

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0071- 04

宫颈癌 HPV 基因疫苗研究进展

侯 萌 综述; 濮德敏 审阅 (华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科, 武汉 430030)

[摘 要] 人乳头瘤病毒(HPV)是由核酸和衣壳蛋白组成的 DNA 病毒,基因组编码 10 个开放阅读框(ORF),分为早期区(E 区),晚期区(L 区)和上游调节区(URR),早期区包含 E1, E2, E4, E5, E6 及 E7 6 个早期基因,编码合成蛋白,调控病毒转录,复制和转化;晚期区 L1 和 L2 编码病毒的主要和次要衣壳蛋白。高危型 HPV 感染与宫颈癌有关。高危型 HPV E6/E7 被证实为转化基因,在相关组织中构成性表达,具有很强的抗原性,被首选用来制备 HPV 基因疫苗;HPV 晚期基因 L1 的产物具有诱导产生中和抗体及细胞免疫的表位,也是制备基因疫苗的理想候选基因。针对 E6, E7 和 L1 等基因序列构建的基因疫苗可同时激活体液免疫和细胞免疫,对宫颈癌有预防和治疗作用。

[关键词] 宫颈癌; 人乳头瘤病毒; 基因疫苗

[中图分类号] R392.7 [文献标识码] A

近年来,流行病学,组织病理学和分子生物学的研究发现,宫颈癌的发生发展与人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染密切相关,而临床上对 HPV 感染尚无预防措施且易癌变,癌前病变药物治疗的效果差,花费高,宫颈癌的手术治疗,放化疗也不理想,因此,针对 HPV 研究开发宫颈癌预防性和治疗性疫苗很有必要。自从 1990 年 Wolf 等^[1]发现直接肌肉注射裸 DNA 质粒,不经任何特殊载体手段即可在肌细胞内取得有效的蛋白表达以来,基因疫苗技术飞速发展,以不可比拟的优势标志着第三次疫苗革命的到来。目前,HPV 基因疫苗已成为国内外研究的热点和重点之一,具有广阔的应用前景。

1 宫颈癌与 HPV

宫颈癌是女性最常见的生殖道恶性肿瘤,在发展中国家中占妇女癌症的 24%,严重威胁妇女的健康和生命。我国是宫颈癌的高发国家,特别是近年来年轻宫颈癌患者有明显上升趋势,发病以每年 2% ~ 3% 的速度增长^[2]。宫颈癌表现出许多性传播疾病的特征:性伴侣越多,初次性交年龄越年轻,宫颈癌发生的危险性明显增高,男性伴侣的性行为也很重要。早在 1842 年, Rigoni-Stern 就推测宫颈癌的发生与性传播感染有关^[3]。1974 年 Zur Hausen^[4]首次提出 HPV 感染与宫颈癌有密切关系或因果关系。

HPV 是一类在自然界广泛存在,具有高度组织和宿主特异性,可致人类皮肤和黏膜异常增生,引起宿主组织疣状病变及乳头状瘤的 DNA 病毒,其病毒颗粒由核酸和衣壳蛋白组成,病毒基因是一闭环,双链 DNA,目前已鉴定出 90 余种亚型。据报道,宫颈癌中 HPV-DNA 的检出率可高达 99%^[5]。根据在宫颈癌发生中的危险性不同,可将 HPV 分为 3 类:高危型 HPV,包括 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 66 型;低危型 HPV,包括 6, 11, 42, 43, 44 型;危险不明型 HPV,包括 55, 56, 61 等。HPV 高危型所致病变常为非整倍体,多不能自然消

退,极少逆转,约 80% 的宫颈癌与高危型 HPV 相关^[6],其中以 16, 18 型呈高度相关性。研究表明,宫颈鳞状细胞癌中以 HPV16 最常见,而在宫颈腺癌中则以 HPV18 为主要亚型,其阳性率可达 50%^[7]。

2 HPV 基因疫苗研究的分子生物学基础

HPV 基因组是 8 000 bp 左右的双链环状 DNA 分子,编码 10 个开放阅读框(open reading frame, ORF),分为早期区(E 区),晚期区(L 区)和上游调节区(upstream regulatory region, URR),分别占基因组的 50%, 40% 和 10%。早期区包含 E1, E2, E4, E5, E6 及 E7 6 个早期基因,编码合成蛋白,调控病毒转录,复制和转化;晚期区 L1 和 L2 编码病毒的主要和次要衣壳蛋白;上游调节区又称病毒长期控制区,为非编码区,长约 400 bp,含有不同转录受体和激活因子的重叠结合区,控制早,晚转录区的转录和病毒颗粒的合成。

高危型 HPV E6/E7 已被证实为转化基因,其编码的 E6, E7 蛋白与细胞转化和病毒复制的调控有关,在宫颈癌细胞系和组织内持续表达,在维持转化组织恶性表型的过程中起至关重要的作用。E6 蛋白能与细胞内 E6 相关蛋白(E6-AP)形成复合物,特异性地结合抑癌基因 p53 的产物,使 p53 降解失活,导致细胞周期失控^[8];作为一种多功能蛋白,它还可通过激活端粒酶使正常细胞永生^[9];新近研究发现 E6 的功能与其它蛋白(如靶蛋白 1, 干扰素调控因子 3, P21 等)的相互作用和凋亡有关^[10]。E6 蛋白分为 5 个功能区: I: N 端, 1 ~ 29 氨基酸; II: 锌指 I 区, 30 ~ 66 氨基酸; III: 中央区(连接区), 67 ~ 102 氨基酸; IV: 锌指 II 区, 103 ~ 139 氨基酸; V: C 端, 140 ~ 151 氨基酸。研究提示, E6 蛋白的 N 端及第 1 锌指区是细胞转化及降解 p53 的关键区。E7 蛋白是 HPV 的主要转化蛋白,与控制细胞周期有关的肿瘤抑制蛋白视网膜母细胞瘤蛋白(Rb1)亲和力极高, E7/Rb1 结合使 Rb1 失活,细胞周期失控而发生永生。E7 蛋白分为 3 个功能区: I 区 1 ~ 15 氨基酸; II 区 16 ~ 38

氨基酸,Ⅲ区 39~98 氨基酸,锌指及 C 端区。HPV16 E7 蛋白的Ⅲ区有一位点 LXCXE(22~26 氨基酸),是结合 Rb1 的关键位点。该区还含有一个 CKII(casein kinase II)位点(31~38 氨基酸),包含 Ser31 和 Ser32,这 2 个 Ser 残基在 HPV16 E7 蛋白中被磷酸化,Ser31/32 磷酸化位点与转化有关。众所周知,细胞免疫在机体抗肿瘤免疫中起决定性作用,大量研究发现,E6,E7 原癌蛋白能够激发机体抗肿瘤的细胞毒性淋巴细胞应答(CTL)。因此,将 E6,E7 蛋白视作肿瘤特异性抗原,是研究开发 HPV 疫苗的着眼点之一。

L1 蛋白是 HPV 的主要衣壳蛋白,它在真核细胞内具有自身组装成病毒样颗粒(virus like particle,VLP)的特性。大量实验表明,HPV L1 蛋白具有较强的免疫原性,能刺激机体产生中和抗体 IgG,IgA,在动物实验中可保护动物免受相应病毒的攻击^[11],另外,L1 蛋白还具有增强机体细胞免疫应答的功能,因此可作为研制 HPV 预防及治疗疫苗的理想靶抗原。

对 E6,E7 和 L1 等抗原表位的深入研究,更奠定了其作为疫苗设计对象的免疫学基础。E6 蛋白的鼠 T 细胞表位主要位于锌指区及连接区(Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ区),HLA-A2.1 则位于 N 端及第 1 锌指区(Ⅰ,Ⅱ区),抗肽抗体表位(B 细胞表位)位于连接区(Ⅲ区)。E7 蛋白的鼠 T 细胞表位多在 C 端区(Ⅲ区)(49~57 氨基酸),HLA 表位仅在 10~33 氨基酸和 80~98 氨基酸,而抗肽抗体表位(B 细胞表位)则位于 10~50 氨基酸。HPV16L1 的中和抗原表位位于其中段的 122~156,182~216,227~261,287~336 和 N 端的 32~51 位氨基酸处,这些抗原表位绝大多数是 HPV16 与其它一种或几种 HPV 型所共有。

3 HPV 基因疫苗

由于 HPV 病毒体仅存在终末分化的复层鳞状上皮组织中,含量很少,缺乏完整的体外培养系统,曾一度使其研究相对滞后。虽然近年来建立了异种移植培养方法及复层鳞状上皮器官培养系统,但所产生的病毒数量有限,只能限于少量研究而不能满足大量需要,也无法制备减毒活疫苗或灭活疫苗,因此,HPV 疫苗研制只有借助基因工程技术来完成。随着现代分子生物学的发展,HPV 疫苗研究有了长足进步,基因疫苗成为目前 HPV 疫苗发展的一个重要趋势。

基因疫苗(又称 DNA 疫苗,核酸疫苗)是将编码特定抗原蛋白的基因序列克隆到合适的质粒载体上而制备成的核酸表达载体,通过肌肉注射,基因枪注射等将其直接接种入机体内,在宿主体内持续表达外源基因,合成抗原蛋白质,从而激发机体免疫系统产生针对外源蛋白质的特异性免疫应答^[12]。它具有以下优点:可同时激活体液免疫和细胞免疫;一个质粒可插入多个同型或异型抗原基因,即组成多价基因疫苗,克服一种基因工程亚单位疫苗只能防止同种亚型 HPV 感染的局限性;可选择各亚型共有的核心蛋白保守 DNA 序列制作基因疫苗,产生跨株系的免疫保护反应,从而避免易变异病毒产生的免疫逃避问题;产生的免疫反应特异,质高,快速,广泛,全面,无感染复制的危险,不会产生回复突变,兼有减毒活疫苗的有效性和亚单位疫苗的安全性;质粒 DNA 免疫原性低,不

会象重组疫苗诱发针对载体的自身免疫反应,可重复使用;制备简单,经济,稳定性好,易于贮存运输,使用方便,可多途径给药等。

高危型 HPV 早期基因 E6,E7 在相关组织中构成性表达,并具有很强的抗原性,因而被首选用来制备 HPV 基因疫苗。许有元等^[13]利用基因工程技术构建了 HPV16E6 真核表达质粒 pcDNA3/E6,脂质体法转染 Cos7 细胞,肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠,免疫组化技术检测抗体产生及抗原表达,结果被转染的 Cos7 细胞表达 HPV16E6 蛋白,免疫小鼠产生抗 HPV16E6 抗体。伍欣星等^[14]将 HPV16E7 蛋白的编码基因定向克隆于真核表达载体,构建了 HPV16E7-HB 基因疫苗,将其直接注射 BALB/c 小鼠和 Wistar 大鼠股四头肌,动态观察 28 d 后仍能测出 E7-DNA 的扩增,提取肌组织 RNA,RT-PCR 检测大鼠特异性 E7 的转录情况,3/3 大鼠,1/10 小鼠为阳性;ELISA 法在免疫小鼠的血清中检出了特异性抗 E7 抗体,证明该基因疫苗构建正确且能够在哺乳动物体内和体外有效表达。张炜等^[15]采用 CMV 启动表达载体,构建了 HPV16 野生型 E7-DNA 疫苗 pcDNA3.1-(ysE7),并将其免疫小鼠,MTT 比色法体外检测特异性淋巴细胞增殖反应,结果野生型 E7-DNA 疫苗组脾淋巴细胞在体外受到 E7 蛋白的再次刺激后出现特异性淋巴细胞增殖反应,与空载体 pcDNA3.1 对照组相比差异有极显著性,表明野生型 E7-DNA 疫苗能诱导特异性的细胞免疫应答。

HPV 晚期基因 L1 的产物具有诱导产生中和抗体及细胞免疫的表位,诱导产生的免疫可抵抗再次感染,故 L1 基因也是制备基因疫苗的理想候选基因。黄建林等^[16]将 PCR2.1HPV16L1 重组质粒上 L1 基因片段克隆至真核表达载体 pTracer-CMV 上,在国内首次构建成 pTracer-CMV-HPV16L1 真核表达质粒,采用脂质体法转染 HeLa,NIH3T3 细胞,荧光显微镜观察发现转染率达 90% 以上,电镜下发现转染细胞中出现 VLPs。贾士东等^[17]从 HPV18-pBR322 质粒中扩增 HPV18L1 基因,构建 2 个真核表达重组质粒 HPV18L1-pcDNA3 和 HPV18L1-pcEP4,将提纯的 DNA 直接免疫小鼠,ELISA 法检测提示二者均能在小鼠体内表达并诱生 HPV18 特异性抗体。Rocha-Zavaleta 等^[18]用编码 HPV16L1 基因的质粒免疫小鼠,12 个月后可检测到全身性的 IgG 抗体及阴道冲洗液中特异性的 IgA 抗体,中和试验证实全身及局部抗体均有效力;实验小鼠的脾细胞显示出 CD8⁺ 细胞介导的 CTL 活性;动物肿瘤模型中 HPV16L1-DNA 可延缓肿瘤生长,延长存活时间。

虽然基因疫苗具有广泛的优越性,但在临床应用中仍存在安全性方面的顾虑,如质粒 DNA 可能与宿主 DNA 整合引起宿主 DNA 变异,可能激活原癌基因诱生恶性肿瘤,可能诱发机体产生抗 DNA 抗体导致自身免疫性疾病等。在 HPV 基因疫苗制备中,可利用基因工程技术对靶基因进行适当改造,去除其致转化特性,保留其免疫原性。陈华波等^[19]采用 PCR 方法从质粒 HPV16 中获得 E6 羧基端基因片段 E6C(编码第 51~151 位氨基酸,去除氨基端转化活性部位,保留大部分免疫表位),构建含 CMV 启动子的真核表达质粒 PLNCE6C,免疫

组化结果显示该质粒在 LA795 细胞中获得有效表达。徐建青等^[20]用 PCR 方法扩增获得 E7C 亚基因(编码 39~98 氨基酸, 去除与转化活性直接相关的 N 端, 保留抗原表位主要集中的 C 端), 插入真核表达质粒获得 pLNCE7C, 体外证实其具有表达能力后免疫小鼠, 结果获得较好的 E7 特异性 CTL 活性。Smahel 等^[21]对 HPV16E7 基因进行改造, 使其 pRb 结合区上编码第 21, 24, 26 位氨基酸的 3 个位点上的碱基发生突变, 去除其转化活性, 构建真核表达质粒 pBSC/E7GGG, 动物实验证实其具有对肿瘤的预防和治疗作用。Osen 等^[22]用人工方法使 HPV16E7 基因的 4 个功能域重排, 保留其全部 T 细胞表位, 形成 E7SH-DNA, 体外实验显示其可产生 E7 特异性的 CTL 反应, 用之免疫小鼠也可诱导 E7 特异性 CTL 反应并对 E7 阳性的肿瘤具有保护作用, 该 DNA 在 NIH3T3 细胞中未检测到转化活性。

另外, 基因疫苗在诱导免疫效应上还未尽如人意, 而且在免疫保护效力上还不如活疫苗有效, 未曾达到人们的期望值。为进一步提高其免疫及保护效率, 众多研究者们作了大量努力: 改善免疫途径和方式; 选择优化免疫刺激序列及载体; 表达嵌合抗原或多重抗原; 共表达抗原与细胞因子或协同刺激分子, 如 LAMP-1, B7-1^[20], HSP 等。Chen 等^[23]研究发现, 利用结核分枝杆菌 HSP70 融合肿瘤抗原基因 HPV16E7 构建基因疫苗, 可显著增强抗原特异性的 CTL 反应和提高抗肿瘤效力。Cheng 等^[24]根据癌抗原的特异性免疫治疗和抗血管形成两种机制, 尝试提高 HPV 疫苗的效力, 连接 HPV16E7 基因与编码钙网硬蛋白(calreticulin, CRT)的基因, 构建质粒 pcDNA3-CRT/E7, 用其免疫 C57BL/6 小鼠, 产生的 E7 特异性抗肿瘤效力显著强于野生型 E7-DNA 和 CRT-DNA; 在肿瘤模型中, 去除 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞的 C57BL/6 小鼠和免疫相容性 BALB 小鼠注射 CRT/E7 或 CRT-DNA 后, 肺部肿瘤结节与野生型 E7-DNA 组相比显著缩小, 提示存在非 T 细胞依赖的抗肿瘤效力; 肿瘤结节微血管密度测定及体内抗血管形成实验进一步证实了 CRT/E7 和 CRT 的抗血管形成作用。Leachman 等^[25]分别将棉尾兔乳头瘤病毒(CRPV)E6 基因与粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和泛素单体基因融合, 所得的两种疫苗与野生型 E6 基因疫苗相比, 可显著抑制乳头瘤的发生发展, 且泛素比 GM-CSF 更有效; 将 CRPV 多种早期基因(E1, E2, E6 或 E7)联合制备疫苗可拓宽 CRPV 特异性反应的范围; 以上两种方法均可显著提高 CRPV 疫苗的临床效力, 将此二法结合, 制备包括泛素, CRPV E1, E2 和 E7 基因的疫苗, 实验显示对乳头瘤具有完全的保护作用。

4 展望

目前, 宫颈癌 HPV 基因疫苗的研究已从理论阶段进入实用阶段, 开始应用于临床前期实验, 显示出美好的前景。我们有理由相信, 随着科学技术的发展, 会出现更安全, 有效的 HPV 基因疫苗用于临床, 最大限度提高宫颈癌患者的生存期和生存质量。

【参考文献】

- [1] Wolf JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. *Science*, 1990, 247: 1465-1468.
- [2] 朗景和. 子宫颈上皮内瘤变的诊断与治疗[J]. *中华妇产科杂志*, 2001, 36(5): 261-263.
- [3] Griffiths M. "Nuns, virgins, and Spinsters". *Rigoni-stern and cervical cancer revisited* [J]. *Br J Obstet Gynaecol*, 1991, 98(8): 797-802.
- [4] Zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, et al. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus [J]. *Int J Cancer*, 1974, 13(5): 650-656.
- [5] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. *J Pathol*, 1999, 189: 12-19.
- [6] Stoler MH. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: A model for carcinogenesis [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2000, 19: 16-28.
- [7] Zur Hausen H. Virus in human cancers [J]. *Science*, 1991, 254: 1167-1173.
- [8] Scheffner M, Huibregtse JM, Viestra RD, et al. The HPV16E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin protein ligase in the ubiquitination of p53 [J]. *Cell*, 1993, 7(3): 495-505.
- [9] 徐波, 胡丽娜, 顾美礼, 等. 宫颈癌治疗性疫苗研究进展 [J]. *国外医学妇产科分册*, 2000, 27(6): 353-356.
- [10] Gao Q, Srinivasan S, Boyer SN, et al. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(1): 733-744.
- [11] Jochmus I, Schafen K, Kaath S, et al. Chimeric virus-like particles of the human papillomavirus type 16 as a prophylactic and therapeutic vaccine [J]. *Arch Med Res*, 1999, 30: 269-274.
- [12] Stevenson FK, Rosenberg W. DNA vaccination: A potential weapon against infection and cancer [J]. *Vox Sang*, 2001, 80(1): 12-18.
- [13] 许有元, 王一理, 司履生. pDNA3/HPV16E6 真核表达质粒的构建及裸 DNA 注射动物实验观察 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1998, 18(5): 406-409.
- [14] 伍欣星, 盛德乔, 王宇哲, 等. 人乳头瘤病毒 16 型 E7 核酸疫苗的构建及鉴定 [J]. *上海免疫学杂志*, 1999, 19(6): 348-351.
- [15] 张炜, 伍欣星, 谭云, 等. 人乳头瘤病毒 16 型 E7 DNA 疫苗的构建及其诱导特异性淋巴细胞增殖的研究 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2001, 22(2): 97-100.
- [16] 黄建林, 张振荣, 李秀荣, 等. PTracer-CMV/HPV16L1 的大量制备及其转染真核细胞的电泳结果 [J]. *微生物学杂志*, 1999, 19(3): 44.
- [17] 贾士东, 谷鸿喜, 王文阁, 等. HPV18L1 基因重组 DNA 构建及免疫小鼠体内特异抗体的测定 [J]. *中国免疫学杂志*, 2000, 16: 356-358.
- [18] Rocha-Zavaleta L, Alejandre JE, Garcia-Carranca A. Parenteral and oral immunization with a plasmid DNA expressing the human papillomavirus 16-L1 gene induces systemic and mucosal antibodies and cytotoxic T lymphocyte responses [J]. *J Med Virol*, 2002, 66(1): 86-95.
- [19] 陈华波, 赵蔚明, 于修平, 等. HPV16E6 羧基端编码基因的克隆及真核细胞表达 [J]. *山东医科大学学报*, 2000, 38(2): 123-125.
- [20] 许建青, 司静懿, 张友会, 等. HPV16 型 E7C 亚基因与共激活分子 B7-1 协同诱导 E7 特异性 CTL 研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19(3): 227-231.
- [21] Smahel M, Sima P, Ludvikova V, et al. Modified HPV16E7 genes as DNA vaccine against E7-containing oncogenic cells [J]. *Virology*, 2001, 281: 231-238.

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0074- 03

DC 瘤苗的研究新进展

骆云雅 综述, 张 梅 审阅 (西安交通大学第一附属医院血液科, 西安 710061)

[摘 要] 树突状细胞是目前发现的功能最强的抗原递呈细胞,在免疫应答中发挥重要作用。近来,树突状细胞成为肿瘤和免疫学研究的热点,特别是 DC 瘤苗在肿瘤免疫治疗中的应用前景诱人。本文综述了 DC 的免疫学活性,抗原摄取和递呈途径,体外诱导扩增及其瘤苗构建和应用的研究进展。

[关键词] 树突状细胞; 瘤苗; 免疫治疗

[中图分类号] R730.51 [文献标识码] A

机体的免疫应答首先由抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC) 捕获、加工和处理抗原,再将抗原递呈给 T, B 淋巴细胞,从而引发一系列的免疫应答。树突状细胞(dendritic cell, DC)作为功能最强的 APC,能激活静息型 T 细胞(naive T cell),激发初始免疫应答,在体内发挥强大的免疫监视功能。肿瘤患者体内 DC 功能缺陷,不能有效递呈肿瘤抗原,导致免疫无能或免疫耐受,使肿瘤得以发生发展^[1]。随着 DC 体外诱导扩增技术的发展及分子生物学技术和基因工程技术应用于 DC 瘤苗构建方法的发现,DC 瘤苗用于肿瘤免疫治疗的实验和临床研究更趋成熟,DC 瘤苗有望成为肿瘤免疫治疗的一种有效方式。本文就 DC 的免疫学活性、抗原摄取和递呈途径、体外诱导扩增及其瘤苗构建和应用的研究进展进行综述。

1 DC 的抗原递呈功能是 DC 瘤苗抗肿瘤免疫治疗的基础

DC 在体内分布广泛,普遍存在于除脑组织外的各种组织和器官中,在遇到外来抗原时可捕获、处理抗原。处于组织间隙的 DC 为未成熟 DC(immature dendritic cell, iDC),被认为是次级淋巴组织 T 细胞富集区域中存在的成熟 DC(mature dendritic cell, mDC) 的前体,具有强大的抗原摄取能力^[2],但因其表面表达低水平的 MHC I 类, MHC II 类及共刺激分子,因而不能有效的将抗原递呈给 T 淋巴细胞,对 T 细胞的刺激能力较低。捕获加工处理抗原后, iDC 丧失抗原摄取能力,向次级淋巴器官迁移,同时逐渐成熟。mDC 表面共刺激分子(CD80, CD86)、MHC I 类分子、T 细胞黏附分子

(CD48, CD58)表达上调,其利用内吞抗原有效合成 MHC II 类分子-肽复合物的能力也得到进一步加强,并分泌一些细胞因子,如 IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 等。

DC 通过巨胞饮作用(macropinocytosis)、吞噬作用及受体介导的内吞作用来摄取抗原^[3]。外源性抗原被 DC 摄取处理后,与 MHC II 类分子结合,并借助高表达的共刺激分子 CD86 等将抗原多肽递呈给 CD4⁺ T 细胞,促使其发生克隆增殖分化,并分泌 IL-12 以加强免疫应答。与 MHC II 类抗原递呈途径相比,对 MHC I 类抗原递呈研究较少。MHC I 类分子不聚集于 iDC 表面,但是其膜表面表达水平在成熟过程中被上调,同时可能有部分伴随着 MHC II 类分子到达细胞表面。MHC I 类分子限制的抗原被递呈给 CD8⁺ T 细胞,诱导机体产生抗原特异性 CTL,在抗肿瘤免疫中意义重大。

2 DC 的体外大量诱导扩增是 DC 瘤苗抗肿瘤免疫治疗的前提

虽然 DC 在体内分布广泛,但数量极少,外周血单个核细胞中 DC 的比例还不到 1%,在淋巴器官中虽数量较多但难以收集,而且由于分离出的 DC 具有异质性,难以满足对 DC 的基础研究及临床应用的需要。此外,体内的 DC 因为肿瘤分泌的一些因子,如 IL-10, TGF, VEGF 限制其成熟而发生功能缺陷。因此,利用 DC 的前体细胞体外诱导分化扩增 DC 是研究 DC 瘤苗的必要途径。

[基金项目] 国家自然科学基金 30170388 资助

[22] Osen W, Peiler T, Ohlschlager P, *et al.* A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity [J]. *Vaccine*, 2001, 19(30): 4276-4286.
[23] Chen CH, Wang TL, Hung CF, *et al.* Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to HSP70 gene[J]. *Cancer Research*, 2000, 60: 1035-1042.
[24] Cheng WH, Hung CF, Chai CY, *et al.* Tumor-specific immunity and

antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108: 669-678.
[25] Leachman SA, Shylankevich M, Slade MD, *et al.* Ubiquitin-fused and/or multiple early genes from cottontail rabbit papillomavirus as DNA vaccines[J]. *J Virol*, 2002, 76(15): 7616-7624.

[收稿日期] 2002 - 09 - 09 [修回日期] 2002 - 11 - 15

2.1 CD34⁺ 干细胞诱导分化扩增 DC

CD34⁺ 干细胞可从骨髓 (bone marrow, BM)、脐血 (cord blood, CB)、外周血 (peripheral blood, PB) 分离纯化而来。CD34⁺ 干细胞在 GM-CSF 和 TNF- α 的作用下可增殖分化为 DC, 而 c-kit 配体可提高 DC 的产量, 肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 和 PMA 也是有效的 DC 分化扩增激活因子^[5]。Hogihara 等^[6]利用鼠基质 (HESS-5) 建立了一种新的 DC 培养体系, 利用这种培养体系从 CD34⁺ 脐血 (CB) 中诱导扩增出 DC, 未成熟及成熟的 CB-DC 分别具有葡聚糖摄取能力及有效的刺激异基因淋巴细胞增殖能力。

为了探讨由不同来源的 CD34⁺ 干细胞诱导分化的 DC 在表型及功能上是否有差异, Servido^[7]将体外诱导的 CD34⁺ BM-DC 及 CD34⁺ PBSC-DC 进行多方面的比较, 如细胞内吞能力、混合白细胞反应、免疫表型分析等。结果发现, 与 BM-DC 相比较, PBSC-DC 不能摄取可溶性抗原, 但是混合白细胞反应强, 表面共刺激分子表达更高。他们认为, BM-DC 可用来负载特异性抗原肽, 而功能上比较成熟的 PBSC-DC 更适合应用于基因治疗。

2.2 单核细胞诱导分化扩增 DC

Garderet 等^[8]总结了外周血单核细胞体外诱导扩增 DC 的基本过程, 包括用白细胞提取法收集外周血单个核细胞, 淘选法分离单核细胞, 人血清培养基 (含患者自体血清或 AB 血清) 或无血清培养基 + GM-CSF + IL-4 与单核细胞共同培养。另一种方法就是从脐血单核细胞诱导扩增 DC^[9], 培养条件与外周血单核细胞诱导 DC 相同。比较这些 CB 黏附细胞来源的 DC (CB-DC) 和 PB 黏附细胞来源的 DC (PB-DC) 的表型和功能后发现, 第 7 天的 CB-DC 表达较低水平的 CD80, CD1a, CD83 和 CMRF-44, 但刺激异基因脐血淋巴细胞和外周血淋巴细胞增殖的能力与 PB-DC 相似, 成熟前摄取吞噬 FITC-葡聚糖的能力也与 PB-DC 相当。

到目前为止, 大多数研究应用单核细胞起源的 DC (MoDC)。在体外使大量单核细胞分化为 DC, 虽然需要外源性细胞因子刺激和较长培养时间 (6 d 或更长), 但是因其具有产量大、纯度高、易获得等优点, 更能满足实验和临床研究的需要。

2.3 白血病细胞诱导分化扩增 DC

抗原递呈是肿瘤免疫的关键环节。若能将白血病细胞直接诱导分化为 DC, 则 DC 表面既能高表达 MHC II 类分子及共刺激分子, 又能表达白血病抗原, 在 DC 瘤苗抗白血病免疫中发挥巨大作用。有人曾尝试利用细胞因子组合诱导白血病细胞株 (KG-1) 分化为 DC^[10], 诱导出的细胞形态不规则, 膜上有明显的树突状突起; 表型上, 表达 MHC II 类分子, 共刺激分子 CD80, CD86, CD83; 功能上具有吞噬乳胶颗粒和诱导异基因 T 淋巴细胞反应能力。从急性髓性白血病患者体内分离出的白血病细胞亦可在体外被诱导分化为 DC^[11], 从一位急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 患者体内分离出的白血病细胞与 GM-CSF + IL-4 + TNF- α 共培养 10 d 后, 表现出典型的树突状细胞特征, 其白

血病起源可由 (15;17) 的 DNA 探针进行原位杂交来证实。

3 DC 瘤苗的体外构建是 DC 瘤苗的抗肿瘤免疫治疗的关键

体外进行抗原负载的 DC 回输后可打破对肿瘤相关抗原的耐受, 并且可以诱导体内的抗肿瘤细胞毒性免疫应答。在 DC 的功能研究及体外培养技术得以发展的基础上, 大量的研究方向集中在完善 DC 对抗原的负载即 DC 瘤苗的构建上。

3.1 抗原肽冲击构建 DC 瘤苗

3.1.1 已知抗原肽冲击 DC

DC 在体外可被合成肽或来自肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen, TAA) 的蛋白冲击致敏, 这些 TAA 包括 MAGE-1, MAGE-3, MUC1, Her-2/neu, CEA, Melan/MART 等。这些抗原肽可被直接应用, 也可在其表位锚点进行单一氨基酸替代以便与 MHC I 类分子更紧密结合, 增强其诱导 CTL 反应的能力。

对 16 例处于进展期的黑色素瘤患者的研究发现^[12], HLA-A2 结合的抗原肽 (tyrosinase, Melan-A/Mart-1 或 gp100) 或 HLA-A1 结合的抗原肽 (MAGE-1/MAGE-3) 联合 KLH 冲击致敏 MoDC, 回输后所有患者都发生了针对 KLH 的迟发性超敏反应 (DTH), 11 例发生针对抗原肽的 DTH。独特型蛋白 (Id-protein) 可通过 DC 的交叉递呈 (cross-presenting) 激发 Id 特异性 CD4⁺ T 细胞, 通过 Id 负载的 DC 回输, 可诱导 B 细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤患者体内针对独特型的体液和细胞反应^[13]。

3.1.2 全肿瘤抗原冲击 DC

由于只有一部分肿瘤的肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原已知, 大部分肿瘤尚未明确, 因而将整个肿瘤细胞作为抗原来源不失为一种可取的方法。例如将 DC 与肿瘤溶解物^[14], 凋亡或坏死细胞共培养^[15], 或将 DC 与肿瘤细胞融合^[16], 将白血病原始细胞诱导为 DC, 使之既具有 DC 特征, 又表达白血病抗原^[10], 等等, 均已报道。

在鼠模型中^[14], 体外用负载了肿瘤溶解物的 DC 作为刺激剂可驯化同系鼠 T 细胞, 导致肿瘤特异性 T 细胞增殖及细胞因子的产生; 在临床实验中, 负载了黑色素瘤细胞溶解物和匙孔血蓝蛋白 (KLH) 的 DC 疫苗免疫后产生了 KLH 特异性 T 细胞反应, 并产生记忆性 CTL。将肿瘤细胞与 DC 细胞融合, 可以获得既具有 DC 特殊功能又表达肿瘤抗原的杂合体, 这种杂合体细胞表达 MHC-I, MHC-II 类抗原, 协同刺激分子以及 DC 特异性或肿瘤细胞表面分子, 输注以后可以产生抗癌作用。

3.2 基因转染构建 DC 瘤苗

3.2.1 抗原基因转染 DC

将编码肿瘤抗原的 DNA 和 RNA 分子转入 DC 可提供较大范围的抗原表位递呈, 并且增加了 MHC I 类和 MHC II 类分子递呈抗原肽的能力, HLA 限制性的抗原选择也可被避免。而且, 肿瘤抗原编码基因导入 DC 后能在 DC 内持续表

达肿瘤抗原,可以克服由于 DC 上抗原-MHC 复合物解离或细胞 MHC 分子降解对其诱导 T 细胞免疫应答产生的不利影响。把这种 DC 瘤苗应用于动物模型,已成功观察到肿瘤的退化性变。Zum 等^[17]通过逆转录病毒将肿瘤相关抗原 HER2 转入 DC,将来自一名伴有 HER2 过表达的乳腺癌患者的 T 细胞成功诱导扩增为 HER2 特异性 CTL 和 Th1 克隆。另外,也可将差异筛选获得的肿瘤特异性表达的 mRNA 导入 DC,用于肿瘤的免疫治疗,这样既可避免诱发自身免疫性疾病,又可诱导强烈的特异性抗肿瘤免疫应答。

3.2.2 免疫辅助分子基因转染 DC

DC 也可被编码免疫调节因子的基因转染,如细胞因子(IL-2, IL-12, IL-18, GM-CSF)以及共刺激分子(B7)等,转染后的 DC 可以更强的诱导免疫应答。利用腺病毒载体将 CD40L 转入 DC 输入荷瘤鼠体内,可诱导出保护性抗原特异性免疫应答,并且可阻止 DC 产生自然凋亡及 Fas-FasL 诱导的凋亡,拮抗 IL-10 等对 DC 功能的抑制作用。Nishioka 等^[18]将 IL-12 基因修饰的 DC 细胞直接注入黑色素瘤和肉瘤小鼠模型的肿瘤病灶中,可以诱发抗肿瘤免疫,IL-12 基因的转染可以促进 DC 细胞的成熟,表现为 MHC-I, MHC-II 和共刺激分子的表达增加。

利用基因工程技术构建 DC 瘤苗面临的一个难题就是转导率不高。为了提高转导率,研究者作过多种尝试。Nishimura 等^[19]比较了在不同时间,不同速度,不同转速下离心力加强腺病毒介导的基因转导效率后发现,最好的离心转导条件是:RS 2000 xg, T 37°C, Tm 2 h, MOI (high multiplicity of infection) 10。转导率提高达 86% 以上。而 Viggo^[20]报告, mRNA 电穿孔与质粒 DNA 电穿孔相比有明显提高的转导率,前者转导率为 89%, 后者则为 40%。更重要的是,编码 Melan-A 的 mRNA 电穿孔的 DC 可强烈激活 Melan-A 特异性的 CTLs 克隆增殖,优于 mRNA 脂质体转导的 DC 或 mRNA 直接冲击的 DC。

总之,DC 瘤苗是肿瘤免疫治疗的新方向,可行性试验已证实抗原冲击的 DC 可用来激发体内的抗原特异性 T 细胞反应,临床 I, II 期试验也取得了可喜的成就。但是 DC 瘤苗真正广泛应用于临床尚有一段距离,必须解决以下问题:数量大纯度高的 DC 的诱导;特异性肿瘤抗原的选择;DC 瘤苗构建方式的改善;合适的 DC 瘤苗回输时间、方式、剂量的选择等等。随着 DC 瘤苗进一步研究的开展,DC 瘤苗应用于临床肿瘤免疫治疗指日可待。

[参考文献]

[1] Almand B, Clark JI, Nikitina E, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: A mechanism of immunosuppression in cancer [J]. J Immunol, 2001, 166(1): 678-689.

[2] Peter B, Stefan W, Wolfram B, et al. Dendritic cells in cancer vaccines [J]. Exp Hematol, 2001, 29: 1247-1255.

[3] Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines [J]. Cell, 2001, 106(3): 255-258.

[4] Nina B. Processing and presentation of antigen by dendritic cells: Implications for vaccines [J]. Trends Mol Med, 2001, 7: 1154-1162.

[5] Ramadan G, Schmit RE, Schubert J. *in vitro* generation of human CD86⁺ dendritic cells from CD34⁺ haematopoietic progenitors by PMA alone in serum-free medium [J]. Clin Exp Immunol, 2001, 125(2): 237-244.

[6] Hogihara M, Lic, Gansuud B, et al. Extensive and long-term *ex vivo* production of dendritic cells from CD34⁺ umbilical cord blood bone marrow cells by novel culture system using mouse stroma [J]. J Immunol Methods, 2001, 253(1-2): 45-55.

[7] Servida F, Soligo D, Delilieri GL, et al. Functional differences between dendritic cells derived from CD34⁺ bone marrow and peripheral blood stem cells [J]. Haematologica, 2000, 85(4): 352-355.

[8] Garderet L, Cao H, Salamero J, et al. *in vitro* production of dendritic cells from human blood monocytes for therapeutic use [J]. J Hematother Stem Cell Res, 2001, 10(4): 553-567.

[9] Zheng Z, Takahashim, Narita M, et al. Generation of dendritic cells from adherent cells of cord blood by culture with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha [J]. J Hematother Stem Cell Res, 2000, 9(4): 453-464.

[10] Hulette BC, Rowden G, Ryan CA, et al. Cytokine induction of a human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1) to a CD1a⁺ dendritic cell phenotype [J]. Arch Dermatol Res, 2001, 293(3): 147-158.

[11] Naritam, Takahashim, Li A, et al. Generation of dendritic cells from leukemia cells of a patient with acute promyelocytic leukemia by culture with GM-CSF, IL-4 and TNF- α [J]. Acta Haematol, 2001, 106(3): 89-94.

[12] Garin J, Diez R, Kieffer S, et al. The phagosome proteome: Insight into phagosome functions [J]. J Cell Biol, 2001, 152: 165-180.

[13] John M, Timmerman, Debrak, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma clinical and immune response in 35 patients [J]. Blood, 2002, 99(5): 1517-1526.

[14] Mule JJ. Tumor vaccine strategies that employ dendritic cells and tumor lysate: Experimental and clinical studies [J]. Immunol Invest, 2000, 29(2): 127-129.

[15] Jenne L, Arrighi JF, Jonuleit H, et al. Dendritic cells containing apoptotic cells prime human CD8⁺ T cells for efficient tumor cell lysis [J]. Cancer Res, 2000, 60: 4446-4456.

[16] Kuyler A, Stuhler G, Walden P, et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccine with tumor cell-dendritic cell hybrids [J]. Nat Med, 2000, 6: 332-336.

[17] Zum, Metzger J, Hermann C, et al. The generation of both T killer and Th cell clones specific for the tumor-associated antigen HER2 using retro virally transduced dendritic cells [J]. J Immunol, 2001, 107(3): 1712-1719.

[18] Nishioka Y, Hirao M, Robbins PD, et al. Induction of systemic and therapeutic antitumor using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express IL-12 [J]. Cancer Res, 1999, 59(16): 4035-4041.

[19] Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T, et al. Novel centrifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence protein gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells [J]. J Immunol Methods, 2001, 253(1-2): 114-124.

[20] Viggo F, Van T, Peter P, et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: Superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells [J]. Blood, 2001, 98(1): 45-56.