

肿 瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001748

人天冬氨酸- β -羟化酶树突状细胞疫苗
对肝癌细胞系的体外作用研究周玉姣¹, 石 果², 许晓蕾¹, 罗 雪¹, 张苑玲¹, 付婧婕¹, 曾爱中¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院感染科、重庆市传染病寄生虫病学重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第一医院普外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:通过对携带人天冬氨酸- β -羟化酶(aspartate- β -hydroxylase, AAH)基因的树突状细胞杀伤肝癌细胞系的研究,探索可用于防治肝癌的树突状细胞疫苗。**方法:**重组腺病毒(Ad-AAH-IRES2-EGFP)感染 C57BL/6 小鼠骨髓未成熟树突状细胞(dendritic cells, DCs)制备携带 AAH 基因的 DCs(AAH-DCs),与同体小鼠脾脏 T 淋巴细胞共培养后作为效应细胞,以肝癌细胞株 HepG2 和 Huh7 分别作为靶细胞,效应细胞分别和靶细胞共培养 24 h, CCK-8 法检测效应细胞对靶细胞增殖的影响;流式细胞术检测效应细胞对靶细胞凋亡的影响。将 AAH-DCs 连续 3 次皮下注射免疫 C57BL/6 小鼠,乳酸脱氢酶释放法检测免疫后小鼠脾脏 T 淋巴细胞对靶细胞的裂解效应。**结果:**AAH-DCs 与 T 淋巴细胞共培养组靶细胞的增殖能力明显低于对照组 ($P=0.000$),凋亡率明显高于对照组 ($P=0.000$);实验组靶细胞的裂解率明显高于对照组 ($P=0.000$)。**结论:**荷载 AAH 基因的树突状细胞疫苗能够诱导产生细胞毒性 T 淋巴细胞从而杀伤表达 AAH 的肝癌细胞。

【关键词】肝癌细胞;树突状细胞;细胞毒性 T 淋巴细胞;天冬氨酸- β -羟化酶

【中图分类号】R392.11;R735.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-01-24

Function of dendritic cells vaccines targeting aspartate- β -hydroxylase
on hepatocellular carcinoma *in vitro*Zhou Yujiao¹, Shi Guo², Xu Xiaolei¹, Luo Xue¹, Zhang Yuanlin¹, Fu Jingjie¹, Zeng Aizhong¹

(1. Department of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,

Key Laboratory of Chongqing for Infectious Disease and Parasitic Disease;

2. Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the antitumor effect of dendritic cells (DCs) vaccine targeting aspartate- β -hydroxylase (AAH) gene against hepatocellular carcinoma (HCC) cells HepG2 and Huh7 for searching DCs vaccine for hepatocarcinoma. **Methods:** AAH-DCs vaccine was prepared *in vitro* via infecting DCs with recombinant adenovirus vector encoding AAH. T cells co-cultured with AAH-DCs vaccine were served as the effector cells and human HCC cell lines HepG2 and Huh7 were regarded as the target cells. The proliferation and apoptosis of target cells, after co-culturing with the effector cells for 24h, were detected by CCK-8 and FCM analysis respectively. C57BL/6 mice were immunized with AAH-DCs vaccines by three continuous subcutaneous injections, and the cytotoxic effect of T cells against target cells was observed by lactate dehydrogenase (LDH) release assay. **Results:** Compared with the control groups, the declined proliferation activity of target cells in AAH-DCs vaccine group was found by CCK-8, while increased apoptosis rate of target cells in AAH-DCs vaccine group was tested by FCM ($P=0.000$). Additionally, LDH release assay showed that the cytotoxic effect of target cells in AAH-DCs vaccine group was higher than that in other control groups ($P=0.000$). **Conclusion:** DCs vaccines targeting AAH can induce the production of cytotoxicity T lymphocytes for fulfilling the killing of HCC cells expressing AAH gene.

【Key words】hepatocellular carcinoma; dendritic cells; cytotoxicity T lymphocytes; aspartate- β -hydroxylase

作者介绍: 周玉姣, Email: 553921304@qq.com,

研究方向: 病毒性肝炎的治疗及预防。

通信作者: 曾爱中, Email: aizhong9@sina.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180522.1625.060.html>

(2018-05-28)

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)致死率居恶性肿瘤第 2 位^[1]。尽管可采取手术切除、肝移植等“治愈性”治疗手段,但由于肝癌易播散、易转移、复发率高等特点,患者 5 年生存率仍很低^[2],因此仍迫切需要探索新型有效的 HCC 治疗模式和方法。

天冬氨酸- β -羟化酶(aspartate- β -hydroxylase, AAH)是一种人鼠高度同源的 II 型跨膜蛋白,在人肝细胞癌和胆管细胞癌中高表达^[3],而癌旁组织及正常组织中几乎不表达^[4]。Xian 等^[5]研究发现 AAH 过表达与 HCC 的肿瘤病灶大小、侵袭生长速度呈正相关。Wang 等^[6]研究发现肝癌患者肿瘤中 AAH 表达水平越高,患者术后预后越差。Aihara 等^[7]利用计算机辅助技术设计并研制出一类以 AAH 催化位点为靶点的小分子抑制剂,结果显示该小分子抑制剂可有效降低 AAH 蛋白 80% 的酶活性,并显著抑制人肝癌细胞株 FOCUS 的增殖、转移和侵袭能力。因此,AAH 作为新型 HCC 高特异性分子标记物和生物治疗靶点在肝癌发生发展、病理生理机制及抗癌药物研发等方面具有重要研究价值。

近几十年来,随着肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)不断被发现以及部分肿瘤疫苗相继研发并应用于临床,人们再次看到了肿瘤治疗的希望。由于肿瘤相关抗原的免疫原性非常弱,导致肿瘤细胞常常逃避免疫监视。为克服这一难点, DNA 疫苗、树突状细胞(dendritic cells, DCs)疫苗等多种类型的肿瘤疫苗应运而生。DNA 疫苗虽能增强外源基因在活体内的表达^[7],但由于不能确保目的基因在机体内的充分表达而导致应用受限。DCs 疫苗利用 DCs 的高效专职抗原提呈功能,主动、靶向地递呈抗原,极大地发挥了刺激细胞免疫应答的作用,因而在防止肿瘤复发与转移等综合治疗措施中显示出巨大潜力^[8-9]。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8 周龄健康雌性 C57BL/6 小鼠,体质量(20.4 ± 1.0) g,购自重庆医科大学实验动物中心;人肝癌细胞系 HepG2、Huh7 由本实验室传代保存;重组小鼠 GM-CSF、IL-4、TNF- α 购自美国 Peprotech 公司;胎牛血清、RPMI1640 和高糖 DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司;兔抗人 AAH 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。CCK-8 试剂盒、LDH 细胞毒性检测试剂

盒购自碧云天生物公司;重组人 AAH 腺病毒载体(Ad-AAH-IRES2-EGFP)、空腺病毒(Ad-IRES2-EGFP)由本课题组构建并保存。

1.2 方法

本研究获得重庆医科大学附属第一医院实验动物伦理委员会的审查批准(2017-189)。

1.2.1 构建 AAH-DCs 疫苗 按照文献方法^[10]体外分离培养 C57BL/6 小鼠股骨、胫骨来源的 DCs,至培养第 6 天,收集细胞 $1\ 000\ r/min$ 离心 5 min,无菌 PBS 重悬细胞,调整密度为 1×10^6 个/mL 并以 200 μL /孔接种于 12 孔板中,在感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 200 的条件下分别加入滴度为 5×10^9 IFU/mL 携带目的基因的重组腺病毒(Ad-AAH-IRES2-EGFP)及滴度为 1×10^{10} IFU/mL 的空腺病毒(Ad-IRES2-EGFP),同时设无病毒感染的 DCs 组。培养 2 h 后加入总体积为 0.2 mL 的含 5 ng/mL 细胞因子(GM-CSF、IL-4 和 TNF- α)和 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,继续培养至 48 h 后收集各组细胞,Western blot 检测 DCs 中 AAH 蛋白的表达。

1.2.2 CCK-8 法检测效应细胞对肝癌细胞增殖的影响 无菌分离 C57BL/6 小鼠脾脏,反复冲洗脾脏至变白,红细胞裂解液作用 3 min,获取 T 细胞。T 细胞分别与上述各组 DCs 以 20:1 的比例共培养,诱导产生细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxicity T lymphocytes, CTLs)。72 h 后分别收集上述细胞作为效应细胞。HepG2 和 Huh7 细胞分别以 4×10^3 个/100 μL 接种于 96 孔板,作为靶细胞。将效应细胞以效靶比 40:1、20:1、10:1 和 5:1 的比例分别加入每孔,总量为 200 μL 。无任何处理的靶细胞设为空白对照组并加入 100 μL 灭菌 RPMI1640 培养液。每组设 3 个复孔,共培养 24 h 后,吸弃每孔上清液, PBS 轻洗 1 次后每孔加入含 10% CCK-8 的 RPMI1640 培养液。继续培养 2 h 后于 450 nm 波长处测定吸光度(absorbance, A)值。

1.2.3 流式细胞术检测效应 T 细胞对肝癌细胞凋亡的影响 分组同前,将肝癌细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板作为靶细胞,待完全贴壁后,按效靶比为 40:1 加入 1 mL 上述各组效应细胞。空白对照组则加入 1 mL 完全 RPMI1640 培养基。每组设 3 个复孔,共培养 24 h 后,收集全部细胞, PBS 洗涤 2 次,适量 PBS 重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 结合液和 PI 染色液,避光反应 10 min,行流式细胞术检测效应细胞对靶细胞凋亡的影响。

1.2.4 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放实验评估 CTLs 对肝癌细胞的杀伤作用 16 只 C57BL/6 小鼠随机分组,分别标记为 AAH-DCs 组、GFP-DCs 组、Blank DCs 组和 PBS 组,每组 4 只。AAH-DCs 组中在每只小鼠背部右侧皮下注射 1×10^6 个/100 μL 的 AAH-DCs 疫苗;GFP-DCs 组和 Blank DCs 组则分别注射等量 GFP-DCs 疫苗和 Blank DCs 疫苗;而 PBS 组则注射 100 μL 灭菌 PBS 溶液。间隔 7 d,连续注射 3 次。最后一次免疫后处死全部小鼠,无菌条件下取出脾脏,按照前述方法提取 T 淋巴细胞,将丝裂霉素 C 处理后的肝癌细胞加入 T 淋巴细胞,并加入终浓度为 5 ng/mL 的

重组小鼠 IL-2, 共培养 72 h 刺激产生特异性 CTLs。

靶细胞 HepG2 和 Huh7 分别以 4×10^3 个/100 μ L 接种于 96 孔板, 细胞贴壁后, 将前述所得不同 CTLs 作为效应细胞以 400:1、200:1、100:1 和 50:1 的效靶比分别与靶细胞共培养 24 h, 同时参照说明设置靶细胞最大释放组、靶细胞自然释放组及效应细胞自然释放组, 每组设 3 个复孔。至检测时收集各孔上清液, 加入预先配制好的 LDH 检测工作液, 室温避光孵育 30 min 后于 490 nm 波长处测 A 值。根据公式: 靶细胞裂解率 (%) = $[A_{490 \text{ nm}}(\text{实验组}) - A_{490 \text{ nm}}(\text{效应细胞自然释放组}) - A_{490 \text{ nm}}(\text{靶细胞自然释放组})] / [A_{490 \text{ nm}}(\text{靶细胞最大释放组}) - A_{490 \text{ nm}}(\text{靶细胞自然释放组})] \times 100$, 获得各组靶细胞的裂解率。

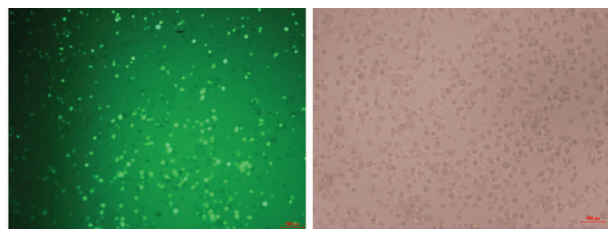
1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件分析所有数据, 所得结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组均数差异性比较采用单因素方差分析, 两组间均数比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

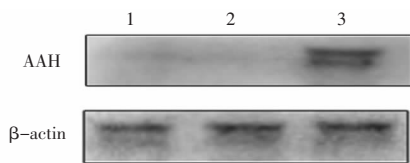
2.1 DCs 疫苗中 AAH 的表达

重组腺病毒感染 DCs 48 h 后于荧光显微镜下可见明显绿色荧光蛋白表达(图 1A)。收集细胞, 提取总蛋白, Western blot 结果显示腺病毒 Ad-AAH-IRES2-EGFP 感染 48 h 后的 DCs 中有 AAH 蛋白(约 86 kD)的表达, 而空腺病毒 Ad-IRES2-EGFP 感染的 DCs 以及无病毒感染的 DCs 中均未见 AAH 表达(图 1B)。



左边为荧光图像, 右边为白光图像

A. 荧光倒置显微镜观察腺病毒 Ad-AAH-IRES2-EGFP 感染 DCs 后的图像 (100 $\times$)



1: Blank DCs; 2: GFP-DCs; 3: AAH-DCs

B. Western blot 检测病毒感染 DCs 后细胞中 AAH 蛋白的表达

图 1 不同 DCs 中 AAH 的表达

2.2 人肝癌细胞系中 AAH 蛋白的表达

Western blot 检测结果显示人肝癌细胞系 HepG2 和 Huh7 细胞中均有不同程度的 AAH 蛋白表达(图 2)。

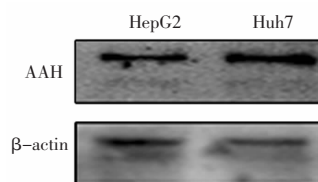
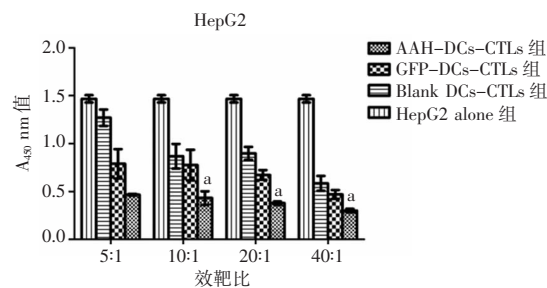


图 2 Western blot 检测不同肝癌细胞中 AAH 蛋白的表达

2.3 效应 T 细胞对肝癌细胞增殖的影响

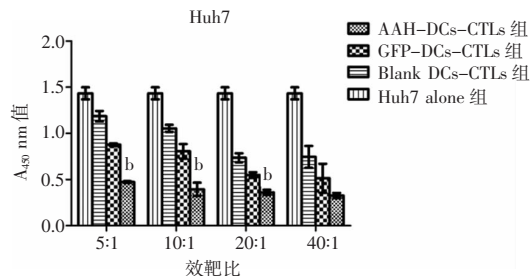
采用 CCK-8 法检测效应细胞对靶细胞增殖的影响。以 HepG2 作为靶细胞时, 随着效靶比比例的增加, AAH-DCs-CTLs 组 HepG2 细胞活力分别为 0.466 ± 0.001 、 0.432 ± 0.071 、 0.379 ± 0.018 和 0.301 ± 0.019 , 即靶细胞增殖能力随着效应细胞增多而降低。在效靶比为 40:1, AAH-DCs-CTLs 组细胞增殖能力 (0.301 ± 0.019) 明显低于 GFP-DCs-CTLs 组 (0.470 ± 0.047 , $P=0.003$)、Blank DCs-CTLs 组 (0.585 ± 0.078 , $P=0.000$) 和未处理 HepG2 组 (1.468 ± 0.039 , $P=0.000$), 方差分析 4 组靶细胞增殖能力的差异具有统计学意义 ($F=325.228$, $P=0.000$)。

此外, 以 Huh7 细胞作为靶细胞时, AAH-DCs-CTLs 组中 Huh7 细胞的增殖能力依次为效靶比 5:1 时 $A_{450 \text{ nm}}$ 值为 0.473 ± 0.010 、10:1 时 $A_{450 \text{ nm}}$ 值为 0.395 ± 0.071 、20:1 时 $A_{450 \text{ nm}}$ 值为 0.361 ± 0.027 、40:1 时 $A_{450 \text{ nm}}$ 值为 0.326 ± 0.029 , 即效靶比为 40:1 时, AAH-DCs-CTLs 组 Huh7 细胞的增殖能力最低, 并低于同比条件下 GFP-DCs-CTLs 组 (0.514 ± 0.156 , $P=0.059$), 以及明显低于同比条件下 Blank DCs-CTLs 组 (0.746 ± 0.118 , $P=0.001$) 和未处理 Huh7 组 (1.433 ± 0.065 , $P=0.000$), 方差分析 4 组靶细胞增殖能力的差异具有统计学意义 ($F=64.639$, $P=0.000$) (图 3)。



a: 与 GFP-DCs-CTLs 组、Blank DCs-CTLs 组、HepG2 alone 组比较, $P<0.05$

A. 效应细胞对 HepG2 细胞增殖的影响



b: 与 GFP-DCs-CTLs 组、Blank DCs-CTLs 组、Huh7 组比较, $P<0.05$

B. 效应细胞对 Huh7 细胞增殖的影响

图 3 效应细胞对表达 AAH 的肝癌细胞增殖的影响 ($n=3$)

2.4 效应 T 细胞对肝癌细胞凋亡的影响

采用流式细胞术检测效应细胞对靶细胞凋亡的影响, HepG2 为靶细胞时, AAH-DCs-CTLs 组靶细胞的凋亡率 $[(37.280 \pm 2.783)\%]$ 明显高于 GFP-DCs-CTLs 组 $[(23.160 \pm 2.330)\%, P=0.000]$ 、Blank DCs-CTLs 组 $[(19.120 \pm 2.315)\%, P=0.000]$ 和未处理的 HepG2 组 $[(5.443 \pm 0.809)\%, P=0.000]$, 方差分析 4 组靶细胞凋亡率的差异具有统计学意义 ($F=107.326, P=0.000$)。而以 Huh7 为靶细胞时, 各组靶细胞的凋亡率分别为: AAH-DCs-CTLs 组 $(29.950 \pm 1.315)\%$ 、GFP-DCs-CTLs 组 $(14.583 \pm 2.811)\%$ 、Blank DCs-CTLs 组 $(9.087 \pm 0.165)\%$ 、未处理 Huh7 组 $(3.097 \pm 0.196)\%$ 。AAH-DCs-CTLs 组凋亡率明显高于 GFP-DCs-CTLs 组 ($P=0.015$)、Blank DCs-CTLs 组 ($P=0.004$) 和未处理 Huh7 组 ($P=0.002$), 方差分析 4 组凋亡率的差异具有统计学意义 ($F=164.008, P=0.000$) (图4)。

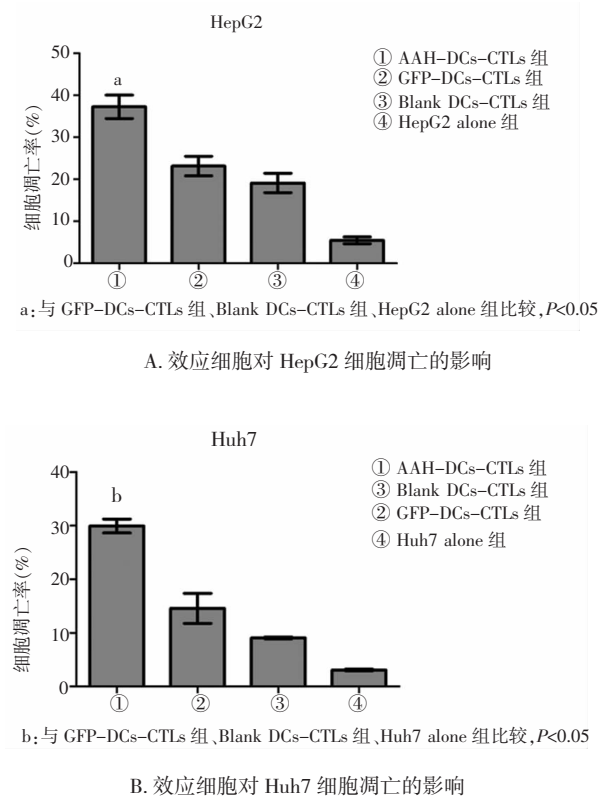


图4 效应细胞对表达 AAH 的肝癌细胞凋亡的影响 ($n=3$)

2.5 疫苗诱导小鼠产生 CTLs 应答反应

LDH 释放实验检测各组疫苗诱导小鼠产生的 CTLs 对靶细胞的裂解效应, 结果显示以 HepG2 细胞作为靶细胞时, AAH-DCs 疫苗组中靶细胞的裂解率随效靶比比例的增加而增加。在效靶比为 400:1 时, AAH-DCs 疫苗组诱导产生的 CTLs 对 HepG2 细胞的裂解率 $[(64.67 \pm 0.57)\%]$ 明显高于 GFP-DCs 组 $[(36.67 \pm 1.53)\%, P=0.001]$ 、空白 DCs 组 $[(8.33 \pm$

$3.06)\%, P=0.002]$ 和 PBS 组 $[(7.67 \pm 4.93)\%, P=0.007]$, 方差分析 4 组靶细胞裂解率的差异具有统计学意义 ($F=107.326, P=0.000$)。以 Huh7 细胞作为靶细胞的实验结果显示在效靶比为 400:1 时, AAH-DCs 疫苗组 Huh7 细胞的裂解率 $[(48.33 \pm 4.51)\%]$ 高于 GFP-DCs 组 $[(43.67 \pm 1.53)\%, P=0.108]$, 并且明显高于空白 DCs 组 $[(18.67 \pm 4.04)\%, P=0.000]$ 和 PBS 组 $[(9.00 \pm 1.00)\%, P=0.000]$, 4 组裂解率的差异具有统计学意义 ($F=109.231, P=0.000$) (图5)。

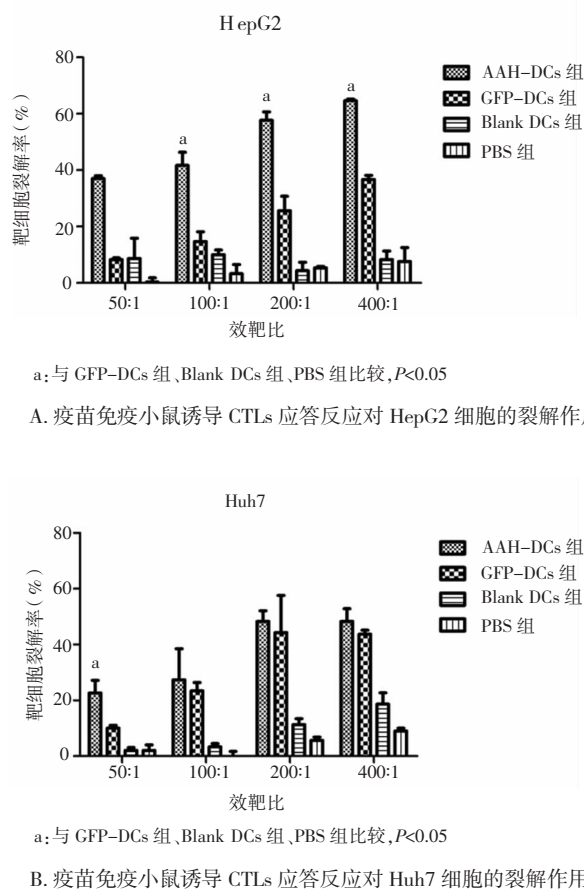


图5 疫苗免疫小鼠诱导 CTLs 应答反应对靶细胞的裂解作用 ($n=3$)

3 讨论

肿瘤免疫治疗是继手术、放化疗之后最具前景的治疗肿瘤的手段之一。肿瘤疫苗的研发应以能够高效激活机体特异性细胞免疫反应为前提^[10]。DCs 作为一种功能强大的抗原提呈细胞, 摄取并加工处理抗原后, 可提呈给 $CD4^+$ T 细胞, 使之活化并发挥抗肿瘤效应; 或提呈给 $CD8^+$ T 细胞直接诱导其增殖活化为抗原特异性的 CTLs, CTLs 则通过分泌 TNF-

α 、IFN- γ 、FasL、穿孔素等多种效应分子诱导肿瘤细胞凋亡。并且,致敏的 DCs 细胞表面还高表达组织相容性复合体 I 类、II 类分子,可特异性结合相应的 T 细胞受体;再次,DCs 还能通过协同共刺激分子及细胞因子的作用,充分激活 T 细胞以达到溶解肿瘤细胞的功效^[1]。因此,DCs 疫苗可望成为一种很有实用前景的抗肿瘤方法。近年来,多项研究也已证实,与 AFP、GPC3、MAGE-A 等肝癌抗原标记物相比,AAH 的表达与肿瘤的病理分化程度和患者术后预后有更明显的相关性。患者的 AAH 表达越高,其术后预后更差。AAH 的催化活性中心是内质网腔内侧的 C-末端结构域,能够对含有表皮生长因子样结构的蛋白上的 L-天冬氨酸和 L-天冬酰胺酰上的 β 碳原子进行羟化修饰。此外,受 AAH 羟化的保守序列也存在于 Notch 信号传导路径中表皮生长因子样结构域和致癌性 Notch 类似物中,而 Notch 信号传导路径在细胞分化、迁移中发挥着重要作用。因此深入探索 AAH 基因与肝癌发生发展关系以及 AAH 在相关信号通路中的作用机制具有重要研究价值^[7,12-14]。本研究通过生物信息学研究发现小鼠基因 Aah 与人 AAH 基因序列相似度高达 99%,具有高度保守性,因此针对人 AAH 基因的研究可以选择在小鼠中展开,利用小鼠的遗传学研究优势,可以大大提高对于 AAH 基因研究的深入和进展。Wu 等^[15]研究发现利用鼠源 DCs 构建携带有 HPV-16 E6/E7 基因的 DCs 与同源小鼠 T 细胞共培养后可诱导 CTLs 产生并表现出对人宫颈癌 CaSki 细胞的体外杀伤作用。符少月等^[16]用人宫颈癌 CaSki 细胞构建裸鼠皮下移植瘤模型,将携带 HPV-16 E6/E7 基因的 DCs 疫苗免疫 BALB/c 小鼠,取免疫后小鼠脾脏 T 淋巴细胞,将其过继到荷瘤裸鼠体内,结果发现与对照组相比,含有目的基因的 DCs 疫苗组其裸鼠皮下肿瘤大小明显减小。本课题组前期工作证实重组腺病毒 Ad-AAH-IRES2-EGFP 体外致敏小鼠 DCs 后,DCs 表面分子标记物 CD11c、CD80 及 MHC-II 均呈高表达,致敏 DCs 与小鼠 T 淋巴细胞共培养后可诱导产生 CTLs 体外杀伤人肝癌细胞株 SMMC-7721^[17]。而本次研究则同时纳入表达 AAH 基因的肝癌细胞株 HepG2 和 Huh7,扩大研究范围,观察 AAH 抗原致敏的 DCs 与 T 细胞共培养后对多种肝癌细胞系的体外杀伤作用,本研究此次实验得出的结果

与前期发表的成果是一致的,即 AAH-DCs 疫苗可体外诱导 CTLs 产生以抑制 HepG2 和 Huh7 细胞的增殖,促进其凋亡。

疫苗除具有免疫原性外,还应该具有诱导机体产生特异性主动免疫的功效。为验证携带 AAH 基因的 DCs 能否作为肿瘤疫苗刺激机体产生免疫应答,研究中将 AAH-DCs 疫苗连续皮下注射免疫 C57BL/6 小鼠,通过检测靶细胞 LDH 释放水平来评估 CTLs 应答效应。结果显示 AAH-DCs 疫苗组靶细胞 LDH 释放水平明显高于 GFP-DCs 疫苗组、Blank DCs 疫苗组和 PBS 组,表明 AAH-DCs 疫苗能够诱导小鼠 CTLs 免疫反应裂解肝癌细胞,提示 AAH-DCs 作为肿瘤疫苗的有效性及其可塑性。Noda 等^[18]研究发现肝胆管细胞癌株 BDEneu-CL24 高表达 AAH 基因,利用此细胞构建大鼠肝胆管细胞原位癌动物模型后,将 AAH-DCs 疫苗通过皮下注射的方式免疫大鼠,发现 AAH-DCs 疫苗处理组大鼠的肝脏肿瘤结节比对照组明显减小,表明 AAH-DCs 疫苗能够诱导大鼠体内的免疫应答,从而发挥对肿瘤的抑制作用。Shimoda 等^[19]用高度恶性的小鼠肝癌细胞株 BNL 皮下注射小鼠建瘤,将负载 AAH 基因的 DCs 疫苗分别于接种癌细胞前后处理小鼠,结果显示 AAH-DCs 疫苗对荷瘤小鼠具有预防和治疗性作用,表现为抑制肿瘤生长、延长小鼠存活时间,提示 AAH-DCs 疫苗作为一种新型疫苗具有抑制肝癌复发的潜力。Yoshito 等^[20]的 1 项研究利用生物信息技术首先分别预测出 AAH 基因中 HLA-DRB1 限制性的和 HLA I 类分子限制性的免疫活性保守序列,然后合成相应的抗原肽,将这些抗原肽于体外刺激人外周血单核细胞,结果发现 DCs 负载 HLA 限制性 AAH 抗原肽可诱导肝癌患者外周血单核细胞 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的激活,表明 AAH 基因同时具有 HLA I 类分子和 HLA II 类分子限制性抗原表位,AAH 是肝癌免疫治疗的潜在靶点。

综上所述,本研究结果表明携带人 AAH 基因的 DCs 疫苗介导产生的 CTLs 可显著发挥对肝癌细胞的体外杀伤效应,为今后研发针对高表达 AAH 的 HCC 的新型靶向治疗手段提供一定基础。后续研究将从扩增样本,优化免疫方法、AAH-DCs 疫苗体内抗癌效应及相关机制进行深入的探索。在实际应用中,由于 DCs 疫苗制备复杂、周期长、成本高,且有

诱发机体自身免疫反应的风险^[21],目前还只有一种针对前列腺癌的治疗性 DCs 疫苗被美国 FDA 批准用于临床,因此将 DCs 疫苗真正广泛应用于临床仍面临着诸多挑战。

参 考 文 献

- [1] Wallace MC, Preen D, Jeffrey GP, et al. The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global perspective[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 9(6): 765–779.
- [2] Armengol C, Sarrias MR, Sala M. Hepatocellular carcinoma: present and future[J]. *Med Clin (Barc)*, 2017[Epub ahead of print].
- [3] Lavaissiere L, Jia S, Nishiyama M, et al. Overexpression of human aspartyl(asparaginyl)beta-hydroxylase in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma[J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(6): 1313–1323.
- [4] Xue T, Su J, Li HM, et al. Evaluation of HAAH/humbug quantitative detection in the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(1): 329–337.
- [5] Xian ZH, Zhang SH, Cong WM, et al. Expression of aspartyl beta-hydroxylase and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(2): 280–286.
- [6] Wang K, Liu J, Yan ZL, et al. Overexpression of aspartyl-(asparaginyl)- β -hydroxylase in hepatocellular carcinoma is associated with worse surgical outcome[J]. *Hepatology*, 2010, 52(1): 164–173.
- [7] Aihara A, Huang CK, Olsen MJ, et al. A cell-surface β -hydroxylase is a biomarker and therapeutic target for hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2014, 60(4): 1302–1313.
- [8] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines[J]. *Nat Med*, 2004, 10(9): 909–915.
- [9] Nencioni A, Brossart P. Cellular immunotherapy with dendritic cells in cancer: current status[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(4): 501–513.
- [10] Ballestrero A, Boy D, Moran E, et al. Immunotherapy with dendritic cells for cancer[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(2): 173–183.
- [11] 冯鹏飞, 韩双印. 树突状细胞疫苗治疗恶性肿瘤研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2015, 29(5): 420–422.
- [12] Steffen Z, Irina N, Torsten W, et al. A critical role for Notch Signaling in the formation of cholangiocellular carcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23: 784–795.
- [13] Diana LB, Gao JS, Tong M, et al. Potential role of phosphorylation as a regulator of aspartyl-(asparaginyl)- β -hydroxylase: relevance to infiltrative spread of human hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Cancer*, 2015, 4: 139–153.
- [14] Cantarini MC, de la Monte SM, Pang M, et al. Aspartyl-asparaginyl beta hydroxylase over-expression in human hepatoma is linked to activation of insulin-like growth factor and notch signaling mechanisms[J]. *Hepatology*, 2006, 44(2): 446–457.
- [15] Wu XM, Liu X, Jiao QF, et al. Cytotoxic T lymphocytes elicited by dendritic cell-targeted delivery of human papillomavirus type-16 E6/E7 fusion gene exert lethal effects on CaSki cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(6): 2447–2451.
- [16] 符少月, 焦庆昉, 黄启彬, 等. 带有 HPV-16 E6/E7 基因的树突状细胞疫苗对裸鼠人宫颈 CaSki 细胞移植瘤的抗肿瘤作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(5): 512–516.
- [17] 李成敏, 刘飞飞, 伍春霞, 等. 人 ASPH 基因修饰树突状细胞介导 CTLs 对肝癌细胞 SMMC-7721 的体外杀伤作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 41(6): 320–326.
- [18] Noda T, Shimoda M, Ortiz V, et al. Immunization with aspartate- β -hydroxylase-loaded dendritic cells produces antitumor effects in a rat model of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Hepatology*, 2012, 55: 86–97.
- [19] Shimoda M, Yoshito T, Kevin PC, et al. Tumor progression-related transmembrane protein aspartate-b-hydroxylase is a target for immunotherapy of hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Hepatology*, 2012, 56: 1129–1135.
- [20] Yoshito T, Sasmita M, Howard S, et al. Aspartate- β -hydroxylase induces epitope-specific T cell responses in hepatocellular carcinoma[J]. *Vaccine*, 2015, 33: 1256–1266.
- [21] Radford KJ, Tullett KM, Lahoud MH. Dendritic cells and cancer immunotherapy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2014, 27: 26–32.

(责任编辑:冉明会)