,162: 3212-3219.

[27] Lehner T, Bergmeier LA, Wang Y, *et al.* Heat shock proteins generate (-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity[J]. Eur J Immunol, 2000, 30(2): 594-603.

[28] Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, *et al.* HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine[J]. Nature Med, 2000, 6(4): 435-442.

[29] Ohashi K, Burkart V, Flohe S, *et al.* Cutting edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex[J]. J Immunol, 2000, 164(2): 558-561.

[30] Matzinger P, Fuchs E J. Beyond self and non-self: Immunity is a conversation, not a war[J]. J NIH Res. 1996, 8: 35-39.

[31] Moseley P. Stress proteins and the immune response[J]. Immunopharmacology, 2000, 48(3): 299-302.

[32] Wells A D and Malkovsky M. Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation:an integrated view[J]. Immunol Today, 2000, 21(3): 129-132.

[33] Wells A D, Rai SK, Salvato MS, *et al.* Hsp72-mediated augmentation of MHC class I surface expression and endogenous antigen presentation[J]. Int Immunol, 1998, 10: 609-617.

[34] Basu S, Srivastava PK. Heat shock proteins: The fountainhead of innate and adaptive immune responses[J]. Cell stress chaperones, 2000, 5(5): 443-451.

[收稿日期] 2002 - 03 - 02 [修回日期] 2002 - 05 - 10

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0136-01

⁶⁰Co 照射对肿瘤坏死因子基因转导的人肝癌细胞增殖的影响

陆云飞, 覃新干 (广西医科大学第一附属医院外科, 南宁 530021)

用肿瘤疫苗增强机体抗肿瘤免疫反应是预防和治疗肿瘤的重要途径之一。我们采用不同照射方式及不同剂量的⁶⁰Co 照射人 TNF- α 基因转导的人肝癌细胞(BEL-7404-TNF), 观察其增殖及 TNF 的分泌量, 以便选择合适的细胞作为肝癌疫苗进行动物实验。

培养 BEL-7404 和 BEL-7404-TNF。用培养皿(φ 90mm) 进行培养, 每 1 个培养皿起始细胞数为 1×10^6 , 培养 2 d 后开始⁶⁰Co 照射。BEL-7404-TNF 分 10 组, 1 ~ 6 组分别给予 0gy, 40 gy, 60 gy, 80 gy, 100 gy, 120 gy 剂量一次性照射; 7 ~ 10 组分别给予总剂量为 40 gy, 60 gy, 80 gy 和 100 gy, 以 20 gy/d 连续分量照射。各组照射完成当天取 7×10^5 个细胞进行培养, 观察其增殖情况, 共 4 周。BEL-7404 也用同样方法处理。检测 BEL-7404-TNF 组和 BEL-7404 组经⁶⁰Co 照射后第 0, 7, 14 天 TNF- α 分泌量。

BEL-7404-TNF 经⁶⁰Co 处理后, 一次性照射组还有细胞分裂、增殖。连续分量照射组则表现为: 40 gy、60 gy 剂量组分裂增殖下降, 生长缓慢, 有繁殖; 80 gy 剂量组分裂增殖停止, 存活 2 周以上, 3 周内全部死亡。100 gy 剂量组分裂增殖停止, 存活不足 14 d。BEL-7404 经⁶⁰Co 处理后, 一次性照射

组仍有细胞分裂、增殖。连续分量照射组: 40 gy, 60 gy 剂量组分裂增殖停止, 存活 2 周以上, 4 周内全部死亡; 80 gy, 100 gy 剂量组分裂增殖停止, 存活不足 7 d。以上细胞存活全经台盼蓝排除法判定。⁶⁰Co 照射 BEL-7404-TNF 组 TNF 分泌量比⁶⁰Co 照射 BEL-7404 组明显增多且稳定。

临床上应用的肿瘤疫苗不仅要求有效, 还要求安全。我们应用不同剂量和不同方式的⁶⁰Co 照射转基因细胞, 发现连续分量照射 80 gy 组细胞增殖停止, 存活 2 周以上, 仍保持 TNF 分泌, 3 周内全部死亡。我们认为采用⁶⁰Co 80 gy 连续分量照射的细胞能达到临床上的安全要求, 而且照射后细胞能存活两周以上, 有利于提高机体的抗肿瘤免疫。这一结果提示用⁶⁰Co 照射人 TNF- α 基因转导的人肝癌细胞, 制备人肝癌疫苗是可行的。

[关键词] BEL-7404-TNF; ⁶⁰Co 照射; 肿瘤疫苗
[中图分类号] R73-36*2 [文献标识码] D
[收稿日期] 2001 - 11 - 15 [修回日期] 2002 - 01 - 16

[基金项目] 广西壮族自治区教育厅重点科研项目资助(合同号 19982-8)