

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.01.005

负载 HER-2/neu 多肽的树突状细胞激发特异性 CTL 反应

孟东¹, 时伟锋¹, 孙春雷¹, 时宏珍², 史央², 朱晨瑶², 唐金海³(1. 苏州大学附属第四医院 乳腺外科, 江苏 无锡, 214035; 2. 南京市免疫细胞工程技术研究中心, 南京得康生物技术有限公司, 江苏 南京, 210019; 3. 江苏省肿瘤医院 普通外科, 江苏 南京, 210000)

[摘要] **目的:**探讨以 HER-2/neu 为靶抗原、树突状细胞(dendritic cell, DC)为抗原载体激发特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)反应的能力及研制治疗型乳腺癌疫苗的可行性。**方法:**采集 17 例 HLA-A201⁺ HER-2/neu⁺ 乳腺癌患者外周血, 分离单个核细胞与外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL), 并诱导为成熟 DC(mature dendritic cell, mDC); 人工合成 HER-2/neu 多肽[E75(KIFGSLAFL)和 GP2(HSAVVGIL)2 条]负载 mDC 后体外反复致敏 PBL(3 次, 每周 1 次), 检测其激发 HER-2/neu 特异性 CTL 的能力与 CTL 的杀伤活性。同时于患者腹股沟淋巴结富集区皮内注射负载 HER-2/neu 多肽的 DC, 每周 1 次, 共接种 4 次, 检测接种前后患者外周血细胞因子和特异性的 CTL 水平变化, 并进行 DTH 试验。**结果:**患者外周 PBL 经过负载 HER-2/neu 多肽 DC 共 3 轮致敏后, HER-2/neu 多肽特异的 CTL 平均比例比对照组(未负载 HER-2/neu 多肽 DC 组)明显增高[(5.41 ± 1.44)% vs (0.41 ± 0.12)% , *P* < 0.05]; 致敏后 PBL 对负载 HER-2/neu 多肽 T2 靶细胞的杀伤率明显高于对照组(未负载 DC 诱导的 CTL)[效靶比为 30:1 时, (35.5 ± 4.7)% vs (11.2 ± 1.4)% , *P* < 0.05]。接种负载 HER-2/neu 多肽的 DC 后, 患者体内血清中细胞因子 IL-2、IL-12、IFN- γ 水平较治疗前显著升高[(409.09 ± 89.39) vs (148.79 ± 28.32) ng/ml, (56.23 ± 14.08) vs (24.49 ± 56.23) ng/ml, (146.57 ± 25.97) vs (67.77 ± 39.35) ng/ml; 均 *P* < 0.05], TNF- α 和 IL-10 水平较治疗前变化不大(*P* > 0.05)。患者 DTH 试验阳性率为 47%(8/17), DTH 阳性患者外周血中特异性 CTL 比例明显上升。**结论:**负载 HER-2/neu 多肽的 DC 体内、外均具有激发特异性 CTL 反应能力, 可诱导 Th1 型细胞因子的分泌, 未发生临床不良反应。

[关键词] 树突状细胞; 乳腺癌; HER-2/neu 多肽; 细胞毒性 T 淋巴细胞; 免疫治疗

[中图分类号] R737.9; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)01-0029-06

Specific CTL response induced by dendritic cells pulsed with HER-2/neu peptide

MENG Dong¹, SHI Wei-feng¹, SUN Chun-lei¹, SHI Hong-zhen², SHI Yang², ZHU Chen-yao², TANG Jin-hai³(1. Department of Breast Surgery, Fourth Affiliated Hospital of Soochow University, Wuxi 214035, Jiangsu, China; 2. Nanjing Immune Cell Engineering Technology Research Center, Nanjing Decon Bio-Technology Co., LTD, Nanjing 210019, Jiangsu, China; 3. Department of General Surgery, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential of autologous dendritic cells (DCs) pulsed with HER-2/neu peptide in inducing specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response and feasibility of breast cancer vaccines. **Methods:** Seventeen breast cancer patients with positive HLA-A201 and HER-2/neu were enrolled and their peripheral blood mononuclear cells and lymphocytes were isolated and induced into DCs and pulsed with HER-2/neu peptide. The killing effect of CTLs against T2 cell line pulsed with HLA-A201-binding peptide HER-2/neu was determined. The patients were inoculated subcutaneously near the inguinal region with auto-DCs pulsed with HER-2/neu peptide for 4 times every week. The immunological responses and clinical responses were examined in 1 week after the final vaccination. **Results:** The average percentage of special CTLs primed by DCs pulsed with HER-2/neu peptide was significantly higher than that in the control group (CTLs primed by DCs unloaded with HER-2/neu peptide) [(5.41 ± 1.44)% vs (0.41 ± 0.12)% , *P* < 0.05].

[基金项目] 南京市科学技术委员会高新技术产业化项目资助(No. 201103058)。Project supported by the High Technology Industrialization Project from Nanjing Science and Technology Commission(No. 201103058)

[作者简介] 孟东(1974-), 江苏省连云港市人, 硕士, 副主任医师, 主要从事乳腺肿瘤基础与临床的研究。E-mail: lygmd@163.com

[通信作者] 唐金海(TANG Jin-hai, corresponding author)。E-mail: shi_yang@deconbio.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120109.1705.007.html>

CTLs induced by DCs exerted a stronger killing effect on T2 cell line pulsed with HER-2/neu peptide than that in control group ($[35.5 \pm 4.7]\%$ vs $[11.2 \pm 1.4]\%$ at the ratio of E [effect] to T [target] as 30:1, $P < 0.05$). Vaccination of DCs was well tolerated and no toxicity was observed. The cytokine levels in sera such as IL-2, IL-12 and IFN- γ were increased after vaccinations ($[148.79 \pm 28.32]$ ng/ml vs $[409.09 \pm 89.39]$ ng/ml, $[24.49 \pm 56.23]$ ng/ml vs $[56.23 \pm 14.08]$ ng/ml, $[67.77 \pm 39.35]$ ng/ml vs $[146.57 \pm 25.97]$ ng/ml, respectively, all $P < 0.05$). The cytokine levels in sera such as TNF- α and IL-10 had no significant changes before and after vaccination. The results of DTH test were positive in 8 patients (8/17), and the percentages of antigen-specific IFN- γ^+ CD8 $^+$ T increased in 8 patients (8/17).

Conclusion: Auto-DC vaccines pulsed with HER-2/neu peptide can elicit specific immune responses *ex vivo* and *in vivo*, and induce secretion of Th1 type cytokines from DCs and have no adverse reaction.

[**Key words**] dendritic cell; breast cancer; HER-2/neu peptide; cytotoxic T lymphocyte; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(1): 29-34]

HER-2/neu 是一种原癌基因, 编码产物为跨膜糖蛋白 P185, HER-2/neu 通过基因扩增或转录异常而表达, 也可通过基因突变被激活, 与多种上皮细胞起源的肿瘤发生关系密切, 在乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胃癌、前列腺癌等 10 余种肿瘤中过表达^[1]。20% ~ 30% 的乳腺癌患者有 HER-2/neu 基因的过表达, 其扩增倍数大于 5 的患者易早期复发且生存期缩短。在有淋巴结转移的患者中, HER-2/neu 阳性的乳腺癌患者预后差于阴性患者。因此, 对 HER-2/neu 阳性乳腺癌患者的治疗已引起广泛关注。尽管罗氏开发的 HER-2/neu 单克隆抗体曲妥珠单抗 (trastuzumab, 赫赛汀) 正在用于 HER-2/neu 阳性乳腺癌患者的治疗^[2], 但是该药反复使用易产生耐药, 且价格昂贵, 影响了临床的广泛使用。因此, 探索针对 HER-2/neu 阳性乳腺癌患者新的治疗方法显得尤为重要。

树突状细胞 (dendritic cell, DC) 是已知功能最强的专职抗原提呈细胞 (antigen-presenting cell, APC), 能有效地刺激初始 T 细胞对异型抗原产生免疫应答, 在抗肿瘤免疫中发挥重要作用^[3-5]。美国 FDA 于 2010 年批准了全球首个治疗前列腺癌的 DC 疫苗 Provenge, 其安全性与有效性已得到临床证实^[6-8]。本研究采集 17 例 HLA201 $^+$ HER-2/neu 高表达乳腺癌患者外周血, 用 HER-2/neu 的 2 种多肽作为抗原, 用患者自体 DC 作为载体制备 DC 疫苗, 探讨其体内、体外激发特异性 CTL 的能力, 为研发治疗型乳腺癌 DC 疫苗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病例选择

本研究的实施根据《世界卫生组织人体细胞、组织和器官移植指导原则(草案)》的要求进行, 并经医院伦理委员会批准。开展本项研究的患者筛选

标准如下: (1) 年龄大于 18 岁; (2) 病理组织学或细胞学确诊为 HER-2/neu 表达阳性的乳腺癌患者; (3) 患者 HLA-A201 分型均为阳性 (流式细胞术); (4) 生活自理, 卡氏体力状况评分标准 60 分以上; (5) 预计生存期至少大于 3 个月。排除标准包括: (1) 怀孕或哺乳期妇女; (2) 器官功能衰竭者; (3) 器官移植者; (4) 严重自身免疫性疾病患者; (5) 不可控制的感染性疾病患者; (6) 对本治疗中所用生物试剂过敏者。

2009 年 5 月到 2010 年 12 月, 共选择 17 例入院治疗的符合入选标准的乳腺癌患者, 平均年龄为 (46.65 ± 10.4) 岁, 已手术切除原发灶。术后病理活检为浸润性导管癌 15 例、小叶癌 2 例; TNM 分期为 III 期 9 例、II 期 8 例。所有患者在接受细胞免疫治疗前均经历过手术治疗和化疗, 部分患者经历过内分泌治疗。所有患者治疗前心、肝、脑、肾等重要器官功能正常, 无自身免疫疾病, Karnofsky 评分 80 分以上, 均签署知情同意书。

1.2 主要材料与试剂

RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司, 重组人 GM-CSF、IL-4、IL-1 β 、PGE-2 和 TNF- α 购自 R&D 公司, 淋巴细胞分离液购自上海恒信化学试剂有限公司, 流式细胞术抗体 CD8、CD80、CD83、CD86、HLA-DR、CD11c、IFN γ 购自 BD 公司。流式细胞仪 (FAC-SCalibur) 为 BD 公司产品。细胞因子检测试剂盒购自 Bender 公司。HER-2/neu 胞外区显性多肽氨基酸序列为 HER-2 E75 (KIFGSLAFL) 和 HER-2 GP2 (IISAVVGIL), 均为 HLA-A201 限制性多肽, 由上海吉尔生化有限公司合成, 纯度分别为 98.4% 和 97.8%。多肽用无热原水溶解, 质量浓度为 10 mg/ml, 分装后 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱贮存。T2 细胞株 (TAP 缺陷细胞株, HLA-A201 阳性, 因其 TAP 缺陷, 使其表达 HLA-I 类分子的抗原肽结合槽未结合抗

原肽,能够与加入的外源性抗原肽结合,形成 HLA-I-抗原肽复合物,能够被相应的 T 细胞克隆所识别)和 K562 白血病细胞株均购自 ATCC 公司。

1.3 DC 的体外培养和 HER-2/neu 多肽负载

患者先进行造血动员,造血动员方案为 GM-CSF 75 μg 皮下注射, Bid, 连续注射 2~4 d。当单核细胞和淋巴细胞数量 $\geq 2 \times 10^9/\text{L}$ 时,采集肝素抗凝外周血 100 ml 左右。参照文献[9-10]方法进行 Ficoll 密度梯度离心,分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),用 RPMI 1640 培养液调整 PBMC 密度至 $3 \times 10^6/\text{ml}$,将细胞接种于 6 孔培养板,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育 90 min,吸取未贴壁细胞即是外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)。于孔中加入 DC 诱导培养液(含 5% 自体血浆、100 ng/ml rhGM-CSF、50 ng/ml rhIL-4),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中诱导,第 3 天进行 1/3 换液,第 5 天收获未成熟 DC(imature dendritic cells, imDC),加入终质量浓度为 20 ng/ml IL-1 β 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PGE-2、20 ng/ml TNF- α 诱导 DC 成熟,收获成熟 DC 后,调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,加入 HER-2/neu 多肽至终质量浓度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,共育 4 h 后收获。按《中华人民共和国药典》2005 版第三部(生物制品)规定的方法进行细菌、病毒、内毒素检测。

1.4 流式细胞术检测 DC 表面标志物

取 50 μl DC[(1~3) $\times 10^5$ 个细胞]样品,分别加入 5 μl FITC、PerCP、APC 或 PE 交链的单克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后,每管加入 0.5 ml 预冷的含 2% 新生牛血清的 PBS 洗涤 2 遍,流式细胞仪检测,应用 CellQuest 软件分析 HLA-DR、CD11c、CD86、CD83、CD80 的阳性表达情况。

1.5 PBL 体外致敏

参照文献[11]进行。用负载 HER-2/neu 多肽的 DC 与 PBL 共育致敏,细胞比例为 1:10,于培养液中加入 500 IU/ml IL-2 和 50 ng/ml IL-7,共育 1 周后进行细胞计数;再加入负载 E75 和 GP2 混合多肽的 DC 和 500 IU/ml IL-2,共育 1 周后第 2 周同样处理,期间适当加液并扩增;于培养第 0、7、14 和 21 天分别计数混合淋巴细胞数量,计算细胞增殖指数(proliferation index, PI)。PI = 扩增后细胞数/接种细胞数。第 3 次刺激后第 7 天收获细胞,即细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)。

1.6 流式细胞术检测多肽特异性的 CD8^+ $\text{IFN}\gamma^+$ T 细胞的频率

按照 BD 公司 CD8^+ $\text{IFN}\gamma^+$ T 检测试剂盒操作说

明书操作。分别检测 HER-2/neu 多肽负载的 DC 刺激的 CTL 中多肽特异性 CD8^+ $\text{IFN}\gamma^+$ T 细胞频率,未负载多肽 DC 刺激的 CTL 作为对照。

1.7 MTT 法检测致敏 CTL 体外特异性杀伤活性

HER-2/neu 多肽负载 T2 细胞株作为靶细胞 1,靶细胞 2 为 K562 细胞,靶细胞 3 为未负载的 T2 细胞株,靶细胞 4 为负载 PSA 多肽(KLQCVDLHV, HLA-A2 限制性)的 T2 细胞株(调整 T2 细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,加入 PSA 多肽至终质量浓度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,共育 4 h 后收获)。效应细胞 1 为 HER-2/neu 多肽负载 DC 致敏的 CTL,效应细胞 2 为未负载 DC 致敏的 CTL。效靶比分别为 30:1、10:1 和 3:1,接种于 96 孔板中,分为 5 组进行检测:(1)组为效应细胞 1 与靶细胞 1;(2)组为效应细胞 1 与靶细胞 2;(3)组为效应细胞 1 与靶细胞 3;(4)组为效应细胞 1 与靶细胞 4,(5)组为效应细胞 2 与靶细胞 1,作为对照组。以完全培养基作为空白对照。每组均设 2 个复孔。用酶标仪测定波长 570 nm 处各孔的光密度(D)值。按以下公式计算细胞杀伤效率:细胞杀伤效率(%) = $[1 - (\text{实验组 } D \text{ 值} - \text{空白对照组 } D \text{ 值}) / (\text{对照组 } D \text{ 值} - \text{空白对照组 } D \text{ 值})] \times 100\%$ 。

1.8 DC 疫苗治疗方案及临床观察指标

DC 细胞以生理盐水离心洗涤 2 次,细胞重悬于 2 ml 10% 人血白蛋白的生理盐水中。采用 18G 贝朗浅静脉留置针(配 BD 血气针筒)分别在患者采血后的第 7、14、21、28 天于患者腹股沟淋巴结富集区 10 cm 直径范围内行皮内注射,左右腹股沟各注射 1 ml,共接种 4 次。

在每次注射后 30 min 及 24 h,观察患者回输后是否出现急性过敏反应,并做及时处理。治疗过程中,根据国家《抗肿瘤药物急性与亚急性毒性反应分度分级标准》观察患者是否出现不良反应。治疗开始前 1 周及治疗结束后 1~2 周进行临床评价。包括体格检查及血常规、肝肾功能等的检查,严密观察不良反应的发生情况。

分别于治疗前及末次回输后 1 周采集患者外周血 2~3 ml,ELISA 法检测患者血清中 IL-2、IL-10、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 的水平。

1.9 迟发型超敏反应(delayed type hypersensitivity, DTH)试验检测 DC 治疗后患者特异免疫应答反应

治疗后 1 周进行 DTH 试验。用 2 支 1 ml 结核菌素或青霉素试验注射器(18 G 针头)分别吸取 HER-2/neu 多肽和 DC 混合物及生理盐水,分别于两上肢前臂内侧行皮内注射,一侧为 HER-2/neu 多肽和 DC 混合物,另一侧为生理盐水,做好相应标

记。注射后 48 ~ 72 h 内观察注射部位有无红肿结节, 并测量结节直径大小。红肿结节直径大于 5 mm 者判断为 DTH 试验阳性。

1.10 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 17.0 统计软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HER-2/neu 负载 DC 的得率及其质量分析

17 例患者每次 DC 回输的平均数量为 $(5.52 \pm 1.57) \times 10^6$ 个细胞, 细胞活率为 98.7%。表型检测结果为: HLA-DR⁺ CD11c⁺ 细胞为 $(96.43 \pm 3.48)\%$, 其中 CD80⁺ 细胞占 $(90.24 \pm 8.83)\%$, CD83⁺ 细胞占 $(76.44 \pm 20.53)\%$, CD86⁺ 细胞占 $(93.84 \pm 6.42)\%$ 。内毒素、革兰染色和细菌检测均为阴性, 说明 DC 疫苗质量合格。

2.2 HER-2/neu 多肽负载的 DC 促进 PBL 增殖

患者 PBL 经 HER-2/neu 多肽负载 DC 反复致敏后, 细胞不断增殖, 细胞增长曲线如图 1, 其最小和最大 PI 分别为 (13.40 ± 0.95) 倍和 (16.57 ± 1.84) 倍, 平均为 (14.64 ± 1.42) 倍。未负载多肽的 DC 也能促进 PBL 增殖, 但 PI 明显低于负载多肽的 DC, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

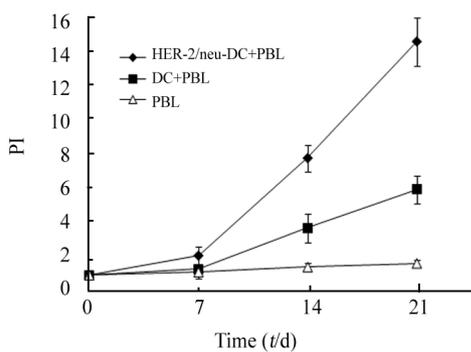


图 1 DC 刺激 PBL 增殖

Fig. 1 PBL proliferation stimulated by DCs

2.3 HER-2/neu 多肽负载的 DC 能够激发抗原特异性 CD8⁺ IFN γ ⁺ T 的扩增

HER-2/neu 多肽负载的 DC 激发特异性 CD8⁺ IFN γ ⁺ T 的扩增, 与对照组 (未负载 HER-2/neu 多肽的 DC) 激发特异性 CD8⁺ IFN γ ⁺ T 相比, 差异具有统计学意义 [$(5.41 \pm 1.44)\%$ vs $(0.41 \pm 0.12)\%$, $P < 0.05$; 图 2]。

2.4 HER-2/neu 多肽负载 DC 致敏的 CTL 具有特异性杀伤能力

E75 和 GP2 混合多肽负载的 DC 体外刺激 PBL 3 周, 获得的 CTL 对负载 HER-2/neu 多肽的 T2 细胞株有明显的杀伤作用, 明显高于对靶细胞 K562 细胞的杀伤 ($P < 0.05$), 也明显高于未负载 HER-2/neu 多肽 DC 诱导的 CTL 对靶细胞的杀伤率 ($P < 0.05$); 同时也发现, HER-2/neu 多肽负载 DC 致敏的 CTL 对 PSA 负载的 T2 细胞株杀伤能力较弱 (图 3)。结果表明, HER-2/neu 多肽负载 DC 致敏的 CTL 具备特异性杀伤靶细胞的能力。

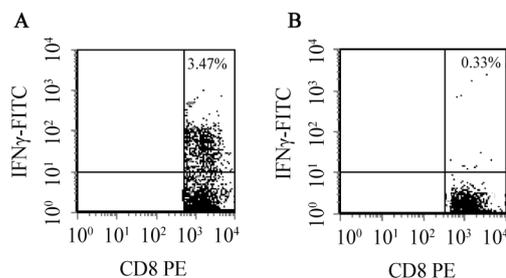


图 2 HER-2/neu 多肽负载的 DC 激发抗原特异性 CD8⁺ IFN γ ⁺ T 细胞的增殖

Fig. 2 Proliferation of CD8⁺ IFN γ ⁺ T cells induced by DCs loaded with HER-2/neu peptide

A: CD8⁺ IFN γ ⁺ T cells induced by DCs loaded with HER-2/neu peptide; B: CD8⁺ IFN γ ⁺ T cells induced by DCs unloaded with HER-2/neu peptide

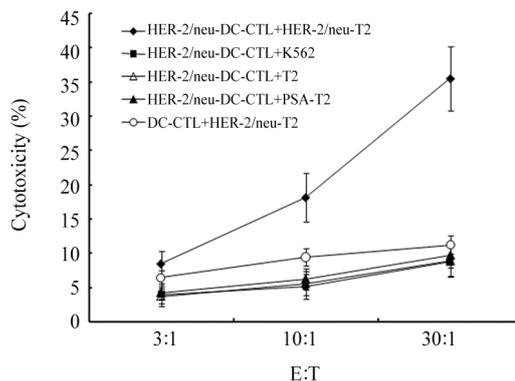


图 3 负载 HER-2/neu 多肽 DC 致敏的 CTL 对靶细胞的杀伤

Fig. 3 Killing effect on target cells of CTLs primed by DCs loaded with HER-2/neu peptide

2.5 HER-2/neu 多肽负载 DC 免疫后患者的不良反应

HER-2/neu 多肽负载 DC 回输后 30 min 及整个治疗过程中, 所有患者均未出现恶心、寒战、发热、红肿、乏力等不良症状。对 DC 回输前后的肝和肾功能检测结果显示, 生化指标没有较大的变化, 因而对

人的肝肾功能无明显影响。回输前后的血常规检测结果,各血液成分在正常范围内。上述结果显示 DC 治疗是安全的,无明显毒性作用。

2.6 DC 治疗前后 Th1 细胞因子水平的改变

17 例患者中有 14 例患者其血清中 IL-2、IFN- γ 、IL-12 的水平在 DC 治疗 4 次后与治疗前比呈明显上升趋势[(409.09 \pm 89.39)、(146.57 \pm 25.97)、(56.23 \pm 14.08) ng/ml vs (148.79 \pm 28.32)、(67.77 \pm 39.35)、(24.49 \pm 56.23) ng/ml, $P < 0.05$]。TNF- α 水平没有发生明显变化[(19.65 \pm 5.29) vs (21.17 \pm 11.03) ng/ml, $P < 0.05$]; IL-10 水平,较治疗前略有下降,但差异不显著[(16.17 \pm 7.23) vs (19.63 \pm 12.61) ng/ml, $P > 0.05$]。结果说明,DC 能明显上调患者 Th1 型细胞因子的水平,改善患者的免疫功能。

2.7 DC 治疗后患者特异性 T 细胞免疫应答的激发

17 患者在 DC 治疗前和治疗后 1 周进行了 DTH 试验,结果显示,治疗前均为阴性,治疗后 8 例患者 DTH 试验呈阳性反应;同时对 17 例患者进行了特异性 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 细胞检测,DTH 试验阳性的患者均观察到了特异性 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 细胞水平的升高(图 4)。

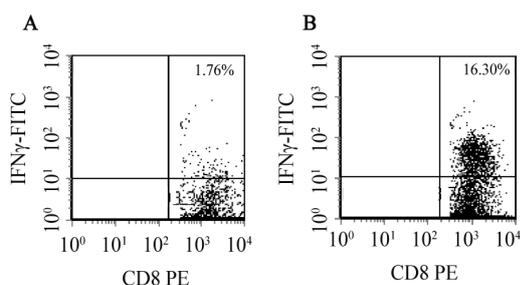


图 4 6 号患者 DC 治疗前后 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 细胞的比例

Fig. 4 Percent of IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells pre- and post-DC therapy in No. 6 patient

A: Pre-DC therapy; B: Post-DC therapy

3 讨论

HER-2/neu 是表皮因子受体家庭一员,20% ~ 30% 的乳腺癌患者有 HER-2/neu 扩增或过度表达,与肿瘤的侵袭性更强、愈后较差有关^[12]。由于 HER-2/neu 在包括乳腺癌在内的一些恶性肿瘤的高度表达及其在细胞信号传递中的重要作用,使得特异性针对 HER-2/neu 为基础的生物治疗成为乳腺癌治疗的一个重要研究方向^[13-15]。

本研究采用 HER-2/neu 胞外区显性多肽 E75 和 GP2 作为抗原,自体成熟 DC 作为抗原载体和免疫佐剂,结果显示,HER-2/neu 多肽负载的 DC 能够激发针对 HER-2/neu 的特异性 CTL 克隆,靶向性强,能防止免疫逃避,建立稳固的免疫应答。

体外实验结果表明,HER-2/neu 多肽负载的 DC 能刺激患者自体 PBL 的增殖,其中 HER-2/neu 多肽负载 DC 刺激 PBL 的增殖指数高于未负载 DC,其原因是患者体内已存在针对 HER-2/neu 多肽的 CTL 克隆,再次接受负载多肽 DC 刺激后快速增殖。为了进一步证实被激活 CTL 的存在和数量,采用流式细胞术检测 DC 激活的 CD8⁺ IFN- γ 比例,结果发现,HER-2/neu 多肽负载 DC 激发的 CD8⁺ IFN- γ 比例为(5.41 \pm 1.44)%,明显高于未负载 DC 组,进一步说明负载 HER-2/neu 多肽的 DC 具有激发特异性 CTL 的能力。

为探讨 CTL 的体外杀伤力与杀伤的特异性,本研究用 K562 作为 NK 效应细胞的靶细胞,负载 HER-2/neu 多肽 T2 细胞株作为负载 HER-2/neu 多肽 DC 致敏 CTL 的靶细胞,以未负载 HER-2/neu 多肽 DC 致敏的 CTL 作为对照。结果显示,负载 HER-2/neu 多肽 DC 致敏 CTL 对 K562 的杀伤活性较低,HER-2/neu 多肽负载 DC 致敏的 CTL 杀伤负载 HER-2/neu 多肽的 T2 细胞株的能力高于未负载 DC 致敏的 CTL。本研究又设计了以 PSA 多肽负载 T2 作为靶细胞,以鉴定杀伤活性的抗原特异性,结果表明,负载 HER-2/neu 多肽 DC 致敏的 CTL 对负载 PSA 多肽的 T2 细胞杀伤率低,说明负载 HER-2/neu 多肽 DC 致敏的 CTL 具有特异识别抗原、对靶细胞进行特异杀伤的功能。

体内实验结果表明,负载 HER-2/neu 混合多肽的 DC 是安全的,17 例患者均未出现明显不良反应。血清细胞因子检测显示,Th1 类细胞因子(IL-2、IL-12、IFN- γ)水平明显升高。Th1 类细胞因子在机体抗肿瘤免疫中发挥重要作用,如 IL-2、IL-12 刺激 NK 细胞或 CTL 的杀瘤活性,IFN- γ 具有较强的抗肿瘤和免疫调节作用等。另外有研究^[16]发现,在 DC 免疫治疗抗肿瘤免疫反应的患者中,Th1 类细胞因子 IFN- γ 的量与患者疾病进展时间和总生存期成正相关。另有文献^[17-18]报道,DC 免疫治疗后 DTH 阳性及特异性 T 细胞与患者的生存期有一定的相关性。在本研究中,8 例(42%)患者 DTH 检测为阳性,DTH 阳性患者治疗后,CD8⁺ IFN- γ ⁺ 特异性 T 细胞克隆数量也明显被激发增加,表明 DC 免疫治疗确实能激发患者特异性免疫应答。

总之, HER-2/neu 多肽负载 DC 的治疗是安全的, 且在体内外均能激发特异性 T 细胞应答, 激活机体的特异性免疫反应, 杀伤肿瘤细胞, 但其长期临床疗效的评价还需扩大样本数量进行深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Czerniecki BJ, Koski GK, Koldovsky U, et al. Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(4): 1842-1852.
- [2] Spector NL, Blackwell KL. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(34): 5838-5847.
- [3] Yee C, Thompson JA, Byrd D, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific $^+$ T cell clones for the treatment of patients with metastatic CD8 melanoma: *In vivo* persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(25): 16168-16173.
- [4] 杨文博, 赵堃. 树突状细胞的研究进展 [J]. *医学综述*, 2011, 17(15): 2279-2281.
- [5] Draube A, Klein-Gonzalez N, Matheus S, et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): 1-11.
- [6] Celestia SH, Paul FS, Eric JS, et al. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with Sipuleucel-T in advanced prostate cancer [J]. *Cancer*, 2009, 115(15): 3670-3679.
- [7] May KF Jr, Gulley JL, Drake CG, et al. Prostate cancer immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(16): 5233-5238.
- [8] 唐晓义, 张斌, 陈虎. 美国 FDA 批准的首个自体细胞免疫药物 Sipuleucel-T 的转化之旅 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(6): 672-677.
- [9] Paczesny S, Shi H, Saito H, et al. Measuring melanoma-specific

cytotoxic T lymphocytes elicited by dendritic cell vaccine with a tumor inhibition assay *in vitro* [J]. *J Immunother*, 2005, 28(2): 148-157.

- [10] Shi H, Cao T, Connolly JE, et al. Hyperthermia enhances CTL cross-priming [J]. *J Immunol*, 2006, 176(4): 2134-2141.
- [11] 朱玉兰, 钱科卿, 秦建伟, 等. 乳腺癌细胞抗原负载的自体树突状细胞体内诱导特异性 T 细胞应答 [J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(6): 708-710.
- [12] Demonty G, Bernard-Marty C, Puglisi F, et al. Progress and new standards of care in the management of HER-2 positive breast cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43(3): 497-509.
- [13] Baselga J. Treatment of HER2-overexpressing breast cancer [J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(7): 36-40.
- [14] Baxevanis CN, Voutsas IF, Gritzapis AD, et al. HER-2/neu as a target for cancer vaccines [J]. *Immunotherapy*, 2010, 2(2): 213-226.
- [15] Morse MA, Hobeika A, Osada T, et al. Long term disease-free survival and T cell and antibody responses in women with high-risk HER2 $^+$ breast cancer following vaccination against HER2 [J]. *J Transl Med*, 2007, 5(1): 42.
- [16] Wheeler CJ, Black KL, Liu G, et al. Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14): 5955-5964.
- [17] Lopez MN, Pereda C, Segal G, et al. Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(6): 945-952.
- [18] Engell-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, et al. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: Assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(1): 1-14.

[收稿日期] 2011-09-15 [修回日期] 2011-12-20

[本文编辑] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符, 它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法, 切不可混淆使用。现根据有关标准和规则, 把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体, 例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体), 例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMRI*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3) 限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体, 例如 *Hind III*、*BamH I*、*Sal I* 等。(4) 各种统计学符号应斜体, 例如样本数 n 、均数 \bar{x} 、样本差 s 、 t 检验、 F 检验、概率 P 、相关系数 r 等。(5) 各种物理量的量符号应斜体(pH 用正体除外), 例如长度 L 、面积 A (或 S)、体积 V 、质量 m 、时间 t 、压力 p 、相对分子质量 M_r 、物质的量浓度 c_B 等。(6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体, 例如左旋 L 、右旋 D 、邻位 o 、对位 p 、反式 *trans*、顺式 *cis* 等。(7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体, 例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)