

热休克蛋白-多肽复合物在肿瘤和传染性疾病免疫中的作用

孟颂东¹ 高 福² 田 波¹

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

²(Harvard University ,Boston ,Massachusetts MA02115 ,USA)

摘 要 热休克蛋白家族中的许多成员如 gp96、HSP90、HSP70 等具有排斥和治疗肿瘤及传染性疾病的免疫原性,进一步研究发现热休克蛋白作为分子伴侣可结合细胞中的肽库,它本身没有抗原性,抗原性由结合的短肽所决定。热休克蛋白将结合的短肽呈递给 I 类 MHC 分子,进而激活特异性 CTL 和记忆性 T 细胞,引发机体细胞免疫反应。据最新发现 gp96 还可能具有与 MHC 一样的功能,可直接将结合的多肽抗原呈递给 T 细胞。近年来对哺乳动物的二种主要热休克蛋白 gp96 和 HSP70 的免疫机制和作为治疗性疫苗的优越性进行了详细研究,这为乙型肝炎和乙肝继发性肝癌的免疫治疗提供了新思路。

关键词 热休克蛋白,肿瘤免疫,CTL,抗原呈递,肽疫苗

中图分类号 TQ93 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2000)04-0425-04

肿瘤免疫是以细胞免疫为主,因此肿瘤免疫学研究主要目的之一是寻求肿瘤特异性抗原,活化杀伤肿瘤细胞的特异性 T 淋巴细胞(CTL),增强机体抗肿瘤排斥反应。目前肿瘤免疫治疗研究主要有以单克隆抗体、脂质体、低密度脂蛋白为载体,以化疗药物、生物素或放射性同位素偶联物作为弹头的导向治疗^[1];将细胞因子基因、共刺激分子 B7 基因等导入肿瘤细胞株、淋巴细胞或成纤维细胞、骨髓造血干细胞,从而抑制肿瘤细胞生长和转移、激发机体免疫反应的基因治疗^[2];直接以核酸免疫动物,使之在宿主细胞内表达目的抗原,引发特异性的体液免疫和细胞免疫的 DNA 疫苗^[3];以及利用肿瘤细胞或病毒抗原区多肽加载体或佐剂免疫的肽疫苗^[4]等方法。近年来在肿瘤抗原分子和主要组织相容性复合物(MHC)抗原呈递研究方面有突破性进展,尤其是发现热休克蛋白(HSPs)在抗原呈递和激活 CD8⁺T 细胞方面有重要作用,为肿瘤和传染性疾病的免疫治疗开辟了新的途径。

1 HSPs 具有肿瘤免疫原性的发现

HSPs 具有肿瘤免疫原性是 Srivastava 于 1986 年在小鼠肿瘤移植实验中寻找不同个体特异性肿瘤抗原时偶然发现的^[5]。他首先从小鼠和大鼠癌组织中分别纯化出质量约 100kD 的蛋白,后来证明是一种存在于内质网腔内的热休克蛋白 gp96。接下来的实验获得一系列排斥肿瘤的抗原,进一步分析发现这些抗原均属于 HSPs,分别是 HSP90、HSP70、HSP60 族蛋白,而从正常组织中提取的 HSPs 不具有免疫活性。后来几年对肿瘤组织和正常组织的 HSPs 的 cDNA 克隆与测序,但令人失望的是二者没有差异。

那么为什么肿瘤组织中分离的 HSPs 具有免疫原性呢?

这一度给研究工作带来困惑和阻力,但 90 年代初两项生物学重大发现为揭开此谜提供了理论基础。一是证实 HSPs 作为分子伴侣能够结合多肽^[6],二是 T 淋巴细胞对巨噬细胞上 I 类 MHC 分子呈递外源性抗原的识别机理有了全面认识^[7]。Srivastava 和他的同事假设结合的多肽具有免疫性,并设计一系列实验证实了他们的假设。他们以甲基胆蒽诱发的小鼠纤维瘤作为模型研究 HSP70-多肽复合物的肿瘤抗原性^[8],同时对感染了泡状口炎病毒(VSV)细胞中 gp96 结合的多肽进行了全面研究^[9],实验证明 HSP-多肽复合物的抗原性来自于多肽,而非 HSP 本身,HSP 通过参与抗原呈递而起作用。

2 热休克蛋白-多肽复合物具有特异免疫原性的机制

2.1 HSPs 与多肽结合的分子基础

HSPs 在所有生物体的细胞中都有表达,且大多为组成型的,根据其分子量大小可分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60 和 HSP28 几种不同的蛋白族。HSPs 家族是目前已知的最保守的分子,同一种生物个体之间还未见有多态性差异,真核生物和原核生物的 HSP70 蛋白氨基酸同源性约为 50%,所以被认为是最具有免疫耐受性的分子^[10]。在正常代谢情况下 HSPs 参与细胞的各种代谢过程,包括新合成多肽的折叠、蛋白多聚体的组装、分泌型蛋白的跨膜运输以及蛋白降解等,细胞在胁迫条件下如高温、低温、高盐、高浓度乙醇、重金属等均会诱导 HSPs 的大量合成^[11],后来又发现细胞在病毒感染、发生癌变时也会导致其合成增加。

同时,HSPs 作为分子伴侣,在抗原呈递过程中也发挥重要作用^[10],能与细胞中各种变性蛋白和短肽结合,尤其是在在

抗原呈递过程中会结合大量抗原性多肽,从而使其具有该细胞特有的抗原库^[12,43]。近年来对 HSP70 族蛋白与底物结合的结构分析研究取得许多进展。这类蛋白有二个功能区: N 端区(约 44kD)有 ATPase 活性, C 端区(约 27kD)结合多肽底物。在对 *E. coli* 结合有一个 7 肽的 DnaK(原核生物的 HSP70)蛋白结晶的结构分析发现^[41], DnaK 与底物的结合区由一个 β -三明治结构域和一个 α 螺旋组成,多肽以伸展构象与 β -三明治环状结构形成的通道结合, α 螺旋不直接与底物结合,对底物结合具有稳定作用。ATP 能促使结合底物与 DnaK 解离, DnaK 与其它 HSP70 族成员都对 ATP 具有很高的亲和力,伴随 ATP 的水解, DnaK 会发生构象变化,构象变化与底物的结合和释放有关,这对于其抗原呈递具有重要意义。哺乳动物 HSP70 与原核生物相似^[15,46],其 N 端 ATPase 活性区晶体结构已测定,包含有 4 个结构域,底物多肽也是以伸展构象与其 C 端区结合。

2.2 HSPs-多肽复合物特异性激活细胞毒性 T 细胞

Udono 等人^[17]在前人研究的基础上首先对热休克蛋白 gp96-多肽复合物对小鼠纤维瘤的免疫机制进行了详细研究。从化学诱导的纤维瘤中提取的 gp96 对该肿瘤有特异免疫原性,用 gp96-多肽复合物免疫小鼠,至少在 5 周内小鼠对该种纤维瘤产生强烈的细胞免疫反应。在 T 细胞免疫应答的感应阶段,若用抗 CD8⁺ 单克隆抗体消除小鼠的 CD8⁺,或用角叉藻聚糖消除巨噬细胞, gp96 则丧失免疫能力,但消除 CD4⁺ T 细胞免疫性不受影响。而在 T 细胞增殖分化和免疫效应阶段, CD4⁺、CD8⁺ T 细胞和巨噬细胞对于 gp96 的免疫原性都是必需的。gp96 结合的多肽能呈递给巨噬细胞上的 I 类 MHC 分子,进而激活 CD8⁺ T 细胞。内源合成的抗原一般由 I 类 MHC 分子呈递,外源合成的抗原一般由 II 类 MHC 分子呈递, gp96 可将外源抗原呈递给 I 类 MHC 分子并激活 CD8⁺ T 细胞,这为癌症的免疫治疗提供了新方法。同时,根据最新研究有证据表明, gp96 可能会在细胞表面表达,这为其作用机制提供了新的线索,即 gp96 直接呈递抗原并激活 CD8⁺ T 细胞(个人通信)。因此, gp96 作用机制有二种可能性,一是抗原多肽前体经 gp96 处理后转给 I 类 MHC 分子,二是直接将抗原多肽呈递给 CD8⁺ T 细胞。

gp96-多肽复合物对 CD8⁺ T 细胞的激活作用在 VSV 模型中也得到证实^[9]。用酸处理分离获得 gp96 上结合的多肽,用此多肽混合物致敏的淋巴瘤细胞能被所有 VSV8(病毒免疫区肽,位于病毒核蛋白 52~59 氨基酸残基)特异性 CTL 克隆所识别,而从未转染的细胞中, gp96-多肽不具有这些免疫性。在体外将 gp96 与 VSV8 多肽结合,用组装的复合物致敏的巨噬细胞能为 VSV 特异性 CTL 识别,其免疫效果比直接用 VSV8 高 200~400 倍。

HSP70-多肽复合物在小鼠抗纤维瘤免疫反应中的作用机制与 gp96 类似,能特异性激活 T 细胞产生肿瘤排斥反应^[8,48]。值得一提的是由于 HSP 是一类具有重要抗逆和免疫功能的高度保守的蛋白质,其本身就是病原菌中重要的抗原成分,含有多被 HLA-DR 分子识别的 T 细胞表位,利用

其自身的免疫原性用于肿瘤和传染性疾病的免疫治疗也有许多报道,但这与本文所论述的免疫机理有本质区别。

3 HSPs-多肽复合物是新型抗肿瘤和传染性疾病的疫苗

目前为止 HSP-多肽复合物已用于小鼠肝癌、肺癌、黑色素瘤等自发性肿瘤和纤维肉瘤、结肠癌等化学诱导肿瘤免疫治疗研究,并建立了小鼠模型^[19]。而且 HSP 能结合 VSV、HIV、流感病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒等多种病毒抗原多肽,激活 CTL,刺激淋巴细胞产生细胞因子,从而引发机体免疫保护反应。HSP-多肽复合物作为新型肿瘤和传染性疾病的疫苗,具有其它疫苗所没有的优越性:

(1) 确定能引起机体免疫反应的抗原决定簇通常是设计疫苗的前提,由于 HSP 能自然结合细胞中的多肽库,从而可能带有肿瘤细胞或病毒感染细胞中全部抗原区多肽,因此,在抗原决定簇还不清楚,或者单一抗原决定簇不足以诱导产生免疫反应,或者抗原高度可变以至于不可能对每个变异体抗原决定簇一一鉴定等情况下, HSP-多肽复合物可直接作为理想疫苗。由于多数化学或物理因素诱导的肿瘤和“自发”形成的肿瘤抗原表现明显的个体特异性,查明单个癌症患者的抗原决定簇不现实,因此可直接从病人自身肿瘤或肿瘤细胞系中提取 HSP-多肽复合物作为疫苗,这也是 HSP-多肽复合物疫苗的独到之处,有关 HSP 提取方法、注射部位、注射剂量、免疫时间等都有详细报道^[20,21]。

(2) HSP-多肽复合物可在体外组装,已有研究在体外合成 gp96-多肽复合物^[10],研究发现温度 50℃ 时复合物解离,当温度缓慢下降时,多肽与 gp96 重新结合,重新复性的复合物有 ATPase 活性和免疫原性, gp96 体外能结合 5~25mer 的多肽,这使得体外合成新型治疗肿瘤和病毒感染性疾病的疫苗成为可能,避免将传染性或其它毒性分子带给病人的潜在危险,而且又避免因多种未知多肽混合物注入体内而引起自身免疫疾病的可能性,因此体外组装已知多肽应是今后进一步发展的方向。

(3) 只有以特定多肽免疫相应 HLA 等位基因的病人才会有效,如果同一分子的不同抗原决定簇由不同 HLA 等位基因型所识别,疫苗必须设计成由各种多肽组成的混合物。HSP 十分保守,不具有多型性,可在同种内相互使用,这已得到实验证实^[18]。因此无论细胞的 MHC 单倍型如何, HSP 均能结合全部肽谱,这样从一特定的单倍型细胞分离的 HSP-多肽复合物能用于免疫其它单倍型个体,从而克服了由于 MHC 多型性而造成的肿瘤疫苗无法在患者群体中通用的缺陷。

(4) 由于 HSP 结合的多肽是细胞产生的全部肽库,因此 HSP-多肽复合物疫苗是多价的,多价抗原可有效防止免疫逃逸和因人类肿瘤特异性抗原多变性造成的疫苗免疫疗效差等问题,为人类肿瘤治疗提供了独特的思路和方法。

(5) 新近研究表明 HSP-多肽复合物可激发记忆性 T 细胞反应^[21],以 gp96-免疫 12 周后,小鼠仍能表现出对肿瘤的

排斥反应。能否激发产生记忆反应对于疫苗的好坏至关重要,但到目前为止,有关肿瘤疫苗引起 T 细胞记忆反应还少有报道。

4 HSPs 作为乙型肝炎和肝癌治疗性疫苗在临床实际应用的前景

近年来许多能激活 CTL 和 T_H 由细胞癌基因或突变的 p53 编码的人类肿瘤抗原已被克隆^[2, 22, 23]。这些为设计特异性肿瘤疫苗提供了广阔前景,许多方法已用于临床,但到目前为止临床治疗效果并不理想,缺乏有效抗原呈递途径和机体免疫耐受是两个主要原因^[2, 24]。目前以肽疫苗免疫时所使用的 T 细胞佐剂或者剂量非常大,或者毒性高,以至于人难以接受。基于 HSP 以上优点,它为抗病毒感染和癌症的免疫治疗提供了更加有效的途径,目前对晚期癌症患者用 gp96 免疫 I 期临床试验已经完成,尽管免疫剂量明显不足,但有一半以上的患者病情得到不同程度的控制,下一步将对早期癌症患者进行试验,效果可能会更明显一些^[10]。

我国约有 1 亿人已被乙型肝炎病毒(HBV)感染,病毒核心抗原在肝癌内和肝周组织中阳性率分别为 62.5% 和 29.2%, 探寻控制和治疗乙肝和肝癌发病在我国有重要意义。中医治疗旨在调整与提高人体综合免疫能力,治疗乙肝和肝癌有其独到之处。近几年有关乙肝和肝癌的免疫治疗已上升至重要地位,目前普遍认为 HBV 特异性 CTL 对于控制病毒感

染、治疗乙肝及乙肝继发性肝癌具有决定性作用^[25~28]。国内有关乙肝和肝癌有许多卓有成效的研究,如应用抗原抗体复合物^[29]、单克隆抗体靶向制剂^[29]、肝癌免疫基因治疗^[30]等,HSPs 的最新研究成果为乙肝和肝癌的免疫治疗提供了新思路。HSP-多肽复合物已成功用于小鼠病毒感染和肝癌的免疫治疗,并建立小鼠模型,尤其是发现 HSP 能结合并提呈 VSV 的免疫区肽,在小鼠肝癌免疫研究中不仅能致敏特异性 CTL,而且能产生记忆性 T 细胞。乙肝细胞及由乙肝继发的肝癌细胞中究竟有无 HSP 结合的病毒抗原区肽,病毒抗原肽在肝癌细胞中免疫原性如何等,这些问题有待于深入研究。

5 小 结

HSP 能结合抗原肽并有效激活 CTL 和记忆性 T 细胞,这在人类肿瘤和病毒感染免疫治疗中将发挥重要作用。尽管有许多问题还有待深入研究,如 HSPs 结合的短肽中特异性抗原肽分析鉴定,HSPs 在抗原结合与呈递中的作用机制等,但就目前研究来看 HSP-多肽复合物能结合并呈递肿瘤细胞中全部抗原肽库,作为肿瘤和病毒感染治疗性疫苗具有一些其它疫苗所没有的优越性,它避免了复杂抗原分离过程和肿瘤抗原多变性带来的局限,同时为寻找肿瘤特异抗原提供了新方法。这也为乙肝及乙肝继发性肝癌的治疗开辟了新思路。

参 考 文 献

- [1] Chen S, Yang A, Chen J *et al.* *Nature* ,1997 **385** :78~80
- [2] Hellstrom I, Hellstrom K E. *J Immunother* ,1998 **21** (2) :119~126
- [3] Kuhober A, Pudollek H, Reifenberg K *et al.* *J Immunol* ,1996 **156** :3687~3695
- [4] Kuhober A, Wild J, Pudollek H *et al.* *Int Immunol* ,1997 **9** (8) :1203~1212
- [5] Srivastava P K. *Adv Cancer Res* ,1993 **62** :153
- [6] Flynn G C, Pohl J, Flocco M T *et al.* *Nature* ,1991 **353** :726~730
- [7] Yewdell J W, Bennick J R. *Adv Immunol* ,1992 **52** :1~123
- [8] Peng P, Menoret A, Srivastava P K. *J Immunol Methods* ,1997 **204** :13~21
- [9] Thomas J F, Niel M C, Agnes A T *et al.* *Proc Natl Acad Sci. USA* ,1996 **93** :6135~6139
- [10] Li Z. *Immunology* ,1997 **9** :315~322
- [11] Parsell D A, Lindquist S. *Annu Rev Genet* ,1993 **27** :437~496
- [12] Srivastava P K, Udono H, Blachere N E *et al.* *Immunogenetics* ,1994 **39** :93~98
- [13] Blachere N E, Srivastava P K. *Cancer Biol* ,1995 **6** :349~355
- [14] Zhu X, Zhao X, Burkholder W F *et al.* *Science* ,1996 **272** :1606~1614
- [15] Flaherty K M, Deluca-Flaherty C, McKay D B. *Nature* ,1990 **346** :623~627
- [16] Gragerov A, Zeng L, Zhao X *et al.* *J Mol Biol* ,1994 **235** :848~854
- [17] Udono H, Levey D L, Srivastava P K. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1994 **91** :3077~3081
- [18] Suto R, Srivastava P K. *Science* ,1995 **269** :1585~1587
- [19] Tamura Y, Peng P, Liu K *et al.* *Science* ,1997 **278** :117~120
- [20] Srivastava P K. *Immunol Methods Manual* Academic Press London :1997, pp. 739~748
- [21] Janetzki S, Blachere N E, Srivastava P K. *J Immunother* ,1992 **21** (4) :269~276
- [22] Overwijk W W, Tsung A, Irvine K R *et al.* *J Exp Med* ,1998 **188** (2) :277~286
- [23] Lane D. *Nature* ,1998 **394** :616~617

- [24] Ada G. *Immunol Cell Biol* ,1999 ,**77** :180~185
- [25] Guidotti L G ,Borrow P ,Hobbs M V *et al* .*Proc Natl Acad Sci USA* ,1996 ,**93** :4589~4594
- [26] Rehermaann B ,Chang K M ,Mchutchinson J *et al* .*J Virol* ,1996 ,**70**(10) :7092~7102
- [27] Shimizu Y ,Guidotti L G ,Fowler P. *J Immunol* ,1998 ,**161**(9) :4520~4529
- [28] Oseroff C ,Sette A ,Wentworth P *et al* . *Vaccine* ,1998 ,**16**(8) :823~833
- [29] 闻玉梅 . 中华微生物学和免疫学杂志 ,1996 ,**16**(3) :155~158
- [30] 黄洪莲 ,王小宁 ,钱其军等 . 中华微生物学和免疫学杂志 ,1997 ,**17**(5) :387~388

Role of Heat Shock Protein-peptide Complexes on Tumor and Infectious Diseases Immunity

MENG Song-Dong¹ GAO Fu² TIEN Po

¹(*Institute of Microbiology ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080*)

²(*Harvard University ,Boston ,Massachusetts MA02115 ,USA*)

Abstract Many heat shock proteins *e. g.* gp96 ,HSP90 ,HSP70 ,etc have elicited rejection and immunotherapy immunogenicity of tumor and infectious diseases. Further study indicated that hsp's can chaperone the endogenous repertoire of peptides ,and the antigenicity of hsp-peptide complexes lies in the peptides ,not HSPs. HSPs present peptides associated with them to MHC class I molecules for recognition by CTL and memory T cells ,and elicit cellular immune responses. The latest finding shows that gp96 may present antigenic peptides directly to T lymphocytes functionally as MHC. In recent years the mechanism of immunogenicity and advantages as vaccine therapy of gp96 and HSP70 ,the two main hsp's in mammals have been studied in detail ,which offers a new opportunity for immunotherapy of hepatitis B and hepatocellular carcinoma.

Key words Heat shock proteins ,tumor immunity ,cytotoxic T lymphocyte ,antigen presentation ,peptide vaccines