

重组人 p53 腺病毒转染淋巴瘤源性树突状细胞的抗肿瘤免疫效应

刘泽法¹ 汤 华¹ 宋飞雪² 曾鹏云² 岳玲玲² 张连生^{2△}

(1 江苏省兴化市人民医院 江苏 兴化 225700 2 兰州大学第二附属医院血液、肿瘤科 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的:研究重组人 p53 腺病毒转染淋巴瘤源性树突状细胞的抗肿瘤免疫效应。方法 采集本科室初诊的弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL) 肿大淋巴结分离单个核细胞(MNC) 进行体外 DC 的诱导培养,分为实验组 A (rAd-p53-DC)、对照组 A (rAd-DC)、空白对照组 A (N-DC),同时采集患者的外周血分离单个核细胞(MNC),进行体外 DC 的诱导培养,分为实验组 B (rAd-p53-DC)、对照组 B (rAd-DC)、空白对照组 B (N-DC),用重组人 p53 腺病毒(rAd-p53) 转染 2 种来源的 DCS,流式检测 DCS 免疫表型,用 Western-blotting 鉴定 P53 蛋白的表达,ELISA 法检测上清中的细胞因子 IL-12 的含量,混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction,MLR) 测定 DCS 刺激同种异体淋巴细胞增殖能力,用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH) 释放法检测经 rAd-p53 转染的两种来源 DCS 的细胞毒性 T 淋巴细胞反应(CTL)。结果 DC 的表型(CD1a 除外) CD83、CD80、CD86 和 HLA-DR 实验组均较对照组及空白对照组明显增高($p < 0.05$)。Western-blotting 可检测到实验组 P53 蛋白的表达。上清液中 IL-12 分泌水平实验组均较对照组及空白对照组明显增高($p < 0.05$)。实验组具有明显的刺激自体淋巴细胞增殖的能力,且刺激能力随 rAd-p53-DC 与淋巴细胞比例的增加而升高。对照组及空白对照组也能刺激同种自体淋巴细胞增殖的能力,但较实验组差($p < 0.05$)。对靶细胞的细胞毒作用(CTL 效应) 结果显示,实验组介导同种异体的淋巴细胞杀伤率显著高于对照组及空白对照组($P < 0.05$)。且实验组 A 的 CTL 效应明显高于实验组 B,两者之间有显著性差异($P < 0.05$)。结论:rAd-p53-DC 为基础的肿瘤疫苗有可能在解决淋巴瘤的 MRD、DC 免疫耐受等问题上发挥强大的治疗作用。

关键词 重组人 p53 腺病毒(rAd-p53) 树突状细胞(DC) 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)

中图分类号 Q75,Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011) 06-1087-06

Anti-tumor Immune Response of Dendritic Cells Derived from Lymphoma Cells Transduced with Recombinant Adenoviruses Encoding Human p53

LIU Ze-fa¹, TANG Hua¹, SONG Fei-xue², ZENG Peng-yun², YUE Ling-ling², ZHANG Lian-sheng^{2△}

(1 The People hospital of XinHua, Jiangsu province1,225700, Department of Hematology and oncology, the No.

2 Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province2 730030, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the immunological effect of modified dendritic cells (DCS) in inducing cytotoxic T cells(CTL) effect against lymphoma cells. **Method:** The DCS were isolated from the lymphoma node of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cells and peripheral blood. It was transfected with recombinant adenovirus vector carrying p53 gene. The expression of DC was detected by flow cytometry. Western-blot was used to detect the expression of p53. ELISA was used to detect IL-12 level in supernatant. The mixed lymphocyte reaction (MLR) was used to detect the ability to proliferate allo-lymphocyte by DCs. The lactate dehydrogenase(LDH) release test was used to determine the cytotoxicity of CTL. **Results:** The surface molecule expressions of DC (except for CD1a) CD83, CD80, CD86 and HLA-DR were significantly more high in experiment group than that in control group and blank group. The secretion of IL-12 in supernatant was higher in experiment than that in control group. The autogene T lymphocyte proliferation and cytotoxic activity against the same kind of DLBCL-cells increased in experiment group than that in control group and blank group ($p < 0.05$). The ability to stimulate T lymphocyte proliferation increased with the rising of the ratio of experiment group and T lymphocyte. However, there was different for rAd-p53-DC derived from Lymph node and peripheral blood ($p < 0.05$). **Conclusion:** DCs transfected with rAd-p53 can induce CTL response in vitro against lymphoma cells.

Key words: Recombinant adenoviruses encoding human p53(rAd-p53); Dendritic cells; Diffuse large B cell lymphoma(DLBCL)

Chinese Library Classification(CLC): Q75,Q78 **Document code:** A

Article ID:1673-6273 (2011) 06-1087-06

作者简介 刘泽法 硕士研究生,现在兴化市人民医院工作。

电话 15152679502, **E-mail:** ynluzefa@126.com

△通讯作者 张连生 硕士生导师,兰州大学第二附属医院血液、肿瘤科主任,

中华血液病学常务委员

(**收稿日期** 2010-12-12 **接受日期** 2011-01-06)

前言

树突状细胞 (dendritic cell, DC) 是目前已知的唯一能激活未致敏 T 细胞 (naive T cells) 功能最强的抗原提呈细胞 (antigen presenting cells, APC), 因其强大的抗原提呈功能和激活抗原特异性的 CTL (cytotoxic T lymphocytes, CTL) 反应, 成为肿瘤生物免疫治疗的重要载体^[1], 目前以 DC 为基础的抗肿瘤免疫治疗, 已在黑色素瘤^[2]、前列腺癌^[3]、肾细胞癌^[4]、慢性粒细胞白血病^[5]、实体瘤^[6]等肿瘤中进行了 I、II 期临床试验, 并取得较好疗效。但在部分肿瘤临床实践中, DC 的输注并没有取得预期的临床效果, 研究发现, DC 在清除瘤细胞过程中发生了免疫耐受, 使瘤细胞成功逃避机体免疫监视^[7-8]。而 DC 的功能依赖于其成熟程度, 如何增强其成熟度、特异性和打破 DC 的免疫耐受的已成为目前的研究热点之一。研究表明, E1 区替代复制缺陷型腺病毒载体 Ad5 具有感染及表达效率高、遗传毒性低、制备方法相对简单、可获得高滴度纯化载体等优点^[9]。Lore K 等^[10]研究表明无论 mDC 还是 pDC, 对腺病毒都有很高的转染率。p53 基因的突变和缺失, 与恶性肿瘤的发生密切相关, 在恶性肿瘤中, p53 基因异常率达 40%-70%, 血液系统肿瘤中异常表达率也达到 30%-50%^[11], 特别是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤, 其异常表达率可高达 50%^[12], 其编码的变异的 P53 蛋白成为肿瘤较理想的靶抗原之一。因此, 我们用重组人 p53 腺病毒 (rAd-p53) 修饰 DC, 观察其是否能诱导 DLBCL 来源的 DC 更成熟以及是否能增强其在体外诱导特异性 CTL 效应, 为 DLBCL 的基因免疫治疗探索一种新方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料

采集本科室初诊的弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 肿大淋巴结和外周血 (2006 年 5 月), 重组人 p53 腺病毒 (rAd-p53) 购于深圳赛百诺公司, Raji 细胞株购于上海科学院细胞中心, 总蛋白裂解酶、蛋白酶抑制剂为美国 Pierce 公司产品, 兔抗人的 p53 多克隆抗体为北京中杉生物技术公司产品, 辣根标记羊抗兔 IgG、Western-blotting 试剂盒为 Scanta Cruz 公司产品, 抗人 CD1a-PE、CD80-FITC、CD83-FITC、CD86-PE、HLA-DR-FITC 单抗为 Burlingame 公司产品, Cytotox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒购自 Promega 公司; 细胞因子 IL-12 检测试剂盒购自深圳晶美生物公司, 淋巴细胞分离液购自上海华精生物科技有限公司。

1.2 DC 的分离和培养

取经病理活检 (2006 年 5 月) 证实为弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 患者浅表肿大淋巴结 2 枚, 在超净工作台上先用无菌生理盐水冲洗, 在除去结缔组织和脂肪组织, 用无菌剪刀剪成 1mm³ 大小的组织碎片, 用玻璃注射器芯轻轻按压同时反复用无菌生理盐水冲洗, 过 200 目网, 收集细胞于 10 ml 离心管中, 经 Ficoll 密度梯度离心法分离出单个核细胞层, RPMI 1640 培养液洗涤细胞后, 接种于 6 孔培养板中, 进行培养, 具体操作参照文献^[13]。

1.3 病毒转染

收集培养第 7 天 DC, 弃去培养液后加少量无血清培养基

覆盖细胞, 再按感染指数 (MOI) 100 加入 rAd-p53 和 rAd, 即分为 3 组: 实验组 A (转染 rAd-p53 的 DC 组, L-rAd-p53-DC)、对照组 A (空载体转染的 DC 组, L-rAd-DC 组)、空白对照组 A (未转染的 DC 组, L-N-DC 组), 在 5% CO₂、37℃ 条件下孵育 2h 后洗去上清, 同时加入含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液继续培养, 24h 后加入 100 ng/ml 的 TNF-α 和 CD40mAb (5C11) (0.5 μg/ml) 继续培养 24 h (第 10 天) 收集细胞。

1.4 T 细胞的制备

取 DLBCL 患者外周血 50 ml (肝素 40 u/ml), 经 Ficoll 密度梯度离心法分离出单个核细胞层, RPMI 1640 培养液洗涤细胞后, 接种于 6 孔培养板中, 在 5% CO₂、37℃ 条件下孵育 2 h 后, 非贴壁细胞吸出后用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养生长液悬浮沉淀细胞, 调节终浓度为 1 × 10⁶ 个 / ml, 加入 6 孔平底培养板 (3ml/ 孔), 培养至第 10 天, 收集悬浮细胞作为 DLBCL 患者 DCs 的反应细胞。贴壁细胞以含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养, 并同时加入 rhGM-CSF (1 000 U/ml)、rhIL-4 (500 U/ml), 培养成 DC, 并加入 rAd-p53 和 rAd, 具体操作同上。也分成 3 组: 实验组 B (转染 rAd-p53 的 DC 组, P-rAd-p53-DC)、对照组 B (空载体转染的 DC 组, P-rAd-DC)、空白对照组 B (未转染的 DC 组, P-N-DC)

1.5 效应细胞的制备

分别取淋巴结来源和外周血来源的培养第 10 天的转染 rAd-p53-DC、rAd-DC 和未转染的 DC (N-DC) 细胞各 5 × 10⁵ 个, 作为刺激细胞, 加入到 24 孔培养板中, 按 5 × 10⁶ 个 / 孔加入 T 淋巴细胞 (反应细胞); 同时以不与 DC 共孵育的自体淋巴细胞为对照, 每组设 3 个复孔。加入 IL-2 (500 U/ml), 于 37℃、5% CO₂ 的培养箱培养。以后隔天半量换液, 并补充 IL-2, 继续培养至第 12 天, 作为效应细胞。

1.6 流式细胞仪检测 DC 细胞表面表型

分别将淋巴结来源和外周血来源的培育第 10 天的 DC 细胞密度调节为 1 × 10⁶ 个 / ml, 取细胞悬液 100 μl / 管, 分别加入 PE 标记的 CD1a、CD80、CD83、CD86、HLA-DR 单抗各 15 μl, 混匀后置室温下暗室反应 30min, 然后用流式细胞仪进行分析。

1.7 Western-blotting 鉴定 DC 细胞 P53 蛋白表达

分别收集第 10 天淋巴结来源和外周血来源的转染 rAd-p53-DC、rAd-DC 和未转染的 DC (N-DC), 分别进行蛋白质抽提, SDS-PAGE 电泳, 当电泳即将结束时, 进行转膜 3 h, 并用 1:1000 的兔抗人的 p53 抗体进行封闭, 洗涤后将膜置于稀释的辣根标记羊抗兔 IgG (1:500), 浸入新鲜配制的二甲基联苯胺和双氧水显色液中, 于暗处显色完全后用大量双蒸水洗涤终止反应。

1.8 ELISA 法检测 DC 细胞中 IL-12 的表达

培养第 10 天后的 DC 取上清液, 分别用 IL-12 ELISA 试剂盒进行 IL-12 水平测定, 具体操作按试剂盒说明书进行

1.9 同种混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reaction, MLR) 测定

分别取培养第 10 天的淋巴结来源和外周血来源的实验组、对照组和空白对照组的 DC, 分别加入丝裂霉素 C, 使其终浓度为 50 μg/ml, 在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 45min, 作为刺

激细胞。分别以 2×10^4 个/孔、 1×10^4 个/孔、 2×10^3 个/孔、 1×10^3 个/孔将 DC 加入 96 孔板中,每组设 3 个复孔。每孔均加入 1×10^5 的 T 淋巴细胞,刺激反应细胞之比(S/R)分别为 1:5、1:10、1:50、1:100,终体积 200 μ l,于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养 96 h。终止培养前 4 h 加入 MTT 20 μ l (5 mg/ml),培养终止后加二甲亚砜 (DMSO) 200 μ l,充分混匀后静置。选择波长为 570 nm 处测 D 值。计算刺激指数 (SI),结果以 3 孔的均值表示 刺激指数 (SI) = 实验孔 D 均值 / 对照孔 D 均值。

1.10 细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes CTL) 反应体外杀伤活性的检测

以 1×10^4 /孔加靶细胞(Raji 细胞)到 96 孔板中,再分别按 5:1、10:1、20:1 (效应细胞:靶细胞)加效应细胞到各孔中,每组设 3 个复孔。同时设 4 个对照:靶细胞最大释放组、体积校正对照组、背景对照组和自然释放组。按 Cytotox96Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒说明书检测 CTL 反应,以对靶细胞的杀伤率表示 CTL 活性。

细胞杀伤率(%) = $[(\text{实验组释放} - \text{效应细胞自发释放} - \text{靶细胞自发释放}) / (\text{靶细胞最大释放} - \text{靶细胞自发释放})] \times 100\%$

1.11 统计学分析

采用 SPSS10.0 软件,所测数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用方差分析。P<0.05 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 DC 诱导培养的成功

新分离的淋巴结单个核细胞和外周血单个核细胞呈球形散在分布,表面光滑 加入细胞因子组合培养 48 h 后,高倍倒置显微镜下可见部分细胞悬浮并发生聚集样增生,部分细胞体积增大;10 天后细胞出现典型树突状突起。同期比较,实验组较对照组突起更为明显;淋巴结来源的 DC 较外周血来源的 DC 突起更明显,而空白对照组突起不明显。同时分别将培养 10 天淋巴结来源的和外周血来源的实验组的 DC,获得的细胞悬液涂片,瑞氏-吉姆萨染色,油镜下可见细胞膜有明显的刺样突起,核偏在且不规则。

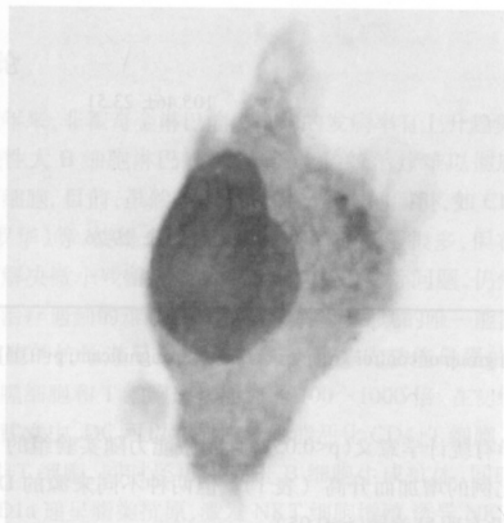


图 1 实验组 A 第 7 天 DC(瑞氏吉姆萨染色 $\times 1000$)
Fig1 experiment group A the senenth DC

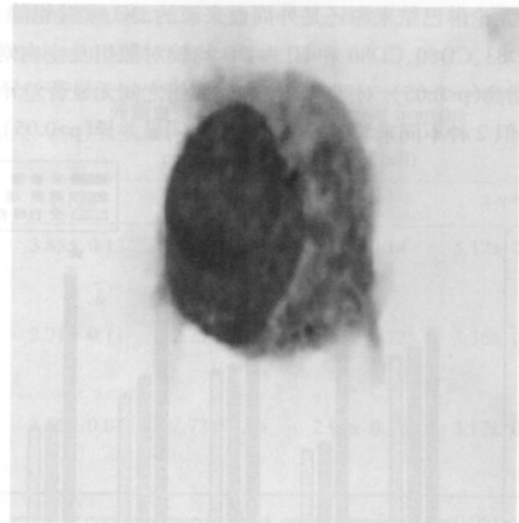


图 2 实验组 B 第 7 天 DC(瑞氏吉姆萨染色 $\times 1000$)
Fig2 experiment group B the senenth DC

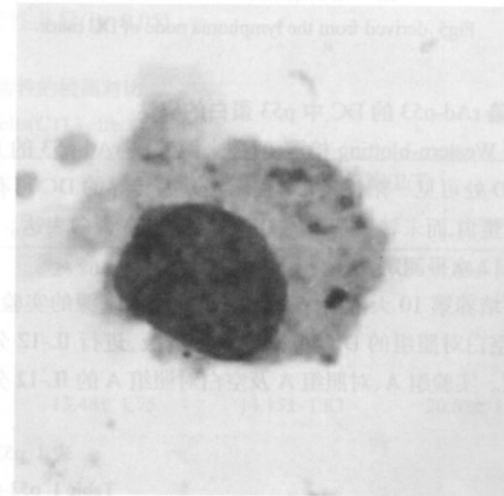


图 3 实验组 A 第 10 天 DC(瑞氏吉姆萨染色 $\times 1000$)
Fig3 experiment group A the ten DC

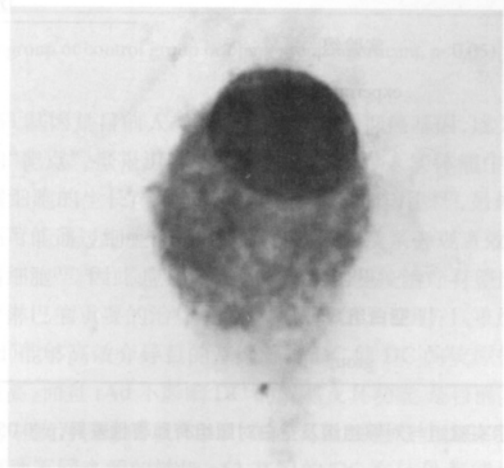


图 4 实验组 B 第 10 天 DC(瑞氏吉姆萨染色 $\times 1000$)
Fig4 experiment group B the ten DC

2.2 p53 转染后 DC 表型分子表达

将培养第 10 天淋巴结来源的和外周血来源的实验组、对照组、空白对照组的 DCs,分别用流式细胞仪检测其表型,结果

表明 无论淋巴结来源还是外周血来源的 DC,实验组除 CD1a 外,CD83、CD80、CD86 和 HLA-DR 均较对照组及空白对照组明显增高 ($p<0.05$)。对照组与空白对照组之间无显著差异 ($p>0.05$)。但 2 种不同来源的 DC 之间没有明显差异 ($p>0.05$)。

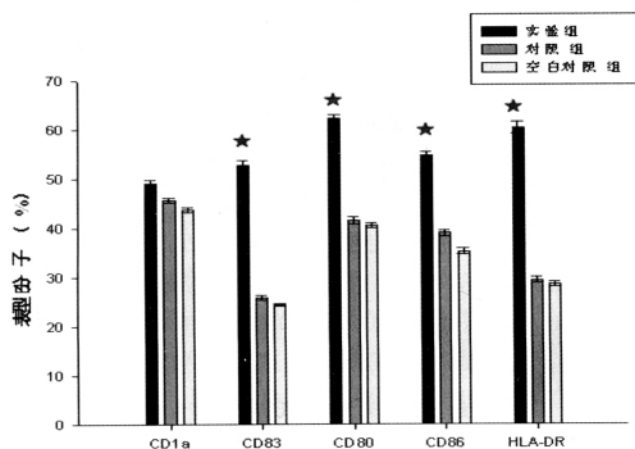


图 5 淋巴结来源 DC 表面标志

Fig5 derived from the lymphoma node of DC mark

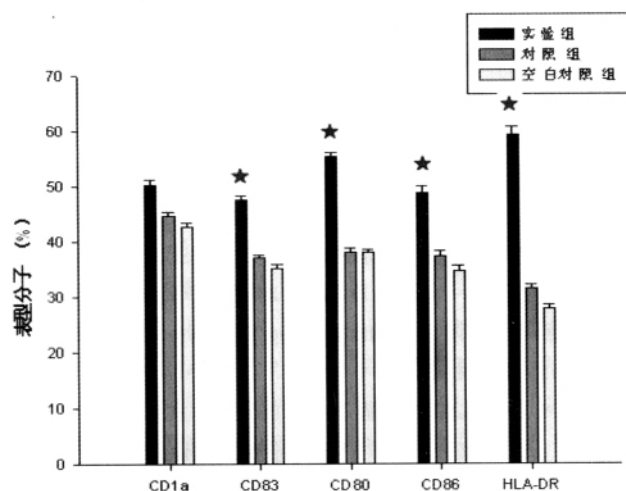


图 6 外周血来源的 DC 表型标志

Fig6 derived from periphra blood of DC mark

* 示实验组与对照组及空白对照组有显著性差异(CD1a 除外), $p<0.05$ (* shows experiment group or control group or blank group significant, $p<0.05$)

2.3 感染 rAd-p53 的 DC 中 p53 蛋白的表达

经 Western-blotting 检测,两种来源感染 rAd-p53 的 DC 在 53 000D 处可见一阳性条带,提示经基因转导的 DC 可有效表达 P53 蛋白,而未转基因的 DC 未检出 P53 蛋白表达。

2.4 IL-12 水平测定

将培养第 10 天淋巴结来源的和外周血来源的实验组、对照组、空白对照组的 DCs 分别收集上清液,进行 IL-12 分泌水平测定。实验组 A、对照组 A 及空白对照组 A 的 IL-12 分泌水

平分别为: $(230.03 \pm 46.09, 112.64 \pm 26.62, 108.65 \pm 30.18)$ pg/ml;实验组 B、对照组 B、空白对照组 B 的 IL-12 分泌水平分别为 $(218.33 \pm 42.29, 105.46 \pm 23.51, 103.19 \pm 29.26)$ pg/ml。结果显示实验组 IL-12 分泌水平均较对照组及空白对照组明显增高 ($p<0.05$)。对照组与空白对照组之间无显著差异 ($p>0.05$)。但 2 种不同来源的 DC 之间分泌 IL-12 水平没有明显差异 ($p>0.05$)。

表 1 p53 转染后 DC 的 IL-12 测定

Table 1 p53-transduced- DC IL-12 determine

Group	淋巴结来源 DC derived from the lymphoma node of DC	外周血来源 DC derived from the periphra blood of DC
实验组 experiment group	$230.03 \pm 46.09^*$	$218.33 \pm 42.29^*$
对照组 control group	112.64 ± 26.62	105.46 ± 23.51
空白组 blank group	108.65 ± 30.18	103.19 ± 29.26

注: * 示实验组与对照组及空白对照组有显著性差异, $p<0.05$ (*shows experiment group or control group or blank group significant, $p<0.05$)

2.5 p53 转染后 DC 刺激自体淋巴细胞的增殖

淋巴结来源和外周血来源的实验组 DCs 都具有很强的刺激自体淋巴细胞增殖的能力,实验组与对照组、空白对照组相

比差异有统计学意义 ($p<0.05$),且刺激能力随实验组的 DCs 与细胞比例的增加而升高(表 1)。但两种不同来源的 DC 之间 MLR 没有明显差异 ($p>0.05$)。

表 2 p53 转染后 DC 刺激自体淋巴细胞的增殖对比

Table 2 p53-transduced- DC stimulate autogene T lymphocyte proliferation contrast

Group	淋巴结来源 DC T 细胞(derived from the lymphoma node of DC: T cell)				外周血来源 DC T 细胞(derived from the periphera blood of DC: T cell)			
	1:100*	1:50*	1:10*	1:1*	1:100*	1:50*	1:10*	1:1*
实验组 experime group	4.35± 0.11	4.86± 0.14	5.23± 0.12	5.86± 0.16	3.85± 0.13	4.36± 0.12	4.89± 0.14	5.17± 0.16
对照组 control group	3.05± 0.08	3.08± 0.09	3.12± 0.10	3.57± 0.12	2.71± 0.11	2.79± 0.08	3.12± 0.12	3.36± 0.14
空白组 blank group	3.01± 0.06	3.05± 0.08	3.10± 0.11	3.23± 0.13	2.65± 0.07	2.72± 0.06	2.97± 0.11	3.17± 0.13

注 : * 示实验组与对照组组及空白对照组有显著性差异, p<0.05(*shows experiment group or control group or blank group significant, p<0.05)

2.6 p53 转染后 DC 的 CTL 杀伤活性的检测
在效靶比(E/T)为 5 :1、10 :1 和 20 :1 时,两种不同来源的 DC 实验组、对照组、空白对照组所诱发的 CTL 活性均值见(表 2),实验组与对照组及空白对照组间的 CTL 活性均有显著性差异(P< 0.05)。且实验组 A 的 CTL 活性高于实验组 B,两者间有显著性差异(P< 0.05)。

表 3 p53 转染后 DC 的 CTL 杀伤活性的检测对比

Table 3 p53-transduced- DC cytotoxic T cells(CTL) effect against

Group	淋巴结来源 DC Raji 细胞(E/T)			外周血来源 DC Raji 细胞(E/T)		
	5:1*	10:1*	20:1*	5:1*	10:1*	20:1*
实验组 experiment group	34.45± 3.59	37.22± 2.41	46.95± 3.79	25.80± 1.82	30.59± 2.31	34.89± 3.05
对照组 control group	13.65± 1.79	17.43± 2.07	24.53± 2.09	13.48± 1.75	14.15± 1.83	20.62± 1.96
空白组 blank group	12.73± 1.91	14.57± 1.74	20.54± 2.03	11.62± 1.41	12.36± 1.67	17.58± 1.84

注 : * 示实验组与对照组组及空白对照组有显著性差异, p<0.05(*shows experiment group or control group or blank group significant, p<0.05)

3 讨论

近年来,非霍奇金淋巴瘤(NHL)的发病率有上升趋势,特别是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL),传统治疗难以彻底消灭淋巴瘤细胞,目前,虽然分子靶向治疗药物的问世,如 CD20 单抗(美罗华)等,使得 DLBCL 的治愈率提高了很多,但在治疗中如何解决微小残留病灶(MRD)、免疫耐受等问题,仍然是目前临床治疗遇到的难题^[14]。而 DC 是目前发现的唯一能激活初始 T 细胞的抗原递呈细胞(APC),也是体内功能最强的 APC,约为巨噬细胞和 T 细胞递呈能力的 100~1000 倍。在初级免疫反应的建立中,DC 可以在体内外既能活化 CD4+T 细胞又能活化 CD8+T 细胞,同时还可以促进 B 细胞生成抗体,同时可以通过 CD1a 递呈脂类抗原,激发 NKT 细胞增殖,诱导 NKT 细胞抗肿瘤作用及调节免疫作用^[15-17]。DC 已经成为肿瘤生物治疗领域的热点之一。

p53 基因是目前人类研究比较清楚的抑癌基因,成为肿瘤治疗的“靶点”,据报道野生型的 p53 基因导入实体瘤中,可出现对瘤细胞的生长产生抑制和诱导凋亡的作用^[18-22],另外,P53 蛋白还可能通过细胞传导和调节免疫系统及系旁观者效应“杀伤肿瘤细胞^[11]”。因此,应用靶向 p53 基因的免疫治疗有望成为一种治疗淋巴瘤重要的治疗手段。本研究结果证明 1、重组腺病毒(rAd)能够高效介导目的基因感染 DC,使 DC 的抗原呈递特异性更高。而且 rAd 不影响 DC 的成熟及其功能,是目前基因治疗研究中较为理想的载体。2、在研究靶细胞毒性实验中,结果表明两种不同来源的转染 p53 基因的 DC 在体外都能诱导特异性 CTL,高效杀伤淋巴瘤细胞。3、针对野生型 p53 基因靶点的 DC 所诱导的 CTL,特异性更高。4、针对野生型 p53 基因靶点的 DC 瘤苗,对瘤细胞杀伤特异性更高,避免了来源于肿瘤组织肿瘤抗原纯度低的缺点,从而降低了 DC 瘤苗治疗过程中自身免疫性疾病发生的危险性。5、rAd-p53 促进了 DC 的成熟,

可能打破了 DC 的免疫耐受,提高了其递呈功能。6、rAd-p53 治疗 DLBCL 的机制除针对 p53 突变基因外,还有可能通过 DC 途径发挥作用,因此,以 rAd-p53-DCs 为基础的肿瘤疫苗有可能在解决 DLBCL 的 MDR 等问题上发挥强大的治疗作用,为 DLBCL 的治疗提供了一个新的思路和策略,为最终彻底治愈 DLBCL 开辟一条崭新的途径。

参考文献(References)

- [1] Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(1): 97-130
- [2] Tounouz M, Libin M, Milier J, et al. Transient expansion of peptide-specific lymphocytes producing IFN-gamma after vaccination with dendritic cells pulsed with MAGE peptides in patients with mAGE-A1/ A3-positive tumors[J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 69: 937-943
- [3] Patrick AB, Jami KB, Pulendran B, et al. Priming Tissue-specific Cellular Immunity in a Phase I Trial of Autologous Dendritic Cells for Prostate Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 2175-2182
- [4] Rieser C, Ramoner R, Shurin MR, et al. Mature dendritic cells induce T-helper type-1-dominant immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. *Urol. Int*, 1999, 63: 151-159
- [5] Fujii SI, Shimizu K, Fujimoto K, et al. Analysis of a chronic myelogenous leukemia patient vaccinated with leukemic dendritic cells following autologous peripheral blood stem cell transplantation [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1999, 90: 1117-1129
- [6] Geiger J, Hutchinson R, Joseph D, et al. Treatment of solid tumours in children with tumour-lysate-pulsed dendritic cells [J]. *Lancet*, 2000, 356: 1163-1165
- [7] Wamoto M, Shinohara H, Miyazono A, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinoma, *Int J. Cancer*, 2003, 104(1): 92-97
- [8] Yin XY, Lu MD, Lai YR, et al. Prognostic significances of tumour-infiltrating S-100 positive dendritic cells and lymphocytes in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50 (53): 1281-1284
- [9] Carlo SC, Lavazza C, Locatelli A, et al. Targeting TRAIL agonistic receptors for cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 15, 13 (8): 2313-2317
- [10] Lore K, Adams WC, Havenga MJ, et al. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells are susceptible to recombinant adenovirus vectors and stimulate polyfunctional memory T cell responses[J]. *immunol*, 2007, 179(3): 1721-1729
- [11] Lu X. p53: a heavily dictated dictator of life and death [J]. *Curr Opin in Genet Dev*, 2005, 15(1): 27-33
- [12] Kamata H, Mitani S, Fujiwara M, et al: Mutation of the p53 tumour suppressor gene and overexpression of its protein in 62 Japanese non-Hodgkin's lymphomas [J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2007, 7: 39-46
- [13] Romani N. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood[J]. *J Exp Med*, 1994, 180: 83-93
- [14] Gazitt Y, Freytes CO, et al. Improved mobilization of peripheral blood CD34+ cells and dendritic cells by AMD3100 plus granulocyte-colony-stimulating factor in non-Hodgkin's lymphoma patients[J]. *Stem Cells Dev*. 2007, 16(4): 657-66
- [15] Tomura M, Yu WG, Ahn HJ, et al. A Novel Function of V14+ CD4+ NKT Cells: Stimulation of IL-12 Production by Antigen-Presenting Cells in the Innate Immune System [J]. *J Immunol*, 1999, 163 (1): 93-101
- [16] Yang YF, Tomura M, Ono S, et al. Requirement for IFN- γ in IL-12 production induced by collaboration between V14+ NKT cells and antigen-presenting cells [J]. *Int Immunol*, 2000, 12(12): 1669-1675
- [17] Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, et al. Differential Regulation of Th1 and Th2 Functions of NKT Cells by CD28 and CD40 Costimulatory Pathways [J]. *J Immunol*, 2001, 166(10): 6012-6018
- [18] Peng Z. Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16 (9): 1016-1027
- [19] Spurgers KB, Coombes KR, Mevni RE, et al. A comprehensive assessment of p53-responsive genes following adenoviral p53 gene transfer in Bcl-2 expressing prostate cancer cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23(9): 1712-1723
- [20] Gu J, Zhang L, Swisher SG. Induction of p53-regulated genes in lung cancer cells: implications of the mechanism for adenoviral p53-mediated apoptosis[J]. *Oncogene*, 2004, 23(6): 1300-1307
- [21] Eisold S, Linnerbach M, Rvschich E, et al. The effect of adenovirus expressing wild-type p53 on 5-fluorouracil chemosensitivity is related to p53 status in pancreatic cancer cell lines[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 15; 10(24): 3583-3589
- [22] Choi JW, Ahn WS, Bae SM, et al. Adenoviral p53 effects and cell-specific E7 protein-protein interactions of human cervical cancer cells [J]. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20 (11) : 2236-2243