

[文章编号] 1007-385X(2007)03-0275-04

自身树突状细胞疫苗治疗尖锐湿疣的临床研究

施晓琴¹, 刘军权^{2*}, 陈复兴², 陈维峰¹(1. 解放军第 97 医院皮肤科, 2. 实验科, 江苏 徐州 221004)

[摘 要] 目的: 观察自身树突状细胞疫苗对人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染所致尖锐湿疣患者 T 细胞的作用和临床治疗效果。**方法:** 入选的 73 例受试者均为 HPV-DNA 检测阳性, 并经过冷冻、或激光、或电外科治疗加干扰素抗病毒治疗半年未愈的尖锐湿疣(condyloma acuminatum, CA)患者。抽取患者外周血分离单个核细胞(PBMC), 用细胞因子联合定向培养树突状细胞(DC); 从 CA 患者的疣细胞中提取 HPV 抗原, 用其致敏自身 DC 制备 DC 疫苗; 将 DC 疫苗与自身 T 淋巴细胞共同培养后, 检测 T 细胞增殖数; 同时将自身 DC 疫苗注入患者腹股沟的浅表淋巴结内, 每例注入 DC 总数为(1~4) × 10⁷ 个, 观察其疗效。**结果:** 经 HPV 致敏的 DC 疫苗能促进自身 T 淋巴细胞增殖, 与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$)。经 HPV 致敏 DC 疫苗治疗后, 治愈率为 90.4% (66/73), 经 6~12 个月随访无复发; 每例治愈时间为(25 ± 10)d。**结论:** HPV 致敏的自身 DC 疫苗能提高自身 T 淋巴细胞增殖能力, 治疗 HPV 致尖锐湿疣疗效显著, 无不良反应。

[关键词] 树突状细胞疫苗; 人类乳头状瘤病毒; 尖锐湿疣; 淋巴细胞增殖

[中图分类号] R752.5 **[文献标识码]** A

Auto-dendritic cell-vaccine in treatment of patients with condyloma acuminatum: a clinical study

SHI Xiao-qin¹, LIU Jun-quan^{2*}, CHEN Fu-xing², CHEN Wei-feng¹(1. Department of Dermatology, 2. Department of Central Laboratory, No. 97 Hospital of PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu province, China)

[Abstract] Objective: To observe the effects of auto-dendritic cell vaccine on T cells of patients with condyloma acuminatum (CA) related human papilloma virus (HPV) and its clinical outcome. **Methods:** 73 patients with condyloma acuminatum (CA) in the present study were positive of HPV-DNA and have been unsuccessfully treated with freezing, laser, or electric therapy combined with interferon anti-virus treatment for half a year. The peripheral blood samples were harvested from patients and the mononuclear cells were extracted to cultivate DCs in presence of cytokines. Auto DCs were sensitized with corresponding HPV virus antigen of a patient to prepare the auto-dendritic cell vaccine. Then the vaccine were cultivated with auto T-cells and the proliferation of T cells were examined. Meanwhile, the auto-DC vaccine (1-4) × 10⁷ was also injected into the patients' inguinal lymph glands and its therapeutic effectiveness was observed. **Results:** The prepared DC-vaccine significantly promoted the proliferation of auto T cells compared with control group ($P < 0.01$). Treatment with auto-DC vaccine had an effective rate of 90.4% (66/73) in the 73 patients, and there was no recurrence after 6-12 months' follow-up. The average time needed for therapy was (25 ± 10) d. **Conclusion:** The prepared auto-DC vaccine can boost auto T lymph cell proliferation and has obvious curative effect on HPV-related CA, with no apparent side effects.

[Key words] dendritic cells; human papillomavirus; condyloma acuminatum; lymphocyte proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(3): 275-278]

尖锐湿疣(condyloma acuminatum, CA)主要由低危型人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)6 和 11 型感染引起的一种性传播性疾病, 其病变局限在上皮层, HPV 的感染和病毒生长依赖于基底细胞的分化。HPV 病毒样颗粒可以激活树突状细胞, 但不能激活存在于表皮的朗格汉斯细胞, 因而不能启动激活 CD8⁺ 的 T 细胞对 HPV 完整病毒免疫反应^[1]。在治疗中, 少数 CA 病例迁延不愈和

顽固难治与 HPV 不能有效激发机体特异性免疫反

[基金项目] 南京军区医学科研“十一五”计划资助项目(No. 06MA45)。Supported by the “Eleventh Five-year Plan” of Medical Research of PLA Nanjing Military Area Command (No. 06MA45)

[作者简介] 施晓琴(1963 -), 女, 汉族, 江苏省南通市人, 主治医师, 主要从事皮肤病相关的细胞免疫学研究, Tel. (0516) 83349159

* Corresponding author. Tel: (0516) 83523166; E-mail: xzljq19600115@sina.com

应及局部免疫功能缺陷有关^[2]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是已知体内抗原提呈功能最强的专职抗原提呈细胞(antigen presentation cell, APC),能摄取各类抗原,表达丰富的MHC分子、共刺激分子、黏附分子及高水平的TH1型细胞因子IL-12^[3]。近年研究显示,经各类肿瘤抗原致敏的DC可诱导机体产生高水平的特异性抗肿瘤免疫应答^[4-5]。本研究将CA患者外周血单个核细胞以冻溶法提取胞质液,并灭活HPV病毒,然后致敏患者自身DC制备DC疫苗,观察该疫苗对CA患者T细胞增殖的影响和治疗效果。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

rhIL-4(比活性13 U/ng)、rhTNF- α (比活性36 U/ng)、rhIL-2(比活性40 U/ng)购于Promega公司。rhGM-CSF由中国军事医学科学院提供。胶原酶、透明质酸酶、RPMI 1640、胎牛血清购于Gibico公司。淋巴细胞分离液(Ficoll, 1.077)购于上海第二制药厂。MTT购于Sigma公司。HPV-6、11和16型核酸扩增PCR荧光检测试剂盒购于深圳匹基生物工程股份有限公司。PE结合的鼠抗人单抗CD1a、CD80及同亚型对照抗体兔抗鼠IgG1k购于Pharmingen公司。FITC结合的CD14、CD86、HLA-DR和同型对照抗体FITC-m IgG1、PE-m IgG2a购于BD公司。流式细胞仪购于美国BD公司的FACSCalier,分析软件为ELITE。Roche lightcycler荧光PCR检测仪购于德国罗氏公司。

1.2 受试对象

受试者从2001年1月至2006年1月来我院门诊就医并经HPV-DNA检测阳性的1576例尖锐湿疣患者中选取。入选73例患者均具有典型的尖锐湿疣临床特征,疣组织标本HPV-DNA检测阳性;均经过冷冻或激光或电外科治疗加干扰素抗病毒治疗半年未愈。为减少患者携带尖锐湿疣负荷数量,在采集标本时,将可见的尖锐湿疣全部清除。治疗之前均明确告知本治疗的优点和不足,患者或家属签署知情者同意书,并报医院伦理委员会批准。

1.3 HPV PCR 荧光检测

按试剂盒说明书要求进行。取手术切除的新鲜疣组织先进行DNA提取,然后加入核酸扩增试剂(含PCR反应液、Taq酶和UNG酶)中,同时进行HPV阳性参控品对照试验,用Roche lightcycler荧光PCR检测仪实时监控检测HPV-DNA。

1.4 HPV 抗原的制备

收集每位治疗患者手术切除的新鲜疣组织标本(3~5枚),将组织块浸于含青霉素 1×10^6 U/L、链霉素 1×10^6 U/L的RPMI 1640中2 h。用无菌生理盐水反复冲洗瘤组织数次,将瘤体剪成 1 mm^3 大小,置于含0.05%胶原酶、0.01%透明质酸酶、10%小牛血清的RPMI1640培养液中,4℃磁力搅拌过夜消化,再经200目网过滤,收集细胞,用Hank液洗2遍,将细胞配成 2×10^9 /L的悬液,用Ficoll分离,除去死细胞层,再用Hank液洗2遍,加入100 μl 生理盐水,放入液氮中,10 min后迅速移至37℃水浴中,待其完全融化后,再次放入液氮中,如此反复3次。将冻融的细胞稀释到1~3 ml,通过微孔滤膜过滤,除去细胞碎片,灭活后置于4℃保存备用。

1.5 DC 的体外培养和自身DC疫苗的制备

抽取患者外周血200 ml,分离出血浆,吸出富含白细胞层的细胞约5 ml,悬浮于等量患者自身血浆中,用淋巴细胞分离液分离收集单个核细胞(PBMC)。将自身血浆加入剩余红细胞中回输给病人。单个核细胞用无菌生理盐水洗涤3次,用RPMI 1640完全培养液将细胞配成 2×10^9 /L的悬液,加入6孔板细胞培养板(2~4块)中,每孔3 ml,置37℃、5%CO₂培养箱中孵育2 h。再用预热的培养液轻洗培养板2次,即获贴壁的单个核细胞,每孔加入完全培养液(含200 μg /L rhGM-CSF和50 μg /L rhIL-4)3 ml。每2 d半量换培养液,将培养第6天的树突状细胞分为2组:一组在培养的9/10 DC中加入灭活HPV抗原30 ml/L;另一组为剩余的1/10 DC中加入RPMI 1640 50 ml/L作为对照。24 h后两组分别加入rhTNF- α 至10 μg /L,第10天时收集实验组DC细胞即为DC疫苗。

1.6 细胞表型的流式细胞仪分析

用于细胞表面标记的单克隆抗体为PE结合的鼠抗人CD1a和CD80单抗、FITC结合的CD14、CD86和HLA-DR单抗。抗体1:10稀释,与细胞4℃孵育20~25 min, PBS洗涤2次,重新悬浮,流式细胞仪检测,每个样本分析细胞数 $\geq 5 \times 10^4$ 。

1.7 用DC疫苗、DC与T细胞进行混合淋巴细胞反应

在96孔细胞培养板中加入反应细胞(自体PBMC经花环沉降法^[6]获得的T细胞)和刺激细胞(DC疫苗和对照DC),其比例分别为1:1、1:10、1:20、1:40、1:80和1:160, T细胞数为 5×10^5 /孔。每孔培养液总量加至200 μl ,每一样本做3个复孔。置37℃、5%CO₂孵箱中孵育72 h,每孔加入5 μg /ml的MTT溶液20 μl ,继续培养4 h,离心去上

清,加入 DMSO 溶解液,150 μl /孔,10 min 后用酶标仪于 490 nm 波长测 D 值。

1.8 自身树突状细胞疫苗治疗受试者

受试者自身 DC 疫苗经细菌和霉菌培养阴性后,收集细胞,用无菌生理盐水洗 3 次,将细胞悬浮于 2 ml 自身血浆中,用注射器将细胞悬液分 4 点注射入腹股沟的浅表淋巴结内,0.5 ml/点。每点细胞数在 $(1 \sim 10) \times 10^6$,细胞总数在 $(1 \sim 4) \times 10^7$ 之间。73 例患者中,接受 1 次治疗有 61 例;35 d 后有 12 例未治愈者行第 2 次治疗。

1.9 统计学处理

以上实验结果用 stato 6.0 统计软件进行 t 检验,数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。

2 结果

2.1 HPV PCR 荧光检测结果

从 73 例患者疣体中采集的标本,经核酸扩增 PCR 荧光检测发现,均为 HPV-6 型。用于刺激 DC 的疣体提取物中的 HPV-6 病毒含量为提取前的 2 ~ 3 倍。

2.2 细胞因子联合培养后 DC 的表型和形态观察

刚分离的 PBMC 呈球形散在分布,表面光滑,贴壁细胞为单个核细胞,加入 rhGM-CSF、rhIL-4 培养 24 h,贴壁细胞为均匀散布的细胞聚集体,随时间延长细胞出现毛刺状突起。加 TNF- α 2 d 后大部分贴壁细胞变为悬浮生长,原毛刺状变为粗大树突状,聚集成簇,形态不规则,相差显微镜可见伸展大量毛刺的典型 DC 形态。培养第 10 天 DC 的 CD1a/CD14、CD80/CD86 和 HLA-DR 阳性细胞分别为 73%、83% 和 69% (图 1)。

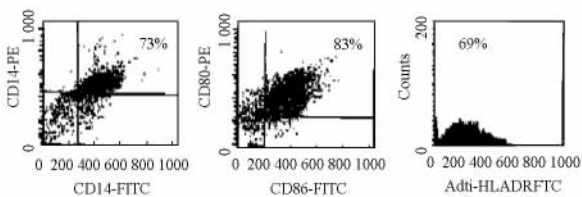


图 1 细胞因子联合培养后 DC 的表面分子

Fig. 1 Surface molecules of DC 10 d after coculture with cell factors

A: The CD1a and CD14 surface molecules of DC; B: The CD80 and CD86 surface molecules of DC; C: The HLA-DR surface molecules of DC

2.3 DC 疫苗对 T 淋巴细胞增殖的促进作用

2 组 DC 均可刺激自身 T 淋巴细胞增殖,它们的

刺激作用随着 DC 与 T 细胞比值的增加而增高。与对照组的 DC 相比,DC 疫苗更强地促进自身 T 细胞的增殖,两者差异显著 ($P < 0.01$, 图 2)。

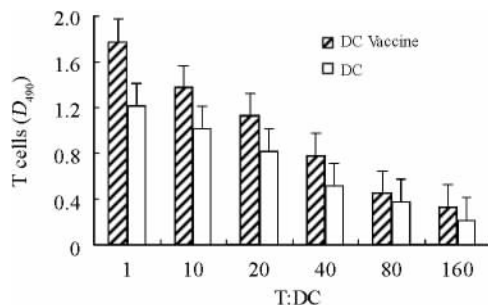


图 2 DC 疫苗对自身 T 细胞增殖的促进作用

Fig. 2 Auto T lymph-cell proliferation induced by auto-DC-vaccine

2.4 临床疗效和随访结果

73 例 CA 患者治疗前均表现为在肛门、外生殖器部位有新生丘疹或结节,呈乳头状瘤样增生,基部狭窄,有蒂;均经过冷冻或激光或电外科治疗加干扰素治疗半年未愈。经自身 DC 疫苗 1 次注射治疗后,61 例 (83.5%) 临床病症消失,疣体 (25 ± 10) d 自行脱落,无新生乳头状瘤样疣体。11 例治疗未愈者 35 天后行第 2 次治疗。经 1 ~ 2 次治疗后患者总治愈率为 90.4% (66/73),表现为乳头状瘤样疣体消失,原疣体部位的组织标本 HPV-DNA 检测转阴。患者经 6 ~ 12 个月随访无复发。

2.5 DC 疫苗治疗的不良反应

15 例在注射自身 DC 疫苗后,有局部淋巴结肿痛,未经任何处理,1 周后恢复正常。经 6 ~ 12 个月随访,未发现与治疗相关的病理性改变。

3 讨论

HPV 有嗜上皮性,其整个生活周期局限在上皮层。病毒侵入基底细胞,病毒 DNA 在基底细胞内复制,随着基底细胞分化成熟逐渐向表层移动,在表层细胞内病毒衣壳蛋白表达并包装形成完整的病毒颗粒,经修饰后释放到上皮表面,以密切接触途径播散。HPV 的衣壳蛋白尽管具有很高的免疫原性,但在自然感染过程中不能有效地在感染早期提呈给免疫系统,在感染后期或皮损进展为恶性时方可检测到抗病毒免疫反应^[7]。

CA 的复发是比较难处理的临床问题。目前对 HPV 感染尚无有效预防和治疗办法,HPV 引起的 CA 复发率高达 60% ~ 70%^[8]。HPV 感染导致细胞表面 MHC I 类分子复合体不能转运至细胞表面,

从而阻止抗原提呈给特异的 T 效应细胞,降低 CTL 对病毒的杀伤作用。另外,HPV 感染者 NK 细胞数量下降,干扰素诱导基因下调^[9-10]。在清除 HPV 感染的患者中,HPV 特异性的 CTL 细胞反应可达 63%,而 HPV 阳性的宫颈癌患者 CTL 反应仅为 14%^[11]。

DC 能诱导抗原特异性 T 细胞杀伤肿瘤或病毒感染细胞,成为目前肿瘤及病毒感染性疾病生物治疗的有效途径^[12-18]。由于 DC 是通过细胞内吞作用摄取抗原,并酸化胞质中降解的抗原肽,再与 MHC II 类分子结合,共同表达在 DC 表面。在体外,用瘤细胞中提取的病毒抗原致敏 DC,可使病毒抗原被 DC 高效摄取,如果用其治疗患者将会取得更显著的疗效^[19]。

本研究将摄取 HPV 抗原的疫苗注射入淋巴结(LN)内,可减少 DC 循环环节,直接将高表达 MHC 分子的抗原肽提呈给相应的 T 细胞,并与 DC 高表达的 B7-1、B7-2 和 CD40 等共刺激分子双重激活 T 细胞,有利于更快地清除病毒感染的瘤细胞^[20]。

研究发现,经 DC 疫苗刺激的自身 T 细胞,其增殖显著数高于对照组,表明具有激发 T 细胞活性的功能。经 DC 疫苗治疗后,73 例 CA 患者 66 例(90.4%)治愈,随防 6~12 月未见复发,说明其有较好的临床效果。DC 疫苗治疗后,患者痊愈时间相差较大,可能与注射的 DC 数量、质量、效果及患者的自身免疫力等因素有关。部分患者治疗后近 35 d 疣体才完全脱落,这是否与 DC 介导了机体体液免疫应答有关还需进一步证实。虽然 DC 疫苗治疗 CA 取得了明显的疗效,但还需对其免疫方案及潜在危险进行深入的研究。

[参 考 文 献]

[1] Fausch SC, Da Silva DM, Rudolf MP, *et al.* Human papillomavirus virus-like particles do not activate langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses [J]. *J Immunol*, 2002, 169(6): 3242-3249.

[2] Burk RD, Ho CY, Beardsley L, *et al.* Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women [J]. *J Infect Dis*, 1996, 174(2): 679-689.

[3] Jongmans W, Tiemessen DM, van Vlodrop IJ, *et al.* Th1-polarizing capacity of clinical-grade dendritic cells is triggered by ribomunyl but is compromised by PGE2 [J]. *J Immunother*, 2005, 28(5): 480-487.

[4] Lau P, Wang F, Jeffery G, *et al.* Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cell in patients with metastatic melanoma [J]. *J Immunother*, 2001, 24(1): 66-78.

[5] 刘军权,陈复兴,主鸿鹄,等. 慢性粒细胞白血病患者 DC 对细胞因子诱导的杀伤细胞细胞毒作用的影响 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2002, 18(3): 274-280.

[6] Madsin M, Johnson HE. A methodological study of E-rosetted formation AET-treated sheep red blood cells [J]. *J Immunol Methods*, 1979, 27(1): 61-74.

[7] Konya J, Dillner J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses [J]. *Adv Cancer Res*, 2001, 82: 205-233.

[8] McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, *et al.* Biology of human papillomaviruses [J]. *Int J Exp Pathol*, 2001, 82(1): 15-53.

[9] Vambutas A, Devoti J, Pinn W, *et al.* Interaction of human papillomavirus type 11 E7 protein with Tap-1 results in the reduction of ATP-dependent peptide transport [J]. *Chin Immunol*, 2001, 101(2): 94-99.

[10] 王 莉,张文夺. HPV 持续性与免疫调节机制 [J]. *现代妇产科进展*, 2004, 13(2): 134-136.

[11] Nakagawa M, Stites DP, Palefsky JM, *et al.* CD4-positive and CD-positive cytotoxic T lymphocytes contribute to human papillomavirus type 16E6 and E7 responses [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999, 6(4): 494-498.

[12] 黄伟峰. 树突状细胞疫苗与 HPV 感染疾病的治疗进展 [J]. *实用癌症杂志*, 2005, 20(1): 106-108.

[13] Sousa CR. Essay: dendritic cells in a mature age [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(6): 476-483

[14] Sasawatari S, Tadaki T, Isogai M. Efficient priming and expansion of antigen-specific CD81 T cells by a novel cell-based artificial APC [J]. *Immuno Cell Bio*, 2006, 84(6): 512-521.

[15] Adam C, Mysliwicz J, Mocikat R. Specific targeting of whole lymphoma cells to dendritic cells *ex vivo* provides a potent antitumor vaccine [J]. *J Transl Med*, 2007, 16(5): 1-11.

[16] Rutella Se, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age, 2006, 108(5): 1435-1440.

[17] 曹雪涛. 肿瘤生长与转移中的免疫学问题 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(1): 2-6.

[18] 陈 冰. 树突状细胞表达的共刺激分子与 Th 细胞分化 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(2): 197-200.

[19] 芦桂青,程 浩,张 行,等. 尖锐湿疣病损组织粗提蛋白对混合淋巴细胞反应的研究 [J]. *中华传染病杂志*, 2005, 23(1): 24-27.

[20] Choudhury A, Gajewski JL, Liang JC, *et al.* Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 1997, 89(4): 1133-1142

[收稿日期] 2006 - 12 - 30

[修回日期] 2007 - 04 - 30

[本文编辑] 韩 丹