

# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

2004 年 2 月 15 日 第 12 卷 第 2 期 (Volume 12 Number 2)



**2/2004**

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,  
2003年百种中国杰出学术期刊,  
《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学  
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.  
世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,  
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,  
俄罗斯《文摘杂志》收录.

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2004 年 2 月 15 日 第 12 卷 第 2 期 (总第119期)

述 评	253 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响 成军
胃 癌	258 胃癌线粒体DNA拷贝量的变化 韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦 262 胃癌前病变p21 <sup>ras</sup> , c-erbB-2, p53表达与中医证候的关系 胡玲, 劳绍贤 266 胃癌淋巴结转移预测的多因素分析 黄宝俊, 徐惠绵, 赵雨杰, 王天骄, 田大彤, 陈峻青
肝 癌	271 人鼠嵌合Fab抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原HAb18G嵌合Fab抗体的表达 邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南 276 肝癌细胞H <sub>22</sub> 与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究 张娟, 张锦堃, 卓少宏 280 肝细胞癌hOGG1 mRNA及其蛋白的表达 周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊 283 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定 田耕, 易继林
病毒性肝炎	286 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶11蛋白 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 291 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 298 新生儿HBe Ag在HBV宫内感染中的作用 邵中军, 门可, 徐剑秋, 徐德忠, 闫永平, 张景霞 302 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花 306 基因表达谱芯片筛选NS5ATP3转染细胞差异表达基因 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花 311 基因表达谱芯片技术筛选NS5A-TP4蛋白反式调节基因 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林 315 HCV包膜糖蛋白E2基因的克隆、蛋白表达及纯化 杜德伟, 贾战生, 秦鸿雁, 刘秋平, 周永兴, 韩 骅 319 应用表达谱芯片技术对NS5ATP7反式调节基因的研究 张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘 敏 323 应用表达谱芯片技术筛选NS5ATP9反式调节基因的研究 李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 程明亮 327 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳 332 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型 温志立, 谭德明
基础研究	336 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭 339 正常与硬化肝组织基因表达差异的初步分析 刘连新, 陈志宏, 武林枫, 李宏伟, 刘芝华, 姜洪池, 王秀琴, 吴 旻 344 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响 廖 冰, 薛 玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪 347 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和Ic-fos表达 杨 玲, 朱清静, 笪邦红, 张赤志

	<p>351 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合酶的表达 田德安, 周晓黎</p> <p>355 胃黏膜保护剂预防幽门螺杆菌培养上清液所致小鼠胃黏膜损伤 崔梅花, 胡伏莲, 董欣红</p> <p>359 结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性 王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 张连阳, 陈金萍</p> <p>363 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和GD细胞的变化 孙凤莲, 宋于刚, 覃汉荣</p> <p>367 当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎的保护作用 刘少平, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平, 吴东方</p> <p>371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响 周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球</p>
临床研究	<p>376 恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析 孙晓敏, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平</p> <p>379 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白4蛋白表达的关系 周正, 劳绍贤, 黄志新, 张向菊, 黄烈平, 匡忠生</p> <p>382 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化 王静, 梁列新, 张志雄, 李国华, 钱伟, 侯晓华</p> <p>385 MRI评估肝硬化再生结节和退变结节 徐海波, 孔祥泉, 熊茵, 冯敢生</p>
焦点论坛	<p>390 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>391 乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展 陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉</p> <p>393 乙型肝炎病毒DNA 多聚酶P结构域研究进展 陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉</p> <p>397 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子ATF-1的调节 王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕</p> <p>401 乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花</p> <p>403 乙型和丙型肝炎病毒对转录因子Nur77的调节 成军</p> <p>406 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节 王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花</p> <p>408 转录因子C/EBPb的生物学功能 成军</p> <p>412 活性氧簇与肝炎病毒的关系 梁耀东, 成军, 吴君, 程明亮</p> <p>414 趋化因子与病毒性肝炎的关系 陆荫英, 成军, 张玲霞</p> <p>417 病毒性肝炎发病机制中环氧合酶的作用 刘敏, 成军, 张树林</p>
文献综述	<p>420 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果 成军</p> <p>428 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化 郑伟达, 王小众</p> <p>432 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病 贾林</p> <p>434 右叶部分肝移植临床解剖进展 刘静, 高毅, 钟世镇</p> <p>439 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点 陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭</p> <p>443 肠道上皮特异性基因CDX2 宋艳, 李凌</p> <p>446 细胞凋亡与肝移植免疫耐受 刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维</p> <p>450 自身免疫性肝炎诊断与治疗 欧强, 谭德明</p> <p>454 VEGF在肝癌中作用 邓靖宇, 何生</p>
研究快报	<p>459 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达及其意义 刘希双, 李玉军, 田宇彬, 张翠萍, 孙显路, 魏良洲, 薛会光, 刘思良</p> <p>461 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较 陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀</p> <p>464 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响 黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇</p> <p>467 MUC5AC蛋白在大肠肿瘤中的表达及意义 卜晓东, 李俐, 黄培林, 樊克武, 赵建华</p> <p>469 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>471 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点 赵尔增, 张建中, 岳茂兴</p> <p>473 细胞周期蛋白D1 RT-PCR ELISA的建立及其初步应用 陈兵, 张雪, 府伟灵, 常杭花, 刘为纹, 徐采朴, 史景泉</p> <p>476 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性 王雯, 李兆申, 许国铭, 张志坚, 林克荣</p> <p>477 尼美舒利对结肠癌细胞ICAM-1 mRNA表达的影响 刘伟, 张超</p>

## 临床经验

- 480 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘4例 张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚洲
- 481 内镜下氩离子凝固术治疗胃肠息肉 毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲
- 483 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系 肖际东, 李瑞珍, 周平, 朱文晖
- 485 大黄与促肝细胞生长素联合治疗重型肝炎 黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国
- 487 5 km长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响 李小丽, 郝悦, 杨凤江, 邹勤, 李智力, 李晓春
- 488 药物性肝病41例 苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅
- 490 数字化成像结肠双对比造影检查345例 何发清, 官泳松, 王小林, 郭兵文, 孙龙
- 492 胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗4例 詹世林, 吴良平, 蒲森水
- 494 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达 孟华, 刘丽娜, 吕申
- 497 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析 周惠萌, 范欣敏
- 499 原发性胆汁性肝硬化37例临床分析 董正芳, 程留芳
- 501 射频消融联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏恶性肿瘤 田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪
- 503 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒

## 封面故事

- 371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响  
周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球 世界华人消化杂志 2004; 12(2): 371-375  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v12/i2/371.htm>

## 国际会议

- 13th United European Gastroenterology Week, UEGW  
October 15-20, 2005
- American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting  
October 28-November 2, 2005
- ISGCON 2005  
November 11-15, 2005  
[isgcon2005@yahoo.co.in](mailto:isgcon2005@yahoo.co.in)  
[www.isgcon2005.com](http://www.isgcon2005.com)
- Advanced Capsule Endoscopy Users Course  
November 18-19, 2005  
[www.asge.org/education](http://www.asge.org/education)
- II Latvian Gastroenterology Congress  
November 29, 2005  
[gec@stradini.lv](mailto:gec@stradini.lv)  
[www.gastroenterologs.lv](http://www.gastroenterologs.lv)
- 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases  
December 1-3, 2005  
[c.chase@imedex.com](mailto:c.chase@imedex.com)  
[www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm](http://www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm)
- 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus  
February 22-25, 2006  
[isde@sapmea.asn.au](mailto:isde@sapmea.asn.au)  
[www.isde.net](http://www.isde.net)

# 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  
(半月刊)

创刊 1993-01-15  
改刊 1998-01-25  
出版 2004-02-15  
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

**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

**出版** 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>  
电话: 010-85381901  
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, 北京市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: 010-85381901  
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

### 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.

2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

邮发代号  
82-262

国外代号  
M 4481

国内定价  
每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证  
1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# 肝癌细胞 H<sub>22</sub> 与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究

张 娟, 张锦堃, 卓少宏

张娟, 汕头大学医学院第一附属医院检验中心 广东省汕头市 515041  
张锦堃, 汕头大学医学院肿瘤病理研究室 广东省汕头市 515041  
卓少宏, 汕头市第三人民医院消化科 广东省汕头市 515073  
张娟, 女, 1972-12-18 生, 安徽省蚌埠市人, 汉族. 1996 年蚌埠医学院本科毕业, 2001 年汕头大学医学院硕士研究生毕业, 主管检验师. 主要从事肿瘤疫苗、肿瘤免疫等的基础研究.  
广东省自然科学基金资助项目, No. 980180  
项目负责人: 张锦堃, 515041, 广东省汕头市, 汕头大学医学院肿瘤病理研究室.  
电话: 0754-8900443  
收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-09-24

## A vaccine prepared by fusion of H<sub>22</sub> cells with the spleen-driven dendritic cells

Juan Zhang, Jin-Kun Zhang, Shao-Hong Zhuo

Juan Zhang, Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China  
Jin-Kun Zhang, Laboratory of Cancer Pathology, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China  
Shao-Hong Zhuo, Department of Gastroenterology, Third Municipal Hospital of Shantou, Shantou 515073, Guangdong Province, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No.980180  
Correspondence to: Jin-Kun Zhang, Laboratory of Cancer Pathology, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China.  
Received: 2003-08-08 Accepted: 2003-09-24

## Abstract

**AIM:** To prepare a cancer vaccine (H<sub>22</sub>-DC) based on fusion of hepatocarcinoma cells (H<sub>22</sub>) with dendritic cells (DC) of mice and to analyze the biological characteristics, tumorigenicity and specific CTL activity of H<sub>22</sub>-DC.

**METHODS:** DCs were fused with H<sub>22</sub> cells and fusion cells were marked with CD11c MicroBeads. The techniques of cell culture, immunocytochemistry and light microscopy were used to test the characteristics of growth morphology of H<sub>22</sub>-DC *in vitro*. As an immunogen, H<sub>22</sub>-DC was inoculated subcutaneously into the right armpit of Balb/C mice, and their tumorigenicity *in vivo* was observed. MTT was used to test the CTL activity of murine spleen *in vitro*.

**RESULTS:** H<sub>22</sub>-DC was able to divide and proliferate *in vitro*, but its activity of proliferation was significantly decreased as compared with H<sub>22</sub> cells and its growth curve was flatter than that of H<sub>22</sub> cells. The spleen CTL activity against H<sub>22</sub> cells in mice implanted with fresh H<sub>22</sub>-DC was significantly higher than that in control groups ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** H<sub>22</sub>-DC can significantly stimulate the specific CTL activity of murine spleen. The DC vaccine is likely to become a helpful approach in immunotherapy of hepatocellular carcinoma.

Zhang J, Zhang JK, Zhuo SH. A vaccine prepared by fusion of H<sub>22</sub> cells with the spleen-driven dendritic cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004; 12(2):276-279

## 摘要

**目的:** 将肝癌 H<sub>22</sub> 细胞与树突状细胞(DC)相融合, 研制杂交瘤苗, 并观察瘤苗的生长特性、致瘤性及免疫活性.

**方法:** 将 DC 与肝癌 H<sub>22</sub> 细胞融合制备 H<sub>22</sub>-DC 融合细胞, 磁式分选器分选融合细胞; 观察融合细胞的生长特性和体内致瘤性; 从 Balb/C 小鼠皮下接种融合细胞, 实验设肿瘤等三组对照, 每组各 5 只小鼠. MTT 比色法检测小鼠脾 CTL 活性.

**结果:** 融合细胞在体外能分裂增生, 但明显低于肿瘤细胞, 无体内致瘤性; 活融合细胞免疫的小鼠, 其脾 CTL 杀伤 H<sub>22</sub> 细胞的活性明显高于对照组小鼠 ( $P < 0.01$ ).

**结论:** 融合细胞能诱导出特异性的 CTL 活性, 可望成为肝癌免疫治疗的新途径.

张娟, 张锦堃, 卓少宏. 肝癌细胞 H<sub>22</sub> 与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究. 世界华人消化杂志 2004;12(2):276-279

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/276.asp>

## 0 引言

T 细胞介导的细胞免疫应答在机体抗肿瘤免疫中起着关键作用, T 细胞的致敏、激活和扩增依赖于抗原呈递细胞(antigen presenting cells, APC)提呈相应的抗原多肽并提供共刺激信号<sup>[1]</sup>. 然而, 由于许多肿瘤细胞为弱免疫原性, 呈现 MHC 分子与共刺激分子的表达低下或缺如, 致使肿瘤抗原不能得到有效的提呈, 因而不能诱导机体有效的抗肿瘤免疫应答, 不能有效地激活体内特异性的杀伤机制. 当前国内外引人瞩目的 APC 瘤苗, 正是期望增强肿瘤细胞的免疫原性和提高抗原呈递细胞对肿瘤抗原的提呈能力, 以诱导有效的特异性 T 细胞抗肿瘤免疫. 树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前已知体内功能最强的一类专职的抗原呈递细胞<sup>[2-4]</sup>, DC 具有抗原捕获、加工和提呈功能<sup>[5-6]</sup>, 尤其对初次免疫应答激发具有强大的刺激活性<sup>[7-9]</sup>. 因此 DC 在肿瘤免疫治疗方面的作用越来越受到人们的重视<sup>[10-13]</sup>. 本文采用小鼠脾脏来源的 DC 与肝癌细胞融合, 以有效发挥 DC 提呈肿瘤抗原的能力, 增强肿瘤细胞的免疫原性, 刺激宿主产生特异性 CTL 活性.

## 1 材料和方法

1.1 材料 BALB/C 小鼠(H-2<sup>d</sup>):清洁级, 6-8 周龄. ♂,



质量 15-20 g, 购自上海西普尔必凯实验动物有限公司, 随机分成实验组和对照组. 小鼠 mAbCD80, CD86, CD54 为 coulter 公司产品. rmGM-CSF 和 rm IL-4 为 R&D Systems 产品; Mini MACS 磁式分选器及 CD11c MicroBeads 为 Miltenyi Biotec GmbH 产品; Metrizamide 为 amresco 产品, PEG 为 Sigma 公司产品.

1.2 方法 分离 DC 在原有 Steinman 法的基础上加以改良, 根据 DC 的半黏附性及 FcR $\gamma$  的特点, 应用 145 g/L 的 Metrizamide 密度梯度离心再用小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)和白介素-4(rmIL-4)共培养, 诱导小鼠脾 DC 扩增, 制备大量的 DC.

细胞融合和筛选 用 500 g/L 的聚乙二醇 (PEG) 使 DC 与 H<sub>22</sub> 细胞融合<sup>[14-15]</sup>. 再用 CD11c MicroBeads 标记, Mini MACS 磁式细胞分选器分选出 H<sub>22</sub>-DC. 置于含 rmGM-CSF 和 rm IL-4(500 ng/L)以及 200 g/L FCS 的 RPMI 1640 完全培养基中扩增培养 2-3 wk. 用光镜和相差镜观察 H<sub>22</sub>-DC, H<sub>22</sub> 和 DC 的形态特征.

1.2.1 免疫细胞化学染色 细胞分别与一抗 CD80, CD86 或 CD54 共孵育, 应用 ABC 试剂, DAB 显色, 观察膜蛋白并用 Olympus 显微摄影显微镜照相.

1.2.2 细胞体外增生特性分析 接种 H<sub>22</sub>-DC 于 24 孔培养板,  $1.25 \times 10^4$ /孔, 每隔 24 h 取 3 孔计数细胞, 取其平均值绘制体外生长曲线, 同时以 H<sub>22</sub> 细胞为对照.

1.2.3 致瘤性分析 实验分三组, 每组又分 4 小组(H<sub>22</sub>-DC, H<sub>22</sub>+DC, H<sub>22</sub> 和 PBS 组). 分别给第一组的实验组小鼠右腋皮下接种 0.1 mL  $1 \times 10^{10}$ - $2 \times 10^{10}$ /L 的活 H<sub>22</sub>-DC, 对照组分别给予等量的 H<sub>22</sub>+DC, H<sub>22</sub> 和 PBS. 每日观察肿瘤的生长情况及小鼠的存活期. 第二组小鼠于免

疫后 14 d 处死, 分离肿瘤并称重比较.

1.2.4 CTL 活性 第三组小鼠于免疫后第 10 d 处死, 分离脾脏, 制备细胞悬液. 加入基因重组 IL-2 的含 100 g/L FCS 的 RPMI1640 培养液, 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 饱湿条件下孵育 3 d. 抗肿瘤实验分为 4 组, 各组均设 5:1 和 10:1 效(CTL)靶(H<sub>22</sub>)比. A 组: CTL(H<sub>22</sub>-DC 组)+H<sub>22</sub>; B 组: CTL(H<sub>22</sub>+DC 组)+H<sub>22</sub>; C 组: CTL(H<sub>22</sub> 组)+H<sub>22</sub>; D 组: CTL(PBS 组)+H<sub>22</sub>. 另设 T 组为相应的 CTL 对照组, E 组为 H<sub>22</sub> 对照组, 培养液空白对照组只含 FCS- RPMI1640. 每组均设 3 个复孔, 置于 96 孔培养板中, 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub> 饱湿条件下孵育 48h, 应用原有的 MTT 法检测细胞毒性. 简而言之, 就是加入新配制已滤菌的 5 g/L 的 MTT 20  $\mu$ l/孔继续孵育 4 h, 吸弃上清液, 加入 150  $\mu$ l DMSO 振荡 10 min 使结晶物充分溶解; 选择 570 nm 波长, 在 Bio-Rad 3550-UV 型全自动酶联检测仪上检测.

统计学处理 用方差分析进行统计学处理, P < 0.05 为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 DC 的形态特征 DC 为具有许多突起的形态不规则的细胞, 有刺突状和球形伪足状突起. 核卵圆形或不规则形, 不断进行波状运动. 胞质富含球形线粒体. 免疫细胞化学染色显示 DC 为 CD80、CD86、CD54 阳性细胞. 细胞形态不规则, 胞质内充满棕黄色细颗粒(图 1).

2.2 H<sub>22</sub>-DC 和 H<sub>22</sub> 的特性及融合细胞筛选 CD11c MicroBeads 标记后, Mini MACS 分选, 结果 H<sub>22</sub>-DC 为阳性细胞, H<sub>22</sub> 为阴性细胞; 免疫细胞化学染色显示 H<sub>22</sub>-DC 为 CD80、CD86、CD54 阳性细胞(图 2), 而 H<sub>22</sub> 为 CD80,



图 1 免疫细胞化学染色 DC. A: CD80; B: CD86; C: CD54 阳性(棕黄色)  $3.3 \times 100$ .

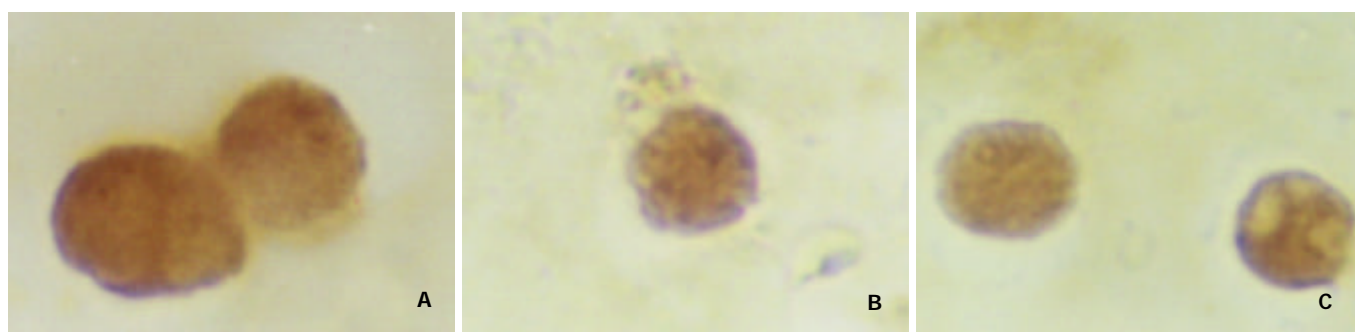


图 2 免疫细胞化学染色 H<sub>22</sub>-DC. A: CD80; B: CD86; C: CD54 阳性(棕黄色)  $3.3 \times 100$ .

CD86, CD54 阴性细胞. 细胞因子 rmGM-CSF 和 rmIL-4 能诱导融合细胞分裂增生, 并延长其存活时间. 经 rmCD11c MicroBeads 标记, Mini MACS 分选的融合细胞中混有未融合的 DC, 但在不加细胞因子的培养液中 10-14 d, DC 自然调亡, 而融合细胞则继续生长.

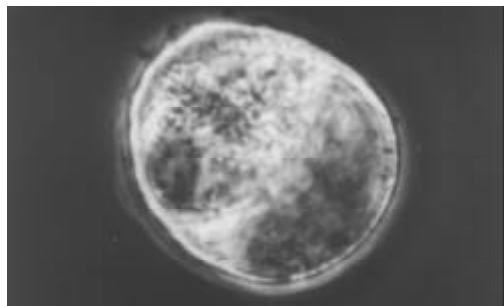


图3 倒置相差显微镜示  $H_{22}$ -DC 融合细胞  $5 \times 40$ .

**2.3 融合细胞鉴定及特性分析**  $H_{22}$ -DC 兼具两种亲本细胞的特性, 细胞呈悬浮生长, 呈卵圆形、扁平、不规则状, 富含线粒体, 核不规则(图3). 不加 rmGM-

CSF、rmIL-4 的  $H_{22}$ -DC 细胞活性低, 加入 rmGM-CSF 和 rmIL-4 后,  $H_{22}$ -DC 可分裂增生, 但其生长曲线明显低于  $H_{22}$  细胞(图4).  $H_{22}$ -DC 免疫小鼠后, 超过 60 d 未见肿瘤形成, 而  $H_{22}$ +DC 和  $H_{22}$  对照组却 100% 成瘤. 荷瘤 14 d 小鼠,  $H_{22}$ -DC 组与  $H_{22}$  组瘤重有显著性差异  $P < 0.01$ (图5-6).

**2.4 CTL 活性分析** MTT 法检测结果表明,  $H_{22}$ -DC 组脾 CTL 活性显著高于  $H_{22}$ +DC,  $H_{22}$  和 PBS 组( $P < 0.01$ )(图6).

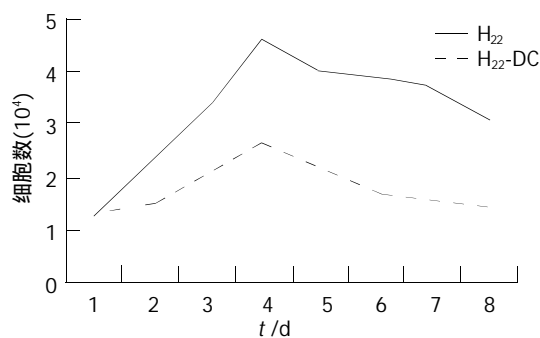


图4 融合细胞  $H_{22}$ -DC 生长曲线.

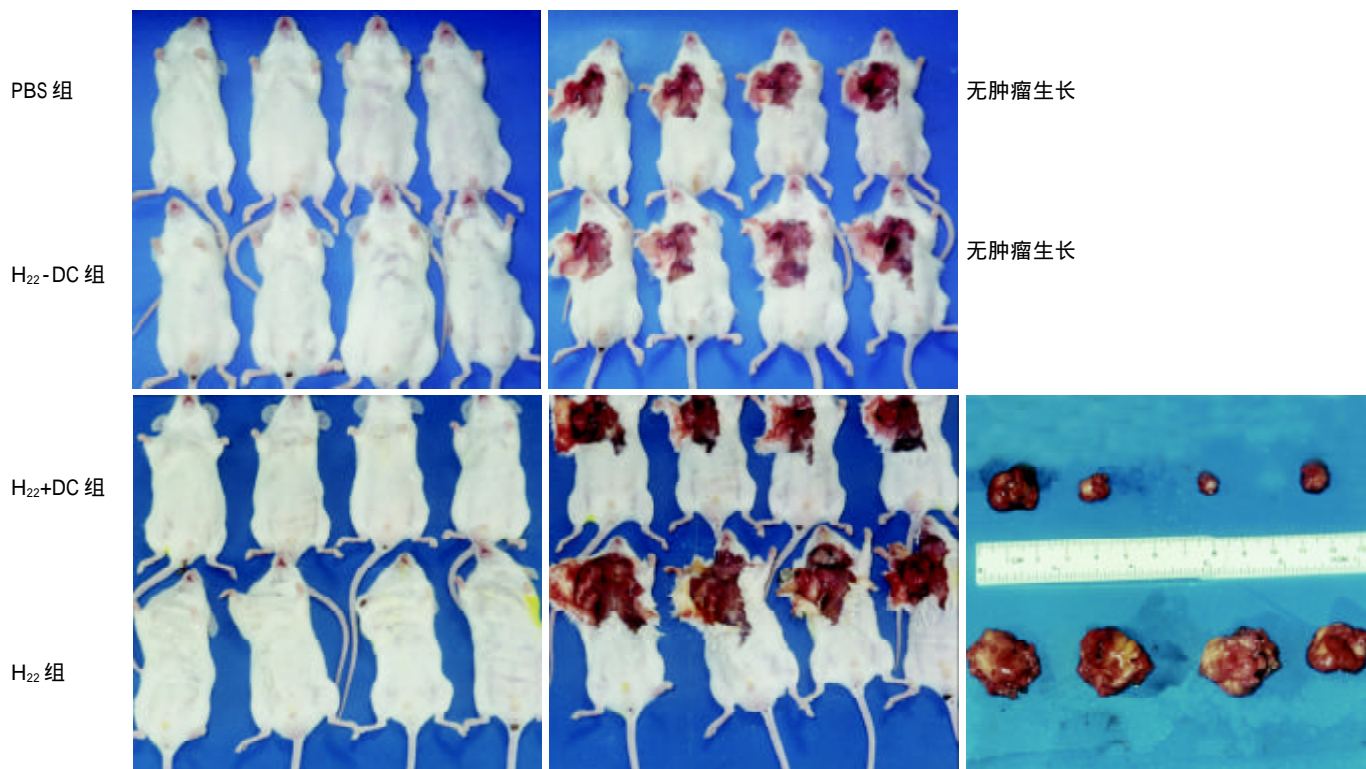


图5 皮下接种  $H_{22}$ -DC 14 d 的 Balb/c 小鼠成瘤情况.

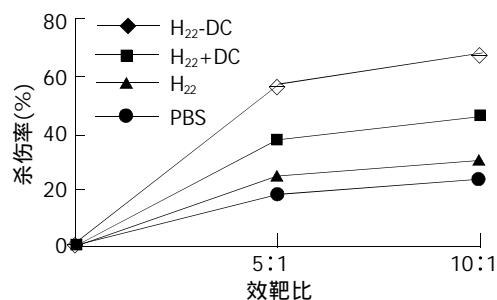


图6 MTT 法检测荷瘤 10 d Balb/c 小鼠的 CTL 活性.

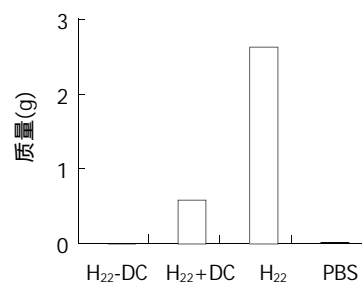


图7 荷瘤 14 d Balb/c 小鼠的瘤重情况.

### 3 讨论

成熟的 DC 能有效的递呈肿瘤肽表位诱导机体 CTL 产生特异性的抗肿瘤免疫反应<sup>[15-18]</sup>. 活化的 B 细胞和 DC 与肿瘤细胞融合可制备 DC 瘤苗. 我们在建立 DC 的分离与扩增培养的基础上, 采用 PEG 化学融合与免疫磁珠法相结合研制融合瘤苗, 不仅大大简化了传统细胞融合方法中的繁琐筛选过程, 也提高了分选细胞的纯度, 是一种既简便又切实可行的方法. CD11c mAb (N418) 对小鼠脾脏 DC 上表达的白细胞整合素  $\alpha\beta_2$  中的  $\alpha$  亚单位是特异性的, CD11c<sup>+</sup> 细胞磁式分选器 (Mini MACS) 分离细胞的原理是通过通过偶联在 CD11c 抗体上的磁珠标记在细胞上, 让细胞流过置于磁场中的分离柱而分离细胞. 磁标记的 CD11c<sup>+</sup> 细胞留在 MACS 分选柱中, 而 CD11c<sup>-</sup> 的细胞流过分选柱. 分选柱撤离磁场后, 从柱上洗脱的 CD11c<sup>+</sup> 细胞 DC 为正选细胞. MACS 的分离效果已得到免疫荧光、PCR、FISH 及 FACS 的确认, 他的优点是处理的细胞量大, 分离纯度高, 方法简便, 易于操作.

近年直接用 DC 与肿瘤细胞融合制备瘤苗已成为肿瘤主动免疫治疗的重要方法之一<sup>[19-23]</sup>. 他不仅方法容易掌握、切实可行, 而且开发了宿主体内免疫系统独特地识别、杀伤肿瘤细胞而又不损伤正常细胞的肿瘤治疗途径<sup>[24-30]</sup>. 利用小鼠 CD11c MicroBeads 标记, Mini MACS 磁式分选器分选出的 H<sub>22</sub>-DC 融合细胞, 兼具两种亲本细胞的特征, 形态不规则. 其中混有的 DC-DC 和 DC, 在不加细胞因子的情况下, DC-DC 于 7-10 d 自然凋亡, DC 于 10-14 d 自然凋亡, H<sub>22</sub>-DC 则继续存活. 融合细胞开始时分裂增生尚快, 尔后生长变的缓慢, 活力和分裂增生活性下降, 体外建株未成功. 可能与肿瘤亲本细胞在体外的生长特性及融合细胞随培养时间增加而出现染色体丢失有关.

将 H<sub>22</sub>-DC 融合细胞注入 Balb/C 小鼠右腋皮下, 超过 60d 未见肿瘤形成; 注入混有等量 DC 的 H<sub>22</sub> 细胞的对照组则 100% 诱发肿瘤, 说明 H<sub>22</sub>-DC 融合细胞已失去体内致瘤性. 荷瘤 14 d 的 DC+H<sub>22</sub> 组小鼠瘤重与 H<sub>22</sub> 组有显著性差异, 说明单纯的混合虽不能阻止肿瘤形成, 但在肿瘤形成的早期却可明显抑制小鼠肿瘤生长. 提示在肿瘤形成早期, DC 在递呈肿瘤抗原和诱导特异性抗肿瘤免疫反应过程中起到了一定的积极作用. 本研究分别取接种 10 d 的 H<sub>22</sub>-DC, H<sub>22</sub>+DC 及 H<sub>22</sub> 小鼠的脾脏, 在体外诱导脾 CTL 活性, 结果表明, 接种融合细胞 H<sub>22</sub>-DC 的小鼠脾 CTL 活性明显高于接种 H<sub>22</sub> 细胞小鼠. 提示瘤苗主动免疫小鼠能在体内产生特异性的抗肿瘤免疫保护作用, DC 和 H<sub>22</sub>-DC 都能诱导小鼠体内特异性的抗肿瘤免疫反应, 刺激效应性 T 细胞的形成, 且 H<sub>22</sub>-DC 无致瘤性, 提示 DC 与肝癌细胞直接融合有望成为肝癌肿瘤免疫治疗的一条有希望的治疗途径.

### 4 参考文献

- 戴晓霞, 金月玲, 黄培林. 树突状细胞的最新研究进展. 中华中西医杂志 2001;2:902-904
- Nagata Y, Ono S, Matsuo M, Gnjatich S, Valmori D. Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO1, by distinct human. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10629-10634
- De Vries II, Eggert AA, Scharenborg NM, Vissers JL, Lesterhuis WJ, Boerman OC. Phenotypic and functional characterization of clinical grade dendritic cells. *J Immunother* 2002;25:429-438
- Zhang X, Gordon JR, Xiang J. Advances in dendritic cell-based vaccine of cancer. *Cancer Biother Radiop* 2002;17:601-619
- 张锦堃, 陈海滨, 孙劲旅, 周燕琼. 树突状细胞对不同诱导时间 LPAK 抗肝癌作用的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:673-375
- 陈海滨, 张锦坤, 黄子亮, 孙劲旅, 周燕琼. 细胞因子树突状细胞对抗肝癌作用的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:191-193
- Rains N, Canan RJ, Chen W, Stubbs RS. Development of a dendritic cell (DC)-based vaccine for patients with advanced colorectal. *Hepatogastroenterology* 2001;48:347-351
- Fay JW. Hematopoietic growth factors, dendritic cell biology, and vaccine therapy of cancer. *Curr Opin Hematol* 2002;9:202-206
- Hu JY, Wang S, Zhu JG, Zhou GH, Sun QB. Expression of B7 costimulation molecules by colorectal cancer cells reduces tumorigenicity and induces anti-tumor immunity. *World J Gastroenterol* 1999;5:147-151
- Gitlitz BJ, Belldgrun AS, Figlin RA. Vaccine and gene therapy of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* 2001;19:141-147
- Zisman A. New trends in the diagnosis and treatment of renal cell carcinoma. *Harefuah* 2002;141:713-717
- Sabel MS, Sondak VK. Tumor vaccines: a role in preventing recurrence in melanoma? *Am J Clin Dermatol* 2002;3:609-616
- Onaitis M, Kalady MF, Pruitt S, Tyler DS. Dendritic cell gene therapy. *Surg Oncol Ckin N Am* 2002;11:645-660
- McConnell EJ, Pathangey LB, Madsen CS, Gendler SJ, Mukherjee P. Dendritic cell-tumor cell fusion and staphylococcal enterotoxin B treatment in a pancreatic tumor model. *J Surg Res* 2002;107:196-202
- Liu YQ, Zhang WD, Chan T, Saxena A, Xiang J. Engineered fusion hybrid vaccine of IL-4 gene-modified myeloma and relative mature dendritic cells enhances antitumor immunity. *Leuk Res* 2002;26:757-763
- 李明松, 袁爱力, 张万岱, 陈学清, 谭晓华, 朴英杰. 树突状细胞诱导的抗肿瘤免疫诱导移植瘤细胞凋亡并抑制其增生. 世界华人消化杂志 2000;8:56-58
- 李明松, 袁爱力, 张万岱, 刘思德, 吕爱民, 周殿元. 树突状细胞体外诱导抗肝癌免疫. 世界华人消化杂志 1999;7:161-163
- 肖兰凤, 罗利琼, 邹奕, 黄树林. CD28/CD80 和 CD2/CD58 活化 PBLs 作用肝癌细胞的表型分析与 TcR V $\beta$  基因亚家族的优势取用. 世界华人消化杂志 1999;7:1044-1046
- 翟守恒, 刘俊彬, 朱平, 王彦宏. 肝硬变和肝细胞癌组织中 CD54、CD80、CD86、HLA-ABC 的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:292-295
- 李军, 张锦堃, 张娟, 陈海滨, 陈肃标. 树突状细胞融合瘤苗的体内抗肝癌效应. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:34-38
- 陆燕蓉, 林苹, 张洁, 王修杰, 周宏远, 黄孝忠, 宁奇志. 肺癌树突状融合细胞的制备及其生物学特征. 免疫学杂志 2001;17:60-63
- 刘美娜. 自体或同种异体树突状细胞融合人卵巢癌细胞体外诱导抗肿瘤免疫反应. 国外医学·妇产科学分册 2001;28:189-190
- 伊焕发, 唐军民, 唐岩, 孙红亚, 甄豆, 戴燕, 秦訖. 人外周血树突状细胞 - 乳腺癌细胞融合细胞. 解剖学杂志 2003;26:105-108
- 李坚, 李卫党, 藏磊, 许化溪, 陈森. 树突状细胞与肿瘤细胞融合后对肿瘤发生和生长的抑制作用. 实用癌症杂志 2000;15:453-455
- 李坚, 藏磊, 许化溪, 马斌, 邵起祥. 树突状细胞与肿瘤细胞融合后诱导 T 细胞介导的抗肿瘤效应. 中国肿瘤临床 2001;28:926-929
- 张卫东, 杨泓, 甄宏韬, 陈庄. 基因工程肿瘤细胞融合疫苗诱导 Th1 应答抗肿瘤. 中华血液学杂志 2002;23:61-64
- 吴军, 杨太成, 王晓怀, 杨传红, 赖晃文, 王捷, 郑文玲. 人癌胚抗原重组疫苗病毒转染树突状细胞体外诱导的抗肿瘤免疫. 中华微生物学和免疫学杂志 2003;23:27-30
- 杨航. 树突状细胞疫苗与泌尿系统肿瘤的生物治疗. 免疫学杂志 2002;18:S164-S167
- 癌症疫苗. 国外医学·预防、诊断、治疗用生物制品分册 2001;24:14-16
- 邹文燕, 钱志红, 徐惠民. 树突状细胞与卵巢癌的免疫治疗. 国外医学·妇产科学分册 2003;30:50-53





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

