

树突细胞靶向系统研究进展

董 慧 综述, 张晓斌 审校

(江苏省扬州五台山医院检验科, 江苏扬州 225003)

关键词: 树突细胞疫苗; 体外负荷; 体内靶向; 综述**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.032**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)19-2566-03

疫苗的出现使人类征服了许多恶性传染病如天花、脊髓灰质炎等,改善了人类的健康进程。但是随着各种新的传染性疾病的出现以及一些旧疾病的死灰复燃,对疫苗的设计已经从最初的预防性疫苗发展到目前的治疗性疫苗。树突细胞(dendritic cell, DC)是体内功能最为强大的抗原递呈细胞,是操纵体液免疫和细胞免疫应答的重要调控因子,通过对“自身”和“外来”抗原的判断来决定免疫系统的不同反应,产生免疫应答或免疫耐受,从而维持机体的免疫平衡状态。DC 强大的免疫激活功能及天然佐剂的特点,使其在改善疫苗的免疫原性、提高疫苗效率以及临床免疫治疗方面具有潜在应用价值。近年来,利用 DC 来改善疫苗的免疫原性成为疫苗设计研究领域的新策略、新思路^[1],特别是抗肿瘤 DC 疫苗的开发与研制成为国内外学者的研究热点。

1 离体负荷(ex vivo loading)DC 疫苗

目前,临床运用的 DC 疫苗一般采用离体基因修饰或负荷抗原的方法来制备。来源于患者骨髓的 CD34⁺ 前体细胞或外周血单核细胞(PBMC)经密度梯度离心、免疫磁珠分选获得 CD14⁺ 细胞,加入细胞因子(如:粒-巨噬细胞集落刺激因子、白细胞介素-4),体外培养收获未成熟 DC^[2]。在某些因子或抗原的刺激下 DC 分化成熟,通过主动摄取、电穿孔、腺病毒介导等方法负载肿瘤抗原或肿瘤抗原替代物^[3]。将负载肿瘤细胞或肿瘤抗原的自身 DC 重新输入患者体内,得益于其迁移功能,DC 进入到淋巴器官的 T 细胞区域,激活 T 细胞,激发抗肿瘤免疫应答,诱导自然杀伤免疫的产生^[4]。目前以 DC 为基础的疫苗研究已经在一系列的基础和临床研究中取得了较理想的效果,临床研究显示:离体负荷肿瘤抗原的 DC 在前列腺癌^[5]、恶性脑胶质瘤^[6]等肿瘤的治疗中具有较好的抑瘤效果,表现出较为乐观的应用前景。以 DC 疫苗作为肿瘤生物治疗的方案已被美国食品药品监督管理局批准进入Ⅲ期临床实验阶段。

然而通过离体负荷抗原或进行基因修饰制备 DC 疫苗的方法成本较高,操作过程复杂,需进行“量体裁衣”,针对个体病例进行逐一操作,在大规模临床应用中受到限制;另外体外负荷的 DC 是经过体外培养、人为修饰后回输入患者体内,在诱导免疫应答方面可能存在一定的未知性和不可控制因素。因此寻求更为简便更为适宜临床操作的 DC 疫苗制备方法是 DC 疫苗开发研究的下一阶段工作。

2 体内靶向(in vivo loading)DC 疫苗

对 DC 直接进行体内靶向是利用 DC 改善疫苗免疫原性制备 DC 疫苗的另一理想方式。所谓 DC 体内靶向是指通过识别 DC 特异性表达的细胞表面受体分子,注射入体内的运送系统将其携带的抗原、DNA 分子、药物分子等直接靶向 DC,从而激发相应的体液和细胞免疫应答。

与离体操作法制备 DC 疫苗相比,直接进行体内 DC 靶向的可能优越性在于:能够批量生产靶向物,适合人群大规模使用,尤其在应对一些传染病的大规模爆发时能够快速发挥作用;另外,体内 DC 处于自然生理状态,进行体内靶向可完全模拟天然免疫进程。

3 靶向系统

目前体内靶向 DC 的运送系统大致可分为 3 类:微粒子载体、感染性活载体和受体配体系统。

3.1 微粒子运送系统 微粒子运送系统包括脂质体和聚合粒子。脂质体也称为微脂粒,是由双层磷脂构成的中空小球,是一种定向药物载体,属于靶向给药系统的一种新剂型。由于生物体膜的基本成分也是磷脂双分子层膜,脂质体具有与生物体相类似的结构,因此具有很好的生物相容性。亲水性的抗原被纳入脂质体囊泡内,两亲性抗原则被插入双层膜间^[7]。通过 DC 受体分子的配体插入脂质体的双层膜间,可将脂质体特异靶向 DC。体内研究发现,将包裹有肽段的脂质体靶向 DC,能有效提高其激发体液免疫应答和 CTL 效应的能力。较之直接注射 DNA 质粒,利用脂质体包裹 DNA 质粒靶向抗原递呈细胞(APC),能够显著提高 DC 的抗原递呈效率和 Th1 免疫应答水平^[8]。将脑膜炎奈瑟菌保护性抗原包裹在 DC 特异性脂质体中进行皮下接种,相比包裹于普通脂质体中,能够显著提高 DC 成熟度、体液免疫应答生成水平^[9]。

利用聚合粒子靶向抗原的优点在于:聚合粒子能够阻止抗原性肽段、蛋白质、DNA 分子的快速降解。国外学者利用甘露糖化多聚粒子包裹携带 HIV 基因的质粒 DNA,特异性靶向抗原递呈细胞 DC。他们以恒河猴为实验动物,于皮肤局部接种该甘露糖化疫苗,发现粒子包裹的质粒 DNA 能够高效的转染皮肤 DC:朗格罕细胞(LC)。LC 迁移至淋巴结,加工处理转染质粒编码的抗原并递呈给 T 细胞,有效激发 HIV 抗原特异性 CD4⁺ 辅助性 T 细胞和 CD8⁺ 记忆性 T 细胞,引起迟发性超敏反应^[10]。

3.2 活载体运送系统 作为细胞免疫的关键调控因子,研究者发现对 DC 进行改造可提高机体的免疫应答水平,具有一定的临床免疫治疗作用。其中体内靶向 DC 的免疫策略在肿瘤免疫治疗中颇有应用前景^[11-13]。利用基因表达载体靶向 DC 可致载体携带的肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)实现细胞内源性表达,持续递呈至抗原特异性 CTL,激发相应的抗肿瘤免疫应答。这种免疫策略的一个关键因素是需要高效率的基因运送系统靶向 DC。总的说来,病毒载体以其高转染效率著称,尤其是腺病毒,在细胞特异性基因运送系统中显示出良好效果,且腺病毒载体并不整合入宿主细胞染色体中,只是进行短暂的表达^[14]。尽管可能牵涉到某些安全性

问题,目前以腺病毒为载体的多项临床实验正在进行中。研究发现 DC 对腺病毒的侵染具有相对的抵抗能力,可能由于 DC 缺乏某些病毒初级接头受体的表达,譬如柯萨奇-腺病毒受体 (CAR),这些受体对于腺病毒进入细胞非常重要。不过这一缺陷可通过对腺病毒进行基因改造来克服,通过插入特定的靶向基序改变病毒的趋向性,使其能够定向侵染特异的细胞类型。

3.3 受体配体系统 除以上介绍的将配体整合入抗原运送系统的方法外,还可以直接将蛋白质或抗原肽与配体相连,达到靶向的目的。将抗原靶向 DC 的配体可分为:包括热休克蛋白 (heat shock protein, HSP)、细菌毒素和糖基在内的“天然”配体,以及细胞表面受体分子的特异性抗体。

“天然”配体:热休克蛋白 (HSP)属于分子伴侣蛋白家族,在错误折叠蛋白的重新折叠和指导蛋白酶降解的过程中发挥重要作用。大部分动物细胞和微生物都表达热休克蛋白。作为胞内含量丰富的可溶性蛋白,HSP 分为多个家族,其中胞质中的 HSP70 和位于内质网的 HSP90 家族成员 gp96 是重要的多肽结合蛋白,它们能与细胞内抗原肽结合,参与抗原的加工和递呈。研究者发现,APC 表面 CD91 分子是 HSP 特异性受体。通过化学耦连、体外混合,或者从表达目的抗原的细胞裂解物中分离等方法可获得抗原-HSP 复合物。通过 HSP 与 CD91 间的直接作用,HSP 可将其携带的抗原分子特异性靶向 APC。

Binder 等^[15]将表达模式蛋白 OVA 的细胞裂解,随着细胞的裂解,HSP 伴随着 OVA 蛋白或者 OVA 片断释放出来,通过特异性受体为 APC 所摄取,交叉激活 CD8⁺T 细胞。Suzue 等^[16]将结核分枝杆菌 HSP70 与 HIVp24 蛋白融合表达,即使在没有佐剂的情况下,以该重组融合蛋白免疫小鼠仍能激发 p24 特异性体液和细胞免疫应答。通过化学耦连将 p24 与 HSP p70 相连接,免疫小鼠,一年后仍能检测到高滴度的 p24 抗体水平。

利用 HSP 作为靶向载体的优势在于:可直接从携带抗原表达系统的细胞中分离出 HSP-抗原复合物,无须进行免疫原性表位鉴定。HSP 与 APC 的作用过程中引起炎症因子和化学因子的释放,诱导 DC 成熟,有利于提高免疫接种的效率^[17]。

部分细菌毒素非常适用于运送 MHC-I 类抗原,这些毒素能够结合细胞表面受体,可通过细胞质膜进入细胞质、通过内吞体膜进入细胞质,或经内吞体-高尔基体-内质网逆行性通路进入内质网。细菌毒素携带的抗原被运送至细胞质或内质网,进入 MHC-I 分子递呈途径。志贺菌毒素的 B 亚单位能够识别并结合表达在 DC、单核细胞等细胞表面的糖鞘脂 Gb3,经内吞方式进入细胞,由核内体和高尔基体运送至内质网。

抗原以糖基包裹可靶向 DC 表面 C 型凝集素受体 (CLRs)。不同的包裹糖基靶向不同的 CLRs,从而决定了不同的免疫应答结果。例如,以氧化型甘露聚糖包裹抗原,主要激发细胞免疫应答,而以还原性甘露聚糖包裹激发的免疫应答以体液应答为主。然而这种碳水化合物运送载体的不足在于:多数用于抗原靶向的糖基能同时被多种类型的受体所识别。基于此,通过合成低聚糖组成的低聚糖簇可将抗原定向特定的 CLRs。

抗体能够高度特异的识别其配体分子,随着 DC 表面分子的开发及相应单克隆抗体的制备,使其成为 DC 靶向的一个有利的运送工具。研究发现,通过化学耦连或基因重组等方法将

抗原分子与 DC 表面分子特异性单抗相连接,可迅速、选择性的将抗原分子靶向淋巴组织中特定的 DC 亚群^[18-19]。人源化抗体的制备成功,更使抗体介导的 DC 靶向具有向临床治疗过渡的研究价值。目前抗体介导的 DC 靶向研究集中于 DC 表面分子:CLRs、整合素、Fc 受体等。

4 小 结

科学研究发展的日新月异,为体内 DC 靶向的研究带来了新的契机与希望。首先,对 DC 系统与日俱增的了解以及越来越多 DC 表面受体分子的发现为体内 DC 靶向提供了新的研究靶点。其次,Toll-样受体的发现及对 DC 识别自身或非自身抗原分子机制的掌握,使得人为实现 DC 与运送载体间的对话成为可能,从而有效的促进靶向抗原的递呈效率及 T 细胞激活。另外,MHC-I、MHC-II 类抗原递呈途径的相关研究使得在疫苗设计时能够将靶向的抗原分子运送入预期的胞内加工递呈通路,从而激发相应的免疫应答。最后,多种靶向载体的开发与使用使得体内 DC 靶向研究具备可行性。尽管还存在诸多困难,离体操作制备 DC 疫苗的临床试验结果证实了以 DC 为基础的疫苗免疫策略的可行性,以小鼠为模型的体内 DC 靶向研究显示出较为乐观的应用前景,加之对人 DC 亚群研究的不断深入,体内 DC 靶向将很有希望成为安全、经济能提供长效保护性免疫或免疫耐受的新型疫苗。

参考文献

- [1] Shortman K, Lahoud MH, Caminschi I. Improving vaccines by targeting antigens to dendritic cells[J]. *Expe Mol Med*, 2009, 41(2): 61-66.
- [2] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 265-277.
- [3] Ueno H, Schmitt N, Klechevsky E, et al. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine[J]. *Immunol Rev*, 2010, 234(1): 199-212.
- [4] Lucas M, Schachterle W, Oberle K, et al. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15[J]. *Immunity*, 2007, 26(4): 503-517.
- [5] Draube A, Klein-Gonzalez N, Mattheus S, et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS ONE*, 2011, e18801.
- [6] Joost Lesterhuis W, Jolanda M, Schreiber G, et al. Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 5725-5735.
- [7] Tacke PJ, Toresma R, Figdor CG, et al. Targeting antigens to dendritic cells in vivo[J]. *Immunobiology*, 2006, 211(6/8): 599-608.
- [8] Geusens B, Strobbe T, Bracke S, et al. Lipid-mediated gene delivery to the skin[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 43(4): 199-211.
- [9] Waterbeemd B, Streefland M, Ley P, et al. Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using genetically engineered strains and a detergent-free purification process[J]. *Vaccine*, 2010, 28(30): 4810-4816.
- [10] Lisiewicz J, Trocio J, Whitman L, et al. DermaVir: a novel topical vaccine for HIV/AIDS[J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(1): 160-169.
- [11] Palucka K, Ueno H and Banchereau J. Recent developments in cancer vaccines[J]. *J Immunol*, 2011, 186(3): 1325-1331.
- [12] Caminschi I, Lahoud MH, and Shortman K. Enhancing immune

responses by targeting antigen to DC[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(4):931-938.

[13] Flacher V, Sparber F, Tripp CH, et al. Targeting epidermal Langerhans cells with antigenic proteins: attempts to harness their properties for immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(7):1137-1147.

[14] Ma LN, Liu J, Shen JJ, et al. Expression of miR-122 mediated by adenoviral vector induces apoptosis and cell cycle arrest of cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(7):554-561.

[15] Binder RJ, Srivastava PK. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8⁺ T cells[J]. *Nature Immunology*, 2005, 6(6):593-599.

[16] Suzue K, Young RA. Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24[J]. *J*

Immunol, 1996, 156(2):873-879.

[17] Bolhassani A and Rafati S. Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine developments[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7(8):1185-1199.

[18] Cheong C, Choi JH, Vitle L, et al. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody[J]. *Blood*, 2010, 116(19):3828-3838.

[19] Idoyaga J, Lubkin A, Fiorese C, et al. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(6):2384-2389.

(收稿日期:2013-02-22)

• 综 述 •

心血管疾病中纤维蛋白原介导的微血管功能障碍机制研究

李 琦, 周 名, 田鹏鹏 综述, 杜 昆[△] 审校
(长江大学附属一医院检验科, 湖北荆州 434000)

关键词: 纤维蛋白原; ET-1; 整联蛋白; 血液黏度
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 19. 033 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2013)19-2568-03

血液黏度对不利的心血管病事件如高血压, 卒中和糖尿病有强烈的预示作用。血液黏度的增高是几个因素变化的结果, 包括血球压积, 红细胞的聚集以及血浆黏度的增加。血浆纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)浓度的增加使血液黏度升高, 从而引起血流剪切力的增加, 血流剪切力的变化会启动内皮细胞和血小板的改变, 导致各种黏附分子和整联蛋白的表达和/或活化。其中一些分子如胞内黏附分子(ICAM-1)和 α5β1 整联蛋白都是纤维蛋白原的受体。Rampling 等^[1]对红细胞聚集提出了非特异性机制的两种主要理论模型。一种是基于大分子的桥联模型, 因为很好的描述了红细胞缢钱现象形成而被广泛接受; 另一种非特异性黏附理论是细胞聚集与分子团块和表面吸附无关, 主要是由较大相对分子质量的蛋白促成的。纤维蛋白原可以特异性的结合于红细胞膜^[2]。大相对分子质量的血浆蛋白如触珠蛋白、C 反应蛋白、血浆铜蓝蛋白和纤维蛋白原显示了强的促红细胞聚集效应^[3]。纤维蛋白原较其他血浆蛋白对红细胞聚集有更强的效应。

1 纤维蛋白原和血管反应性

最近有研究, 显示纤维蛋白原含量的增加可致猪小冠状动脉(直径 0.8~1.4 mm)和人胸腔内动脉段的扩张, 在此项研究中 2 μm 浓度的纤维蛋白原只引起约 20% 的血管扩张, 而 60% 的血管扩张是在纤维蛋白原浓度达到 12 μm 时出现^[4]。纤维蛋白原介导的血管扩张作用可以被阿昔单抗(抑制血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa 的血小板聚集抑制剂)抵消, 以及由于内皮的剥脱或一氧化氮合成抑制物的存在而被减弱。由于阿昔单抗与血小板 GPⅡb/Ⅲa 一样对 αvβ3 整合蛋白有亲和力, 作者提出纤维蛋白原结合血管 αvβ3 整合蛋白是导致血管反应性媒介物合成的机制。Lominadze 等^[5]第一次阐述了纤维蛋白原结合内皮黏附分子-1(ICAM-1)介导动脉的收缩, 提示 ICAM-1

可能参与纤维蛋白原结合到血管内皮的过程中, 是纤维蛋白原介导血管收缩的可能机制。实验发现纤维蛋白原介导的血管收缩效应可以被内皮缩血管肽 A 型(ET-A)受体抑制剂转换。更进一步的研究发现纤维蛋白原的增高会通过增强来自内皮细胞的 Weibel-Palade 小体的胞吐作用来增加内皮缩血管肽的生成^[6]。有研究还提示 ICAM-1 启动胞外信号调节激酶-1/2(ERK-1/2), 促进了内皮缩血管肽 1 型(ET-1)的生成。纤维蛋白原在其 Aa 链上有两个 RGD 序列, Aa 链上的 572 到 574 残基是 αvβ3 和 α5β1 整联蛋白的结合点, 两者竞争结合纤维蛋白原。而内皮缩血管肽 1 型(ET-1)可能参与了 RGD/α5β1 整联蛋白相互作用介导血管收缩机制的过程中。血管平滑肌细胞(VSMC)间 Ca²⁺ 和 K⁺ 通道活化的减少参与了 RGD/αvβ3 整联蛋白交互反应介导血管扩张机制中, α5β1 缺失的情况下, αvβ3 整联蛋白呈启动的状态, 与纤维蛋白原有高亲和力, α5β1 整联蛋白的重新表达可以抑制 αvβ3 整联蛋白介导的黏附功能。这些研究提示在病理过程中, α5β1 表达可能出现变异从而导致 αvβ3 整联蛋白其配体亲和力的调整^[7]。另外, Martin-ez-Lemas 等^[8]研究表明在骨骼肌微小动脉中产生肌源性血管收缩需要 αvβ3 和 α5β1 整联蛋白的参与。

2 参与内皮细胞收缩性的 ICAM-1 和 α5β1 整联蛋白信号通路

血管内皮细胞管腔内表面受体的活化可以启动很多的信号级联, 其中一些会导致血管反应性的改变。纤维蛋白原结合内皮 ICAM-1 可以致 ERK-1/2 路径的活化(磷酸化作用)^[6]。整联蛋白信号传导既包括 ERK 也包括 JNK 路径^[9], 像 α5β1 一类的整联蛋白的活化可以引导多种激酶的活化(如黏着斑激酶 FAK, Src, Fyn, Shc 等), 与细胞骨架肌动蛋白相关的 FAK/Src 激酶的活化能引导 JNK 的活化, Fyn/Shc 激酶与