

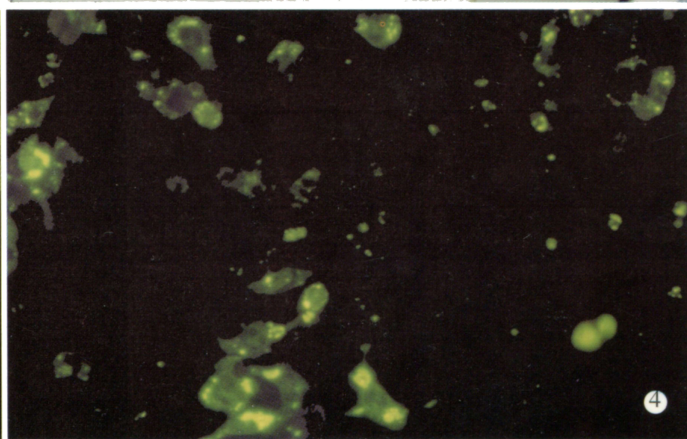
# 世界华人消化杂志®

**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- $\alpha$ 、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 $\alpha$  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 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm</a> 2002 世界华人消化杂志电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm</a> 2001 世界华人消化杂志电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm</a> 2003 World J Gastroenterol 电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm">http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm</a> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm">http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm</a> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm">http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm</a>
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- $\alpha$ , 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 $\alpha$  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

# 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

郭建巍,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,甘肃省兰州市,兰州军区兰州总医院实验科.  
jwkuo@sohu.com  
电话:0931-8975413  
收稿日期:2002-11-12 接受日期:2002-11-28

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

Jian-Wei Guo, Li-Wei Qin, Mei-Ying Cai

Jian-Wei Guo, 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: 2002-11-12 Accepted: 2002-11-28

## Abstract

AIM: To investigate the cytotoxic lymphocyte (CTL) primed by DC based hepatocellular carcinoma (HCC) vaccine against the growth of the carcinoma xenograft on nude mice.

METHODS: High purity of dendritic cells (DCs) were obtained and the immune responses of lymphocytes primed by BCG HSP70 activated DCs were loaded with HCC associated antigens to prepare DC based HCC vaccine. The nude mouse model bearing human HCC xenografts was established and the characteristics of the tumor were identified with immunohistochemical techniques. Transplanted human HCC on nude mouse was treated with freezing and anabiotic HCC specific lymphocytes.

RESULTS: Lymphocytes primed by DCs based HCC vaccine had the specific cytotoxicity against HCC lines. The CTL after freezing and antibiotics could prevent and treat HCC xenograft on nude mice with a preventive rate of 97 %.

CONCLUSION: DCs not only inhibit the growth of human HCC and other cancer cells *in vitro*, but also prevent the growth of HCC xenograft on nude mice *in vivo*.

Guo JW, Qin LW, Cai MY. Cytotoxic lymphocytes primed by DC based hepatocellular carcinoma vaccine against growth of carcinoma xenograft on nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):419-421

## 摘要

目的: 本研究探讨肝癌 DC 疫苗活化的 CTL 对人肝癌裸鼠皮下抑制瘤的抑制作用。

方法: 将负载肝癌相关抗原 DC 经 BCG HSP70 活化后制成肝癌 DC 疫苗, 用此肝癌 DC 疫苗诱导的肝癌特异性淋巴细胞预防和治疗人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 同时观察 DC 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的直接预防作用和冷冻复苏后肝癌特异性淋巴细胞对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的预防和治疗作用。

结果: DC 对肝癌细胞的抑制率为 97 %, 用冷冻复苏后的 CTL 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 对肝癌细胞的平均抑制率为 96 %; 冷冻复苏后的 CTL 治疗人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 对肝癌细胞的抑制率为 98 %。

结论: 本研究结果为肝癌 DC 疫苗的进一步深入研究及今后的临床应用奠定良好的基础。

郭建巍, 秦力维, 蔡美英. 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. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):419-421  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/419.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<sup>[1]</sup>. 我们的前期研究结果表明: 在体外, DC 负载肝癌细胞溶解物<sup>[2]</sup>、hAFP218-226 位 LLNQHACAV HLA-A2 限制性九肽<sup>[3]</sup>和凋亡的肝癌细胞均可诱导出肝癌特异性 CTL, 并特异性杀伤肝癌细胞. 现将进一步探讨体外培养的、负载肝癌相关抗原 DC 诱导的肝癌特异性淋巴细胞预防和治疗人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 及 DC 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的直接预防作用, 并观察冷冻复苏后肝癌特异性淋巴细胞对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的预防和治疗作用如下。

## 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(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); RPMI1640 (Gibco); 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(streptoavidin), 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);四周龄 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 收集诱导7d的DC<sup>[4]</sup>,调整细胞密度为 $5 \times 10^6/L$ ,加入24孔细胞培养板,每孔1 mL,同时每孔加入肝癌可溶性抗原120 g/L, BCG HSP70 10 g/L,于37℃培养4 h,用不完全RPMI1640洗涤3次,将负载肝癌可溶性抗原后的DC与自身淋巴细胞以1:6混合后用含300 KU/L 基因重组IL-2的完全RPMI 1640分瓶培养,分别在培养的第3,5天换液,7 d收集淋巴细胞备用.人肝癌裸鼠皮下移植瘤的普通石蜡切片用Triton-X-100,1 g/L 柠檬酸三钠处理10 min, PBS洗2次各5 min,用7.5 mL/L  $H_2O_2$  阻断内源性过氧化物酶15 min, PBS洗两次各3 min,加1:200稀释的正常羊血清100  $\mu$ L,置湿盒内37℃,30 min,滤纸吸去血清;分别加20 g/L 100  $\mu$ L 鼠抗人肝癌单克隆抗体和PBS(作空白对照),置湿盒内37℃,1 h,取出4℃过夜, PBS洗2次各5 min,滴加1:200稀释的生物素化羊抗鼠 IgG 抗体50  $\mu$ L,置湿盒内37℃,30 min, PBS泡洗2次各5 min,滴加1:200稀释的HRP 标记链亲和素,置湿盒内37℃,30 min, PBS泡洗2次各5 min;加DAB工作液50  $\mu$ L,镜下观察适时终止,自来水充分冲洗,最后苏木精复染、脱色、返蓝、逐级脱水、透明、封片,普通光学显微镜观察.

1.2.1 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 $1 \times 10^6/L$ ,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 $5 \times 10^6$ /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质量,按公式:抑制率=[(对照组平均瘤质量-实验组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量]  $\times$  100 % 计算肿瘤抑制率.

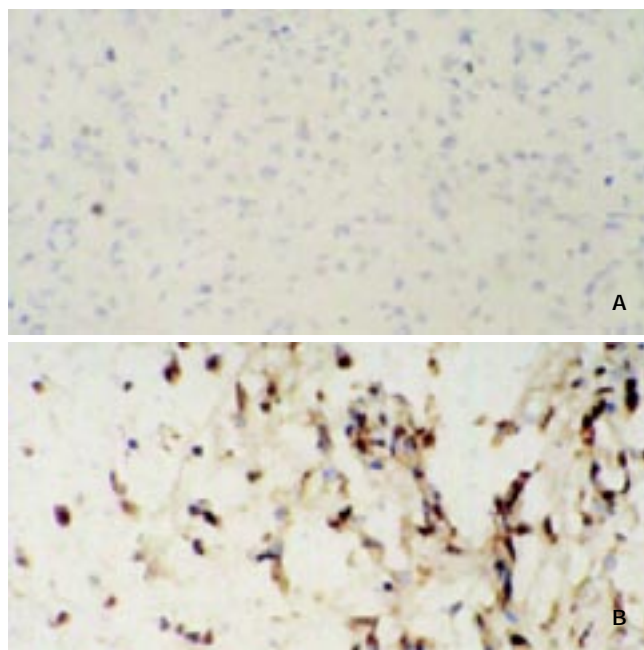
1.2.2 肝癌特异性淋巴细胞预防肝癌裸鼠皮下移植瘤<sup>[5]</sup> 收集肝癌特异性淋巴细胞, PBS洗3次,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/L$ ,于裸鼠左侧背部皮下注射,每只1 mL,共6只;另取6只裸鼠,每只左侧背部皮下注射1 mL 生理盐水作阴性对照.同时于裸鼠右侧腋窝皮下接种 SMMC-7721 细胞 $5 \times 10^6$ /只,每只液体总量为0.2 mL,每3 d观察移植肿瘤生长情况,共观察30 d,取裸鼠移植瘤称质量后按上述公式计算肿瘤抑制率.

1.2.3 冻存和复苏后肝癌特异性淋巴细胞预防和治疗人

肝癌裸鼠皮下移植瘤 收集肝癌特异性淋巴细胞,用不完全RPMI 1640洗涤3次,用1 mL 冻存液(含100 g/L DMSO 的 FCS)调整细胞密度为 $2 \times 10^6/mL$ ,加入冻存管中.置-20℃冰箱4 h后移入液氮气态4 h,最后转入液态,保存30 d.使用时将冻存管迅速取出,放入37℃水浴箱,待完全融化后加入含预热RPMI 1640的离心管中,1500 r/min 离心5 min,用不完全RPMI 1640洗涤3次,苔盼蓝染色检查细胞活力后备用.预防组:收集冻存复苏后肝癌特异性淋巴细胞, PBS洗3次,苔盼蓝染色调整活细胞浓度为 $1 \times 10^6/L$ .取6只裸鼠,于每只左侧背部皮下注射复苏后的肝癌特异性淋巴细胞,每只1 mL;另取6只裸鼠,每只左侧背部皮下注射1 mL 生理盐水作阴性对照.于裸鼠右侧腋窝皮下接种 SMMC-7 721 细胞 $5 \times 10^6$ /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.取裸鼠移植瘤称质量,按1.2.1中的公式计算肿瘤抑制率.治疗组:先于12只裸鼠右侧腋窝皮下接种 SMMC-7 721 细胞 $5 \times 10^6$ /只,每只液体总量0.2 mL,7 d后于6只裸鼠左侧背部皮下分别注射浓度为 $1 \times 10^6/L$ 冻存复苏后肝癌特异性淋巴细胞1 mL;在另6只裸鼠左侧背部皮下注射1 mL 生理盐水作阴性对照.每3 d观察移植肿瘤生长情况,共观察30 d.取裸鼠移植瘤称质量,按1.2.1中的公式计算肿瘤抑制率.

## 2 结果

于裸鼠腋窝皮下接种 $5 \times 10^6$ 只人肝癌细胞 SMMC-7 721 后,6只裸鼠均有肿瘤生长,解剖后平均瘤重大于1 g.免疫细胞组化LSAB法结果 阳性染色呈棕黄色.大多数分裂及非分裂细胞都有着强弱不一阳性着色,阳性染色分布于胞质、核周及胞膜,相应的空白对照均未见阳性染色(图1).



A:negative control B:  
图1 裸鼠人肝癌皮下移植瘤的免疫组织化学特征( $\times 200$ ).

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( $P < 0.05$ ).

肝癌特异性淋巴细胞预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 对肝癌细胞的抑制率均为 96%, IL-2 条件下培养的淋巴细胞(即 LAK 细胞)预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤抑制率仅为 70%, 说明肝癌特异性淋巴细胞预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤有效( $P < 0.05$ ).

用冷冻复苏后的 CTL 预防人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 对肝癌细胞的平均抑制率为 96%; 冷冻复苏后的 CTL 治疗人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 对肝癌细胞的抑制率为 98%, 相同条件下培养的淋巴细胞对人肝癌裸鼠皮下移植瘤抑制率仅为 70%, 说明冷冻复苏后的 CTL 预防和治疗人肝癌裸鼠皮下移植瘤均有效( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

肿瘤生物治疗中存在的一个主要问题, 即大多数人类肿瘤细胞抗原类型仍未得到明确的鉴定, 而已知的肿瘤相关抗原是否真正代表肿瘤排斥抗原缺乏体内实验证据<sup>[6]</sup>. 前期研究表明: 在体外负载肝癌细胞可溶性抗原的 DC 活化的自身淋巴细胞主要为 CD4<sup>+</sup>T 细胞同时还有部分 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 可有效杀伤肝癌细胞; 同时, 活化细胞培养上清和细胞中可分别检测到 Th1 型细胞因子 TNF 和 IEN- $\gamma$  也能抑制肝癌细胞生长<sup>[2]</sup>. 因此, 用 DC 负载已建株的肝癌细胞可溶性抗原诱导肝癌特异性免疫应答意义深远. 用 BCG 预防和治疗膀胱和泌尿道转移癌已有 20 多年的历史, 并显示出良好的效果<sup>[7,8]</sup>. HSP 是 BCG 细胞质的一种重要成分, 存在于 BCG 培养物中, 是一种高度保守的胞内蛋白, 其合成在受到一系列应急刺激后(温度增加、营养缺乏、有毒刺激等)显著增加. 除此之外, 肿瘤细胞转染分枝杆菌 HSP 基因后也可以使宿主免于肿瘤的攻击<sup>[9]</sup>. 鉴于 BCG HSP70 独特的生物学特性, 本研究首次用其活化负肝癌相关抗原后的 DC, 制成肝癌 DC 疫苗, 以更有效激发针对肝癌特异性的免疫应答<sup>[10-16]</sup>.

目前, 国内仅有个别 DC 肿瘤疫苗临床应用的研究报告<sup>[17]</sup>, 大部分工作仍主要集中于基础研究和临床前准备阶段. 李明松 et al<sup>[18,19]</sup>研究表明: 胃癌、大肠癌、肝癌、卵巢癌患者外周血 DC 体外诱导的抗肿瘤细胞免疫反应不仅能预防而且能抑制人裸鼠移植瘤生长; DCs 能从凋亡胆管癌细胞有效提呈肿瘤抗原并诱导出显著的杀伤胆管癌细胞的免疫反应<sup>[20]</sup>; 从外周血单核细胞中诱导出大批量的 DCs, 这些 DCs 可被低温保存而不改变其功能. 在以上研究的基础上, 本研究改进传统 DC 诱导方法, 获得高纯度 DC 后, 在体外负载中国人自己建株的国人肝癌细胞 SMMC-7 721 可溶性抗原, 经 BCG HSP70 活化后制成肝癌 DC 疫苗, 并诱导具有生物学活性的肝癌特异性 CTL. 冷冻复苏后的 CTL 不但可预防

人肝癌裸鼠皮下移植瘤, 而且可抑制人肝癌裸鼠皮下移植瘤生长. 由于肝癌 DC 疫苗是以活细胞的形式进入机体、并活化机体免疫系统, 因此我们也评价了 DC 在体内对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的直接作用, 研究证明 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
- 郭建巍, 蔡美英, 秦力维, 董薇, 魏大鹏. 树突状细胞负载肝癌可溶性抗原后的免疫应答. *免疫学杂志* 2002;18:123-127
- 郭建巍, 蔡美英. 树突状细胞负载 AFP 表位肽抗原后的免疫应答. *中华肝脏病杂志* 2002;10:178-180
- 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
- 李明松, 袁爱力, 刘思德, 张振书. 树突状细胞诱导的抗大肠癌免疫预防裸鼠移植瘤发生并抑制其生长. *肿瘤* 1999;19:280-283
- Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, Burkeholder S, Kraus ET, Davoust J, Palucka KA. Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J Immunol* 2000;165:3797-3803
- Lamm DL. Long-term results of intravesical therapy for superficial bladder cancer. *Urol Clinics N Am* 1992;19:573-579
- Kamat AM, Lamm DL. Immunotherapy for bladder cancer. *Curr Urol Rep* 2001;2:62-69
- Lukacs KV, Lowrie DB, Stokes RW, Colston MJ. Tumor cells transfected with a bacterial heat-shock gene lose tumorigenicity and induce protection against tumors. *J Exp Med* 1993;178:343-348
- Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 2000;68:6883-6890
- Kim KD, Lee HG, Kim JK, Park SN, Choe IS, Choe YK, Kim SJ, Lee E, Lim JS. Enhanced antigen-presenting activity and tumour necrosis factor- $\alpha$ -independent activation of dendritic cells following treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Immunology* 1999;97:626-633
- Jiao X, Lo-Man R, Guernonprez P, Fiette L, Deriaud E, Burgaud S, Gicquel B, Winter N, Leclerc C. Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J Immunol* 2002;168:1294-1301
- Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 2000;68:6883-6890
- Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol* 2000;78:318-324
- Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun* 2002;70:5167-5176
- Demangel C, Bean AG, Martin E, Feng CG, Kamath AT, Britton WJ. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin-infected dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;29:1972-1979
- 李明松, 袁爱力, 黄建翔, 钟翰辉, 张振书. 树突状细胞诱导的抗肿瘤免疫抑制肝癌患者术后复发和转移. *中华肝胆外科杂志* 2001;7:98-99
- 李明松, 袁爱力, 陈学清, 赖卓胜, 钟翰辉, 张振书, 周殿元. 树突状细胞体外诱导抗卵巢癌免疫反应. *实用肿瘤学杂志* 1999;13:251-252
- 李明松, 袁爱力, 潘德春, 陈春龙, 张振书. 树突状细胞诱导抗胃癌移植瘤免疫. *胃肠病学和肝病学杂志* 1999;8:259-260
- 吴刚, 韩本立, 裴雪涛. 人树突状细胞体外提呈凋亡胆管癌细胞抗原的研究. *第二军医大学学报* 2000;16:8-12



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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

