

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0166-04

Hsp70-肿瘤抗原肽复合物防治小鼠黑色素瘤 B16 肺转移的作用

陈洪涛, 张桂梅, 张 慧, 冯作化 (华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学系, 武汉 430030)

[摘 要] 目的: 探讨热休克蛋白 70-肿瘤抗原肽复合物(Hsp70-antigen peptide complexes)对小鼠黑色素瘤 B16 转移的防治作用。方法: 分别从小鼠腿部接种的 B16 实体瘤及小鼠肺 B16 转移灶提取混合抗原肽, 体外与 Hsp70 结合制得复合物, 此复合物免疫小鼠后用于预防或治疗经尾静脉接种转移至肺的 B16 黑色素瘤, 观察其对肿瘤转移的防治作用。结果: Hsp70-肿瘤抗原肽复合物免疫后肺转移灶结节数显著减少($P < 0.01$), 体外脾细胞表现出对 B16 较高的杀伤率($P < 0.01$); 并对肺转移灶有显著的治疗作用($P < 0.01$), 而从 B16 实体瘤提取的混合抗原肽制得的复合物比从肺转移灶提取的混合抗原肽制得复合物有更好的治疗效果($P < 0.01$), 表现出体外脾细胞对 B16 更高的杀伤率($0.01 < P < 0.05$)。结论: Hsp70-肿瘤抗原肽复合物对肿瘤的转移有明显的防治作用, 而从实体瘤提取的混合抗原肽比从转移灶提取的混合抗原肽更为有效。

[关键词] 转移; 实体瘤; 转移灶; Hsp70

[中图分类号] R730.3 [文献标识码] A

The Prevention and Therapeutic Effects of Hsp70-Antigen Peptide Complexes on B16 Tumor Pulmonary Metastasis in Mice

CHEN Hong-tao, ZHANG Gui-mei, ZHANG Hui, FENG Zuo-hua (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tongji Medical College, HUST, Wuhan 430030, China)

[Abstract] Objective: To explore the preventive and therapeutic effects of Hsp70-antigen peptide complexes (HACs) on pulmonary metastasis of melanoma B16 cells in mice. Methods: Antigen peptide mixtures were prepared from massive tumors and metastatic foci respectively, and bound with Hsp70 *in vitro*. The HACs were used to mice to prevent the formation of micrometastatic foci after the injection of B16 cells through tail vein, or treat the existent micrometastatic foci in lung. The number of metastatic foci was counted and the cytotoxicity of splenocytes to B16 cells was determined. Results: After immunization with HACs, the number of metastatic foci in mice decreased significantly ($P < 0.01$), and the cytotoxicity of splenocytes to B16 cells was significantly enhanced ($P < 0.01$). The immunization with HACs can both prevent the formation of metastatic foci and treat the existent metastatic foci. The immunization with peptide mixture from massive tumors produced better therapeutic effect ($P < 0.01$), and induced stronger cytotoxicity of splenocytes to B16 cells ($0.01 < P < 0.05$), than peptides from metastatic foci. Conclusions: HACs can induce significant preventive and therapeutic effect on tumor metastasis, and peptides from massive tumors were more effective than those from metastatic foci.

[Key words] metastasis; massive tumor; metastatic foci; heat shock protein 70

* 肿瘤转移是患者死亡的主要原因^[1], 而迄今尚无有效防治方法。在研究 Hsp70-抗原肽诱导抗肿瘤免疫应答的基础上^[2-3], 本研究从诱导肿瘤免疫应答、防止转移灶形成、减少已形成的微小转移灶等方面进一步研究 Hsp70-肿瘤抗原肽复合物免疫治疗对肿瘤细胞转移的影响, 初步证明了其防治作用。

1 材料与方

1.1 材料来源

重组人 Hsp70 为本室制备^[2], 其纯度达 90% (SDS-PAGE)。小鼠黑色素瘤 B16 细胞购自美国

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973)计划资助项目 (No. 2002CB513100)

[作者简介] 陈洪涛(1977-), 男, 湖北省十堰市人, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫学与肿瘤生物治疗研究

[通讯作者] 冯作化, E-mail: fengzhg@public.wh.hb.cn

ATCC 公司。C57/BL6 种小鼠购自中国医学科学院实验动物中心。

1.2 B16 混合抗原肽的制备

分别取小鼠腿部接种的 B16 实体瘤(平均大小为 9 mm × 12 mm)和 B16 肺转移灶(平均大小 1 mm × 1 mm),研磨成单个细胞悬液,按照文献[2]的方法制备两种不同组织来源的抗原肽,过滤除菌,置 -20℃ 保存备用。以下将制得的两种抗原肽分别称为“实体瘤抗原肽”和“转移灶抗原肽”。

1.3 Hsp70 与肿瘤混合肽体外结合

采用 Blachere NE 等人的方法[4]进行抗原肽和 Hsp70 体外结合。反应体系含 1 mmol/L ADP, 1 mmol/L MgCl₂, 75 μg/ml 抗原肽、250 μg/ml Hsp70, 37℃ 水浴 2 h。

1.4 B16 肺转移模型的建立

取体外传代培养的 B16 细胞经尾静脉接种至小鼠,每只每次 6×10^5 ,接种后的每天取 5 只小鼠解剖肺,观察肺转移情况。小鼠肺表面在接种后 4 d 出现转移瘤结节,第 14 天肺表面形成大量的转移灶。因此,本实验中以接种后第 5 天作为形成转移病灶的治疗时间,以接种后第 15 天解剖小鼠计数肺表面肿瘤结节数以检测防治转移效果。

1.5 Hsp70-肿瘤抗原肽复合物免疫小鼠预防 B16 细胞肺转移试验

将小鼠随机分成 5 组, A 组为空白对照组, B 组于分组后第 11 天尾静脉接种 B16 细胞,每只每次 6×10^5 , C、D、E 组于分组后当日小鼠左腋皮下注射实体瘤抗原肽-Hsp70 复合物,免疫 10 d,每只每次 0.1 ml (7.5 μg 抗原肽),每天 1 次,第 11 天 D、E 组小鼠尾静脉接种 B16 细胞,每只每次 6×10^5 ,第 15 天 E 组小鼠开始用此复合物治疗,每只每次 0.1 ml,每天 1 次,连续注射治疗 10 d。第 25 天解剖各组小鼠,计数肺表面肿瘤结节数,另取其脾作杀伤检测。

1.6 Hsp70-肿瘤抗原肽复合物免疫小鼠对 B16 细胞肺转移灶的治疗试验

将小鼠随机分成 4 组, A 组为空白对照组, B、C、D 组经尾静脉接种 B16, 6×10^5 /只, C、D 组在接种后的第 5 天开始分别用实体瘤抗原肽-Hsp70 复合物、转移灶抗原肽-Hsp70 复合物治疗, 0.1 ml/只(7.5 μg 抗原肽/只),每天 1 次,连续注射 10 d,第 15 天解剖小鼠取肺,计数肺表面瘤结节数。

1.7 淋巴细胞的肿瘤细胞毒功能检测

分别取各组的小鼠脾脏,无菌制备脾细胞悬液,低渗法除去红细胞, PBS 液洗 3 次,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基调细胞浓度 2×10^6 /ml,以 100 μl/

孔接种于 96 孔板中,作为效应细胞(effector cells, E)。同时计数 B16 调整浓度分别为 1×10^5 /ml、 2×10^5 /ml,以每孔 100 μl 接种于 96 孔板中,分别作靶细胞组(target cells, T)、效靶混合组,温育 28 h,然后采用 MTT 法分别检测杀伤率。

杀伤率(%) =

$$\left[1 - \frac{\text{效靶细胞 OD 值} - \text{效应细胞 OD 值}}{\text{靶细胞 OD 值}} \right] \times 100\%$$

1.8 统计学处理

采用 *t* 检验进行组间差异显著性分析。

2 结果

2.1 Hsp70-肿瘤抗原肽复合物免疫小鼠对 B16 细胞肺转移的预防作用

从(图 1)可见,未经免疫的小鼠接种 B16 后,肺部表面的转移结节数为 593 ± 19 ,解剖时可见双肺布满黑色转移灶。免疫后再接种 B16,转移结节数为 89 ± 13 ,双肺转移灶的数目显著减小($P < 0.01$)。免疫接种加治疗组,肺部的转移灶仅散在分布,结节数目减少为 42 ± 14 ,与免疫接种未治疗组有显著差异($P < 0.01$)。

图 1 Hsp70-肿瘤抗原肽复合物免疫小鼠
后对肿瘤转移的预防效果

Fig. 1 The prevention effect of immunization with HACs
on tumor metastasis

B: Inoculated with B16 cells; D: Immunized with HACs before inoculation with B16 cells, $P < 0.01$ compared with B; E: Immunized with HACs before and after inoculation with B16 cells, $P < 0.01$ compared with B, $P < 0.01$ compared with D

2.2 免疫后激活的 T 细胞体外对 B16 的特异性杀伤作用

表 1 是各组小鼠取脾后体外脾细胞对 B16 的杀伤率。A 组对 B16 的杀伤率达 13.2%,可能是脾细胞中 NK 细胞等非特异性杀伤的结果, B 组接种 B16 后杀伤率达 35.1%,表明体内已建立了对肿瘤的特异性免疫,但这种杀伤仍低于 C 组免疫后高达 67.4% 的杀伤率, D 组表明免疫再接种 B16 后,体内对肿瘤的特异性

杀伤下降,可能是肿瘤下调了机体免疫的结果,E组是免疫接种再治疗组,与D组相比,这种下调的免疫状态经过 Hsp70-肽复合物的再激活后,对 B16 的杀伤率有所提高。

表 1 免疫后激活的平 T 细胞对 B16 的特异性杀伤作用
Tab.1 The specific cytotoxicity of activated T cells to B16 cells after immunization

Groups	n	Cytotoxicity % ($\bar{x} \pm s$)	
		E/T(10:1)	E/T(20:1)
A	8	10.1 ± 3.2	13.2 ± 4.1
B	8	31.3 ± 3.7	35.1 ± 3.8 [△]
C	8	61.3 ± 2.4	67.4 ± 3.1 [▲]
D	8	47.6 ± 4.2	52.5 ± 3.6 ^{**}
E	8	60.4 ± 3.4	65.2 ± 3.3 [*]

A: Blank control, normal mice; B: Positive control, inoculating B16 cell; C: Immunizing with HACs; D: Immunizing with HACs, then inoculating B16 cell; E: Immunizing with HACs, inoculating B16 cell, then treating with HACs; $\Delta P < 0.01$, compared with A; $\blacktriangle: P < 0.01$, compared with B; $** : P < 0.01$, compared with B, $P < 0.01$, compared with C; $* : P < 0.01$, compared with B

2.3 两种不同部位的肿瘤抗原肽-Hsp70 复合物免疫小鼠后对 B16 肺转移灶的治疗作用

疗作用($P < 0.01$),解剖时也发现这 2 组小鼠的肺部转移结节仅散在分布。但实体瘤抗原肽-Hsp70 复合物更有效($P < 0.01$)。这也与表 2 中 C、D 2 组的结果相吻合。

2.4 Hsp70-肿瘤抗原肽复合物治疗后脾细胞体外对 B16 的特异性杀伤

见表 2, C 组为转移灶抗原肽-Hsp70 复合物治疗组,高于 B 组杀伤率;D 组为实体瘤抗原肽-Hsp70 复合物治疗组,也高于 B 组杀伤率,而且实体瘤抗原肽-Hsp70 复合物治疗组要比转移灶抗原肽-Hsp70 复合物治疗组杀伤率要高。

表 2 Hsp70-肿瘤抗原肽复合物治疗后脾细胞对 B16 细胞的特异性杀伤

Tab.2 The specific cytotoxicity of splenocytes to B16 after treatment with HACs

Groups	n	Cytotoxicity % ($\bar{x} \pm s$)	
		E/T(10:1)	E/T(20:1)
A	8	14.1 ± 3.8	17.2 ± 4.1
B	8	26.3 ± 2.7	32.1 ± 3.2 [△]
C	8	41.4 ± 3.5	44.8 ± 2.8 [▲]
D	8	45.5 ± 3.1	49.2 ± 3.3 [*]

$\Delta : P < 0.01$, compared with A; $\blacktriangle : P < 0.01$, compared with B; $* : P < 0.01$, compared with B, $0.01 < P < 0.05$, compared with C

3 讨论

对于肿瘤侵袭与转移的研究目前有了很大的进展,但仍限于某些方面或某些层面的机制,很多具体机制仍不清楚,通过阻断肿瘤转移而实现防治肿瘤转移的研究仍未取得突破。本文研究结果表明,Hsp70-抗原肽复合物的作用可能为防治肿瘤转移提供一条新的路径。

肿瘤细胞为正常细胞突变而来,其抗原成份类似于正常细胞,对免疫系统而言具有低免疫原性,而且其共刺激分子往往低表达^[5]。而从肿瘤细胞中获取的抗原肽与 Hsp70 形成复合物后,可有效诱导抗肿瘤免疫应答,抑制肿瘤的体内生长^[3]。近年来研究表明,肿瘤抗原肽与热休克蛋白如 gp96 形成复合物被体内的抗原提呈细胞(APCs,如树状突细胞等)通过表面受体 CD91 等被摄入至细胞内^[6],这种复合物起着诸如细胞因子样的作用,APCs 由此被活化,并上调表达共刺激分子^[7]。活化的 APCs 激活 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺T 细

图 2 不同组织来源的肿瘤抗原肽对小鼠肺转移灶的治疗作用

Fig.2 Therapeutic effect of peptides from different sources on pulmonary metastatic foci in mice

B: Inoculated B16 cell; C: Treated with peptides from metastatic foci after inoculation with B16 cells, $P < 0.01$ compared with B; D: Treated with peptides from massive tumor after inoculation with B16 cells, $P < 0.01$ compared with B, $P < 0.01$ compared with C

从图 2 可以看出,实体瘤抗原肽-Hsp70 复合物与转移灶抗原肽-Hsp70 复合物对肺转移灶都有显著的治

胞,进而表现出较强的抗肿瘤免疫。本实验表明,直接从实体瘤组织中获取瘤细胞、制备抗原肽,通过 Hsp70 在体内诱导免疫应答,可以有效的防治肿瘤肺转移;而且从不同部位肿瘤组织中获取的抗原肽均可诱导免疫应答。在肿瘤细胞浸润转移过程中,只有一小部分高表达肿瘤相关基因的细胞易于浸润组织、形成转移灶,从理论上讲,从转移灶获得的抗原肽,应该更接近转移灶肿瘤细胞的抗原肽谱,具有更好的免疫治疗效果。但我们获得的结果则与预期的结果不同。与从较小的肿瘤转移灶获取的抗原肽相比,从较大的实体瘤中获取的抗原肽进行免疫治疗,效果更佳。这一结果表明,对同一种肿瘤而言,转移能力强的细胞克隆与转移能力弱的细胞克隆在抗原谱方面没有明显差异;转移相关基因的高表达,可能对肿瘤抗原谱的影响不大,不会造成抗原谱的大幅度漂移,因此,从已形成的实体瘤获取抗原肽,完全可以用于免疫防治肿瘤转移灶的形成。

从较大实体瘤中获取的抗原肽具有更好的免疫治疗效果,可能是由于较大的肿瘤组织中,与肿瘤相关的异常基因表达更活跃,异常蛋白在细胞内蛋白比例增加,因而肿瘤抗原肽在混合抗原肽中的比例增加。但具体机制仍有待深入研究。

Hsp70-抗原肽复合物可以有效激活机体抗肿瘤免疫应答,其但从上面的结果来看,其免疫效果显然受到肿瘤的影响。免疫后接种肿瘤,脾细胞的杀瘤活性与未接种相比明显降低,而在接种后再进行免疫治疗,脾

细胞的杀瘤活性则更低,这显然是肿瘤诱导免疫耐受机制所产生的影响。虽然免疫后脾细胞的杀瘤活性仍显著高于未免疫组,并产生明显的防治肿瘤的效果,但若要实现完全抑制肿瘤转移灶的形成,仍需要阻断免疫耐受机制。

[参 考 文 献]

- [1] Sugarbaker EV. Patterns of metastasis in human malignancies[J]. *Cancer Biol Rev*, 1981, 2: 235-235.
- [2] Feng ZH, Huang B, Zhang GM, *et al*. Investigation on the effect of peptides mixture from tumor cells inducing anti-tumor specific immune response[J]. *Sci China(Series C)*, 2002, 45(4): 361-369.
- [3] 黄 波, 冯作化, 张桂梅, 等. 重组人 Hsp70 提呈的 H22 肝癌细胞混合抗原肽治疗小鼠肿瘤的研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002, 22(2): 160-163.
- [4] Blachere NE, Li ZH, Chandaukar 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: 1315-1322.
- [5] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family[J]. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12: 991-1045.
- [6] Sreyashi Basu, Robert J. Binder, *et al*. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin [J]. *Immunity*, 2001, 14(3): 303-313.
- [7] Zheng H, Dai J, Stoilova D, *et al*. Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity[J]. *J Immunol*, 2001, 167: 6731-6735.

[收稿日期] 2003 - 12 - 09

[修回日期] 2004 - 05 - 14

中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会 第八次全国学术交流会议征文通知

中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会第八次全国学术会议拟定于 2005 年 5 月下旬在江西南昌市召开。会议将邀请国内外著名妇科肿瘤专家作专题报告。这将是国内妇科肿瘤学界一次高水平的、别开生面的学术会议,欢迎全国妇科肿瘤学同仁踊跃投稿参会。

一、会议主题

妇科肿瘤的放射治疗及综合治疗新思维、新成果。

二、征文内容

妇科肿瘤放射治疗、化学治疗、手术治疗、生物治疗及综合治疗;妇科肿瘤防治的经验;癌前期病变;妇科肿瘤的基础研究;妇科肿瘤诊断治疗的新技术、新知识;妇科肿瘤的细胞学、病理学;康复治疗;妇科肿瘤患者的护理及其它有关的边缘学科等的论文。

三、征文要求

论文要求未公开发表,格式参考《中华妇产科杂志》论文格式撰写,全文及摘要各一份;或交 500 ~ 800 字大摘要一份。同时注明作者姓名、工作单位、联系地址、邮政编码及联系电话或 E-mail 地址。来稿采用 word 格式打印并同时寄软盘或通过 E-mail 投稿。投稿信封上请注明“征文”字样。论文经会议主委会审阅后编辑成论文集,供大家学习参考。会议交流的论文由中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会颁发论文证书及 I 类学分并评选优秀论文。截稿时间为 2005 年 2 月 28 日(以当地邮戳为准)。

来稿请寄:江西省南昌市北京东路 519 号江西省肿瘤医院;邮政编码:330029; E-mail: huaimin@esco.org.cn

联系人:胡爱民 13870911571

卜照香 13657001266

联系电话:(0791) 8313664