

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.010

· 基础研究 ·

吉非替尼联合靶向 EGFR DNA 疫苗对小鼠 Lewis 肺癌细胞体内外的抑制作用

刘 崇, 武建毅, 唐 亮, 谈立松* (上海市肺科医院 中心实验室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 探讨吉非替尼(gefitinib)联合靶向 EGFR DNA 疫苗对小鼠 Lewis 肺癌体内外的抑制作用。方法: 用鸡 EGFR 与兔 IgG Fc 段异种融合 DNA 疫苗 pVAX1/cEGFR-rFc 免疫小鼠制备抗血清, ELISA 方法测定抗血清的效价。MTT 法检测 Lewis 细胞的生长情况。建立 Lewis 肺癌鼠移植瘤模型, 随机分为疫苗组、吉非替尼组、吉非替尼 + 疫苗组和对照组, 观察各组小鼠肿瘤体积、重量及生存情况。结果: pVAX1/cEGFR-rFc DNA 疫苗免疫小鼠后抗 EGFR 血清效价为 1:1 000。与抗血清组或吉非替尼组相比, 抗血清 + 吉非替尼组可显著抑制 Lewis 细胞的生长 ($P < 0.05$)。体内实验显示, 吉非替尼 + 疫苗组小鼠移植瘤生长缓慢, 荷瘤小鼠生存率显著提高 ($P < 0.01$)。结论: 以 EGFR 为靶点的 DNA 疫苗和靶向药物吉非替尼之间具有协同性抗肿瘤作用, DNA 疫苗主动免疫可以提高吉非替尼的疗效。

[关键词] 肺肿瘤; 吉非替尼; 表皮生长因子受体; DNA 疫苗; 协同作用

[中图分类号] R734.2; R730.54 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2009)04-0369-05

Inhibitory effect of gefitinib combined with DNA vaccine targeting EGFR against mouse lung cancer Lewis cells

LIU Dong, WU Jian-yi, TANG Liang, TAN Li-song* (Central Laboratory, Shanghai Pneumology Hospital, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibitory effect of gefitinib combined with DNA vaccine targeting EGFR against implanted Lewis tumors in mice. **Methods:** Chicken EGFR L2 domain and rabbit IgG Fc domain fusion pVAX1/cEGFR-rFc DNA vaccine was injected into mice and the titer of anti-EGFR in serum was determined by ELISA. The growth of Lewis cells was measured by MTT. Lewis lung cancer mouse models were established and were randomly divided into vaccine, gefitinib, gefitinib + vaccine, and control groups. The tumor volume and weight and survival of mice were examined in different groups. **Results:** The titer of anti-EGFR in mice vaccinated with pVAX1/cEGFR-rFc plasmid was 1:1 000. The proliferation of Lewis cells in anti-EGFR combined with gefitinib was significantly inhibited compared with those in anti-EGFR and gefitinib groups ($P < 0.05$). *In vivo* results showed that the growth of implanted Lewis tumors in vaccine + gefitinib group was greatly inhibited, and the survival rate of Lewis-bearing mice was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** DNA vaccine targeting EGFR has a synergistic effect with gefitinib in anti-tumor activity, and this DNA vaccine can increase the efficiency of gefitinib.

[Key words] lung neoplasms; gefitinib; epidermal growth factor receptor(EGFR); DNA vaccine; synergistic effect

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(4): 369-373]

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)靶向治疗是近年来肿瘤生物治疗的热点^[1-4]。EGFR 靶向治疗的策略主要有两种:一种通过小分子化学物质与信号分子或其受体的关键位点结合, 封闭其活性, 从而达到阻断信号转导、抑制肿瘤生长的目的。靶向药物吉非替尼(gefitinib, ZD1839)就属于此类物质^[5]。另一种策略是设计针对信号分子的抗体或疫苗, 封闭肿瘤的信号转导通路。目前抗 EGFR 单克隆抗体以及 EGFR 靶向疫苗都已相继问世^[6-7]。本课题组曾以 EGFR 为靶点构建了鸡 EGFR(chicken EGFR, cEGFR)与免疫球蛋白

白 IgG Fc 段(rabbit Fc, rFc)融合的 DNA 疫苗 pVAX1/cEGFR-rFc, 通过动物实验证明该疫苗对小鼠移植肿瘤有保护作用^[8]。本实验将不同靶向策略的两种药物联合运用, 探索靶向 EGFR 的 DNA 疫苗

[基金项目] 上海市科委重点基金资助项目(No. 03DZ19236); 上海市肺科医院课题(No. 200612)。Supported by the Key Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality(No. 03DZ19236); the Research Project of Shanghai Pneumology Hospital(No. 200612)

[作者简介] 刘 崇(1976-), 女, 山东省济宁市人, 医学硕士, 助理研究员, 主要从事肺癌防治的研究工作

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: tanlisong@yahoo.com.cn

苗是否可以增强吉非替尼的抗肿瘤效果, 为肿瘤联合治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

吉非替尼片剂为英国阿斯利康制药公司产品。C57BL/6 小鼠, 4 周龄(♀), 购自中科院上海实验动物中心(动物合格证号: 中科动管第 006 号)。RPMI 1640 培养基、新生胎牛血清均购自 Gibco 公司。小鼠 Lewis 肺癌细胞株为本室保存。

1.2 EGFR 靶向 DNA 疫苗的制备

以鸡 EGFR(chicken EGFR, cEGFR)膜外部分 L2 区基因与免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段(rabbit Fc, rFc)基因为基础构建的异种融合 DNA 疫苗 pVAX1/cEGFR-rFc 为本实验室构建、鉴定, 并已进行相关的实验研究^[4]。

1.3 DNA 疫苗免疫小鼠及 ELISA 法测定抗血清的效价

取 C57BL/6 小鼠 10 只, 于大腿肌肉内注射 100 μg 超纯 DNA 疫苗质粒, 每 5 d 重复 1 次, 共 4 次。末次注射后 5 d 眼球取血, 检测抗体滴度。方法如下: 高表达 EGFR 的 A549 细胞制成细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 1×10^5 个细胞, 24 h 后弃上清液, PBST(PBS 含 0.05% Tween20)洗板 3 次。每孔加入 200 μl 封闭液(内含 1% BSA 的 PBST), 37 °C 孵育 2 h。待测小鼠抗血清用 PBST(含 1% BSA)按 1:200; 1:500; 1:1 000; 1:2 000; 1:4 000 稀释后, 每孔加入 100 μl, 37 °C 继续孵育 2 h。按说明书稀释羊抗小鼠 IgG-HRP, 每孔加 100 μl, 37 °C 孵育 1 h, 每孔加底物邻苯二胺应用液 100 μl, 置暗处 15 min, 酶标仪测光密度值(D_{492})。每组 3 复孔, 取平均值。

1.4 MTT 法检测 Lewis 细胞的增殖

将 Lewis 细胞按 5 000 个/孔铺于 96 孔板, 12 h 后加入不同浓度的吉非替尼和(或)anti-EGFR, 孵育 48 h 后, MTT 法检测 Lewis 细胞的增殖。

1.5 Lewis 肺癌小鼠模型的建立与分组

选取 Lewis 肺癌细胞株, 以 1×10^6 个/100 μl 在腋窝部皮下接种 C57BL/6 小鼠, 2 周后无菌取出瘤体, 研磨器研磨, 制备细胞悬液。再以 200 μl 细胞悬液(4×10^6 细胞)腋窝皮下接种 C57BL/6 小鼠。将荷瘤小鼠随机分为疫苗组、吉非替尼组、吉非替尼 + 疫苗组、对照组, 每组 10 只。疫苗组: 在接种肿瘤 1 周后, 大腿肌内注射 100 μg 超纯 DNA 疫苗, 每 5 d 重复 1 次, 共 4 次; 吉非替尼组: 吉非替尼溶解于 5% 葡萄糖溶液, 剂量为 100 mg/(kg · d), 溶液量按每 10 g 体重 0.1 ml, 每天灌胃 1 次, 每周连用 5 d, 连续用药 3 周^[9]。吉非替尼 + 疫苗组: 上述两种处理措施同时进行。对照组: 处理同联合组, 但口服成分为 5% 葡萄糖溶液, 肌内注射成分改为每次 100 μl 生理盐水。

1.6 药物体内抗肿瘤作用的检测

瘤体可触及后, 用游标卡尺每周 3 ~ 4 次测量肿瘤最长径(a)和最短径(b), 肿瘤体积(mm^3)计算公式为: 肿瘤体积 = $1/2 a \times b^2$, 绘制肿瘤生长曲线。观察小鼠生存情况, 绘制生存曲线。用药结束后 2 d 处死小鼠, 完整剥离肿瘤称重, 计算抑瘤率。抑瘤率(%) = $(1 - \text{实验组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$ 。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。利用 excel 软件进行统计学处理, 行方差分析和 *t* 检验。

2 结果

2.1 DNA 疫苗免疫小鼠抗血清的效价

ELISA 检测 pVAX1/cEGFR-rFc DNA 疫苗免疫小鼠后抗血清的效价, 结果(表 1)显示, pVAX1/rFc-cEGFR 组稀释 1:200, 1:500 和 1:1 000 后, 血清 D_{492} 值与 NS 对照和空载体相比, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 空载体 PVAX1 与 NS 对照比较差异无显著性; 从结果可判断 pVAX1/rFc-cEGFR 组抗血清 anti-EGFR 的效价为 1:1 000。

表 1 DNA 疫苗免疫小鼠抗 EGFR 血清的效价
Tab.1 Titers of Anti-EGFR serum in DNA vaccine immunized mice

Group	1:200	1:500	1:1 000	1:2 000	1:4 000
pVAX1/cEGFR-rFc	0.521 ± 0.031*	0.318 ± 0.021*	0.262 ± 0.021*	0.121 ± 0.013	0.106 ± 0.021
pVAX1	0.130 ± 0.014	0.120 ± 0.016	0.096 ± 0.009	0.115 ± 0.025	0.098 ± 0.017
NS	0.127 ± 0.034	0.121 ± 0.012	0.010 ± 0.013	0.112 ± 0.014	0.102 ± 0.022

* $P < 0.05$ vs NS or pVAX1

2.2 吉非替尼联合抗血清抑制 Lewis 细胞生长

MTT 结果(图 1)显示,吉非替尼联合抗血清 anti-EGFR 组较单独使用吉非替尼组具有更好的抑制肿瘤细胞生长的作用。使用 Calcusyn 2.0 软件计算两药作用结合指数(combination index, CI), CI < 0.9 为协同作用, CI > 1.1 为拮抗作用, CI 在 0.9 ~ 1.1 为相加作用。抗血清稀释 200 倍后和吉非替尼联合使用,具有较好的协同效果(表 2)。

表 2 吉非替尼联合抗血清抑制 Lewis 细胞的生长

Tab.2 Gefitinib combined with anti-EGFR serum inhibited growth of Lewis cells

Gefitinib ($c_B/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Anti-EGFR	CI value
1.0	1:200	0.812
2.5	1:200	0.802
5.0	1:200	0.796
10	1:200	0.781
1.0	1:500	0.808
2.5	1:500	0.786
5.0	1:500	0.713
10	1:500	0.707

CI(combination index) < 0.9 means synergistic effect

2.3 吉非替尼联合疫苗抑制 Lewis 移植瘤的生长

各实验组小鼠在接种 Lewis 细胞后第 7 天均可见肿瘤生长,但随后 DNA 疫苗组和吉非替尼组的肿瘤生长速度较对照组缓慢(图 2),肿瘤体积也小于对照组 ($P < 0.01$);而吉非替尼 + 疫苗组的治疗效果则更加明显。荷瘤后 31 d,吉非替尼 + 疫苗组小鼠的平均肿瘤体积为 $(1.30 \pm 0.12) \text{ cm}^3$,而 NS 对照组已达 $(4.0 \pm 0.24) \text{ cm}^3$, ($P < 0.01$);吉非替尼 + 疫苗组小鼠的肿瘤体积也明显小于单独疫苗组 [$(2.40 \pm 0.43) \text{ cm}^3$, $P < 0.05$]和吉非替尼药物组 [$(2.00 \pm 0.45) \text{ cm}^3$, ($P < 0.05$)]。

治疗结束后 2 d 处死小鼠,解剖肿瘤称重后发现,DNA 疫苗组和吉非替尼组的平均瘤重较对照组明显降低($P < 0.01$),抑瘤率明显增强。吉非替尼 + 疫苗组的治疗效果更明显,较对照组和其他各治疗组都有明显的统计学差异($P < 0.01$,表 3)。

2.4 吉非替尼联合疫苗对荷瘤小鼠生存率的影响

小鼠荷瘤后生存率分析(图 3)显示,至 30 d 治疗结束时,对照组小鼠的生存率为 40%,只有 4 只小鼠存活;单独疫苗组和吉非替尼组小鼠的生存率

高于对照组小鼠,30 d 时有 6 只小鼠存活($P < 0.05$);吉非替尼 + 疫苗组的小鼠生存率为 70%,显著大于其他各组(疫苗组和吉非替尼药物组均为 50%, $P < 0.05$)。

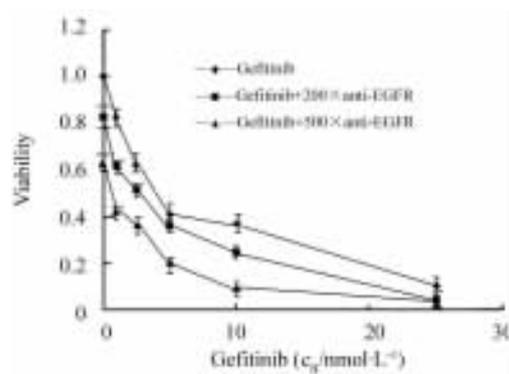


图 1 Gefitinib 联合 anti-EGFR 抗血清抑制 Lewis 细胞的生长

Fig.1 Gefitinib combined with anti-EGFR serum inhibited proliferation of Lewis cells

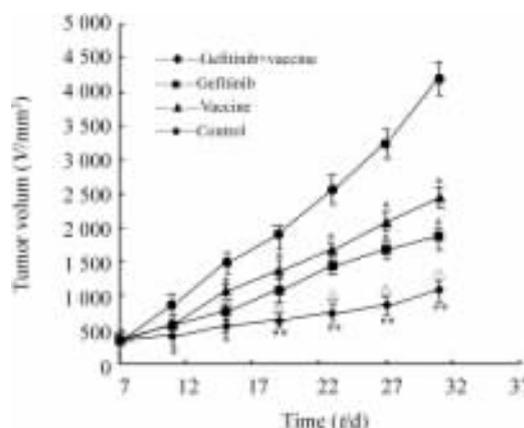


图 2 Gefitinib 联合 DNA 疫苗抑制 Lewis 鼠移植瘤的生长

Fig.2 Gefitinib combined with DNA vaccine inhibited growth of implanted Lewis tumors

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs or control;

$\Delta P < 0.05$ vs gefitinib or vaccine

表 3 DNA 疫苗联合吉非替尼对 Lewis 移植瘤的抑制作用

Tab.3 Inhibitory effect of gefitinib combined with DNA vaccine against implanted Lewis tumors ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Tumor mass (m/g)	Inhibitory rate (%)
Vaccine	6	$1.12 \pm 0.1^*$	48
Gefitinib	6	$1.03 \pm 0.09^*$	53
Gefitinib + vaccine	7	0.68 ± 0.12	69
Control	4	$2.17 \pm 0.22^{**}$	-

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs gefitinib + vaccine

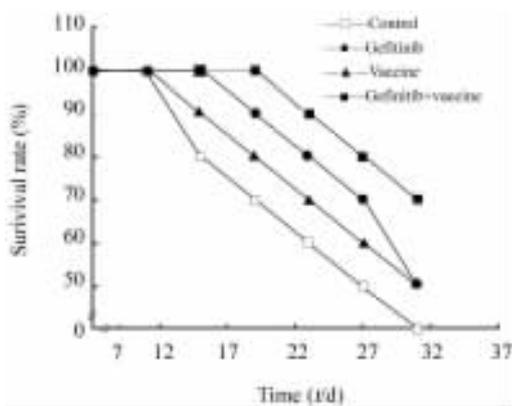


图3 Gefitinib 联合 DNA 疫苗延长荷瘤小鼠生存期
Fig.3 Gefitinib combined with DNA vaccine increased survival time of Lewis-bearing mice

3 讨论

EGFR 的分子靶向治疗是当今肿瘤治疗中最突出的研究方向之一^[10]。EGFR 属于 I 型跨膜酪氨酸激酶生长因子受体, 在多种肿瘤和正常组织中高表达, 其功能与细胞增殖、血管新生、肿瘤转移和细胞凋亡等密切相关^[11-15]。在 EGFR 靶向治疗的策略中, 吉非替尼是很成功的 EGFR 靶向药物, 吉非替尼为小分子 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂。研究^[5,16-17]证明吉非替尼具有抑制多种实体瘤增殖、促进肿瘤细胞凋亡和防止肿瘤转移的作用。

吉非替尼通过小分子作用阻断 EGFR 信号转导通路, 而构建 EGFR 靶向 DNA 疫苗在蛋白疫苗和 DNA 疫苗水平都取得了初步效果^[7,18-19]。EGFR 属于内源性抗原, 在几乎所有的组织细胞表面都表达^[20], 对这一类的抗原, 机体很容易产生免疫耐受。怎样打破机体对内源性抗原 EGFR 的免疫耐受是 EGFR 靶向免疫治疗的难点。EGFR 分子进化上高度保守, 在种间存在着很高的同源性^[21], 在此基础上利用异种同源蛋白做为免疫原进行肿瘤免疫治疗已取得了一定的效果^[9]。本课题曾经构建了以鸡源 EGFR(chicken EGFR, cEGFR)膜外部分与免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段(rabbit Fc, rFc)为基础的融合 DNA 疫苗 pVAX1/cEGFR-rFc。通过 DNA 疫苗免疫小鼠, 结果表明融合疫苗能诱发特异性的体液免疫, 产生高滴度的 anti-EGFR 抗体, 而且可以抑制小鼠皮下 B16 移植肿瘤细胞的生长, 延长小鼠的存活时间。鸡源 EGFR 与人 EGFR 有 73% 同源性, 而且鸡源 EGFR 对小鼠和人都是外源性抗原, 动物实验结果对临床具有较高参考意义^[8]。考虑到单纯疫苗

的治疗效果有限, 本研究将靶向阻断药物吉非替尼和 EGFR 靶向 DNA 疫苗联合应用, 以期通过阻断 EGFR 转导通路和主动免疫两种方式提高疗效, 观察 DNA 疫苗和吉非替尼药物之间有无协同作用。日本学者^[21]报道吉非替尼不仅可以阻断 EGFR 的信号转导, 还可以激活机体的细胞免疫, 并且发现激活作用是通过可溶性白介素 2 受体实现的, 这为本实验提供了重要的理论依据。本实验结果表明, 吉非替尼与 EGFR 靶向 DNA 疫苗联合的抗肿瘤效果明显优于两种成分的单用, 联合组小鼠的移植瘤生长缓慢, 抑瘤率达到 69% (疫苗组和吉非替尼组分别为 48% 和 53%); 且联合组荷瘤小鼠的生存率增加, 30 d 达 70% (疫苗组和药物组小鼠均为 50%)。由此可见作为共同靶点的 EGFR, DNA 疫苗和靶向药物之间起到了协同作用, 主动免疫可以提高吉非替尼的疗效, 同时吉非替尼也使得靶向 DNA 疫苗的效果更加明显。

[参考文献]

- [1] Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies [J]. *Cancer Control*, 2009, 16 (1): 8-13.
- [2] Harichand-Herd S, Ramalingam SS. Targeted therapy for the treatment of non-small cell lung cancer: focus on inhibition of epidermal growth factor receptor [J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 20(3): 217-223.
- [3] Jin Q, Esteva FJ. Cross-talk between the ErbB/HER family and the type I insulin-like growth factor receptor signaling pathway in breast cancer [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2008, 13 (4): 485-498.
- [4] Li L, Wang H, Yang ES, Arteaga CL, et al. Erlotinib attenuates homologous recombinational repair of chromosomal breaks in human breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(22): 9141-9146.
- [5] Blackledge G, Averbuch S. Gefitinib ('Iressa', ZD1839) and new epidermal growth factor receptor inhibitors [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(3): 566-572.
- [6] Crombet T, Torres O, Neninger E, et al. Phase I clinical evaluation of a neutralizing monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2001, 16(1): 93-102.
- [7] Ramirez BS, Pestana ES, Hidalgo GG, et al. Active anti metastatic immunotherapy in Lewis lung carcinoma with EGFR extracellular domain protein in VSSP adjuvant [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(9): 2190-2199.
- [8] 武建毅, 刘 崇, 唐 亮, 等. cEGFR-rFc 融合 DNA 疫苗抗小鼠黑色素移植瘤的效果 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15 (4): 342-347.
- [9] 徐 立, 张耀军, 林小军, 等. Iressa 对肝癌细胞 Hep-3B,

- HepG2 裸鼠移植瘤的抑制作用 [J]. 癌症, 2006, 25(4): 447-450.
- [10] Sawyers C. Targeted cancer therapy [J]. Nature, 2004, 432 (70): 294-297.
- [11] Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, *et al.* Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 1995, 19(3): 183-232.
- [12] West HJ. Novel targeted agents for lung cancer [J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10(1): 41-46.
- [13] Joy AA, Butts CA. Extending outcomes: epidermal growth factor receptor-targeted monoclonal antibodies in non-small-cell lung cancer [J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10(1): 24-29.
- [14] Pakkala S, Ramalingam SS. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling in non-small-cell lung cancer therapy [J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10(1): 17-23.
- [15] Pennell NA, Lynch TJ. Combined inhibition of the VEGFR and EGFR signaling pathways in the treatment of NSCLC [J]. Oncologist, 2009, 14(4): 399-411.
- [16] Li J, Li Y, Feng Z, *et al.* Anti-tumor activity of a novel EGFR tyrosine kinase inhibitor against human NSCLC *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Lett, 2009, 279(2): 213-220.
- [17] Lin CC, Yang CH. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in elderly or poor performance status patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. Target Oncol, 2009, 4(1): 37-44.
- [18] Lu Y, Wei YQ, Tian L, *et al.* Immunogene therapy of tumors with vaccine based on xenogeneic epidermal growth factor receptor [J]. J Immunol, 2003, 170(6): 3162-3170.
- [19] 胡 兵, 魏于全. 表皮生长因子受体靶向肿瘤生物治疗 [J]. 癌症, 2004, 23(4): 471-475.
- [20] Skliris GP, Murphy LC, Los M, *et al.* Targeting the EGFR pathway for cancer therapy [J]. Curr Med Chem. 2006, 13(29): 3483-3492.
- [21] Kanazawa S, Yamaguchi K, Kinoshita Y, *et al.* Elevation of soluble interleukin-2 receptor in patients with non-small cell lung cancer treated with gefitinib [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2006, 132(11): 719-725.
- [收稿日期] 2009-04-18 [修回日期] 2009-06-12
- [本文编辑] 徐红梅

· 科技动态 ·

TLR9 通过 Notch 配体 dll4 调控结核分枝杆菌引起的小鼠肺部肉芽肿的免疫应答

由结核分枝杆菌引起的结核病仍为最具破坏性的细菌性疾病之一,发病率和病死率都很高,因此备受关注。由结核分枝杆菌引起的肺部肉芽肿是肺结核病的典型症状。肉芽肿的主要成分为具有很强吞噬作用的巨噬细胞。由于病因不同,肉芽肿的形态结构亦不相同,由异物引起的肉芽肿称异物性肉芽肿,由感染因素引起的肉芽肿称感染性肉芽肿,但肉芽肿的形成机制目前仍不清楚。结核分枝杆菌能侵入宿主免疫系统,在肺肉芽肿中驻留,致使目前的抗结核药物无法杀灭菌体。近年来药物耐受以及伴有 HIV 感染的结核病发病率急剧增加,给结核的控制带来很大的困难,迫切需要深入了解肉芽肿的形成机制,以期在临床上有良好的治疗效果。

美国密歇根大学医学院病理学系的 Ito 博士等构建了 TLR9 缺陷的小鼠 ($Th9^{-/-}$ mice) 模型,通过气管内注入结核分枝杆菌使小鼠肺部形成肉芽肿。14 d 后,采用尾静脉注射方式进行分枝杆菌来源的纯化蛋白诱导物 (purified protein derivative, PPD) 的感染,结果发现 TLR9 缺陷的小鼠中肉芽肿的体积增大,引起肉芽肿部位 APC 细胞表型及数量的变化。其中, Th17 细胞明显减少,其相关的细胞因子也明显下降 (如 IL-17A、IL-17F、IL-6、IL-21、IL-23p19), 但 IL-10 却明显升高。髓样 DC (mDC) 降低,巨噬细胞增多, Th1 细胞、Th2 细胞、浆细胞样 DC (pDC) 和嗜中性粒细胞没有明显变化。趋化因子的检查发现,能够募集未成熟 DC 到炎症部位的 CCL20 和 CCL22 明显降低,直接导致了肉芽肿部位的 DC 减少。随后,实验将肺部肉芽肿中 DC 进行分离纯化,并对其功能特征进行分析。结果发现, TLR9 缺陷小鼠感染后的第 4、8、16 天,在肺部 DC 以及肺部的 mDC 细胞中 dll4 表达均明显降低,而且伴随着 IL-6、IL-12p40、IL-23p19 等细胞因子的降低。既然肺部 DC 细胞的情况如此,那么骨髓来源的 M Φ 中的情况怎么样? 作者又用 CpG 和 BCG 感染骨髓来源的 DC 和 M Φ 后,观察 Notch 的配体、IFN- γ 和 IL-17 的表达变化。体内和体外的结果都证明是来源于骨髓的 DC 而不是来源于骨髓的 M Φ 表达低水平的 IL-17 和 dll4。

为了进一步探究 TLR9- dll4-Th17 之间的关系,作者对野生型小鼠用抗 dll4 和抗 IL-6 的抗体进行阻断,观察肉芽肿的体积以及细胞因子、趋化因子和 dll4 的表达,结果显示这两种处理均获得了和 TLR9 缺陷小鼠相一致或类似的结果。

综上所述,作者发现了结核分枝杆菌感染小鼠后肺部肉芽肿形成的机制,即结核分枝杆菌感染小鼠后启动树突状细胞中 TLR9 信号的 MyD88 通路,使 IL-6、IL-23 及 TNF- α 的表达上调,同时 dll4 的表达也上调,这些因子共同促进了 Th0 细胞向 Th17 细胞分化。其中 dll4 发挥了重要作用,促进了肉芽肿部位 Th17 细胞的功能效应;而 TLR9 可能是影响 dll4 表达及调控分枝杆菌抗原引起肉芽肿形成的必需因素。

[张庆华 摘译, 李 楠 审阅. Ito T, Schaller M, Hogaboam C M, *et al.* J Clin Invest, 2009, 119(1): 33-46.]