

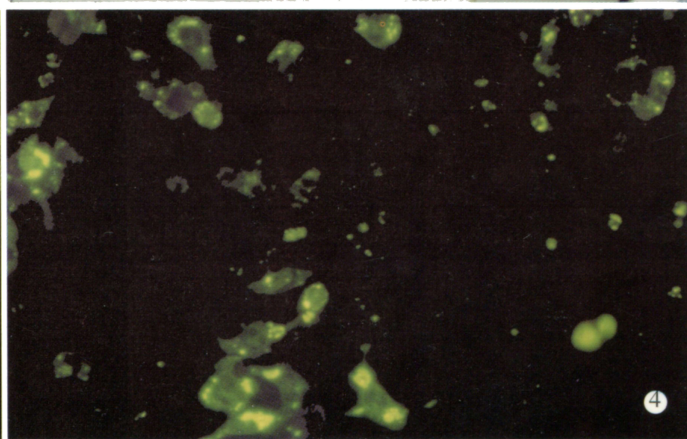
世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 4 月 15 日 第 11 卷 第 4 期

(Volume 11 Number 4)



4/2003

ISSN 1009-3079

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生



World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®, Clinical Medicine, Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

目次

2003 年 4 月 15 日 第 11 卷 第 4 期 (总第 108 期)

述评

373 新基因结构与功能研究的策略 成军

病毒性肝炎

- 378 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析 成军,李克,陆荫英,王琳,刘妍
- 385 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,陈天艳,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟
- 389 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体 钟彦伟,成军,张忠东,孙敏,李强,李克,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅
- 394 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析 刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军
- 399 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因 牟劲松,刘妍,王刚,成军,段惠娟,李克,陆荫英,王琳,王惠芬

肝 癌

- 404 单克隆抗体 3A5- 复方中药安迪偶联物的肝癌导向治疗 梁军,孙纪元,谢艳华,栗燕,闫露,王四旺
- 408 树突状细胞内外对肝癌细胞的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英,吕同德
- 411 肝癌组织中 survivin 蛋白表达的意义 陈涛,贾玉容,田伏洲,蔡忠红,李广阔
- 415 热休克蛋白 70 与 IL-2 对小鼠肝癌移植模型的治疗比较 傅庆国,沈晓东,孟凡东,郭仁宣
- 419 肝癌 DC 疫苗活化的 CTL 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英

基 础 研 究

- 422 HBeAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆 陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞
- 426 酵母双杂交技术筛选 HBeAg 肝细胞结合蛋白基因 陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞
- 430 大鼠肝卵圆细胞的生物学特征 陈耀凯,王宇明,李俊刚,郎松
- 434 肝硬变大鼠肝部分切除术后残肝 TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s mRNA 的变化 陈平,李昆,董家鸿,韩本立
- 438 细菌内同源重组法构建 HBV S 区和 C 区基因非复制型腺病毒载体及其体外表达 黄呈辉,欧阳玲,马会慧,汤正好,李刚,姚集鲁
- 442 大鼠肠巨噬细胞 TNF α 表达及复方大承气汤的影响 陈海龙,王辉,李文利,范琦
- 446 家兔回肠淋巴管铸型的扫描电镜研究 滕诚毅,王晓平,魏双艳,王广友,汤凤彩

焦 点 论 坛

- 450 酵母单杂交技术的原理及应用 马守东,洪源,成军
- 451 酵母双杂交系统的原理及应用 陈天艳,成军,张树林
- 456 抑制性消减杂交技术原理及应用 杨倩,成军,刘妍,王建军,张树林
- 459 噬菌体展示技术的原理及应用 张忠东,成军,张树林
- 461 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用 刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英
- 464 丙型肝炎病毒与 JAK-STAT 信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 466 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 469 肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 472 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
- 474 生物信息学技术与新基因的研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳

研 究 快 报

- 478 中药复方肠安泰对肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜固有层 B 细胞及 IL-12 的影响 王文萍,王垂杰,姜良铎,饭乡正明
- 481 细胞外信号调节激酶在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系 褚传莲,李延青,张燕,李文婕,赵宪邨

研究快报	483 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究 李保森,游绍莉,赵志海,辛绍杰,赵景民,王松山 486 鼠肝移植对胃黏膜损伤的实验研究 褚延魁,马庆久,鲁建国,刘维,何显力,杜锡林,乔庆,王胜智
临床经验	488 重叠丙型肝炎病毒感染在慢性乙型肝炎患者肝脏病变中的作用 商庆华,于建国,徐传镇,肖德明,尹燕明,陈崇兴,张光曙 491 正常人胃左静脉的声象图及血流动力学特征 夏建国,董胜翔,李凤华 494 手术与非手术治疗重症急性胰腺炎 120 例 金世龙,侯庆福,顾红光,王仁云,廖维健
消息	388 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 393 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 398 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 403 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次 407 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版 414 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册 418 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 425 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 433 WJG 搭建我国消化化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 437 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊 477 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊
征文通知	429 第五届上海国际肝癌肝炎会议征文启事 480 全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会征文通知
电子版	2003 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm 2002 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm 2001 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm 2003 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm 2002 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm 2001 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm
读者来信	493
封面故事	377 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所、基因治疗研究中心

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(月刊)
创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-04-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀 张金哲
黄象谦 张学庸
黄志强 赵东海
黎介寿 周殿元
刘耕陶 社长总编辑 马连生
裘法祖 中文编辑 潘伯荣
汤钊猷 王瑾晖
王宝恩 英文编辑 任师颜
危北海 排版 李少华
吴孟超 校对 李天华
吴咸中

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail: wcjd@wjgnet.com
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话 (010)85381892
传真 (010)85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话: (010)85381892
传真: (010)85381893
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录
美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志()》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明
本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证
CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期 24.00 元 全年 288.00 元 1401004000050

COMMENTARY

Strategy in study the structure and function of novel gene

Cheng J 373

VIRAL HEPATITIS

Bioinformatics analysis of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene and protein

Cheng J, Li K, Lu YY, Wang L, Liu Y 378

Screening of gene encoding of hepatic proteins interacting with Hcbp6 via yeast two hybridization

Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Zhang J, Chen TY, Hong Y, Liu Y, Wang G, Zhong YW 385

Screen for human single chain variable region in antibody against human hepatitis C virus core protein binding protein 6

Zhong YW, Cheng J, Zhang ZD, Sun M, Li Q, Li K, Wang L, Li L, Zhang LX, Chen JM 389

Gene expression profile of HepG2 cell transfected with hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene

Liu Y, Cheng J, Li K, Yang Q, Lu YY, Wang L, Wang JJ 394

Cloning of genes transactivated by NS3 protein of HCV with suppressive and subtractive hybridization

Mu JS, Liu Y, Wang G, Cheng J, Duan HJ, Li K, Lu YY, Wang L, Wang HF 399

LIVER CANCER

Effect of monoclonal antibody 3A5 coupled with Chinese medicine compound Andi in targeted treatment of hepatocellular carcinoma

Liang J, Sun JY, Xie YH, Li Y, Yan L, Wang SW 404

Inhibition of dendritic cells against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*

Guo JW, Qin LW, Cai MY, Lu TD 408

Expression of survivin protein in hepatocellular carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features and prognosis.

Chen T, Jia YR, Tian FZ, Cai ZH, Li GK 411

Comparison of therapeutic efficacy between tumor-derived heat shock protein 70 and interleukine-2

Fu QG, Shen XD, Meng FD, Guo RX 415

Cytotoxic lymphocytes primed by DC based hepatocellular carcinoma vaccine against growth of carcinoma xenograft on nude mice

Guo JW, Qin LW, Cai MY 419

BASIC RESEARCH

Screening and cloning of gene encoding HBcAg interacting protein in hepatocytes

Lu YY, Wang L, Li K, Cheng J, Liu Y, Zhang LX 422

Screening of HBcAg interacting proteins in hepatocytes with yeast-two hybrid technique

Lu YY, Wang L, Li K, Liu Y, Cheng J, Zhang LX 426

Biological characteristics of rat hepatic oval cells

Chen YK, Wang YM, Li JG, Lang S 430

Changes of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA after partial hepatectomy in rat liver

Chen P, Li K, Dong JH, Han BL 434

Construction of replication-deficient recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and its expression *in vitro*

Huang CH, Ou-Yang L, Ma HH, Tang ZH, Li G, Yao JL 438

TNF α expression and effects of Dachengqi Decoction compound in gut macrophages

Chen HL, Wang H, Li WL, Fan Q 442

Lymphatic corrosion casts in rabbit ileum: scanning electronmicroscopic studies

Teng CY, Wang XP, Wei SY, Wang GY, Tang FC 446

FOCUSED FORUM

Principle and applications of yeast single hybridization

Ma SD, Hong Y, Cheng J 450

Principle of yeast two hybridization and its applications

Chen TY, Cheng J, Zhang SL 451

Principle and applications of suppressive and subtractive hybridization technique

Yang Q, Cheng J, Liu Y, Wang JJ, Wang SL 456

Principle of phage display technique and its application

Zhang ZD, Cheng J, Zhong YW, Zhang SL 459

Gene chip technique in the pathogenesis of viral hepatitis

Liu Y, Cheng J, Wang JJ, Yang Q, Lu YY 461

Hepatitis C virus and signal transduction system of JAK-STAT

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 464

Hepatitis C virus and signal transduction system of MAPK

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 466

Tumor inhibitive factor p21/waf1 and regulation of replication and expression of hepatitis virus

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 469

Effect of Hepatitis B virus on cellular signal transduction

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 472

Study on Bioinformatics and new gene

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 474

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi \$

World Chinese Journal of Digestology
Monthly \$ \$

Founded on 15th January, 1993

Renamed on 25th January, 1998

Publication date 15th April, 2003

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/R

Edited by Editorial Board of World Chinese Journal of Digestology
P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

77, Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Overseas Distributor China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China **Code No.** M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

Copyright © 2003 by The WJG Press

Indexed/

Abstracted by

Chemical Abstracts

EMBASE/

Excerpta Medica

Abstract Journal

树突状细胞体内外对肝癌细胞的抑制作用

郭建巍,秦力维,蔡美英,吕同德

郭建巍,吕同德,兰州军区兰州总医院实验科 甘肃省兰州市 730050
秦力维,兰州军区兰州总医院眼科 甘肃省兰州市 730050
蔡美英,四川大学华西基础医学院免疫教研室 四川省成都市 610041
郭建巍,男,1965-08-03生,甘肃省临夏市人,汉族.医学博士,主治医师.主要从事肿瘤免疫学方面的研究.
项目负责人:郭建巍,730050,甘肃省兰州军区兰州总医院实验科. jwkuo@sohu.com
电话:0931-8975413
收稿日期:2002-11-19 接受日期:2002-11-28

Inhibition of dendritic cells against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*

Jian-Wei Guo, Li-Wei Qin, Mei-Ying Cai, Tong-De Lu

Jian-Wei Guo, Tong-De Lu, Department of Laboratory, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province China
Li-Wei Qin, Department of Ophthalmology, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province China
Mei-Ying Cai, Department of immunology, School of Basic Medical Sciences, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, Sichuan Province China
Correspondence to: Dr. Jian-Wei Guo, Department of Laboratory, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province China. jwkuo@sohu.com
Received: 2002-11-19 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To estimate the growth inhibition of hepatocellular carcinoma (HCC) cells *in vitro* and *in vivo* by human dendritic cells (DCs).

METHODS: High purity DCs were obtained from cultured plastic-adherent monocytes isolated from healthy human peripheral blood with GM-CSF and IL-4. The levels of IL-12 and TNF were analyzed in liquids of cultured medium by ELISA and MTT reduction assay respectively. Fas-L expression on DC was also detected by flow cytometry. Growth inhibition test of DC against HCC cell lines was also performed. Transplanted human HCC on nude mouse was treated with DCs.

RESULTS: Inhibitory effects on the growth of human HCC lines and other cancer cells were observed by DCs *in vitro*. DCs prevented the HCC xenograft from growth on nude mouse with a prophylaxis rate of 97 %.

CONCLUSION: DCs not only inhibit the growth of human HCC *in vitro* but also prevent the growth of HC xenograft on nude mouse *in vivo*.

Guo JW, Qin LW, Cai MY, Lu TD. Inhibition of dendritic cells against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003; 11(4):408-410

摘要

目的: 研究树突状细胞对肝癌等肿瘤细胞的直接作用。

方法: 用 rhGM-CSF 和 rhIL-4 从健康人外周血诱导树突状细胞, 用 ELISA 和 MTT 法分别检测 DC 培养上清液中 IL-12 和 TNF 水平, 用 MTT 法检测 DC 对肝癌细胞 SMMC-7 721、QGY-7 703、HEPG-2、Alexander, 胃癌细胞 SGC-7 901, 慢性髓原性白血病细胞 K562、Burkitt's 淋巴瘤细胞 Raji 和正常人二倍体细胞的抑制作用, 同时用流式细胞术检测 DC 表面 FasL 的表达, 最后用 DC 进行人肝癌裸鼠皮下抑制瘤的抑制试验。

结果: 诱导 7 d 的 DC 对 4 种肝癌细胞和胃癌细胞均有不同程度抑制作用, 随着效靶比的增加, DC 对肝癌细胞和胃癌细胞的抑制作用逐渐增加; DC 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 其抑制率为 97 %。

结论: DC 进入机体后也可以非特异性抑制方式发挥抑癌作用, 本研究丰富和拓展了肝癌 DC 疫苗的内容, 为今后肝癌 DC 疫苗的研究奠定了基础。

郭建巍, 秦力维, 蔡美英, 吕同德. 树突状细胞体内外对肝癌细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003; 11(4): 408-410
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/408.htm>

0 引言

树突状细胞 (DC) 是体内功能最强的抗原提呈细胞 (APC), 也是天然免疫和获得性免疫的重要调节剂^[1,2]. 表面具有高密度的抗原呈递分子 (MHC- 和 MHC-) 和共刺激分子 (CD40, ICAM-1/CD54, ICAM-3/C. D50, IFA-3/CD58, B7-1/CD80, B7-2/CD86) 等, 因而成为功能强大的 APC. DC 激活的 T 细胞免疫在抗肿瘤过程中起着主导作用^[3-8]. 我们研究体外培养的 DC 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的直接预防作用如下。

1 材料和方法

1.1 材料 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF PEPRO TECH); 重组人白介素-4 (rhIL-4 PEPRO TECH); 鼠抗人 DC 单克隆抗体^[9] (镇江医学院许化溪教授馈赠); 兔抗鼠 FITC 标记二抗 (华美生物工程公司); RPMI 1640 (Gibco 公司); 淋巴细胞分离液 (上海试剂二厂); 生物素化羊抗鼠 IgG, HRP 标记链亲和素 (streptavidin), 北京中山生物技术有限公司; 内源性生物素封闭试剂 (avidin biotin blocking system, 武汉博士德生物有限公司); 鼠抗人肝癌单克隆抗体 mcAb18 (由本研究室刘小波博士馈赠); 新生小牛血清 (杭州四季青生物工程材料研究所); BCG HSP

70 和肝癌细胞可溶性抗原(本实验室自己制备); 4 周龄 Balb/c 裸鼠, 雌雄各半(由华西医科大学实验动物中心提供); 正常人外周血源于 18-25 岁健康志愿者. SPF 级动物实验室(华西医科大学实验动物中心提供); SPSS10.0 for Windows 统计软件.

1.2 方法 收集 6-9 d DC^[10] 培养上清, -20 °C 冻存备用. 待样品收集齐后, 统一进行检测. 在酶标板孔中分别加入样品或不同浓度的 IL-12 标准品(500 - 15.625 ng/L) 100 μ L, 室温(20-25 °C)反应 120 min, PBS 洗板 4 次后分别加入检测剂工作液, 每孔 100 μ L, 室温孵育 60 min, PBS 洗板 4 次, 加入底物, 室温避光显色 10-30 min, 2 mol/L H₂SO₄ 终止后 450 nm 测光密度值(A 值), 结果用 3 孔均值表示. 调整对数生长期 L929 细胞浓度为 2×10^5 个/L, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μ L, 37 °C 培养 24 h 后弃上清, 分别加入待测标本及 TNF 标准品(250 KU/L、125 KU/L、62.5 KU/L、31.25 KU/L、15.6 KU/L、7.8 KU/L、0 KU/L), 每份标本 3 复孔. 最后加入放线菌素 D(100 mg/L)10 μ L, 同时设细胞对照和空白对照. 37 °C 含 50 mL/L CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 离心, 弃上清, 每孔加入 MTT(5 g/L) 10 μ L, 继续孵育 4 h. 离心, 弃上清, 加入 DMSO 100 μ L, 振荡后 570 nm 比色测 A 值. 按下式计算各孔细胞死亡百分率, 间接反映 TNF 生物学活性. 并绘制 TNF 标准曲线. 细胞死亡率 % = $[1 - (\text{实验组 A 值} - \text{空白组 A 值}) / (\text{对照组 A 值} - \text{空白组 A 值})] \times 100\%$. 常规法诱导 DC, 分为 2 组, 一组于诱导 7 d 加入 LPS 10 mg/L, 一组不加, 37 °C 含 50 mL/L CO₂ 的培养箱中培养 24 h, PBS 洗涤 2 次, 用 40 g/L 多聚甲醛 4 °C 固定 30 min, PBS 洗涤 2 次, 加入兔抗人 Fas-L 多克隆抗体 100 μ L, 4 °C 120 min, PBS 洗涤 2 次, 加入羊抗兔 -FITC 二抗 100 μ L, 以正常人淋巴细胞作阴性对照, 4 °C 120 min, PBS 洗涤 2 次, 流式细胞术检测细胞表面 Fas-L 表达.

1.2.1 DC 对肝癌细胞的生长抑制试验^[11] 收集诱导 7 d 的 DC, 分为 2 组, 一组直接加入 96 孔细胞培养板中, 另一组加 LPS 10 g/L 后再加入 96 孔细胞培养板, 每一组 DC 细胞浓度分别为 2×10^5 /孔和 1×10^5 /孔(效靶比分别为 2/1, 1/1), 靶细胞分别为肝癌细胞 SMMC-7 721, QGY-7 703, HEPG-2, Alexander, 胃癌细胞 SGC-7 901, 慢性髓原性白血病细胞 K562, Burkitt's 淋巴瘤细胞 Raji 和正常人二倍体细胞, 靶细胞浓度为 1×10^5 /孔, 同时做每种靶细胞和效应细胞对照各 3 复孔. 效应细胞与靶细胞混合培养 16 h, 加入 5 g/L MTT 10 μ L 继续培养 8 h. 离心培养板(2 000 r/min, 10 min), 弃去上清, 每孔加 DMSO 100 μ L, 于 570 nm 处测定 A 值. 按抑制率 = $[1 - (\text{实验孔 A 值} - \text{效应细胞对照孔 A 均值}) / \text{靶细胞对照孔 A 均值}] \times 100\%$ 计算实验结果; 用肝癌细胞 Alexander 和胃癌细胞 SGC-7 901 分别作靶细胞, 以效靶比 10/1, 5/1, 2.5/1 重复以上实验, 并计算抑制率.

1.2.2 DC 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤 收集诱导 7 d 的 DC, PBS 洗 3 次后, 调整细胞浓度为 1×10^6 /L, 于裸鼠左侧背部皮下注射, 每只 1 mL, 共 6 只; 另取 6 只裸鼠, 每只背部皮下注射 1 mL 生理盐水作阴性对照. 同时于裸鼠右侧腋窝皮下接种人肝癌 SMMC-7 721 细胞 5×10^6 /只, 每只液体总量为 0.2 mL, 每 3 d 观察移植肿瘤生长情况, 共观察 30 d. 在无菌条件下取裸鼠移植瘤称重, 按公式: 抑制率 = $[(\text{对照组平均瘤质量} - \text{实验组平均质量}) / \text{对照组平均瘤质量}] \times 100\%$ 计算肿瘤抑制率.

2 结果

DC 培养 7d 上清中 IL-12 水平为最高(图 1). 正常人 DC 培养液中基本上无 TNF 表达. 效靶比为 1:1 时, 诱导 7 d 的 DC 对 4 种肝癌细胞和胃癌细胞均有不同程度抑制作用(抑制率 22.8-49.2%), 但不抑制正常人二倍体细胞生长. 加入 LPS 后, DC 对 4 种肝癌细胞和胃癌细胞的抑制减弱(图 2). 随着效靶比增加为 2.5:1、5:1 和 10:1 时, 诱导 7 d 的 DC 对肝癌细胞和胃癌细胞的抑制作用逐渐增加(图 3).

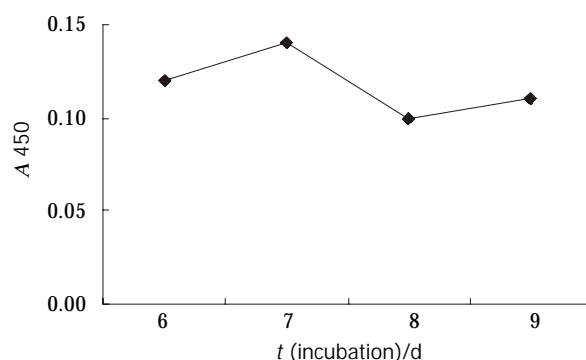


图 1 不同培养时间 DC 分泌 IL-12 的水平.

经 LPS 作用后, DC 表面 Fas-L 的表达略低于诱导 7 d 未处理 DC, 平均荧光强度分别为 3.29 和 6.04 ($P < 0.05$). DC 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 对肝癌细胞的抑制率为 97%, 而 IL-2 条件下培养的淋巴细胞(即 LAK 细胞)对肝癌细胞的抑制率仅为 70%, 说明 DC 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤有效 ($P < 0.05$).

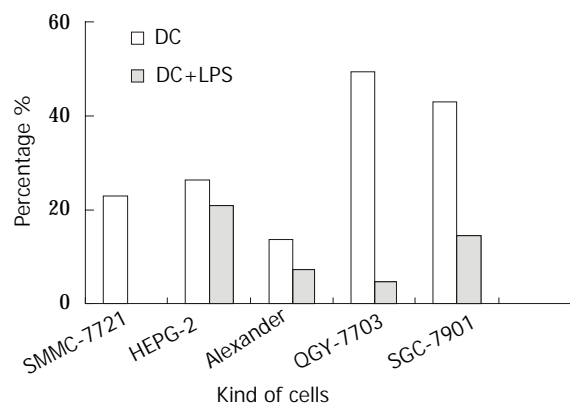


图 2 DC 对肝癌细胞的抑制作用.

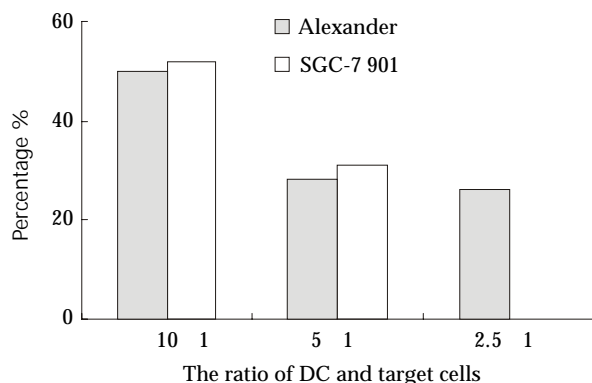


图3 DC对肿瘤细胞的抑制作用。

3 讨论

DC最初以其独特的形态而得名。正常情况下，体内绝大多数DC处于非成熟(immature)状态，主要位于肠黏膜等易于外来抗原接触的部位，仅表达低水平的共刺激分子和黏附分子，不能激活T细胞。能有效捕捉抗原，具极强的抗原加工和处理能力。成熟DC则主要迁移(migration)至外周淋巴器官，其捕获抗原的能力下降，但可激发有抗原受体的T细胞^[12,13]。DC的两大功能在时相上分开，这恰与其生物学功能相适应。在T细胞分化过程中可溶性CK的作用已得到确认，研究最彻底的CK为IL-12，它是DC的关键性产物。无论是从IL-12产生能力，还是IL-12产生水平上，DC对Th0来说是Th1和Th2型细胞因子的良好诱生剂。IL-12作用于Th0使之分化为Th1，这在IL-12或STAT4缺陷动物和缺乏IL-12受体的人身上已被证明^[14,15]。IL-12主要通过IL-2协同诱导CTL的分化；刺激活化CD3⁺T细胞(包括CD4⁺和CD8⁺)增生；协同IL-2诱导CD56⁺NK细胞及LAK细胞增生而发挥作用^[16-18]。

在以往的研究中，都比较重视DC对淋巴细胞的活化，以诱导抗原特异性CTL，这也是DC最重要的功能之一。既然非成熟DC能有效捕捉抗原，具极强的抗原加工和处理能力，而成熟与非成熟之间的界限又不是非常明显，那么，外周血单核细胞经细胞因子诱导后分化的DC是否仍保留有这样的功能呢？带着这一有兴趣的问题我们用DC对一系列肿瘤细胞进行了抑制性实验，结果表明：

DC对四种肝癌细胞及其他肿瘤细胞均有不同程度的抑制作用，而经LPS处理后的DC对四种肝癌细胞及其他肿瘤细胞的抑制作用明显减弱，说明DC经LPS诱导使其成熟后其对肿瘤细胞的抑制作用明显减弱。因为非成熟DC主要通过巨胞饮、受体介导的内吞及吞噬三种方式摄取抗原，而成熟DC捕捉抗原能力下降，因此推测DC对四种肝癌细胞及其他肿瘤细胞的抑制作用可能是通过吞噬途径实现的。肝癌组织中Fas抗原检出率分别为31.7%^[19]和52.8%^[20]。我们的研究中，LPS作用前后DC细胞表面FAS-L的表达分别为：6.04%和3.29%。因此，在DC对肝癌细胞的作用中，Fas和Fas

配体途径发挥了一定的作用。至于DC抑制肿瘤细胞的其他因素还有待于以后更深入的研究。本研究中，DC对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的直接抑制率为97%，表明DC疫苗进入机体后可以非特异性抑制和特异性免疫应答两种方式发挥作用，丰富了和扩展了肝癌DC疫苗的内容，为今后肝癌DC疫苗的临床研究及应用奠定了重要基础。

4 参考文献

- Mule JJ. Dendritic cells: at the clinical crossroads. *J Clin Invest* 2000;105:707-708
- Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002;82:97-130
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N. Dendritic cell subsets: the ultimate T cell differentiation decision Makers? *Gut* 1999;45:640-641
- Rommel E, Terracciano L, Noppen C, Zajac P, Heberer M, Spagnoli GC, Padovan E. Modulation of dendritic cell phenotype and mobility by tumor cells in vitro. *Hum Immunol* 2001;62:39-49
- Rawson P, Hermans IF, Huck SP, Roberts JM, Pircher H, Ronchese F. Immunotherapy with dendritic cells and tumor major histocompatibility complex class I -derived peptides requires a high density of antigen on tumor cells. *Cancers Res* 2000;60:4493-4498
- Reinhard G, Marten A, Kiske SM, Feil F, Bieber T, Schmidt-Wolf IG. Generation of dendritic cell-based vaccines for cancer therapy. *Br J Cancer* 2002;86:1529-1533
- Burdin N, Moingeon P. Cancer vaccines based on dendritic cells loaded with tumor-associated antigens. *Cell Biol Toxicol* 2001;17:67-75
- Meidenbauer N, Andreessen R, Mackensen A. Dendritic cells for specific cancer immunotherapy. *Biol Chem* 2001;382:507-520
- 许化溪, 王胜军, 潘志超, 严俊, 臧磊, 马斌, 邵启祥, 李娜, 刘恭植. 人树突状细胞单克隆抗体的制备及其应用. *中华医学杂志* 1999;79:195-396
- 郭建巍, 蔡美英. 人外周血中树突状细胞的诱导和鉴定. *华西医科大学学报* 2002;33:68-71
- Chapoval AI, Tamada K, Chen L. In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells. *Blood* 2000;95:2346-2351
- Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor -dependent long-term cultures. *J Exp Med* 1997;185:317-328
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389-400
- 郭建巍, 蔡美英. Th 细胞的活化与树突状细胞. *国外医学免疫学分册* 2002;25:13-16
- Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999;20:561-567
- Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, Tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:47-64
- Schuhbauer DM, Mitchison NA, Mueller B. Interaction within clusters of dendritic cells and helper T cells during initial Th1/Th2 commitment. *Eur J Immunol* 2000;30:1255-1262
- Toes RE, Schoenberger SP, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. CD40-CD40Ligand interactions and their role in cytotoxic T lymphocyte priming and anti-tumor immunity. *Semin Immunol* 1998;10:443-448
- 张俊峰, 石学涛, 衣龙海, 李胜. Fas/FasL在肝癌免疫逃避中的作用探讨. *山东医药* 2002;42:1-2
- 彭志海, 韩国新, 唐华美. bcl-2和Fas/FasL系统在肝癌细胞凋亡中的作用. *中华实验外科杂志* 2000;17:38-39



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

