

B-CLL 患者瘤细胞膜表面 Id-ScFv 和人 Hsp70 的制备及其抗瘤效应

叶庆^{1,2}, 王志华³, 秦叔逵², 周红艳¹, 邓昊¹, 沈关心⁴

Preparation of Heat Shock Protein 70 (Hsp70) and Idiotypic Determinant Single-chain Antibody (Id-ScFv) in a Patient with B-cell Chronic Lymphatic Leukemia (B-CLL) and Antitumor Effect of Peptide Complex Hsp70-Id

YE Qin^{1,2}, WANG Zhi-Hua³, QIN Shu-Kui², ZHOU Hong-Yan¹, DENG Hao¹, SHEN Guan-Xin⁴

1. 江汉大学肿瘤研究所,
湖北 武汉 430056
2. 中国人民解放军第八一医院
全军肿瘤中心,
江苏 南京 210002
3. 华中科技大学同济医学院
附属同济医院泌尿外科,
湖北 武汉 430030
4. 华中科技大学同济医学院
免疫学系,
湖北 武汉 430030

1. Institute of Tumor,
Jiangnan University,
Wuhan, Hubei, 430056,
P. R. China
2. People's Liberation Army
Cancer Center,
The 81st Hospital of
People's Liberation Army,
Nanjing, Jiangsu, 210002,
P. R. China
3. Department of Urology,
Tongji Hospital,
Tongji Medical College,
Huazhong University of Science
and Technology,
Wuhan, Hubei, 430030,
P. R. China
4. Department of Immunology,
Tongji Medical College,
Huazhong University of Science
and Technology,
Wuhan, Hubei, 430030,
P. R. China

通讯作者: 沈关心

Correspondence to: SHEN Guan-Xin
Tel: 86-27-83692611
Fax: 86-27-83692611
E-mail: guanxin_shen@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金
(No. 30070325)

Grant: National Natural Science
Foundation of China
(No. 30070325)

收稿日期: 2007-06-11
修回日期: 2007-10-09

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Idiotypic determinant (Id) of malignant B lymphocyte surface membrane immunoglobulin (Smlg) is not only a specific marker for chronic B-cell lymphatic leukemia (B-CLL) but also a specific antigen as an attractive target for active immunotherapy. However, as a small self antigen, it has poor immunogenicity. As an important molecule for antigen presentation, heat shock protein 70 (Hsp70) can efficiently strengthen the immunogenicity of antigen. In this study, we prepared Hsp70 and idiotypic determinant single-chain antibody (Id-ScFv) fragment against Smlg in patient with B-CLL and explored the *in vitro* antitumor effect of peptide complex Hsp70-Id and the possible immune mechanism. METHODS: Id-ScFv and human Hsp70 proteins were expressed in *E.coli* and identified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and purified by metal chelate chromatography and DEAE ion-exchange chromatography. The purified Hsp70 was combined with the prepared Id-ScFv to produce peptide complex Hsp70-Id *in vitro*. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy human were stimulated with Id-ScFv, HSP70 and HSP70-Id, separately. The proliferation rate of PBMCs was determined by MTT assay; the changes of T lymphocyte subsets were assessed by flow cytometry (FCM); the levels of interleukin-12 (IL-12) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in supernatant were detected by ELISA. Killing efficiency of activated PBMCs to chronic B-cell leukemia cell line Daudi, chronic myelogenous leukemia cell line K562 and hepatoma carcinoma cell line HepG2 were tested by cell counting. RESULTS: Id-ScFv and Hsp70 were expressed successfully in *E.coli*. The proliferation rate of PBMCs and secreting levels of IL-12 and TNF- α of lymphocytes in Hsp70-Id group were significantly higher than those in Id-ScFv and HSP70 groups ($P<0.05$), which were significantly higher than that in negative control group ($P<0.05$). The proportion of CD8⁺ T cells was increased in Hsp70-Id, Id-ScFv and Hsp70 groups, and the most significant increase was observed in Hsp70-Id group. The activated PBMCs in both Hsp70-Id and Id-ScFv groups had stronger cytotoxic activities to Daudi cells than to K562 or HepG2 cells ($P<0.05$), and the effect was significantly stronger in Hsp70-Id group than in Id-ScFv group ($P<0.001$). CONCLUSION: Purified Hsp70 and Id-ScFv proteins in a B-CLL patient were prepared successfully. Hsp70-Id complex could significantly enhance specific antitumor effect of PBMCs *in vitro* through improving the proliferation of PBMCs, activating specific CD8⁺ T cells, and inducing secretion of Th1 type cytokines. KEYWORDS: Chronic B-cell lymphatic leukemia (B-CLL); Idiotypic determinant single-chain antibody (Id-ScFv); human heat shock protein 70 (Hsp70)

【摘要】 背景与目的:恶性 B 型淋巴细胞表面免疫球蛋白(surface membrane immunoglobulin, SmIg)表达的独特型决定簇(Idiotypic determinant, Id)不仅是该类肿瘤特异性标记,也是该类肿瘤的特异性抗原,可诱导机体对其产生特异性免疫应答,但由于 Id 是自体成分,分子量小,免疫原性较弱。人热休克蛋白 70(heat shock protein, Hsp70)是一类重要的抗原提呈分子,能有效加强抗原肽的免疫原性。本研究通过制备慢性 B 型淋巴细胞性白血病(B-cell chronic lymphatic leukemia, B-CLL)患者瘤细胞膜表面独特型单链抗体(Idiotypic determinant single-chain antibody, Id-ScFv)和 Hsp70 两种蛋白,在体外研究两者联合抗癌作用并初步探讨其机制。方法:分别在大肠杆菌中表达 Id-ScFv 和 Hsp70 两种蛋白,表达产物经 SDS-PAGE 电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)及 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)检测鉴定后,分别用金属螯合层析和离子交换层析纯化并在体外将这两种蛋白结合成复合物(Hsp70-Id)。用 MTT 法及检测 Id-ScFv 组、人 Hsp70 组及 Hsp70-Id 组刺激外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的增殖作用,以 ELISA 法检测各组培养上清中 IL-12 和 TNF- α 水平,并用流式细胞术检测各组 PBMC 亚群的变化。用活细胞计数法检测各组被激活的 PBMC 对慢性 B 细胞白血病细胞株 Daudi、慢性髓性白血病细胞株 K562 和肝癌细胞株 HepG2 的杀伤作用。结果:经 SDS-PAGE 电泳分析纯化后表达产物的分子量大约为 30 ku (Id-ScFv 蛋白)和 70 ku (Hsp70 蛋白),分别与其理论预期值相符。PBMC 的增殖作用、培养上清中 IL-12 和 TNF- α 水平, Hsp70-Id 组明显强于 Id-ScFv 组和人 Hsp70 组($P<0.05$),而 Id-ScFv 组和人 Hsp70 组明显强于阴性对照组($P<0.05$)。流式细胞术检测显示在 Hsp70-Id 组、Id-ScFv 组和人 Hsp70 组 PBMC 中 CD8⁺ T 细胞亚群的百分率均有增加,其中 Hsp70-Id 组最明显。在 Id-ScFv 组 and Hsp70-Id 组激活的 PBMC 对 Daudi 细胞的杀伤作用较 K562、HepG2 细胞强($P<0.05$),且 Hsp70-Id 组激活的 PBMC 对 Daudi 细胞的杀伤作用明显强于 Id-ScFv 组($P<0.001$)。结论:成功获取 B-CLL 患者瘤细胞膜表面 Id-ScFv 和人 Hsp70 两种纯化蛋白;Hsp70-Id 在体外可增强 PBMC 的特异性杀瘤作用,其机制可能与促进 PBMC 的增殖、活化 CD8⁺ T 细胞并诱导具有抗肿瘤作用的 Th1 型细胞因子的分泌有关。

关键词: 慢性 B 淋巴细胞性白血病;表面独特型单链抗体;人热休克蛋白 70

中图分类号:R73-36 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2008)02-0133-06

恶性 B 淋巴瘤瘤细胞膜表面免疫球蛋白的独特型决定簇(SmIg)不仅是肿瘤特异性标记,也是淋巴瘤特异性抗原之一。所以可用其独特型抗原(Id)作为疫苗进行主动免疫治疗^[1,2]。但由于 Id 是自体成分,免疫原性较弱,且肿瘤患者免疫功能低下,故 Id 诱导机体免疫应答能力较弱。Hsps 是一类重要的抗原提呈分子,能够与抗原肽结合,并将其提呈给

抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APCs)。本研究将前期构建的慢性 B 细胞白血病细胞 SmIg 原核表达载体 pHEN2 和人 Hsp70 原核表达载体 pMSH70 在大肠杆菌中表达,并将这两种蛋白在一定条件下在体外结合形成 Hsp70-Id,研究其抗癌作用并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pHEN2-ScFv: 含有 B-CLL 患者瘤细胞膜表面 Id-ScFv 的 DNA 序列,由本课题组构建^[3];质粒 pMSH70: 含有编码人 Hsp70 的 DNA 序列,该质粒由同济医学院生化与分子生物学系冯作化教授惠赠;大肠杆菌 HB2151 和 XL-1-blue: 本课题组储存;IPTG: Ameresco 产品;Ni²⁺-NTA-Agarose: 德国 QIAGEN 公司产品;DEAE-葡萄糖凝胶 A-52: Pharmacia 进口分装;人 Hsp70、人 IL-1、人 TNF- α ELISA 检测试剂盒均为 Promega 公司产品;辣根过氧化物酶标记的 His 抗体(5 mg/mL)为 CRPinc 公司产品;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(0.8 mg/mL)为上海生物制品研究所产;MTT 为 Sigma 公司产品;Bio-Tek Instrument 自动快速酶标仪为 Bio-Tek 公司产品;抗 D4-FITC 抗体,抗 CD8-FITC 抗体,抗 CD3-FITC 抗体均为 Sigma 公司产品;流式细胞仪为美国 BD 公司产品;Daudi(慢性 B 细胞白血病细胞株)、K562(慢性髓性白血病细胞株)和 HepG2(肝癌细胞株)均为本室长期保存的细胞株,用含 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养基,置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于以下实验。

1.2 方法

1.2.1 B-CLL 患者瘤细胞膜表面 Id-ScFv 的制备及纯化 含 Id-ScFv 基因(一端融合 6 个组氨酸纯化标签)的阳性转化菌 pHEN2-ScFv 培养过夜,用 IPTG 诱导后离心取上清过 Ni²⁺柱,用不同浓度的咪唑缓冲液洗脱,收集各段的柱出口液,检测其蛋白浓度。将各管样品蛋白合并液用 PBS 透析,以 PEG20000 浓缩,经除菌过滤,置 4℃备用。

1.2.2 B-CLL 患者瘤细胞膜表面 Id-ScFv 的 SDS-PAGE 电泳鉴定和 ELISA 检测鉴定 将上述纯化产物加入已制备好的 SDS-PAGE 上样孔中,电泳,而后用考马斯亮蓝染色,脱色液脱色。用不同浓度的咪唑缓冲液梯度洗脱,每 3 mL 收集一管,共收集 180 管。将 180 个样品加入两张 96 孔酶标板,加入辣根过氧化物酶标记的 His 抗体,并设阴性(PBS-

吐温)和阳性(His-probe)对照,酶标光度计 495nm 测每孔吸光度(absorbance, A)值。

1.2.3 人 Hsp70 蛋白的制备及纯化 将含有 pMSH70 的 XL-1-blue 0.5 mL 加入 M9ZB 培养基中,扩增至 A 值为 0.3~0.5 时,加入诱导剂至终浓度为 0.02 mmol/L IPTG/5 mmol/L 乳糖诱导,用超声波破菌,将上清加入已平衡好的 DEAE 柱,用 20 mmol/L PBS 洗脱,再以含 100 mmol/L NaCl 的 20 mmol/L PBS 洗脱,将含有目的蛋白的各管收集液合并,加入 ATP 至终浓度 3 mmol/L,静置过夜以去除目的蛋白可能的结合肽,再次过柱、洗脱。测量各管样品蛋白含量。将各管样品蛋白合并液用 PBS 透析,以 PEG20000 浓缩,经除菌过滤,置 4℃ 备用。

1.2.4 人 Hsp70 蛋白的 SDS-PAGE 电泳鉴定和 ELISA 检测鉴定 将上述纯化产物加入已制备好的 SDS-PAGE 上样孔中,电泳,而后用考马斯亮蓝染色,脱色液脱色。用人 Hsp70 ELISA 检测试剂盒检测上述纯化产物中人 Hsp70 蛋白的含量,操作按说明书进行。

1.2.5 Hsp70-Id 制备 取过滤除菌的 Hsp70 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)15 μL , Id-ScFv (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)25 μL , ADP (10 mmol/L)5 μL , MgCl_2 (10 mmol/L)5 μL , 37℃ 温育 2 h。

1.2.6 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)的增殖作用 常规分离 PBMC,标本来源于 5 个健康志愿者,每次实验的细胞来源于同一人。洗涤并用含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养液(培养液中含终浓度为 200 U/mL 的 IL-2)悬浮,计数并调整细胞浓度至 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 备用。96 孔板每孔加入 100 μL $2 \times 10^6/\text{mL}$ PBMC 悬液,分别加入 Id-ScFv (终浓度为 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Id-ScFv 组)、人 Hsp70 蛋白(终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 人 Hsp70 组)、Hsp70-Id (本研究中 Hsp70-Id 的剂量及浓度按 Hsp70-Id 中所含 Id-ScFv 的量进行计算)按 5 倍稀释法加入细胞孔中,使其终浓度分别为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.0048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.00096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。每份标本设 3 复孔,加入等体积 RPMI-1640 液作为阴性对照,加入结核菌素 PPD (终浓度为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作为阳性对照,置 37℃、5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.6.1 MTT 法检测各组 PBMC 的增殖率 72 h 后,用 MTT 法测定各组 570nm 处 A 值。根据公式计算各组的增殖率:

增殖率=(实验组 A 值-阴性对照组 A 值)/阴

性对照组 A 值 $\times 100\%$

1.2.6.2 检测各组培养上清中 IL-12 和 TNF- α 含量 收集上述各组(Hsp70-Id 组取终浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 这一组为例)在培养箱中培养 5 d 的培养上清,用人 IL-12 ELISA 试剂盒和人 TNF- α ELISA 试剂盒分别检测其中 IL-12 和 TNF- α 的浓度。

1.2.6.3 流式细胞术检测各组 PBMC 亚群的变化 收集上述各组(Hsp70-Id 组取终浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 这一组为例)在培养箱中培养 5 d 的细胞和荧光抗体一起在 4℃ 环境下孵育 35~50 min,用 Hanks 液洗涤两次,标记后的细胞用 FACScan (Bacton Dickinson)行单色分析。抗体分别为抗 CD4-FITC 抗体、抗 CD8-FITC 抗体。

1.2.7 激活的 PBMC 对不同肿瘤细胞的杀伤作用 将各组在培养箱中培养 5 d 的细胞为效应细胞,以 Daudi、K562、HepG2 (细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$)为靶细胞。将各组效应细胞转到 96 孔板中,再分别加入 Daudi、K562、HepG2,按效:靶=20:1 的比例混合,并设对照组 1(效应细胞为新鲜分离的 PBMC)、对照组 2(效应细胞为培养 5 d 的未刺激的 PBMC),置 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。5%伊红染色,显微镜观察并用白细胞计数板计数,计算细胞死亡率。

细胞死亡率=(实验组-阴性对照组细胞死亡率)/4 个大方格内淋巴细胞总数 $\times 100\%$

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行 t 检验、 χ^2 检验及 Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 具统计学意义。

2 结果

2.1 可溶性 Id-scFv 蛋白的表达、纯化及鉴定

含 Id-scFv 基因的阳性转化菌 pHEN2-ScFv 培养过夜,上清离心后做 12% SDS-PAGE 电泳分析可见, IPTG 诱导 6 h 时出现约 30 ku 的特异性蛋白条带,与目的蛋白 Id-ScFv 理论推算值相符(图 1A)。经 ELISA 鉴定证明,在咪唑洗脱液 MCAC-20~MCAC-40 区可见一明显组氨酸标记蛋白吸收峰,即为 Id-scFv 蛋白洗脱峰,最大浓度为 0.547 mg/mL。

2.2 人 Hsp70 蛋白的表达、纯化及鉴定

经 ELISA 鉴定证明,经过 DEAE-Sephadex A-52 离子交换柱层析法纯化的人 Hsp70 蛋白产量可达 1.136 mg/mL。经 SDS-PAGE 电泳鉴定,在分子量大约 70 ku 处,可见特异性蛋白染色条带。与目的蛋白人 Hsp70 理论推算值相符。见图 1。

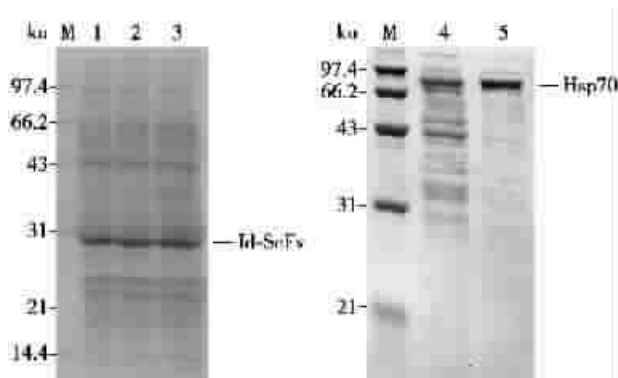


图1 重组阳性菌表达 Id-ScFv 和人 Hsp70 蛋白的 SDS-PAGE 电泳鉴定图

Figure 1 Identification of recombinant idiotype determinant single-chain antibody (Id-ScFv) and human heat shock protein 70 (Hsp70) by SDS-PAGE

Lane M: protein molecular weight marker; lanes 1-3: pHEN2-containing HB2151 induced by IPTG for 6, 12, and 18 h, separately; lane 4: expression products in *E.coli* B2151 containing recombinant plasmid pHEN2-ScFv; lane 5: purified Hsp70 protein by DEAE-Sephadex A-52 ion-exchange chromatography.

2.3 MTT 法检测各组 PBMC 的增殖率

PBMC 的增殖率在 Id-ScFv 组、人 Hsp70 组、Hsp70-Id 组 (终浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 较阴性对照组明显增高 ($P<0.05$), Hsp70-Id 组明显强于 Id-ScFv 组和人 Hsp70 组 ($P<0.05$), 而 Id-ScFv 组和人 Hsp70 组明显强于阴性对照组 ($P<0.05$)。Hsp70-Id 的浓度在 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 0.00096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间时, PBMC 的增殖率与 Hsp70-Id 呈剂量依赖关系 (相关系数 $r=0.999$)。当 Hsp70-Id 浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右时, 对 PBMC 增殖作用较明显。见图 2, 3。

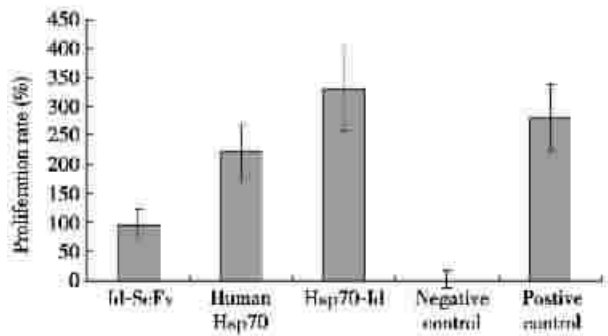


图2 Hsp70-Id 刺激 PBMC 增殖的作用

Figure 2 Proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with complex Hsp70-Id

2.4 检测各组培养上清中 IL-12 和 TNF- α 水平

各组培养上清中 IL-12 和 TNF- α 水平在 Id-ScFv 组、人 Hsp70 组、Hsp70-Id 组较阴性对照组明显增高 ($P<0.05$), Hsp70-Id 组明显强于 Id-ScFv 组

和人 Hsp70 组 ($P<0.05$), 而 Id-ScFv 组和人 Hsp70 组明显强于阴性对照组 ($P<0.05$)。见图 4。

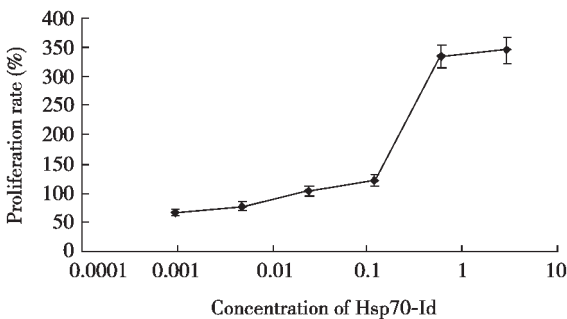


图3 不同浓度 Hsp70-Id 对 PBMC 增殖的影响

Figure 3 Proliferation of PBMCs stimulated with different concentrations of Hsp70-Id

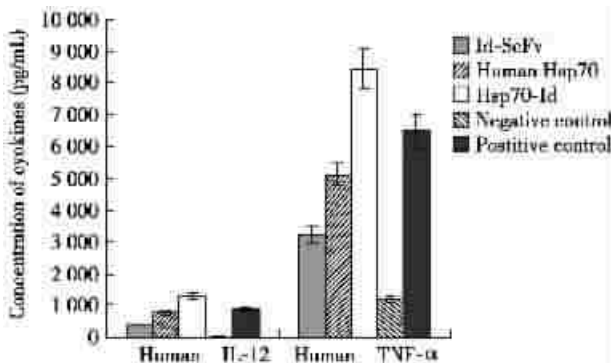


图4 增殖的 PBMC 培养上清中 IL-12 和 TNF- α 水平

Figure 4 The levels of interleukin-12 (IL-12) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in culture supernatant of proliferating PBMCs

2.5 流式细胞术检测各组 PBMC 中 T 细胞亚群的变化

流式细胞术检测显示在 Hsp70-Id 组、Id-ScFv 组和人 Hsp70 组 PBMC 中 CD8⁺ T 细胞亚群的百分率较阴性对照组均有增加 ($P<0.05$), 其中 Hsp70-Id 组最明显 ($P<0.001$)。见图 5。

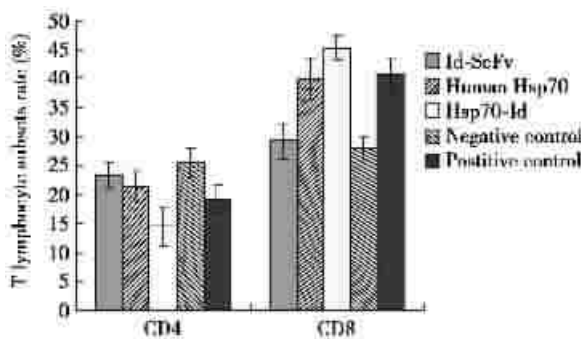


图5 各组增殖的 PBMC 中 T 细胞亚群的变化

Figure 5 T lymphocyte subsets in proliferating PBMCs

2.6 激活的 PBMC 对不同肿瘤细胞的杀伤作用

在倒置显微镜下可见, 对照组 2 的 3 种靶细胞、Hsp70-Id 组及 Id-ScFv 组的靶细胞 K562 和 HepG-2 细胞形态基本正常, 死亡率均低于 10%, 而在人 Hsp70 组和对照组 1 的 3 种靶细胞、Hsp70-Id 组及 Id-ScFv 组的靶细胞 Daudi 均可见明显的细胞形态异常及死亡的结构变化。数据通过统计学处理显示: 在 Id-ScFv 组和 Hsp70-Id 组, 激活的 PBMC 对 Daudi 细胞的杀伤作用较 K562 细胞、HepG2 细胞强 ($P<0.05$); 且 Hsp70-Id 组激活的 PBMC 对 Daudi 细胞的杀伤作用明显强于 Id-ScFv 组 ($P<0.01$), 而人 Hsp70 组激活的 PBMC 对 3 种靶细胞的杀伤作用均强于阴性对照组 ($P<0.05$); 由于 K562 是 NK 细胞敏感的细胞株, 新鲜分离的 PBMC (对照组 1) 对 K562 细胞的杀伤作用较 Daudi 细胞、HepG-2 细胞强 ($P<0.05$)。见图 6。

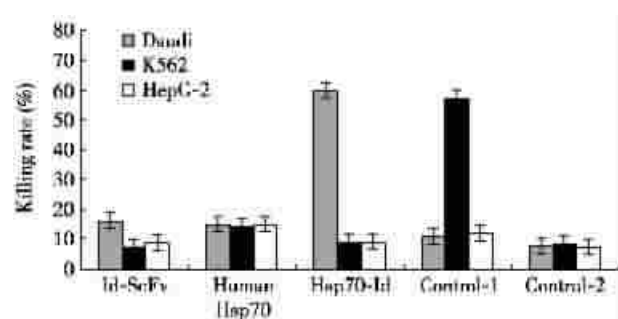


图 6 激活的 PBMC 对不同肿瘤细胞的杀伤作用

Figure 6 Killing efficiency of activated PBMCs to different tumor cells

The effector cells in Control-1 group are fresh PMBCs; the effector cells in Control-2 are unstimulated PMBCs that cultured for 5 days.

3 讨 论

肿瘤细胞在恶性增殖过程中, 细胞内可产生众多的可被 CTLs 识别的抗原肽^[4,5]。恶性 B 淋巴细胞表面免疫球蛋白 (SmIg) 表达的独特型决定簇 (Id) 不仅是该类肿瘤特异性标记, 也是类肿瘤的特异性抗原。这种蛋白可作为靶分子供自体 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞识别, 诱导机体对其产生特异性免疫应答, 所以可用 Id 作为恶性 B 淋巴瘤的特异性疫苗进行主动免疫治疗^[1,2]。但由于 Id 是自体成分, 分子量小, 免疫原性较弱, 且肿瘤患者免疫功能低下, 故 Id 诱导机体免疫应答能力较弱。本实验和我们以前的工作都证明^[3]: 在高浓度下 (550 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Id-ScFv 蛋白具有较弱的诱导 PBMC 细胞增殖作用, 其激活的 PBMC 具有较弱的特异性杀瘤作用; 但浓

度较低时, 这种作用并不明显。这表明 Id-ScFv 蛋白虽具有一定抗原性, 但其抗原性很弱。所以若以此作为抗原诱导机体产生保护性免疫应答, 必须与佐剂或载体联合作用以增强其免疫原性。

Hsp70 最初作为一类分子伴侣被人们认识, 现在发现它们还是一类重要的抗原提呈分子, 能够和抗原肽结合, 并将后者提呈给 APCs。有文献报道 Hsp70 对抗原的提呈具有放大作用, 仅需结合 2 ng 多肽即可产生有效的免疫应答^[6]。因此, Hsp70 可作为一种理想的抗原提呈分子, 有效加强抗原肽的免疫原性。

鉴于此, 本研究将前期构建的慢性 B 细胞白血病患者 SmIg 原核表达载体 pHEN2 和 Hsp70 原核表达载体 pMSH70 在大肠杆菌中表达, 纯化并鉴定 Id-scFv 蛋白和人 Hsp70 两种蛋白。由于 Hsp70 具有在腺苷二磷酸 (adenosine diphosphate, ADP) 存在的条件下结合多肽的性质^[7], 本实验室已用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 和 Western blot 证明在 1 mmol/L ADP 和 1 mmol/L MgCl_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下温育 2 h 足以形成复合物 Hsp70-Id。该 Hsp70-Id 对 PBMC 的增殖作用明显强于 Id-ScFv 组和人 Hsp70 组 ($P<0.05$), 而 Id-ScFv 组和人 Hsp70 组明显强于阴性对照组 ($P<0.05$)。说明 Hsp70-Id、Id-ScFv 蛋白及人 Hsp70 蛋白均可激活 PBMC, 诱导其增殖, 但以 Hsp70-Id 的作用最强。另外在 Hsp70-Id 浓度梯度实验中, Hsp70-Id 浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时就能够刺激 PBMC 的增殖和活化, 与浓度为 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小分子抗原肽刺激能力比较, 两者肽的用量相差近 1000 倍, 说明人 Hsp70 蛋白能增强 Id-ScFv 的免疫原性。

在细胞杀伤实验中, Id-ScFv 组和 Hsp70-Id 组激活的 PBMC 对 Daudi 细胞的杀伤作用较 K562、HepG-2 细胞强, 显示 Id-ScFv 和 Hsp70-Id 激活的 PBMC 的杀伤作用具有很好的细胞特异性, 并且 Hsp70-Id 激活的 PBMC 的这种特异性的杀伤作用要明显强于 Id-ScFv 组 ($P<0.01$), 说明 Id-ScFv 能诱导针对 B-CLL 的特异性的杀瘤作用, 而 Hsp70 和 Id 结合形成肽复合物后可以有效增强这种特异性杀伤的诱导。为探讨这种特异性杀瘤作用形成的机制, 我们检测了各种肽激活的 PBMC 中 T 细胞亚群的变化和细胞上清中细胞因子的变化。流式细胞术检测显示在 Hsp70-Id 组、Id-ScFv 组和人 Hsp70 组 PBMC 中 CD8⁺ T 细胞亚群的百分率均有增加, 其中 Hsp70-Id 组最明显, 说明 Hsp70-Id 具有的强大的

杀瘤作用可能与 CD8⁺T 细胞亚群的增加密切相关。激活的 PBMC 的培养上清中 IL-12 和 TNF- α 水平在 Hsp70-Id 组、Id-ScFv 组和人 Hsp70 组 PBMC 中 CD8⁺T 细胞亚群的百分率均有增加, 其中Hsp70-Id 组最明显, 也表明该 Hsp70-Id 诱导的免疫反应可明显增加 Th1 类型的细胞因子的产生, 能打破肿瘤患者体内由于 Th1/Th2 类细胞因子间的漂移所引起的免疫耐受, 增强机体抗肿瘤免疫效应^[8]。

总之, 本研究成功获取恶性 B 淋巴细胞瘤患者的恶性 B 淋巴细胞膜表面 Id-ScFv 和人 Hsp70 两种纯化蛋白; 人 Hsp70 蛋白能增强 Id-ScFv 的免疫原性, 它们形成的 Hsp70-Id 激活的 PBMC 具有有效的和特异的杀瘤作用, 其机制可能与促进 PBMC 的增殖、活化 CD8⁺T 细胞并诱导具有抗肿瘤作用的 Th1 型细胞因子的分泌有关。由此可见 Hsp70-Id 是一种有望用于临床对恶性 B 淋巴细胞瘤进行主动免疫治疗的特异性疫苗。

[参 考 文 献]

[1] Better M, Chang C P, Robinson R R, et al. Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment [J]. Science,

1988,240(4855):1041-1043.
[2] Skerra A, Pluckthun A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli [J]. Science, 1988,240(4855):1038-1041.
[3] Zhu L, Liao W, Zhu H, et al. Construction, expression and *in vitro* biological behaviors of Ig scFv fragment in patients with chronic B cell leukemia [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2006,26(2):157-160,171.
[4] Van den Eynde B, Brichard V G. New tumor antigens recognized by T cells [J]. Curr Opin Immunol, 1995,7(5):674-681.
[5] Robbins P F, Kawakami Y. Human tumor antigens recognized by T cell [J]. Curr Opin Immunol, 1996,8(5):628-636.
[6] Blachere N E, Li Z, Chandawarkar R Y, et al. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity [J]. J Exp Med, 1997,186(8):1315-1322.
[7] Facciponte J G, Wang X Y, Macdonald I J, et al. Heat shock proteins HSP70 and GP96: structural insights [J]. Cancer Immunol Immunother, 2006,55(3):339-346.
[8] Wu Y, Wan T, Zhou X, et al. Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8⁺ CTL response by dendritic cell vaccine [J]. Cancer Res, 2005,65(11):4947-4954.

[编辑及校对:杨允贵]