

β-榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗治疗小鼠肝癌免疫机制研究

倪菲菲¹ 刘亚军² 周浩³ 林琳⁴ 刘增巍² 沈洪^{1,2} 王立新³

摘要 目的 观察 β-榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗对小鼠肝癌的治疗作用,探讨 β-榄香烯抗肿瘤的免疫机制。**方法** 制备 Balb/c 小鼠脾脏来源的 DC 并鉴定其表型,以 Balb/c 小鼠来源的肝癌细胞株 BNL 1MEA.7R.1 (简称 BNL) 为靶细胞,募集富含肿瘤“信息”的抗原载体—自噬小体,制备 DC/DRibble 疫苗。预先免疫小鼠,分设对照组、β-榄香烯组、疫苗组、联合组,对照组皮下、腹腔注射 PBS,β-榄香烯组和联合组连续 7 天腹腔注射 β-榄香烯 50 mg/(kg·d),疫苗组和联合组分别在第 1 天淋巴结注射疫苗,第 3、5 天皮下注射疫苗,第 10 天处死小鼠,无菌获得小鼠脾脏,制备悬液,分设不加刺激和 Dribble 刺激组,孵育 72 h,ELISA 法检测上清中 IFN-γ 的含量。另外给予联合组小鼠脾细胞不同刺激,分设对照组、DRibble 组、DC 组、疫苗组,孵育 72 h,ELISA 法检测上清中 IFN-γ 的含量。建立小鼠肝癌荷瘤模型,分为对照组、β-榄香烯组、疫苗组、联合组,治疗方式同上免疫方式,观察各组小鼠的肿瘤大小及生存期,第 23 天处死小鼠,剥取肿瘤组织经 HE 染色,光学显微镜观察肿瘤组织病理形态学表现。**结果** 体外检测发现不同方式免疫后小鼠中,联合组 IFN-γ 分泌量明显高于其他组($P < 0.01$),β-榄香烯组、疫苗组高于对照组($P < 0.01$);给予免疫后小鼠脾细胞不同刺激,发现疫苗组、Dribble 组均能刺激脾细胞分泌大量 IFN-γ($P < 0.01$),当 β-榄香烯刺激浓度 10 μg/mL 时,IFN-γ 分泌明显增多($P < 0.01$);体内观察发现联合组小鼠肿瘤生长速度明显减慢,瘤表面积、生存期与其他组相比均有统计学差异($P < 0.01$),肿瘤组织 HE 染色可见周围结缔组织包裹紧密完整,大量炎性细胞浸润。**结论** β-榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗能够诱导特异性免疫细胞分泌细胞因子功能增强,从而发挥抗肿瘤作用,其免疫效应基础可能与增强 DC 抗原递呈功能有关。

关键词 β-榄香烯;肝癌;树突状细胞;自噬小体

Treatment of Hepatic Cancer in Mice by β-elemene Combined DC/Dribble Vaccine: an Immune Mechanism Research NI Fei-fei¹, LIU Ya-jun², ZHOU Hao³, LIN Lin⁴, LIU Zeng-wei², SHEN Hong^{1,2}, and WANG Li-xin³ 1 First Clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210029), China; 2 Department of Digestive Diseases, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210029), China; 3 Department of Pathogen Biology and Immunity, Southeast University, Nanjing (210009), China; 4 Jiangsu Provincial Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Nanjing (210000), China

ABSTRACT Objective To observe the therapeutic effects of β-elemene combined DC/Dribble vaccine in treating mice with hepatic cancer, thus exploring their anti-tumor mechanisms. **Methods** Dendritic cells were derived from Balb/c mice's spleen and their phenotypes were identified. Using hepatic cancer cell line BNL1MEA.7R.1 (abbreviated as BNL) originated from Balb/c mice as target cell, DC/Dribble vaccine was prepared via raising the antigen representing carrier autophagosomes (DRips in Blebs, DRibbles), which were rich in tumor antigen information. The mice previously immunized were divided into 4 groups, i.e., the control group, the β-elemene group, the vaccine group, and the combined group. The PBS

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.30771999,30972783);江苏省中医药领军人才培养资助项目(No.LJ200901);江苏省中医院院级课题资助项目(No.Y11004)

作者单位: 1.南京中医药大学第一临床医学院(南京 210029); 2.江苏省中医院消化科(南京 210029); 3.东南大学医学院病原生物学与免疫学系(南京 210009); 4.江苏省中西医结合医院(南京 210000)

通讯作者: 沈洪, Tel: 13851872859, E-mail: shenhong999@163.com

was subcutaneously and intraperitoneally injected to mice in the control group. The β -elemene was intraperitoneally injected at the daily dose of 50 mg/kg to mice in the β -elemene group and the combined group for 7 successive days. DC/Dribble vaccine was injected into the lymph node of mice in the vaccine group and the combined group on the 1st day, and DC/Dribble vaccine was subcutaneously injected on the 3rd day and the 5th day. All the mice were sacrificed on the 10th day. Their spleens were obtained sterilely, and the suspension was incubated with or without Dribble. The cells were inoculated for 72 h. The contents of IFN- γ in the supernatant were measured by ELISA. In addition, the spleen cells obtained from the combined group were incubated with different stimulations for 72 h, which were then divided into the control group, the Dribble group, the DC group, and the DC/Dribble vaccine group. The supernatant of cultured cells were collected and the contents of IFN- γ were measured by ELISA. The liver tumor-bearing mouse model was established, and then the BNL bearing mice were randomly divided into 4 groups, i.e., the control group, the β -elemene group, the vaccine group, and the combined group. The treatment ways were the same as the immune ways. The tumor size and the survival period were observed in each group. On the 23rd day the mice were sacrificed. The tumor tissue was stripped and stained by HE staining. The pathomorphological manifestations of the tumor tissue were observed by light microscope. Results *In vitro* detection of mice immunized previously by different ways showed that the secretion of IFN- γ was significantly higher in the combined group than in the rest groups ($P < 0.01$). The secretion of IFN- γ was significantly higher in the β -elemene group and the vaccine group than in the control group ($P < 0.01$). The spleen cells could be stimulated to secrete a large amount of IFN- γ in the vaccine group and the Dribble group ($P < 0.01$). When the β -elemene was 10 $\mu\text{g/mL}$ as the stimulating dose, the secretion of IFN- γ obviously increased ($P < 0.01$). *In vivo* observation showed that the growth velocity of tumors in mice of the combined group was slowed down. There was statistical difference in the tumor area or the survival period of mice in the combined group, when compared with the other groups ($P < 0.01$). In HE staining, the surrounding connective tissues of the tumor were wrapped tightly and compactedly, with infiltration of a large amount of inflammatory cells. Conclusions β -elemene combined DC/Dribble vaccine could induce specific immune cells to secrete secretory cells, thus exerting its anti-tumor effect. Its immunological effects might be associated with enhancing the DC antigen presenting function.

KEYWORDS β -elemene; hepatic cancer; dendritic cell; autophagosomes

肝癌是恶性程度极高,预后极差的恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康。在肿瘤发生、发展过程中,肿瘤抗原不能有效呈递给 T 细胞是导致免疫逃脱的重要原因之一。树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前研究发现的体内最强的抗原递呈细胞(antigen-presenting, APC)。自噬小体(drips in blebs, 简称 DRibble)是肿瘤细胞“递交”肿瘤抗原的有效载体之一,APC 交叉递呈源自自噬小体抗原,并诱导细胞免疫应答的效果明显强于灭活肿瘤细胞和可溶性蛋白^[1]。 β -榄香烯是从姜科植物莪术中提取的抗癌有效成分,其有效生物活性能降低肿瘤细胞的有丝分裂,诱发肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长,还能作用细胞膜,使肿瘤细胞破裂,改变和增强肿瘤细胞的免疫原性,诱发和促进抗体对肿瘤细胞的免疫反应^[2]。前期实验已经证明 β -榄香烯可以增强 DC 表面多种免疫相关的共刺激因子的表达,更有利于 DC 呈递外源性抗原以及激

活 T 细胞,使机体更好地发挥免疫监视和免疫应答^[3]。本研究主要探讨 β -榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗治疗小鼠肝癌的免疫机制。

材料与方法

1 动物及细胞株 Balb/c 雌性小鼠,清洁级,6~8 周龄,购自扬州大学实验动物中心,生产许可证:SCXK(苏)2007-0001;小鼠 BNL1MEA.7R.1(BNL)肝癌细胞株由东南大学免疫实验室冻存。

2 试剂及仪器 β -榄香烯购自大连华立金港药业有限公司,批号:0904281;酪氨酸激酶受体 3 配体(FMS-like tyrosine kinase-3 ligand, Flt3L)和粒细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)真核表达质粒由东南大学免疫实验室常规冻存;RPMI-1640 培养基购自 Invitrogen 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物制品

研究所;红细胞裂解液购自碧云天生物试剂公司;流式检测用荧光标记抗体 CD11c-PE, CD11b-FITC 购自美国 BD 公司;小鼠细胞因子 IFN- γ ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司;蛋白定量试剂盒购自江苏凯基生物有限公司。

IEC 高速低温冷冻离心机购自美国 IEC 公司; LD25-2 水平离心机购自北京医用仪器设备厂; Olympus 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司; FAScan 流式细胞仪购自美国 BD 公司; HZS-D 水浴振荡器购自哈尔滨市东联电子公司; 756MC 型紫外分光光度仪购自上海第三分析仪器厂; Bio-Rad 酶标仪 550 购自美国伯乐; K-80 电热恒温水槽购自上海医用恒温设备厂; T22 超净工作台购自苏州净化设备厂; 小型动物麻醉机购自美国 SUMMIT 公司; CO₂ 培养箱购自美国 Napco 公司。

3 DC 制备 Balb/c 小鼠脾脏来源的 DC 制备参考文献[4], 获得包含大量 DC 的脾细胞悬液, 为分析体内诱导 DC 所占比例, 留取部分脾细胞, 检测细胞表面标志 CD11c、CD11b 分子的表达情况。

4 肝癌荷瘤鼠模型建立及 DRibble 制备 小鼠皮下接种体外传代培养 BNL 肝癌细胞, 接种不同细胞数量, 观察成瘤情况。将肿瘤剥离取出, 研磨, 过滤, 洗涤, 用适量培养液重悬细胞, 移入 500 mL 细胞培养瓶中培养, 细胞贴壁生长, 生长状态良好, 参考文献[1] 方法, 提取细胞上清中的 DRibble, 保存于 -20℃, 避免反复冻融, 以 Bradford 法测定 DRibble 中总蛋白的含量。

5 检测指标及方法

5.1 检测不同免疫方式对小鼠脾细胞分泌 IFN- γ 的影响 取冻存的 DC 细胞复苏, 加入制备好的 DRibble, 37℃ 培养 6 h。取出后用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 加入适量培养液重悬, 制备成 DC/DRibble 疫苗, 调整细胞浓度, 置于冰上备用。为检测不同免疫方式诱导体内特异性免疫应答的差异, 分别以不同的方式预免疫小鼠, 取不同方式免疫小鼠脾细胞, 分为 Dribble 刺激组和不加刺激组, 72 h 后收集细胞培养上清, 采用 ELISA 法检测脾细胞分泌 IFN- γ 的情况。

具体分组如下: PBS 组(A 组); DC/DRibble 疫苗组(B 组); β -榄香烯组(C 组); β -榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗组(D 组)。A 组皮下、腹腔注射 PBS; B 组 DC/DRibble 疫苗免疫, 将 Balb/c 小鼠置于小型动物麻醉机中, 异氟烷全身吸入式麻醉, 待小鼠完全麻醉后, 固定小鼠, 以无菌手术器械剪开小鼠腹部皮肤, 找到两侧腹股沟淋巴结, 第 1 天每侧淋巴结注射

15 μ g DRibble, 无菌手术缝线缝合伤口, 皮下两点注射 DC/DRibble 疫苗, 每侧 5×10^6 个, 分别在第 3、5 天, 双侧腹股沟附近皮下注射 DC/DRibble 疫苗, 每侧 5×10^6 个; C 组连续腹腔注射 β -榄香烯 7 天, 剂量 50 mg/kg, D 组 DC/DRibble 疫苗免疫同 B 组同时腹腔注射 β -榄香烯 7 天。第 10 天将小鼠处死, 于 75% 乙醇中浸泡 5 min, 无菌手术分别取出不同小鼠的脾脏, 制备单细胞悬液, 用培养液重悬, 调整至合适浓度, 分别接种于 24 孔板, 浓度为 2×10^6 /mL, 每组分设不加刺激和 Dribble 刺激组, 收集孵育 72 h 的培养上清, ELISA 法检测上清中 IFN- γ 的含量。

5.2 检测不同刺激方式对免疫后小鼠脾细胞分泌 IFN- γ 的影响 为检测 β -榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗在体外诱导特异性免疫应答中的作用, 以联合免疫后小鼠脾细胞作为效应细胞, 加入不同刺激, 72 h 后收集细胞培养上清, ELISA 检测脾细胞分泌 IFN- γ 的情况。

采用 β -榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗免疫小鼠, 免疫方式同上 D 组, 第 10 天将小鼠处死, 于 75% 乙醇中浸泡 5 min, 无菌手术取出小鼠的脾脏, 制备单细胞悬液, 用培养液重悬, 调整至合适浓度, 加入不同刺激。

具体分组如下: 培养液组(A 组); DRibble 刺激组(B 组); DC 刺激组(C 组); DC/DRibble 疫苗刺激组(D 组)。将各组刺激与免疫后小鼠脾细胞共同培养于 24 孔板中, 每孔脾细胞浓度为 2×10^6 /mL, B 组 Dribble 5 μ g/孔, C 组 DC 浓度为 2×10^5 /mL, D 组 DC/DRibble 疫苗浓度为 2×10^5 /mL, 各组分设不同浓度的 β -榄香烯 0、10 (μ g/mL) 加以刺激, 终体积 500 μ L/孔, 收集孵育 72 h 的培养上清, ELISA 法检测上清中 IFN- γ 的含量。

5.3 β -榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗对小鼠 BNL 细胞皮下移植瘤的抑制作用 为探讨 β -榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗对小鼠 BNL 细胞皮下移植瘤的抑制作用, 首先小鼠腹股沟皮下注射 BNL 细胞, 建立皮下肿瘤, 肉眼可见米粒大小肿块时分组采取不同的治疗方式, 观察各组小鼠皮下肿瘤的生长情况, 用游标卡尺测量大小并记录。

取 Balb/c 肝癌模型小鼠癌细胞悬液, 调整浓度至 2×10^7 /mL, 取 0.1 mL 瘤液接种于小鼠腹股沟皮下, 观察小鼠成瘤情况, 肉眼可见米粒大小肿块时, 取荷瘤小鼠 20 只随机分为: A: PBS 对照组; B: β -榄香烯组; C: DC/DRibble 疫苗组; D: β -榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗组; DC/DRibble 疫苗治疗方式同上, β

榄香烯连续腹腔注射 7 天,剂量 50 mg/kg,观察各组小鼠的肿瘤大小及生存期,每 2~3 天测 1 次肿瘤长径 a 及横径 b ,按 $A = a \times b$ 求得瘤表面积,当 $A \geq 150 \text{ mm}^2$ 时,小鼠被认为死亡。观察后期,将小鼠脱颈处死,剥取肿瘤组织固定于 10% 福尔马林中,常规取材,脱水,石蜡包埋,切片经 HE 染色,光学显微镜观察肿瘤组织病理形态学表现。

6 统计学方法 使用 GraphPad Prism 5 软件生成图表,组间数据比较采用 SPSS 15.0,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

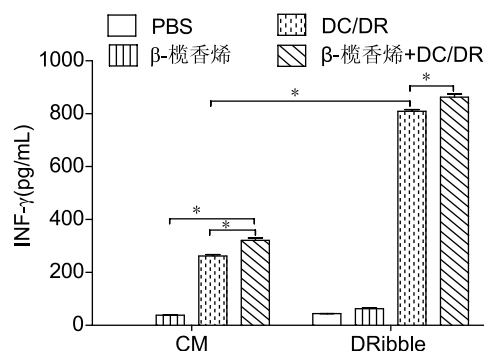
1 DC 含量鉴定 获取小鼠脾脏细胞,发现注射质粒小鼠的脾脏明显大于正常小鼠,其脾细胞总数达 $250 \sim 400 \times 10^6$ 个细胞/脾脏,显著多于正常小鼠 ($60 \sim 80 \times 10^6$ 个细胞/脾脏)。获得脾细胞中 $\text{CD11c}^+ \text{CD11b}^+$ 细胞与 $\text{CD11c}^+ \text{CD11b}^-$ 细胞的比例达 14.5% 和 5.1%,说明已成功获得包含大量 DC 的脾细胞悬液。

2 小鼠肝癌皮下移植瘤模型制备及 Dribble 总蛋白测定 将经体外培养传代的肝癌 BNL 细胞通过皮下注射接种于小鼠的右侧腹股沟下,3、4 天以后,观察到有皮下瘤体长出,约 7~12 天肿瘤直径达到 1 cm 左右。将肿瘤剥离取出,研磨,移入 500 mL 细胞培养瓶中培养,细胞贴壁生长,生长状态良好。以小鼠肝癌细胞 BNL 为靶细胞,通过加入蛋白酶体抑制剂、自噬诱导剂、溶酶体酸化抑制剂等,阻断短寿蛋白的降解,促进自噬小体的生成,成功提取自噬小体 (DRibble),Bradford 法定量检测 DRibble 总蛋白水平为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

3 不同免疫方式对小鼠脾细胞分泌 $\text{IFN-}\gamma$ 的影响 (图 1) 不加 Dribble 刺激时,其他 3 组与 PBS 组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), β -榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗组优于单独 DC/DRibble 疫苗和单独 β -榄香烯组 ($P < 0.01$);单独 DC/DRibble 疫苗优于单独 β -榄香烯组 ($P < 0.01$)。加入 DRibble 刺激后,各组分泌 $\text{IFN-}\gamma$ 均明显增高,整体趋势同前, β -榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗组优于单独 DC/DRibble 疫苗和单独 β -榄香烯组 ($P < 0.01$)。

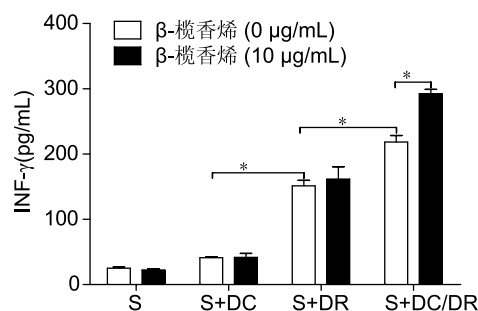
4 不同刺激对免疫后小鼠脾细胞分泌 $\text{IFN-}\gamma$ 的影响 (图 2) DC/DRibble 疫苗组、Dribble 组均能刺激免疫后小鼠脾细胞分泌大量 $\text{IFN-}\gamma$,DC/DRibble 疫苗组 β -榄香烯浓度分别为 0、10 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 时, $\text{IFN-}\gamma$ 分

泌量分别为 (218.40 ± 10.02)、(292.7 ± 6.34) pg/mL ,明显高于其他组 ($P < 0.01$),其中加入 β -榄香烯组高于不加组 ($P < 0.01$)。Dribble 组 β -榄香烯浓度分别为 0、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, $\text{IFN-}\gamma$ 分泌量分别为 (151.50 ± 8.20)、(161.70 ± 18.70) pg/mL ,与单独脾细胞组、DC 组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$);单独脾细胞组、DC 组均可检测到少量 $\text{IFN-}\gamma$ 的分泌。



注: * $P < 0.01$

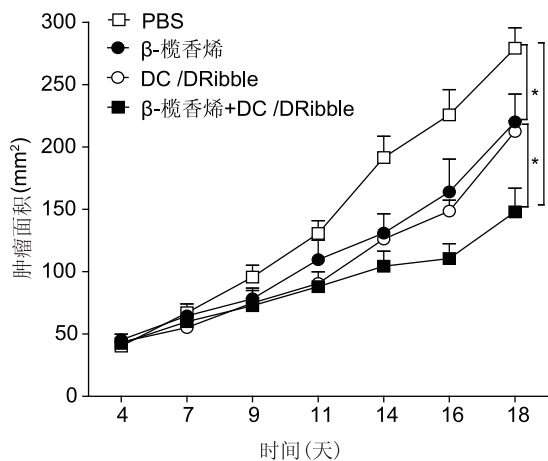
图 1 不同免疫方式免疫后小鼠脾细胞分泌 IFN 水平比较



注: * $P < 0.01$

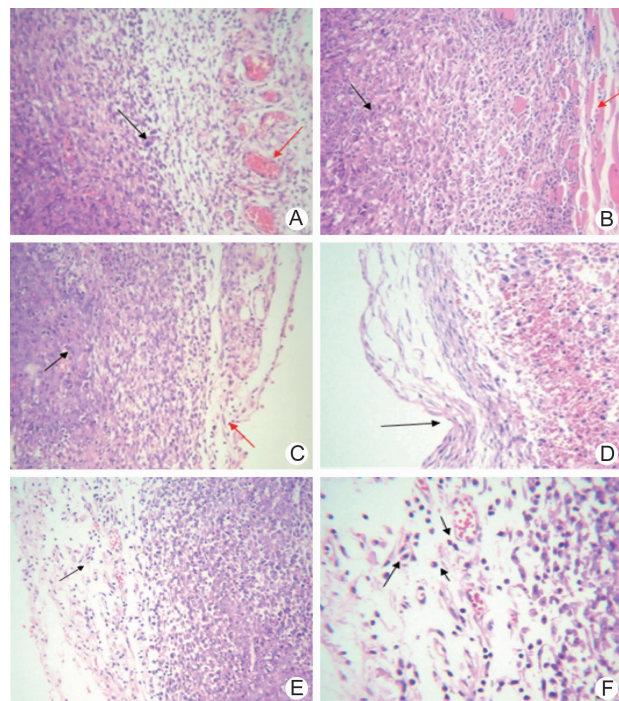
图 2 不同刺激对免疫后小鼠脾细胞分泌 $\text{IFN-}\gamma$ 的影响

5 β -榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗对小鼠 BNL 细胞皮下移植瘤的抑制作用 (图 3、4) 各组在治疗后肿瘤均有不同程度的生长,D 组生长速度明显减慢,B、C 组肿瘤生长缓慢,而 A 组肿瘤呈浸润性快速生长。D 组与 A 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$);D 组分别与 B、C 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);B 组及 C 组分别与 A 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);B 组与 C 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。可见 β -榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗组更能有效抑制肿瘤的生长,同时荷瘤鼠生存周期延长,与 PBS 组比较有明显差异 ($P < 0.01$),与 β -榄香烯组及 DC/DRibble 疫苗组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但 β -榄香烯组与 DC/DRibble 疫苗组相似,对荷瘤小鼠生存期的影响比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 荷瘤小鼠皮下肿瘤生长情况



注: A 为 PBS 组(100×); B 为 β-榄香烯组(100×); C 为 DC/DRibble 疫苗组(100×); D 为联合组(100×); E 为联合组(100×); F 为联合组(200×)

图5 各组小鼠取肿瘤组织病理学结果 (HE)

细胞从 S 期进入 G₂/M 期^[7],降低肿瘤细胞的分裂增殖能力,并诱导其凋亡,吴伟忠等^[8]还证明 β-榄香烯等处理的 H22 细胞具有较强免疫原性,能激发机体产生特异性抗肿瘤免疫。

DC 是目前已知功能最强的抗原递呈细胞,它可以提取,加工可溶性抗原活细胞抗原并向 T 淋巴细胞递呈,参与 T 细胞亚群的分化及固有免疫应答。故以 DC 为载体的肿瘤疫苗目前已成为肿瘤生物治疗的研究热点^[9],而自噬小体(Dribble)作为一种新型抗原交叉递呈的载体,更易于被 DC 摄取及交叉递呈^[1]。因此本实验通过观察 β-榄香烯联合 DC/DRibble 疫苗对小鼠肝癌的治疗作用,以探讨 β-榄香烯抗肿瘤的免疫机制。

小鼠 DC 以 CD11c 为鉴别标志,分为髓系 DC、淋系 DC 以及浆系 DC 等亚类^[5],主要根据是否表达 CD11b 以及 B220 区分,本实验用流式细胞术检测诱导后脾脏细胞中 DC 的含量,发现获得脾细胞中 CD11c⁺在 20%左右,说明已成功获得包含大量 DC 的脾细胞悬液,为制备 DC 疫苗提供基础。

体外刺激脾细胞产生 IFN-γ 的原理是脾细胞中含有的 pAPC 摄取抗原,然后以 MHC I 分子或 MHC II 分子提呈抗原肽,分别再活化效应 CD8 或 CD4 细胞

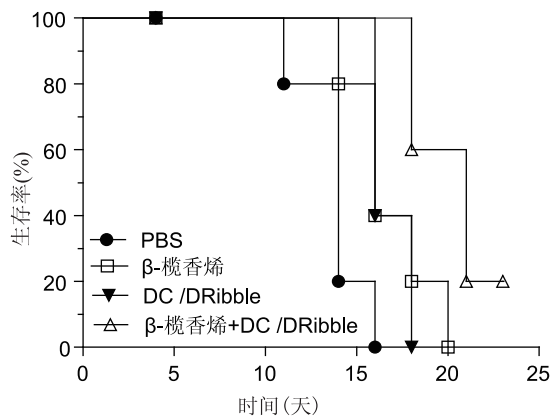


图4 荷瘤小鼠生存周期

6 各组小鼠瘤组织病理形态学观察(图5) A 图黑色箭头处可见肿瘤细胞为多边形和卵圆形,大小、形态不一,核大,深染,核仁明显,核分裂相易见,周围可见疏松结缔组织,未见明显炎细胞浸润,红色箭头处可见大量血管,血供丰富; B 图和 C 图黑色箭头处可见肿瘤细胞形态同 PBS 组,红色箭头周围可见疏松结缔组织包绕,结缔组织内可见少量炎细胞; D 图中黑色箭头处可见周围结缔组织包裹紧密完整, E 图黑色箭头处可见大量炎性细胞浸润,炎细胞类型有中性粒细胞,单核巨噬细胞和淋巴细胞。

讨 论

β-榄香烯是从姜科植物莪术中提取的有效抗癌成分,是国家二类非细胞毒性抗肿瘤新药,实验研究表明 β-榄香烯对肿瘤细胞的 DNA、RNA 合成均有抑制作用,尤其以 RNA 减少更为显著^[6],能降低肿瘤细胞的有丝分裂,并对肿瘤细胞生长产生抑制作用,阻滞肿瘤

并诱导产生 IFN- γ 。本实验中首先分别采取不同方式免疫小鼠,发现 β -榄香烯组,DC/Dribble 疫苗组, β -榄香烯联合 DC/Dribble 疫苗组均能诱导体内免疫应答,分泌 IFN- γ ,并且联合组产生 IFN- γ 的能力明显强于其他组,加入 Dribble 刺激后分泌更高水平的 IFN- γ 。为了进一步验证 β -榄香烯联合 DC/Dribble 疫苗诱导免疫应答,分别以不同刺激方式刺激免疫后小鼠脾细胞,发现 β -榄香烯联合 DC/Dribble 疫苗刺激小鼠脾细胞产生 IFN- γ 的能力明显强于其他组。

β -榄香烯通过与 DC/Dribble 疫苗联合应用,激发机体免疫应答,本研究发现联合组肿瘤生长速度受到显著抑制,与 PBS 对照组比较差异有统计学意义。肿瘤组织病理切片 PBS 对照组可见浸润性生长,血供丰富,而联合组周围结缔组织包裹紧密完整,并有大量炎症细胞浸润。

通过以上实验发现 β -榄香烯联合 DC/Dribble 疫苗激活体内外免疫应答的能力优于单独 DC/Dribble 疫苗,并且明显优于 β -榄香烯联合 Dribble 或者 DC,分析 β -榄香烯发挥抗肿瘤免疫效应基础可能与增强 DC 抗原递呈功能有关,而绝大多数恶性肿瘤进行性生长免疫逃脱的机制正是因为肿瘤抗原不能有效地递呈给 T 细胞产生特异性免疫应答造成的,这可能是 β -榄香烯发挥抗肿瘤免疫的机制之一,但是本实验中 DC 疫苗采用脾细胞悬液,并未做 DC 细胞的进一步分离和纯化,同时效应细胞也未分离,进一步实验可将效应细胞进行磁珠分选,分选出 T 细胞、B 细胞,以深入探讨 β -榄香烯增强 DC 抗原递呈功能的分子机制,此项工作也有待进一步开展。

参 考 文 献

- [1] Li Y, Wang LX, Yang G, et al. Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(17): 6889-6895.
- [2] 邹丽娟,王丽,卢步峰,等. 不同剂型 β -榄香烯类药物抗癌疗效及其机制的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2001, 28(5): 344-246.
- [3] 林琳,沈洪,王立新,等. 黄芩甲苷、 β -榄香烯对小鼠树突状细胞免疫功能的影响[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2011, 30(2): 294-297.
- [4] 苏舒,薛萌,曹萌,等. 联合输注 Flt3-L 和 GM-CSF 表达质粒体内诱导小鼠 DC 的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(6): 515-517.
- [5] Masten BJ, Olson GK, Kusewitt DF, et al. Flt3 ligand preferentially increases the number of functionally active myeloid dendritic cells in the lungs of mice [J]. *Immunology*, 2004, 172(7): 4077-4083.
- [6] 秦叔逵,钱军,杨爱珍,等. 榄香烯乳抗肺癌细胞的实验研究[J]. *肿瘤防治研究*, 1996, 23(4): 251-255.
- [7] Wang G, Li X, Huang F, et al. Antitumor effect of β -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(7-8): 881-893.
- [8] 吴伟忠,刘康达,汤晓雷,等. β -榄香烯诱导的抗肿瘤免疫保护作用机理初探[J]. *中华肿瘤杂志*, 1999, 21(6): 405-408.
- [9] Sun K, Wang L, Zhang Y. Dendritic cell as therapeutic vaccines against tumors and its role in therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Cellular Molecular Immunol*, 2006, 3(3): 197-203.

(收稿:2012-01-08 修回:2012-10-08)

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅