

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0272-03

HSPgp96 体外诱导腹腔巨噬细胞抗肿瘤细胞毒作用

施海燕¹, 顾君一², 张天一², 林琳², 朱昌来²(1. 南通大学基础医学院病理生理学教研室, 南通 226001; 2. 南通大学神经再生重点实验室, 南通 226001)

[摘要] 目的: 探讨 HSPgp96 对小鼠 PEM ϕ 体外抗肿瘤细胞毒作用的影响。方法: 分离巯基乙酸盐诱导的小鼠 PEM ϕ , 随机分为培养液对照组、LPS 诱导组、HSPgp96 诱导组。应用硝酸还原酶法、MTT 法、扫描电镜分别观测 PEM ϕ NO 的生成、对肝癌细胞 H22 的细胞毒作用及形态学变化。结果: 在 HSPgp96 的体外诱导下, 小鼠 PEM ϕ NO 的生成量显著增加, 对肝癌细胞 H22 的细胞毒作用明显增强, 其效应与 LPS 相当。结论: HSPgp96 可在体外有效激活 PEM ϕ 的抗肿瘤细胞毒作用, NO 是 PEM ϕ 杀瘤机制中的重要效应分子之一。

[关键词] 热休克蛋白 gp96; 腹腔巨噬细胞; 肿瘤; 细胞毒作用

[中图分类号] R730.51 [文献标识码] A

The Cytotoxic Effect of Peritoneal Elicited Macrophages Induced by HSPgp96 on Anti-Tumor *in vitro*

SHI Hai-yan¹, GU Jun-yi², ZHANG Tian-yi², LIN Lin², ZHU Chang-lai²(1. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Science, Nantong University, Nantong 226001, China; 2. Key Laboratory of Neural Regeneration, Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the cytotoxic effect of PEM ϕ induced by HSPgp96 on anti-tumor *in vitro*. **Methods:** PEM ϕ separated from mice induced by thioglycolate were divided into three groups randomly: Culture medium in control; LPS-induced group; HSPgp96-induced group. The production of NO, the cytotoxic effect to H22 cells and the morphologic change of PEM ϕ were investigated separately by enzyme method, MTT assay and scanning electron microscope. **Results:** *In vitro*, HSPgp96 can increased NO production from PEM ϕ of mice and significantly enhance the cytotoxic effect of PEM ϕ to H22 cells as well as LPS. **Conclusion:** HSPgp96 can effectively induce the cytotoxic effect of PEM ϕ on anti-tumor in which NO is one of the capital effective molecules *in vitro*.

[Key words] heat shock protein gp96; peritoneal elicited macrophages; tumor; cytotoxicity

有关热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)与 M ϕ 的抗肿瘤作用机制及临床应用研究,是目前国内外研究的热点。已有的研究表明,肿瘤细胞的 HSP70 提取物、HSPgp96 提取物在肿瘤免疫及同种移植排斥反应方面具有广泛的应用前景^[1]。HSPgp96 是 HSP 家族的成员之一,认为 HSPgp96 的抗肿瘤作用主要以 HSPgp96 相关肽为基础,以激活特异性 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)的免疫效应为主要机制^[2]。而巨噬细胞(macrophages, M ϕ)也是宿主重要的抗肿瘤免疫活性细胞,一旦活化可释放多种免疫活性物质,对多种肿瘤的发生发展有一定抑制作用。本研究应用提纯的小鼠肝癌细胞 H22 中的

HSPgp96,有效治疗小鼠 H22 肝癌移植瘤的初步研究^[3],观察小鼠腹腔巨噬细胞(peritoneal elicited macrophages, PEM ϕ)在体外经 HSPgp96 诱导后,其抗肿瘤细胞毒作用及一氧化氮(nitric oxygen, NO)生成的变化,结合电镜下的形态学观察,探讨 HSPgp96 的抗肿瘤免疫机制。

[基金项目] 江苏省教育厅基金资助项目(03KJD320183)

[作者简介] 施海燕(1973-),女,江苏省大丰市人,讲师,硕士,主要从事肿瘤免疫治疗研究。

[通讯作者] 顾君一

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基(Sigma), 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, Sigma), 四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma), NO 检测(酶法) 试剂盒(晶美生物工程北京有限公司), 二甲基亚砷(Dimethyl Sulfoxide, DMSO, Sigma)。JSM-T300 扫描电子显微镜(JEOL 公司), RS-20 III 高速冷冻离心机(TDMY SEIKOCO. LTD. TOKYO JAPAN)。

1.2 动物与瘤株

ICR 封闭群小鼠, 24 ~ 30 g, 购自南通大学动物实验中心。小鼠腹水型肝癌 H22 细胞株由中科院上海药物研究所提供, 本室常规接种传代。

1.3 HSPgp96 的纯化鉴定

参照文献[3]。

1.4 分离小鼠 PEMφ 及细胞培养

小鼠腹腔注射 3% 的巯基乙酸盐 1 ml 连续 3 d。5 d 处死小鼠, 收集腹水, 贴壁法分离 PEMφ, 按 1 × 10⁶/ml 接种, 用含 10% 小牛血清的 1640 培养液继续培养。

1.5 检测小鼠 PEMφ 的 NO 生成量和细胞毒活性

PEMφ 接种于 96 孔培养板, 分 3 组, 每组 6 孔: 培养液对照组; LPS 诱导组, 终浓度 10 μg/ml; HSPgp96 诱导组, 终浓度 60 μg/ml。37℃、5% CO₂ 孵育 24 h 后, 取对数生长期的腹水型肝癌细胞 H22 按效靶比 E: T (10: 1) 加入各孔, 设靶细胞对照孔 6 个, 24 h 后用酶法测定各孔上清液 NO 含量, 用 MTT 法测定各孔 H22 细胞 OD₅₇₀ 值。

$$\text{PEM}\phi \text{ 细胞毒活性}(\%) =$$

$$\left(1 - \frac{\text{实验组靶细胞 OD 值}}{\text{对照孔靶细胞 OD 值}} \right) \times 100\%$$

1.6 扫描电镜下观察细胞形态学变化

盖玻片置于小培养皿内, PEMφ 接种于培养皿, 分培养液对照组和 HSPgp96 诱导组, 终浓度 60 μg · ml⁻¹。孵育过程同 1.5。然后取出 PEMφ 爬片制备成扫描电镜标本, 观察细胞形态学变化。

1.7 统计学处理

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组样本均数采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 scheffe 检验法, 以 Stata8.0 软件进行统计。

2 结 果

2.1 HSPgp96 对 PEMφ NO 生成量及细胞毒活性的影响

各组小鼠 PEMφ 与诱导剂共同孵育, 培养液作为阴性对照, LPS 作为阳性对照。与培养液对照组比较, HSPgp96 诱导组小鼠 PEMφNO 的生成量显著增加($P < 0.01$), 对肝癌细胞 H22 的细胞毒活性明显提高($P < 0.01$), 与阳性对照组 LPS 的作用相当(表 1)。

2.2 HSPgp96 诱导的 PEMφ 的形态变化

HSPgp96 诱导组 PEMφ 体积较大, 表面高低不平, 细胞呈不规则形, 肝癌细胞 H22 体积相对小, 表面光滑, 细胞多呈圆形(图 1A、B、C)。见 PEMφ 黏附肿瘤细胞(图 1A), 甚至伸出伪足包绕肿瘤细胞(图 1B), 被杀伤的个别肿瘤细胞可见溃破缺口(图 1C)。激活的 PEMφ 体积增大, 细胞表面片垂样、泡状突起显著增多, 向四面八方伸出伪足, 并可见粗大的伪足(图 1D)。

表 1 PEMφ 的 NO 生成量和细胞毒活性

Tab. 1 The production of NO and cytotoxicity of PEMφ

| Groups | Production of NO (μmol/L) ($\bar{x} \pm s$) | OD($\bar{x} \pm s$) | Cytotoxicity(%) (E: T = 10: 1) |
|-----------------|--|-----------------------|---------------------------------------|
| H22 cells | — | 0.546 ± 0.042 | — |
| Control | 179.58 ± 4.99 | 0.311 ± 0.049 | 43.0 |
| LPS(10 μg/ml) | 359.73 ± 17.88* | 0.149 ± 0.004* | 72.7 |
| HSP(60 μg/ml) | 368.79 ± 25.56* | 0.163 ± 0.012* | 70.1 |

* $P < 0.01$ as compared with the control group

3 讨 论

肿瘤细胞来源的 HSPgp96 是结合了抗原肽的复合物, 其肿瘤免疫效应的发挥依赖于免疫系统的综合协同作用, 涉及 α/βT 细胞、γ/δT 细胞、自然杀伤细胞

(natural killer cell, NK) 和淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine activated killer, LAK) 样细胞等^[4]。免疫系统的非特异性抗肿瘤免疫效应的一个重要方面是发挥 Mφ 的细胞毒作用, 其细胞毒效应分子也是多种多样, NO 就是其中之一。本实验发现, HSPgp96 在体外可

直接激活小鼠 PEM ϕ ,使 PEM ϕ NO 的产生增加、细胞毒作用增强,与 LPS 的作用相当。

图 1 扫描电镜下 HSPgp96 诱导的 PEM ϕ 的形态变化

Fig.1 The morphologic change of PEM ϕ induced by HSPgp96 observed by electron microscope

A: PEM ϕ adheres the hepatic carcinoma cell H22($\times 3500$); B: PEM ϕ stretches out pseudopodia and encloses H22($\times 3500$); C: Ruptures can be seen on some killed H22($\times 3500$); D: The activated PEM ϕ enlarges, prominences like vacuolus or lamellar forming pseudopodia in various direction increase apparently on the cell surface, some pseudopodia are rather thick($\times 5000$)

LPS 是 G⁻ 细菌细胞壁的主要成分,以往研究已表明,LPS 单独刺激可以在较低的浓度下(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)诱导体外培养的 M ϕ 诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)mRNA 的表达,有明显的剂量依赖性, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下即可达到表达高峰,维持到 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度^[5],并诱导 M ϕ NO 的产生,杀伤肿瘤细胞^[6]。本实验以 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度 LPS 诱导 PEM ϕ ,作为有效的阳性对照,反映出 HSPgp96 具有的作用强度。

Panjwani 等^[7]学者报道,鼠及人类 M ϕ 经 HSPgp96 和 HSP70 刺激后,导致 NO 合酶的感应,iNOS mRNA 的表达增强,产生 NO,并且干扰素(Interferon, IFN)和 HSPgp96 混合物的刺激可加强 NO 的产生。NO 是一种高活性和不稳定的自由基,是活化的 M ϕ 杀灭肿瘤细胞及病原微生物的主要效应分子之一,NO 也能通过诱导肿瘤细胞凋亡和抑制 DNA 合成的限速酶等多种途径来抑制肿瘤的生长。M ϕ 还通过分泌肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、活性氧及细胞因子 IL-1 等生物活性物质直接杀瘤或抑制瘤细胞生长,M ϕ 的抗癌效应还与抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, AD-CC)、膜接触效应(Fas/FasL 途径)等机制有关。我们在扫描电镜下观察到激活的 PEM ϕ 黏附、包绕并杀伤肝癌细胞 H22,并通过 MTT 法证实 HSPgp96 诱导的 PEM ϕ 对肝癌细胞 H22 的细胞毒活性显著增强。

实验结果提示,HSPgp96 在体外可通过激活小鼠

PEM ϕ ,使其 NO 产生增加并对肝癌细胞 H22 产生抗肿瘤作用。本研究为 HSPgp96 作为瘤苗用于肿瘤的免疫预防和治疗提供有意义的实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] 岳培彬,杨树德,黄常志. 热休克蛋白 gp96 抗肿瘤免疫的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(3): 225-227.
- [2] Hoos A, Levey DL. Vaccination with heat shock protein-peptide complexes: From basic science to clinical applications[J]. Expert Rev Vaccines, 2003, 2(3): 369-379.
- [3] 施海燕,周欣阳,张天一,等. HSPgp96 与 rIL-2 治疗小鼠 H22 肝癌移植瘤的实验研究[J]. 南通医学院学报, 2004, 24(2): 122-124.
- [4] 刘丹. 热休克蛋白在天然免疫和适应性免疫中的作用[J]. 国外医学免疫学分册, 2004, 27(3): 121-124.
- [5] 苏踊跃,罗向东,杨宗城. ERK1/2 信号通路参与 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 表达的调节[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(10): 1205-1207.
- [6] 包建军,邢 嵘,于丽华,等. 一氧化氮与活化的小鼠腹腔巨噬细胞细胞毒作用关系的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1997, 4(3): 204-206.
- [7] Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs[J]. J Immunol, 2002, 168(6): 2997-3003.

[收稿日期] 2005 - 08 - 15

[修回日期] 2005 - 10 - 09

[本文编辑] 韩 丹