

T_H 细胞在记忆性 CTL 介导的 肿瘤抑制中的作用研究

高丰光 Germain J. P. Fernando 刘文军

【摘要】 目的 观察记忆性 CTL 的抑瘤作用是否需要抗原特异性 T_H 细胞的辅助。方法 表达 OVA T 细胞表位 SINFELK 特异性 TCR 的 T 细胞转输 RAG^{-/-} 小鼠,经相应 T 细胞表位多肽刺激后产生记忆性 CTL,将此记忆性 CTL 转输已产生特异性和非特异性 T_H 细胞的 C57BL/6 小鼠体内并接种肿瘤细胞 EG7。结果 经 T 细胞表位多肽免疫后,SINFELK 特异性 TCR T 细胞成功在 RAG^{-/-} 小鼠体内增殖并分化为记忆性 CTL;抗原特异性 T_H 细胞可辅助产生较多效应性 CTL 但并没有完全的肿瘤抑制作用;记忆性 CTL 的完全抑瘤活性需要抗原特异性 T_H 细胞的辅助。结论 机体对肿瘤的长期完全杀伤作用不但需要肿瘤特异性抗原诱导产生的记忆性 CTL,而且需要特异性 T_H 细胞的辅助,肿瘤疫苗的设计必须包括特异性的 CTL 表位多肽和辅助性 T_H 细胞多肽。

【关键词】 记忆性 CTL; 长效免疫; T_H 细胞; 肿瘤; 疫苗

The role of T_H cells in memory CTL mediated tumor protection GAO Feng-guang*, Germain J. P. Fernando, LIU Werrjun. *Department of Immunology, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China
Corresponding author: GAO Feng-guang, Email: gfengguang1@163.com

【Abstract】 Objective To study the role of T_H cell in the activation of memory T cells and shifting to functional tumor killer cells. **Methods** Adoptive transfers SINFELK specific CTL to RAG^{-/-} mice and then immunized them with SINFELK to generate ovalbumin specific memory CTL. C57BL/6 mice were adoptive transferred with memory CTL immunized with T-helper epitopes of ovalbumin and then challenged with ovalbumin specific tumor cells. **Results** With SINFELK immunization, specific CTL proliferated and acquired memory CTL phenotypes; OVA specific T_H cells could help the host to generate more specific CTL but this effect is not strong enough to get tumor inhibition. Memory CTL needs T_H cells to completely regress the development of tumor formation. **Conclusion** Long lasting antitumor effect needs both antigen specific memory CTL and specific T_H cells and so the design of tumor vaccine should include specific CTL and T_H peptides.

【Key words】 Memory CTL; Long lived protective immunity; T helper cell; Cancer; Vaccines

T_H 细胞 辅助机体产生的 CD8⁺ 杀伤性 T 细胞 (CTL) 是机体抗肿瘤免疫的主要机制,也是肿瘤免疫学研究的重点。初始 T 细胞经抗原激活后分化为效应性 T 细胞和记忆性 T 细胞,但目前尚未阐明效应性 CTL、记忆性 CTL 产生、维持、再活化的机制和规律,也不清楚记忆性 CTL 的抗瘤活性是否需要 T_H 细胞的辅助。Livingston 等^[1,2] 发现,抗原表位免疫动物可导致特异性 CTL 克隆的扩增并产生记忆性 CTL,

但无法分阶段研究 CTL 克隆激活、扩增、效应及记忆阶段是否需要 CD4⁺ T_H 细胞的辅助。TCR 转基因鼠的出现,可提供大量效应性 CTL,将一定数量转基因鼠 CTL 转输正常小鼠,可有效研究效应性 CTL 对抗原的应答效应^[3]。转输效应性 CTL 治疗肿瘤的研究使人们对效应性 CTL 的结局和作用得到了广泛和深入的了解^[4],但由于外周淋巴细胞中肿瘤特异性记忆性 CTL 的匮乏,使人们对记忆性 CTL 在抗肿瘤免疫中的作用知之甚少,也并不清楚肿瘤免疫中 CD4⁺ T_H 细胞在记忆性 CTL 的产生、维持和重新活化中的作用。本研究以细胞转输技术探讨记忆性 CTL 介导的抗瘤作用是否需要 T_H 细胞的辅助,将 H-2K^b 背景、OVA₂₅₇₋₂₆₄ 多肽 SINFELK 特异性 TCR 的 OT-1 小鼠^[5] T 细胞转输 RAG^{-/-} 小鼠,SINFELK 免疫后获得肿瘤特异性记忆性 CTL,继以 OVA T_H 表位多肽诱导

作者单位:361005 厦门大学医学院免疫学教研室(高丰光);Centre for Immunology and Cancer Research, University of Queensland, Princess Alexandra Hospital, Brisbane QLD, 4102, Australia (Germain J. P. Fernando); Clinical Medical Virology Centre, University of Queensland, Sir Albert Sakzewski Virus Research Centre, Royal Children's Hospital, Brisbane QLD, 4029, Australia (刘文军)

通讯作者:高丰光,Email:gfengguang1@163.com,电话:0592-2188421

产生特异性 T_H 细胞,再将记忆性 CTL 转输已产生特异性或非特异性 T_H 细胞小鼠,并接种表达 OVA 的肿瘤细胞 EG7,以探讨记忆性 CTL 的抗瘤作用是否需要特异性 T_H 细胞辅助,发现,特异性 T_H 细胞能辅助机体产生较多效应性 CTL 但并不能保护机体抵御肿瘤细胞攻击;记忆性 CTL 需要 T_H 细胞的辅助才能够产生完全的肿瘤抑制作用。但尚不清楚 T_H 细胞亚类在记忆性 CTL 复激活中的作用和可能机制,这应是进一步研究的重点。

材料和方法

多肽和动物:对应于 OVA 氨基酸序列 257~264 和 323~339 的多肽 SIINFEKL (GF257) 和 ISQAVHAAHAEFNEAGROVA (OVT),分别是 $H-2K^b$ 背景小鼠 OVA 蛋白特异性 CTL 表位和 T_H 表位^[6],对照多肽 HGSEPCIIHRGKPFQLEAVF-EANQNTKTA (GF2550)、GF257 和 OVT 均由 Auspep 公司合成,经 HPLC 分析,多肽纯度符合实验要求 (>99%)。源于 $CD8^+$ OVA 特异性 T 细胞克隆 149.42,TCR 可变区是 V 2 和 V 5 的 OT-1 TCR 转基因小鼠^[5]、6~12 周龄雌性小鼠 (C57BL/6, $RAG^{-/-}$) 购自 ARC,Perth,Australia。EG7 肿瘤细胞系来自 $H-2K^b$ 遗传背景 C57BL/6 小鼠转染 OVA 基因^[7],以 RPMI 1640 培养基(内含 0.1 mmol/L nonessential amino acids, 1 mmol/L sodium pyruvate, 2 mmol/L L-glutamine, 50 mg/ml gentamicin sulfate)培养。此培养基另加 50 mmol/L 2-ME (Aldrich, Milwaukee, WI) 和 10% FBS (Life Technologies, Grand Island, NY)。

动物免疫和细胞转输:记忆性 CTL 产生按文献 [8] 方法进行,首先,收集 OT-1 小鼠淋巴结细胞并以 PBS 缓冲液洗涤 3~4 次,调节细胞浓度至 5×10^6 /ml,将上述细胞悬液 0.1 ml 经尾静脉注射 $RAG^{-/-}$ 小鼠;次日以 50 μ g SIINFEKL/Freund 免疫受体鼠(小鼠尾部皮下、颈部用 Freund 完全佐剂 CFA,右前足垫用 Freund 不完全佐剂 IFA),饲养至少 1 个月以产生记忆性 CTL;再次,将 $RAG^{-/-}$ 小鼠产生记忆性 CTL 转输到 C57BL/6 小鼠体内。

抗体和流式细胞计数分析:phycoerythrin (tetramer-PE) 偶连的 SIINFEKL-MHC tetramers 单抗购自 National Institute of Allergy and Infectious Disease MHC Tetramer Core Facility (Atlanta GA),CD8-APC、CD44-Bio、Streptavidin FITC 购自 Pharmingen (San Diego, CA)。处死小鼠,制备细胞悬液,以含 0.1% BSA 和 0.1% NaN_3 的 PBS 液调节细胞浓度,以 3 mg/ml anti-FcR 抗

体标记细胞,Becton Dickinson FACS Caliber 流式细胞仪 CELLQUEST (Becton Dickinson) and FLOWJO (Tree Star, San Carlos CA) 软件分析 10 000~50 000 细胞。

辅助性 T_H 细胞产生:IFA 购自 Sigma 公司,参考文献 [9] 方法以 OVT 多肽混合 IFA 免疫小鼠以产生 T_H 细胞。

ELISPOT 检测效应性 CTL:以 0.1 mol/L $NaHCO_3$ 无菌过滤后混合一定量的抗 $IFN-\gamma$ 单抗,4 过夜,包被 Multiscreen^R-HA Opaque 无菌培养板,取小鼠脾细胞制备成 10^7 /ml 细胞悬液,按照文献 [10] 方法操作。先将 10^6 脾细胞加入培养孔,实验孔另加入 IL-2 (10 ng/ml, Gbco BRL Life 公司);其次,每孔加入 SIINFEKL 多肽至终浓度 1 和 0.001 μ g/ml,37 $^{\circ}C$ 孵育 16~20 h;再以 PBST 洗板 3 次后,加入 Biotin 偶连的抗 $IFN-\gamma$ (PharMingen) 单抗,室温孵育 2~4 h,然后加入 Avidin 标记的马抗兔过氧化物酶 (Sigma 公司);最后以 PBST 和 PBS 各洗板 3 次后,加入底物 DAB 和 Peroxide urea (Sigma),显微镜下计数阳性斑点。

ELISPOT 检测 T_H 细胞:方法同上,只作适当修改。每孔加入 10^6 细胞、IL-2 (10 ng/ml, Gbco BRL Life 公司) 后,再加入 OVA 特异性 T_H 多肽至终浓度 8 或 4 μ g/ml,37 $^{\circ}C$ 孵育 36~40 h;以 PBST 洗板后,加入 Biotin 标记抗 $IFN-\gamma$,室温孵育 2~4 h,然后加入 Avidin 标记的马抗兔过氧化物酶 (Sigma 公司);最后以 PBST 和 PBS 各洗板 3 次后,加入底物 DAB 和 Peroxide urea (Sigma),显微镜下计数阳性斑点。

肿瘤保护实验:以 RPMI 1640 培养肿瘤细胞系 EG7,每周传代 2~3 次。实验前 7 d,以 IFA 混合 50 μ g 特异性 T_H 多肽或非特异性钥孔血蓝素 (KLH) 免疫小鼠以产生 OVA 特异或非特异性 T_H 细胞,实验日将 5×10^5 记忆性 CTL 经尾静脉转输 C57BL/6 小鼠并将 3×10^6 EG7 细胞接种各实验组小鼠颈部皮下,8 d 后处死,取肿瘤称其重量。

结 果

1. 受 SIINFEKL 刺激后,特异性 TCR T 细胞在 T/B 细胞匮乏 $RAG^{-/-}$ 小鼠体内大量增殖:初始 T 细胞在内环境稳定的条件下可针对自身多肽/MHC 复合体发生增殖反应,射线照射后的急性反应可能影响 T 细胞的增殖反应,特别是处理后产生的细胞因子可引起初始 T 细胞和效应性 T 细胞的增殖分化^[11]。本实验中,为避免射线影响,我们将 OT-1 细胞转输到 $RAG^{-/-}$ 小鼠体内。OT-1 小鼠淋巴结细胞

中,超过 60% 的细胞表达 SIINFEKL 特异性的 TCR (图 1A), 将 5×10^5 OT-1 淋巴结细胞转输 $RAG^{-/-}$ 小鼠并以 SIINFEKL 刺激, 14 d 后, 受体鼠淋巴结细胞中近 18% 的细胞表达 SIINFEKL 特异性的 TCR (图 1B), 42 d 后, 受体鼠淋巴结细胞中仍有约 22% 的细胞表达 SIINFEKL 特异性的 TCR (图 1C)。以 ELISPOT 技术检测效应性 CTL, $RAG^{-/-}$ 转输受体鼠, 其脾细胞在 14 d 和 42 d 分别有 410 个和 1000 个 IFN- γ 特异性斑点 (图 1D), 提示 SIINFEKL 特异性 TCR T 细胞受抗原刺激后可在 $RAG^{-/-}$ (deficient in both B and T cells) 小鼠体内增殖。本实验结论在射线处理的 B6 受体鼠上也得到证实^[12], 从而提示, 在相同的 H2K^b 背景下, T 细胞增殖反应都是针对 SIINFEKL 多肽特异性的增殖反应, $RAG^{-/-}$ 小鼠可以作为 SIINFEKL 多肽特异性 CTL 产生的工具鼠。由于 $RAG^{-/-}$ 小鼠缺乏自身 T、B 细胞, 避免了急性 T 细胞缺失或其它因素产生的细胞因子介导的非特异性 T 细胞增殖的影响。

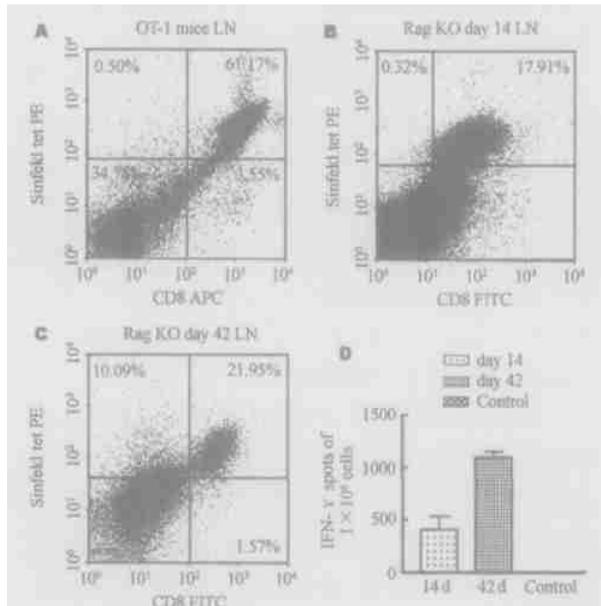


图 1 表达 SIINFEKL TCR 的 T 细胞在 $RAG^{-/-}$ 和 C57BL/6 小鼠体内增殖结果

Fig 1. The results of SIINFEKL peptide specific TCR T cells proliferation in T/B deficient $RAG^{-/-}$ mice

5×10^5 lymph nodes (LN) cells were prepared and FACS analysis was done as time indicated. The results of expression of CD8⁺ and SIINFEKL specific TCR of OT-1 mouse lymph nodes (A) and $RAG^{-/-}$ mouse lymph nodes which had been adaptive transferred OT-1 cells for 14 (B) and 42 (C) days; ELISPOT results of $RAG^{-/-}$ mice of adoptive transfer 5×10^5 OT-1 lymph nodes cells for 14 and 42 days (D)

2. SIINFEKL 特异性 TCR T 细胞受抗原表位刺激后的增殖过程中成功分化成记忆性 CTL: 记忆性 CTL 与初始 CTL 的本质区别是其曾接触过抗原并发生过增殖反应, CTL 激活过程中表面分子的改变成

为记忆性 CTL 潜在的分子标记, 就记忆性 CD8⁺ CTL 而言, 其表面分子主要有 CD44、CD62L 和 CD45^[13]。实验显示: OT-1 小鼠的淋巴结细胞中的初始 T 细胞中, 几乎所有细胞没有 CD44 分子的高水平表达 (图 2A)。受抗原表位刺激后的增殖反应中, 在 14 d 约有 48% 的 $RAG^{-/-}$ 淋巴结细胞有 CD8、CD44 分子的高水平表达 (图 2B), 其中 CD8、CD44 高表达的细胞中有 91.45% 的细胞 SIINFEKL TCR 阳性 (图 2C); 在抗原刺激后的 42 d, 上述数字分别达到 10.82% (图 2D) 和 97.52% (图 2E)。因此, 在转输后的 14 d, SIINFEKL 激活的 CTL 即具有记忆性 CTL 的特征: CD44 分子的高度表达。本实验中所用的记忆性 CTL 在 $RAG^{-/-}$ 小鼠体内受 SIINFEKL 激活后至少存活 42 d。

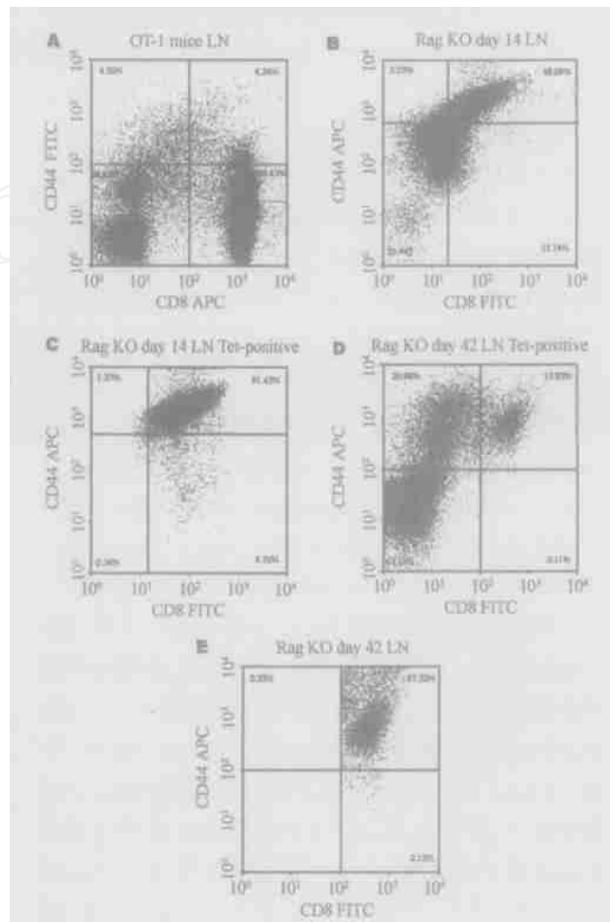


图 2 转输 $RAG^{-/-}$ 小鼠的 SIINFEKL 特异性 TCR T 细胞经相应抗原刺激后, 获得记忆性 CTL 表型特征

Fig 2. Naïve SIINFEKL TCR T cells undergoing antigen specific driven proliferation acquire a memory CTL phenotype in $RAG^{-/-}$ recipients

OT-1 lymph node cells (A) were transferred into $RAG^{-/-}$ recipients and SIINFEKL peptides were immunized. Lymph node cells of recipients was performed to analysis the expression of CD8⁺ and CD44⁺ (B, D) and CD8⁺, CD44⁺ and SIINFEKL TCR (C, E) at day 14 (B, C) and 42 (D, E)

3. 特异性 T_H 细胞预存在可辅助机体产生较多

特异性效应性 CTL, 但此种效应尚不能完全抵御肿瘤细胞的攻击: 为确保 T_H 表位多肽免疫和转输记忆性 CTL 小鼠出现的抑瘤效应由转输的记忆性 CTL 介导, 需排除 OVA T_H 多肽免疫后可能产生的 T 细胞和 NK 细胞的间接作用。如图 3 所示, 将 3×10^6 EG7 肿瘤细胞接种对照和 T_H 多肽预免疫的 C57BL/6 小鼠皮下, 对照组和 T_H 多肽免疫组均无肿瘤保护效应, 而转输记忆性 CTL 且 T_H 多肽免疫组有完全肿瘤抑制作用 ($P < 0.01$, unpaired *t* test, 图 3A)。ELISPOT 检测发现, 受肿瘤细胞 EG7 攻击后, T_H 多肽免疫组较对照组产生较多效应性 CTL (图 3B, T_H vs 对照, unpaired *t* test, $P < 0.05$)。CTL 转输组有较其它实验组更多的效应性 CTL 产生 (CTL + T_H vs 对照 $P < 0.001$, CTL + T_H vs T_H $P < 0.05$), 提示: 已产生特异性 T_H 细胞的宿主遇相应抗原刺激时, 特异性 T_H 细胞的存在可以辅助机体产生较多的特异性效应性 CTL, 但此种效应并不足以保护机体免于肿瘤形成。

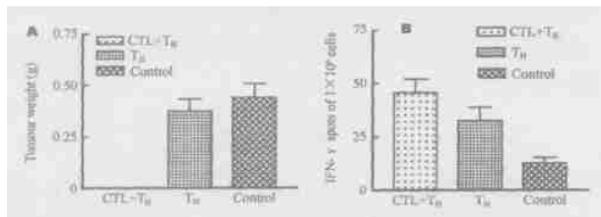


图 3 特异性 T_H 细胞肿瘤保护试验结果 (A) 和辅助诱导抗原特异性效应性 CTL 试验结果 (B)

Fig 3. The results of tumor protection experiment of specific T helper cells (A) and the results of antigen specific effector CTL experiment (B)

CTL + T_H vs control, $P < 0.001$ T_H vs control, $P < 0.05$ unpaired *t* test; CTL + T_H vs T_H , $P < 0.05$ paired *t* test. CTL + T_H : the group of adoptive transfer of SIINFEKL specific memory CTL and OVA specific T_H peptide immunization; T_H : OVA specific T_H peptide immunization only; control: normal C57BL/6 mice

4. 记忆性 CTL 需要特异性 T_H 细胞的辅助才能产生完全的肿瘤抑制作用: 为探讨 T_H 细胞在记忆性 CTL 介导的抗肿瘤免疫中的作用, 本研究以 OVA 特异性 T_H 多肽或非特异性蛋白 KLH 免疫 C57BL/6 小鼠以产生特异性或非特异性 T_H 细胞, 转输记忆性 CTL 的同时接种小鼠肿瘤细胞 EG7 以观察记忆性 CTL 产生的抗肿瘤效应是否需要特异性或非特异性 T_H 细胞的辅助。结果显示: 单纯记忆性 CTL 转输不能获得完全的肿瘤抑制作用, 需特异性 T_H 细胞的辅助才能产生完全的肿瘤抑制作用 (图 4A, CTL + T_H vs CTL + KLH $P < 0.01$; CTL + T_H vs CTL $P < 0.001$,

paired *t* test); OVA T_H 多肽免疫成功诱导特异性 T_H 细胞的产生, 且此类细胞在记忆性 CTL 介导的抗肿瘤免疫反应中发挥巨大作用 (图 4B, CTL + T_H vs CTL 和 CTL + T_H vs KLH, 均 $P < 0.05$, paired *t* test)。

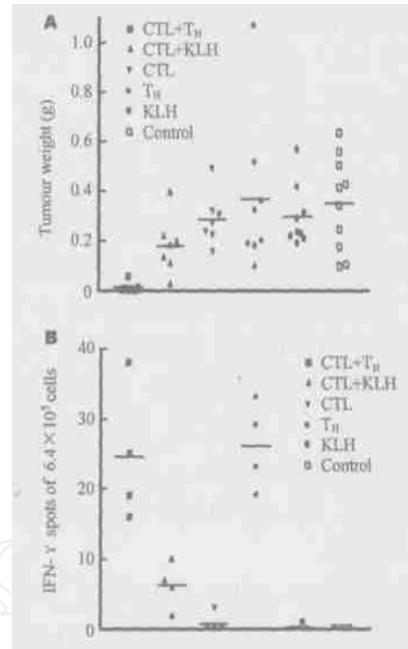


图 4 记忆性 CTL 肿瘤抑制试验结果 (A) 和抗原特异性 T_H 细胞检测结果 (B)

Fig 4. Result of memory CTL inhibited tumor test (A) and determine antigen specific T_H cells (B)

The mice were performed different operation which indicated that: the group of memory CTL and antigen specific T_H cells ($n = 7$); the group of memory CTL and antigen nonspecific T_H cells ($n = 7$); the group of memory CTL only ($n = 7$); the group of antigen specific T_H cells only ($n = 8$); the group of antigen nonspecific T_H cells only ($n = 9$) and the normal C57BL/6 group ($n = 10$). (A) The results of tumor challenge experiment ($P < 0.001$, vs, paired *t* test; $P < 0.0001$, vs \blacktriangledown , paired *t* test; $P < 0.05$, vs, unpaired *t* test; $P < 0.001$, vs, unpaired *t* test). (B) The results of ELISPOT experiment challenged with OVA specific T_H peptide *in vitro* (vs and vs $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively)

讨 论

TCR 转基因鼠可提供大量均一性 CTL, 将一定数量 TCR 转基因鼠 CTL 转输正常小鼠, 再以特异性抗原免疫可有效研究效应性 CTL 对抗原的应答效应^[3]、分析免疫应答过程中抗原特异性 T 细胞表型和功能变化, 改进后也可用于体内诱导抗肿瘤免疫的研究^[14, 15]。本研究所用 OT-1 细胞的 TCR 由 V 2V 5 异二聚体构成, 识别 H-2K^b 编码的 MHC 分子提呈的抗原表位 SIINFEKL。经 SIINFEKL Tet-PE 流

式细胞分析, 61.17% 的 OT-1 小鼠淋巴结细胞为 $V2^+V5^+CD8^+$ 。将此淋巴结细胞转输 $RAG^{-/-}$ 小鼠并以 SINFEKL 多肽刺激, 14 d 后, 受体鼠淋巴结细胞中仍有 17.91% 的细胞表现为 $V2^+V5^+CD8^+$, 至 42 d 该阳性率仍达 21.95%, 提示受 SINFEKL 刺激后, 特异性 TCR T 细胞在 T/B 细胞匮乏 $RAG^{-/-}$ 小鼠体内可大量增殖。Cho 等^[16]以 $RAG1^{-/-}$ 2C TCR 转基因鼠初始 $CD8^+$ T 细胞转输同基因背景但缺乏淋巴细胞的 $RAG1^{-/-}$ 受体鼠并免疫抗原多肽, 30 d 或更长时间, 受体鼠中存活的 2C 细胞分化为具有记忆性 CTL 表型的细胞。本研究发现, 几乎所有 OT-1 小鼠淋巴结细胞无 CD44 分子的高水平表达 ($CD44^{high+}$, 图 2A), 抗原介导的免疫应答中, 14 d 约有 48% 的 $RAG^{-/-}$ 淋巴结细胞有 CD8、CD44 分子的高水平表达 (图 2B), 其中 CD8、CD44 高表达的细胞中有 91.45% 的细胞 SINFEKL TCR 阳性 (图 2C), 在抗原免疫后 42 d, 上述数字分别达到 10.82% (图 2D) 和 97.52% (图 2E)。

经抗原刺激后, 绝大多数初始 CTL 经有效激活分化为效应性 CTL, 再转化为记忆性 CTL, 少数初始 CTL 在内环境稳定的条件下, 不需要分化为效应性 CTL 而直接转化为记忆性 CTL^[17]。Geginat 等^[11,18]发现在淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 免疫小鼠体内存在着两类截然不同的记忆性 CTL, 较大数量的一类具有 $CD44^{high}CD62L^-$ 表型, 定居于脾脏, 可迅速分化为效应性 CTL, 决定了 LCMV 免疫小鼠对相应抗原的快速反应能力, 效应性 CTL 经过 6~10 代的分裂即具有记忆性 CTL $CD44^{high}CD62L^-$ 表型; 另一类具有 $CD44^{high}CD62L^+$ 表型, 已丧失迅速分化为效应性 CTL 的能力, 定居于脾脏和淋巴结, 但由于肿瘤特异性记忆性 CTL 的匮乏, 使人们对记忆性 CTL 在抗肿瘤免疫中的作用知之甚少, 也不清楚肿瘤免疫中 $CD4^+$ T_H 细胞在记忆性 CTL 的产生、维持和重新活化中的作用。本研究将 SINFEKL TCR OT-1 小鼠淋巴结细胞转输 $RAG^{-/-}$ 小鼠、表位多肽刺激产生记忆性 CTL, 将记忆性 CTL 转输预存在特异性 T_H 细胞的 C57BL/6 小鼠, 以探讨记忆性 CTL 是否需要特异性或非特异性 T_H 细胞以产生完全的肿瘤抑制作用。结果发现, 尽管 T_H 细胞预存在可辅助小鼠产生较多数量的效应性 CTL, 但此数量的效应性 CTL 并不能完全抵御肿瘤细胞的攻击, 记忆性 CTL 需要 $CD4^+$ 特异性 T_H 细胞的辅助才能产生完全的肿瘤抑制作用。

Franco 等^[19]发现, 在 MHC 限制的 CTL 反应中, 与 T_H 表位共同免疫时, 和 MHC 类分子有高亲和力的 CTL 表位多肽 ($IC_{50} < 50$ nmol/L), 总是良好的免疫原; 亲和力介于 50~500 nmol/L 之间的 CTL 表位多肽, 其免疫原性是不稳定的, 只有其中的 10%~50% 能够激发 CTL 反应; 亲和力小于 500 nmol/L 的多肽很少具有免疫原性。因此, CTL 表位多肽与相应 MHC 类分子亲和力是决定记忆性 CTL 介导的抗肿瘤反应是否需要 T_H 细胞的关键。但 Bell 等^[20]报道, CTL 表位多肽本身决定了记忆性 CTL 是否需要其它因子的辅助以获得杀伤活性, 此种辅助作用至少通过 CD40 依赖性途径、CD40 独立性途径和 $CD4^+$ 细胞分泌的可溶性细胞因子等 3 条途径完成。本研究尚未对记忆性 CTL 需要特异性 T_H 细胞辅助的机制, 即 SINFEKL CTL 表位多肽与 MHC 类分子的亲和力决定抑或 SINFEKL 本身决定了记忆性 CTL 需要特异性 T_H 细胞辅助以产生完全的肿瘤抑制作用, 以及 T_H 细胞的辅助作用可否由 CD40 依赖性途径、CD40 独立性途径替代完成进行研究, 这应是进一步工作的重点。

参 考 文 献

- Livingston BD, Crimi C, Grey H, et al. The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J Immunol*, 1997, 159: 1383-1392.
- Barber DL, Wherry EJ, Ahmed R. Cutting edge: rapid *in vivo* killing by memory CD8 T cells. *J Immunol*, 2003, 171(1): 27-31.
- Kearney ER, Pape KA, Loh DY, et al. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction *in vivo*. *Immunity*, 1994, 1: 327-332.
- Dalyot-Herman N, Bathe OF, Malek TR. Reversal of $CD8^+$ T cell ignorance and induction of anti-tumour immunity by peptide-pulsed APC. *J Immunol*, 2000, 165: 6731-6737.
- Clarke SR, Barnden M, Kurts C, et al. Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-1: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol Cell Biol*, 2000, 78: 110-117.
- McFarland BJ, Sant AJ, Lybrand TP, et al. Ovalbumin (323-339) peptide binds to the major histocompatibility complex class II A (d) protein using two functionally distinct registers. *Biochemistry*, 1999, 38(50): 16663-16670.
- Moore M, Carbone F, Bevan M. Introduction of soluble protein into the class II pathway of antigen processing and presentation. *Cell*, 1988, 54: 777-785.
- Cho B, Wang C, Sugawa S, et al. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2976-2981.
- Fernando GP, Stewart DJ, Tindle RW, et al. Th2-type $CD4^+$ cells neither enhance nor suppress antitumour CTL activity in a mouse tumour model. *J Immunol*, 1998, 161: 2421-2427.
- Sun Y, Iglesias E, Samri A, et al. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J Immunol Methods*, 2003, 272(1-2): 23-34.
- Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human $CD8^+$ memory T-cell subsets in response to antigen or

- homeostatic cytokines. *Blood*, 2003, 101(11): 4260-4266.
- 12 Kieper WC, Jameson SC. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide MHC ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 13306-13311.
 - 13 Tough DF, Sun S, Zhang X, et al. Stimulation of memory T cells by cytokines. *Vaccine*, 2000, 18: 1642-1648.
 - 14 Byers AM, Kembell CC, Moser JM, et al. Cutting edge: rapid *in vivo* CTL activity by polyoma virus-specific effector and memory CD8⁺ T cells. *J Immunol*, 2003, 171(1): 17-21.
 - 15 Ochsenbein AF, Klennerman P, Karrer U, et al. Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2233-2238.
 - 16 Cho BK, Rao VP, Ge Q, et al. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate into memory T cells. *J Exp Med*, 2000, 192: 549-556.
 - 17 Rayevskaya M, Kushnir N, Frankel FR. Anti-human immunodeficiency virus-gag CD8⁺ memory T cells generated *in vitro* from Listeria-immunized mice. *Immunology*, 2003, 109(3): 450-460.
 - 18 Oehen S, Brduschar-Riem K. Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *J Immunol*, 1998, 161: 5338-5346.
 - 19 Franco A, Tilly DA, Gramaglia I, et al. Epitope affinity for MHC class determines helper requirement for CTL priming. *Immunol Nature*, 2000, 1: 145-150.
 - 20 Bell EB, Sparshott SM, Bunce C. CD4⁺ T cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen—a unifying concept. *Immunol Today*, 1998, 19: 60-64.

(收稿日期:2004-06-10)

肿瘤免疫学

榄香烯复合瘤苗 HSP70 与卡介苗 HSP70 免疫效应机制的对比研究

高志红 郭连英 沈杰 施广霞 钱振超

分别从榄香烯复合瘤苗及卡介苗中提取纯化 HSP70,并以榄香烯复合瘤苗作为阳性对照,通过测定免疫小鼠全脾细胞的细胞增殖周期、细胞表型、细胞毒活性,研究两者在免疫效应及机制上的不同之处。

HSP70 的提取纯化按本室常规进行并加以改进,使提取物达到电泳纯,并经 Western blot 鉴定。取健康 BALB/c 小鼠 32 只,随机分成 4 组,分别为:PBS 对照组、卡介苗 HSP70 组、榄香烯复合瘤苗 HSP70 组、榄香烯复合瘤苗组。每组 8 只,雌雄各半。分别将 PBS(0.1 ml/只)、卡介苗 HSP70(每只 50 μg/0.1 ml)、榄香烯复合瘤苗 HSP70(每只 50 μg/0.1 ml)以及榄香烯复合瘤苗(每只 3 × 10⁶/0.1 ml)于小鼠腹腔进行免疫,共免疫 3 次后,将小鼠全部处死。

基金项目:国家自然科学基金重点项目
(No. 39730440)

作者单位:116011 大连医科大学附属第一医院内科

通讯作者:高志红, Email: gaozhihong19@yahoo.com.cn, 电话: 0411-83635963-2119

免疫小鼠全脾细胞的细胞增殖周期测定结果表明,小鼠经免疫后,各组处于增殖状态的 G₂+S 期细胞明显增多,其中榄香烯复合瘤苗组的 G₂+S 期细胞比例最高为 59.64%。其次为榄香烯复合瘤苗 HSP70 组 54.68%,与卡介苗 HSP70 组 45.79% 比较差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。全脾细胞的表型测定显示了 PBS 对照组小鼠 T 细胞的比例较少,仅占 6.25%,经免疫后,各组免疫小鼠的 T 细胞占全脾细胞的比例均明显提高,其中,以榄香烯复合瘤苗 HSP70 组为最高,达 35.55%,与卡介苗 HSP70 组 14.32% 比较差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。小鼠经卡介苗 HSP70 免疫后,其 CD4 阳性细胞的比例明显增高,达 53.32%,而榄香烯复合瘤苗 HSP70 组仅为 21.23%,为最低组(两组比较差别显著, $P < 0.05$),表明这两种 HSP70 在对小鼠脾细胞的刺激上有其不同的选择性。小鼠经免疫后,全脾细胞对 Hcar-F 细胞及 L929 细胞均有明显的杀伤活性,对 Hcar-F 细胞的细胞毒活性分别为榄香烯复合瘤苗组 47.71% (与 PBS 对照组比较差别有统计学意义, $P < 0.01$),榄香

烯复合瘤苗 HSP70 组 53.68% (与 PBS 对照组比较差别有统计学意义, $P < 0.01$),卡介苗 HSP70 组 36.84% (与 PBS 对照组比较差别有统计学意义, $P < 0.05$)。对 Hcar-F 细胞的杀伤能力上榄香烯复合瘤苗 HSP70 组明显高于卡介苗 HSP70 组 ($P < 0.01$),但对于 L929 细胞,两者的杀伤能力基本接近。

本实验结果提示了来自于榄香烯复合瘤苗中的 HSP70 较卡介苗 HSP70 对 Hcar-F 有更强的抗肿瘤免疫活性,其原因推测主要是由于来自肿瘤组织中的 HSP70 携带有肿瘤抗原信息—肿瘤抗原肽,刺激 T 细胞,产生特异的抗肿瘤免疫。来自于卡介苗的 HSP70,有可能携带着结核菌的抗原肽,在肿瘤免疫中,其抗癌性主要是通过它所引起的非特异性的细胞及体液免疫应答,如 CD4 T 细胞的增多、细胞因子 (IFN- γ 、IL-2 等) 分泌增多、非特异性的 T 细胞的增多,激活并诱导巨噬细胞产生 NO 等信息分子,从而发挥其在肿瘤免疫中的辅助作用。

(收稿日期:2004-08-23)