

联合应用热休克蛋白70与卡介苗对Hcaf细胞的抑制作用

杨野, 刘宇, 郭仁宣, 傅庆国

杨野, 中国医科大学附属第一医院干诊科 辽宁省沈阳市 110001

刘宇, 郭仁宣, 傅庆国, 中国医科大学附属第一医院普外二科 辽宁省沈阳市 110001

杨野, 医学博士, 主要从事肝胆肿瘤的外科治疗.

作者贡献分布: 刘宇, 郭仁宣及傅庆国对此文所作贡献均等; 此课题由杨野与刘宇设计; 研究过程由杨野, 刘宇及傅庆国操作完成; 本论文写作由杨野完成.

通讯作者: 杨野, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院干诊科, doctor_3047_cn@sina.com.cn

电话: 024-23256666

收稿日期: 2008-01-21 修回日期: 2008-03-18

Inhibitory effect of heat shock protein 70 combined with bacillus calmette-guerin on mouse hepatoma Hcaf cells

Ye Yang, Yu Liu, Ren-Xuan Guo, Qing-Guo Fu

Ye Yang, Ward of Cadre Care, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Yu Liu, Ren-Xuan Guo, Qing-Guo Fu, the Second Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ye Yang, Ward of Cadre Care, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. doctor_3047_cn@sina.com.cn

Received: 2008-01-21 Revised: 2008-03-18

Abstract

AIM: To investigate the anti-Hcaf cell efficacy induced by heat shock protein 70 (HSP70) and bacillus calmette-guerin (BCG), and to provide references for treatment of human malignant tumor using HSP70.

METHODS: Sixty-four mice were randomly and averagely divided into 4 groups: control group (injected with 50 μ L PBS), BCG group (immunized with 1 mg BCG), HSP70 group (immunized with 10 μ g HSP70) and combination group (immunized with 10 μ g HSP70 plus 1 mg BCG). Rat tumor model was induced by inoculation of Hcaf cells. Survival time, survival rate and tumor size were observed evaluated. Tumor tissues collected to observe the characteristics of Hcaf cells and alpha-fetoprotein (AFP) expression.

RESULTS: After immune treatment, the tumor growth of mice was inhibited, and the survival time was significantly prolonged in the HSP70 group and the combination group as compared with that in the control group (77.1 ± 15.1 d, 82.8 ± 13.2 d vs 22.9 ± 3.50 d, both $P < 0.01$); meanwhile, the survival rate was also enhanced (41.7% , 66.7% vs 0 , both $P < 0.01$). AFP was expressed markedly in the control group and the BCG group; however, it was restrained in the HSP70 group and the combination group, especially in the latter. In comparison with that in the control group or the BCG group, the tumor cell atypia was decreased in the HSP70 group and the combination group.

CONCLUSION: Combination of HSP70 and bacillus calmette-guerin can inhibit the growth of Hcaf cells remarkably, which is superior to HSP70 or BCG alone.

Key Words: Heat shock protein 70; Bacillus calmette-guerin; Hcaf tumor cell; Immunohistochemistry

Yang Y, Liu Y, Guo RX, Fu QG. Inhibitory effect of heat shock protein 70 combined with bacillus calmette-guerin on mouse hepatoma Hcaf cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(17): 1855-1858

摘要

目的: 观察联合应用热休克蛋白70(HSP70)与卡介苗(BCG)对Hcaf肿瘤的抑制作用, 为应用肿瘤来源的HSP70治疗人类恶性肿瘤提供参考依据.

方法: 实验小鼠64只随机分为对照组、BCG免疫组、HSP70免疫组和联合组4组, 每组16只. 小鼠接种Hcaf细胞制成肿瘤模型. BCG组接种1 mg BCG; HSP70组注射10 μ g HSP70, 联合组以HSP70 10 μ g和BCG 1 mg代替, 对照组注射50 μ L PBS液. 观察小鼠的生存时间、生存率和肿瘤大小等指标的变化. 取肿瘤组织进行免疫组化实验, 观察肿瘤细胞性状及AFP的表达情况.

结果: 应用免疫治疗后, 小鼠肿瘤生长均得

■背景资料

恶性肿瘤的免疫治疗越来越受到人们的关注. 就目前的研究成果表明, 通过肿瘤的传统化疗、放疗及手术治疗往往难以获得根治, 难于解决转移和复发, 且常有明显的损伤和毒副作用. 肿瘤特异性和非特异性主动免疫治疗, 通过激发、增强机体对肿瘤的主动免疫排斥反应, 作为传统疗法的辅助方法, 则有可能达到根治肿瘤的目的.

■同行评议者

周霞秋, 主任医师, 上海瑞金医院感染科

■研发前沿

热休克蛋白是70目前被认为对于人体的许多种恶性肿瘤都有很好的免疫作用。卡介苗作为一种有效的免疫佐剂已在防治膀胱肿瘤方面取得良好效果,有实验表明应用BCG可以控制肿瘤的生长和减少肿瘤的复发。

到不同程度的抑制,生存期均有延长,其中HSP70组和联合组与对照组相比差异显著(77.1 ± 15.1 d, 82.8 ± 13.2 d vs 22.9 ± 3.50 d, 均 $P < 0.01$),同时生存率也有所提高(41.7% , 66.7% vs 0 , both $P < 0.01$)。对照组及BCG免疫组AFP表达明显,而HSP70组和联合组AFP表达均受到不同程度抑制,其中联合组尤其显著。与对照组及BCG免疫组比较, HSP70组和联合组肿瘤细胞异型性均有所降低。

结论: HSP70与BCG联合应用对Hcaf细胞有明显抑制作用,其疗效要优于单独应用HSP70或BCG。

关键词: 热休克蛋白70; 卡介苗; Hcaf肿瘤细胞; 免疫组化

杨野, 刘宇, 郭仁宣, 傅庆国. 联合应用热休克蛋白70与卡介苗对Hcaf细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(17): 1855-1858

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1855.asp>

0 引言

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一组具有重要生理功能,高度保守的蛋白质分子家族,其中HSP70是目前研究最多也最深入的一种。目前认为HSP70对于人体的许多种恶性肿瘤都有很好的免疫作用^[1-5]。HSP70分离与纯化技术也已比较完善^[6-7],其用于抗肿瘤的研究也广泛开展^[8-11]。卡介苗(bacillus calmette-guerin, BCG)作为减毒活疫苗已经在世界范围内广泛应用,目前国内外公认其作为一种有效的免疫佐剂已在防治膀胱肿瘤方面取得良好效果^[12-15],有实验表明应用BCG可以控制肿瘤的生长和减少肿瘤的复发^[16]。本文以此为出发点,观察HSP70和BCG联合应用的抗肿瘤效果,为恶性肿瘤的免疫治疗提供有实用意义的参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 615小鼠肝癌细胞株Hcaf细胞购于大连医科大学病理教室,于♀近交系615小鼠腹腔内传代扩增。快速蛋白液相色谱系统(FPLC系统), ConA-Sepharose, Mono Q高效层析柱均购自瑞典Pharmacia公司。小鼠抗小鼠HSP70单克隆抗体购自美国Santa Cruz生物技术公司。碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠IgG购自武汉博士德生物工程有限公司。FITC标记的兔抗山羊多克隆抗体购自美国Sigma公司。BCG购自成都生物制品公司。AFP试剂盒及UltraSensitive s-p试剂盒购于福

州迈新生物技术开发有限公司。近交系清洁级♀615小鼠购自中国医学科学院实验动物繁育中心,于中国医科大学医学实验动物中心清洁级动物间饲养。

1.2 方法 取腹腔传代第6-7天小鼠Hcaf瘤性腹水,离心收集细胞, PBS洗涤3次,留细胞沉淀备用。

1.2.1 HSP70的分离与纯化及定量定性分析: 将 5×10^9 个Hcaf细胞置于40 mL低渗缓冲液(30 mmol/L NaHCO_3 , 0.5 mmol/L 苯甲酰磺酰氟, pH 7.2)中,以超声粉碎机破碎,4℃ 10 000 g离心2 h,取上清过ConA-Sepharose柱,收集未结合组分,4℃第一透析液(20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L NaCl, 15 mmol/L β -巯基乙醇, 3 mmol/L MgCl_2 , pH 7.5)中透析过夜,然后将样品加到EDAD柱上,结合部分用含3 mmol/L ADP的缓冲液进行洗脱,将洗脱液加于Mono Q柱,用FPLC系统进行分离,200-500 mmol/L梯度NaCl洗脱,分别收集各洗脱峰蛋白,4℃第二透析液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)中透析过夜。将各色谱柱分离的样品及Mono Q柱的各洗脱峰样品在10% SDS-PAGE上进行相对分子质量及纯度测定。经免疫印迹分析确认为HSP70后,再以比色法进行纯度分析。

1.2.2 分组、肿瘤模型制备及免疫治疗: 取近交系615系小鼠64只,以随机原则分为对照组、BCG免疫组、HSP70免疫组和联合组4组,每组16只。于小鼠胸部右侧皮下接种Hcaf细胞 1×10^6 个/只,活细胞率 $>96\%$ 。制成肿瘤模型后,BCG组将BCG 1 mg接种于小鼠左侧胸部皮下,每7天1次;HSP70组将提取的HSP70以10 μg (以PBS调制0.2 g/L)注射于小鼠左侧胸部皮下,每7天1次;联合组以HSP70 10 μg 和BCG 1 mg代替,对照组每次注射50 μL PBS液。观察各组小鼠的生存时间、生存率、肿瘤大小等指标。

1.2.3 免疫组化实验: 取近交系615系小鼠20只,按照之前的分组原则及免疫治疗方法处理,于荷瘤19 d后猝死所有小鼠,切取肿瘤组织进行免疫组化染色,观察肿瘤细胞性状及AFP的表达情况。

统计学处理 所有数据均在SPSS14.0软件包上进行, t 及 χ^2 检验分析结果, $P < 0.05$ 为显著性差异的检验标准。

2 结果

经两次亲和层析和Mono Q柱分离后,得到纯度较高的 M_r 约为70 000的蛋白,免疫印记分析证

■相关报道

目前已有文献报道,肿瘤来源的热休克蛋白70具有肿瘤免疫作用,卡介苗也已在防治膀胱肿瘤方面得到应用,而联合应用二者的效果却鲜有报道。

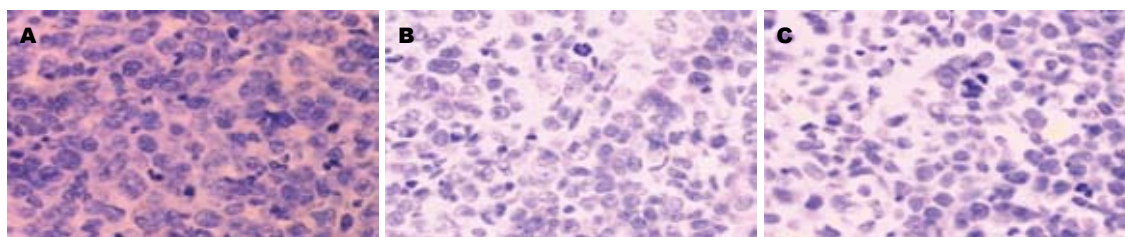


图1 HSP70与BCG联合应用对肿瘤组织AFP表达的影响. A: 对照组; B: HSP70组; C: 联合组.

■创新盘点

本文作者在查阅大量相关文献后, 通过具体实验, 首次提出将热休克蛋白70与卡介苗联合应用, 发现其抗肿瘤作用得到了增强.

表1 HSP70与BCG联合应用对小鼠肿瘤、生存期限及生存率的影响 (mean \pm SD)

分组	肿瘤直径(cm)	肿瘤体积(cm ³)	平均生存天数(d)	生存率(%)
对照组	12.94 \pm 2.32	842.52 \pm 534.93	22.9 \pm 3.5	—
BCG组	11.53 \pm 1.30	593.08 \pm 149.10	47.7 \pm 11.9	—
HSP70组	8.97 \pm 2.36	334.55 \pm 237.10 ^{bd}	>77.1 \pm 15.1 ^{bd}	41.7 ^{bd}
联合组	3.89 \pm 0.96	17.73 \pm 8.24 ^{bdf}	>82.8 \pm 13.2 ^{bdf}	66.7 ^{bdf}

^b P <0.01 vs 对照组; ^d P <0.01 vs BCG组; ^f P <0.01 vs HSP70组.

实, 该蛋白即为HSP70. 应用免疫治疗后, 小鼠肿瘤生长均得到不同程度的抑制, 生存期均有延长, 其中HSP70组和联合组与对照组相比差异显著(P <0.01). 其中联合治疗组疗效尤其明显, 无论肿瘤大小、小鼠生存期及生存率均与另外两个单独免疫组有显著性差异, 本组有5只小鼠得到长期无瘤存, 7只荷瘤存活, 4只死亡, 生存率75%. 对照组于荷瘤后28 d内均死亡, 无一长期存活, 死亡率100%(表1). 切取肿瘤组织进行免疫组化染色显示, 对照组及BCG免疫组AFP表达明显, 染色呈强阳性, 而HSP70组和联合组AFP表达均受到不同程度抑制, 表明肿瘤增生得到了免疫抑制, 其中联合组尤其显著, 有3只小鼠肿瘤组织AFP显色阴性. 各免疫组均可见不同程度的淋巴细胞浸润, 尤其以联合组淋巴细胞浸润明显. 与对照组及BCG免疫组比较, 另外两组肿瘤细胞异型性均有所降低, 并可见到肿瘤中心坏死及肿瘤细胞变性(图1).

3 讨论

恶性肿瘤的免疫治疗已有近百年的历史, 其作为手术、放疗及化疗以外的肿瘤第四治疗程式即肿瘤的生物治疗越来越受到人们的关注. 尽管人类肿瘤主动免疫治疗还面临许多问题, 如应怎样克服肿瘤细胞异质性; 如何解除抗体的免疫抑制状态. 但就目前的研究成果表明, 通过肿瘤的传统化疗、放疗及手术治疗往往难以获得根治, 难于解决转移和复发, 且常有明显的损伤和毒副作用. 通过肿瘤特异性和非特异性主

动免疫治疗, 如能激发、增强机体对肿瘤的主动免疫排斥反应, 作为传统疗法的辅助方法, 则有可能达到根治肿瘤的目的.

机体对于疾病的免疫应答可分为特异性与非特异性免疫两种, 非特异应答(BCG可以增强此反应)是与生俱来的, 他的形成并不需要抗原刺激. 他是广泛地针对多种抗原, 此种反应作用广泛, 是免疫应答的基础, 但他的针对性不强, 对某种特定抗原物质往往不能产生足够强度的反应; 而特异性免疫应答(HSP70可以诱发并增强此反应)可以达到疾病的最终治愈. 本研究将二者联合应用, 观察到二者联合应用疗效要大于单独应用的疗效, 联合组进行免疫治疗后, 肿瘤显著缩小, 与对照组的肿瘤迅速增长形成鲜明对比, 平均生存期大于82.8 d, 与对照组相比, 差异明显(P <0.01), 而且生存率也明显高于其他各组. 这是因为肿瘤来源的HSP70可以携带多种肿瘤抗原肽, 可激发有效的抗肿瘤效应^[17], 其通过多种机制表现出抗肿瘤的活性: HSP70作为分子伴侣与肿瘤细胞内的内源性多肽结合提呈给杀伤细胞^[18]; 通过激活CTL(CD8⁺)细胞和 $\gamma\delta$ T细胞杀伤肿瘤^[19]; 通过NK细胞发挥作用^[8]. HSP70作为免疫调节剂抑制肿瘤细胞生长及杀伤肿瘤细胞, 而其抗肿瘤效用又得到传统免疫佐剂BCG的加强. BCG菌种中的核酸、胞壁中的脂质、菌体蛋白及脂多糖均能刺激免疫产生抗癌免疫反应^[20-21], BCG中含有的胞壁酰二肽的活性成分可刺激T、B淋巴细胞功能, 激活巨噬细胞, 促进NK细胞杀瘤活性^[22-23]. 并且因为BCG可在

■应用要点

通过比较联合组与HSP70的抗肿瘤作用, 结果显示联合应用HSP70与BCG较单独应用HSP70具有更显著的抑瘤和治疗作用, 证明HSP70与BCG联合应用可以增强疗效, 其抗肿瘤效果要优于单独应用HSP70. 本研究的结果为联合应用肿瘤源性的HSP70及BCG治疗恶性肿瘤提供了重要的实验依据.

■同行评价

本文内容较新, 结果令人鼓舞, 具有较好的学术价值。

宿主体内长期存活并增殖达几周或数月, 它具有可诱导强烈而长期的免疫应答的能力。致使二者共同作用的结果表现为荷瘤小鼠肿瘤明显缩小甚至消失, 小鼠生存率显著提高, 组织学显示肿瘤细胞体积减小, 核分裂相减少, 细胞异型性不明显, 淋巴细胞大量浸润, AFP表达减少等。

另外, 通过比较联合组与HSP70的抗肿瘤作用, 结果显示联合应用HSP70与BCG较单独应用HSP70具有更显著的抑瘤和治疗作用, 无论在小鼠的肿瘤大小还是生存率上差别均显著, 这充分证明HSP70与BCG联合应用可以增强疗效, 其抗肿瘤效果要优于单独应用HSP70。总之, 本研究的结果对于联合应用肿瘤源性的HSP70及BCG治疗恶性肿瘤提供了重要的实验依据。

4 参考文献

- 1 Ramp U, Mahotka C, Heikau S, Shibata T, Grimm MO, Willers R, Gabbert HE. Expression of heat shock protein 70 in renal cell carcinoma and its relation to tumor progression and prognosis. *Histol Histopathol* 2007; 22: 1099-1107
- 2 Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R, Lerch MM, Saluja A. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 616-625
- 3 傅庆国, 郭仁宣, 姚振宇. 肿瘤热休克蛋白70多肽复合物诱导特异性细胞毒T淋巴细胞产生的实验研究. *中华医学杂志* 2000; 80: 301-303
- 4 Chang CL, Tsai YC, He L, Wu TC, Hung CF. Cancer immunotherapy using irradiated tumor cells secreting heat shock protein 70. *Cancer Res* 2007; 67: 10047-10057
- 5 吴顺华, 成军, 郑玉建. 热休克蛋白家族与肝癌的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 14: 87-92
- 6 马萍, 孟凡东, 傅庆国. 快速蛋白液相色谱系统纯化和分析小鼠肝癌细胞热休克蛋白70的研究. *中国医科大学学报* 2001; 4: 243-244
- 7 隋春阳, 李航宇, 胡勇, 宗志红, 李洪秀, 郭仁宣. HSP70-肿瘤肽复合物的纯化及其对肝癌细胞株HepG-2增殖的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 18: 1775-1779
- 8 Kim HP, Morse D, Choi AM. Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets* 2006; 10: 759-769
- 9 Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G,

- Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 15-27
- 10 Li Y, Subjeck J, Yang G, Repasky E, Wang XY. Generation of anti-tumor immunity using mammalian heat shock protein 70 DNA vaccines for cancer immunotherapy. *Vaccine* 2006; 24: 5360-5370
 - 11 傅庆国, 孟凡东, 郭克建, 郭仁宣. 热休克蛋白70在诱导肿瘤免疫中的效应. *中华微生物学和免疫学杂志* 2003; 23: 31-33
 - 12 任月发, 韩瑞发. BCG激活的淋巴细胞对膀胱肿瘤细胞株TBC-1杀伤作用的实验研究. *中国实用医药杂志* 2007; 10: 21-23
 - 13 Hameed A, Sezian N, Thwaini A. Bladder contracture: review for intravesical bacillus Calmette-Guerin complication. *Can J Urol* 2007; 14: 3745-3749
 - 14 Agrawal MS, Agrawal M, Bansal S, Agarwal M, Lavania P, Goyal J. The safety and efficacy of different doses of bacillus Calmette-Guerin in superficial bladder transitional cell carcinoma. *Urology* 2007; 70: 1075-1078
 - 15 兰卫华, 靳风烁, 王洛夫, 谢芳, 王晶. 卡介苗与丝裂霉素C膀胱灌注预防浅表性膀胱癌复发疗效及毒性比较的Meta分析. *中华泌尿外科杂志* 2006; 1: 29-32
 - 16 任淑萍, 万敏, 丛宪玲, 吴秀丽, 王莉, 卫红飞, 王燕媚, 于永利, 王丽颖. 卡介苗作为抗肿瘤重组蛋白疫苗佐剂的研究. *中国免疫学杂志* 2007; 6: 526-530
 - 17 龚福生, 郑秋红, 应敏刚, 刘胜, 谢云青, 陈蓉明. 小鼠肠癌HSP70多肽复合物的纯化及其抗肿瘤免疫效应. *中华肿瘤防治杂志* 2007; 15: 1132-1135
 - 18 米振国, 张旭, 任连生, 刘红耀, 王全红, 韩存芝, 崔援朝, 郭素堂. 同种肿瘤来源的HSP70-PC对原位大鼠膀胱肿瘤的治疗研究. *肿瘤研究与临床* 2006; 2: 81-84
 - 19 Bak SP, Amiel E, Walters JJ, Berwin B. Calreticulin requires an ancillary adjuvant for the induction of efficient cytotoxic T cell responses. *Mol Immunol* 2008; 45: 1414-1423
 - 20 Wei MQ, Mengesha A, Good D, Anne J. Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer Lett* 2008; 259: 16-27
 - 21 蒋幼凡, 沈庆, 薛亚梅. 卡介菌多糖核酸对肺癌细胞粘附及骨架结构的影响. *第三军医大学学报* 2004; 13: 1178-1180
 - 22 Yutkin V, Pode D, Pikarsky E, Mandelboim O. The expression level of ligands for natural killer cell receptors predicts response to bacillus Calmette-Guerin therapy: a pilot study. *J Urol* 2007; 178: 2660-2664
 - 23 Naoe M, Ogawa Y, Takeshita K, Morita J, Iwamoto S, Miyazaki A, Yoshida H. Bacillus Calmette-Guerin-pulsed dendritic cells stimulate natural killer T cells and gammadeltaT cells. *Int J Urol* 2007; 14: 532-538; discussion 538

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。(常务副总编辑: 张海宁 2008-06-18)