

综述

Gp96 蛋白的免疫学及其临床应用研究进展

陈才伟, 贾晓娟, 孟颂东, 刘文军

中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

摘要: 热休克蛋白 Gp96 属于 HSP90 家族, 是内质网中最丰富的蛋白质之一, 在细胞内发挥着分子伴侣的作用。在天然免疫中, Gp96 则通过与 Toll 样受体等相互作用刺激抗原呈递细胞 (如 DC 等) 产生各种细胞因子激活免疫系统; 而在获得性免疫中, Gp96-抗原肽复合物通过抗原交叉将抗原肽呈递给 MHC-I 类分子, 诱发机体抗原特异性细胞毒 T 细胞免疫应答, 清除病原体感染和肿瘤; 近年来的研究还发现 Gp96 具有免疫佐剂的功能。以下从 Gp96 的生物学特性、免疫学机制以及其在抗病原体感染和抗肿瘤免疫中的应用等方面做一小结, 为设计以 Gp96-抗原肽为新一代疫苗的临床研究提供理论基础。

关键词: 热休克蛋白, Gp96, 免疫佐剂, 抗原交叉呈递

Overview of Gp96 mediated immunity

Caiwei Chen, Xiaojuan Jia, Songdong Meng, and Wenjun Liu

CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: As a member of the HSP90 family, heat shock protein (HSP) Gp96 is one of the most abundant proteins in the endoplasmic reticulum (ER), which displayed important molecular chaperones function in cells. Gp96 can stimulate the production of cytokines by activating the antigen presentation cells (such as dendritic cell, et al) in innate immunity. It is capable of eliciting an antigen-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) immune response to eliminate pathogens and tumors by facilitating antigen cross-presentation in adaptive immunity. Gp96 is also an ideal adjuvant in many recent researches. Here, we review the progress that addresses the role of biological characteristics, immunogenic mechanism that may be involved in the induction of anti-infection immune response and antitumor immunity, which may guide the new vaccine strategies with the knowledge of Gp96-antigen complexes.

Keywords: heat shock protein, Gp96, adjuvant, antigen cross-presentation

热休克蛋白 (Heat shock protein, HSP) 是一类在生物进化中高度保守且广泛存在于原核及真核生物中的蛋白质, 加热、缺氧、病毒感染、重金属中毒、氧化剂等刺激因素都可诱导其表达增加^[1]。HSP

根据同源程度及分子量大小可分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40、小分子 HSP 及泛素等多个亚家族^[2]。Gp96(GRP94) 为内质网 HSP90 家族的代表, 与细胞质 HSP90 高度同源, 主要生物

Received: February 25, 2011; Accepted: April 20, 2011

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA10A215).

Corresponding author: Wenjun Liu. Tel/Fax: +86-10-64807503; E-mail: liuwj@im.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA10A215) 资助。

学功能有: 分子伴侣; 与细胞内的其他肽类蛋白质结合, 参与细胞的抗损伤、修复和热耐受过程; 参与蛋白质水解过程; 结合抗原肽, 加工提呈肿瘤抗原及维持细胞内环境稳定等作用; 对细胞的生长、发育、分化及死亡具有一定的调节作用^[3]。近年来随着对 Gp96 研究的不断深入, 人们发现它能够激活免疫应答, 具备独特的抗肿瘤免疫效应和免疫佐剂功能, 在抗肿瘤免疫及疫苗制备中具有很大的应用前景。因此, Gp96 在肿瘤发病学、治疗、预防学以及疫苗研发中的意义已引起广泛关注, 成为近年来最活跃的研究领域之一。

1 Gp96 的生物学特性

Gp96 是一种遗传单态性分子, 其氨基酸 (aa) 序列高度保守: 小鼠和仓鼠的 Gp96 氨基酸序列有 95% 以上的同源性, 猪源、人源与禽源的 Gp96 氨基酸序列分别有 97% 和 89% 以上的同源性。

成熟的 Gp96 蛋白由 3 个结构域组成: N 端为 ATP 酶活区, 也具有结合抗原肽的能力, 其中 N 端 1~22aa 为信号肽序列; 中间为带电的连接区 (M); N-M 区具有免疫佐剂功能; C 端为二聚化区, 可能与机体免疫调节相关, 其末端含有内质网定位滞留信号序列 KDEL^[4]。此外, 该蛋白含有 5 个 N-糖基化位点, 4 个高亲和力和 11 个低亲和力的 Ca^{2+} 结合位点^[4]。Gp96 有单体、二聚体、四聚体、多聚体等多种构象。在天然条件下, Gp96 呈杆状的二聚体, 二聚化区在 C 端 692~709aa, 若缺失该区域则以单体形式存在^[5]。Dolins 解析出的 Gp96 全长晶体结构显示其二聚体为一种螺旋状的 V 型构象 (“twisted V”), 这种结构使其 N 端分开从而阻碍其 N 端的二聚化^[6]。二聚化结构是 Gp96 的生物学活性的基础。有研究表明 Gp96 的最小肽结合位点是 624~630aa, 该区域高度保守, 而另一些研究发现 Gp96 结合多肽位点在 N 端。根据 Gp96 肽结合模型推测, Gp96 肽结合区由约 200aa 形成一个 α 螺旋沟, 位于反向 β 片层构成的表面上, 肽配位即位于这个沟内^[5]。二

聚化结构域与肽结合位点毗连, 提示该结构域可能与 Gp96 肽复合物的高度稳定性以及将肽传递给 MHC-I 分子进行抗原递呈有关, 因为 MHC-I 类分子也具有同样结构的肽结合域^[5]。Gp96 形成的高度寡聚结构与其佐剂功能相关: 其同源寡聚化有利于结合肽段和分子伴侣功能^[7]; 在 Gp96 的 N 末端 1~355 片段之间有一段重要的氨基酸序列, 能与 APCs 结合, 增加抗原肽的提呈, 在小鼠体内诱导抗原特异性的 CTL 反应, 所以这段序列具有充分的免疫活性; Ding 发现 Gp96 作为一种潜在的 Th-1 型佐剂主要是依赖于该蛋白的独特的聚集结构^[8]; 孟颂东课题组研究发现低聚集态的重组 Gp96 比高聚集态的天然 Gp96 具有更强的肽段结合能力, 它与肽段结合能力和自我包装能力与其诱导 CTL 能力相关^[9]。Gp96-抗原肽复合物相当稳定, SDS-PAGE 也不能破坏它们之间的相互作用。已经证实 Gp96 结合肿瘤抗原、病毒抗原、次要组织相容性抗原和模拟抗原, 它和细胞内的肽以 1:1 的比率非共价结合, 无明显氨基酸序列特异性^[7]。Gp96 的以上这些特性为其在肿瘤免疫治疗和疫苗的发展奠定基础。

2 Gp96 的免疫学效应机制

2.1 Gp96 的受体

Arnold-Schild 等研究发现 Gp96 是通过与细胞膜表面受体作用介导进入和作用于细胞^[10]。人和鼠的专职抗原呈递细胞 (APC) 如巨噬细胞 (M Φ)、树突细胞 (DC) 和 B 细胞等表面含有 Gp96 受体, 如 CD91 (即 α -2 巨球蛋白受体或叫低密度脂蛋白相关蛋白), 清道夫受体 (Scavenger receptor)、CD14、CD36、CD40 等^[4,10-11](图 1)。只有受体介导的 Gp96-抗原肽的内吞作用才能导致与其结合的 MHC-I 类抗原再提呈, 并引起细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 活化, 非受体介导的非特异性的胞吞则不能, 且这种受体介导的 Gp96 的抗原提呈, 其抗原提呈效率比吞噬介导的递呈高 1 万倍^[11]。

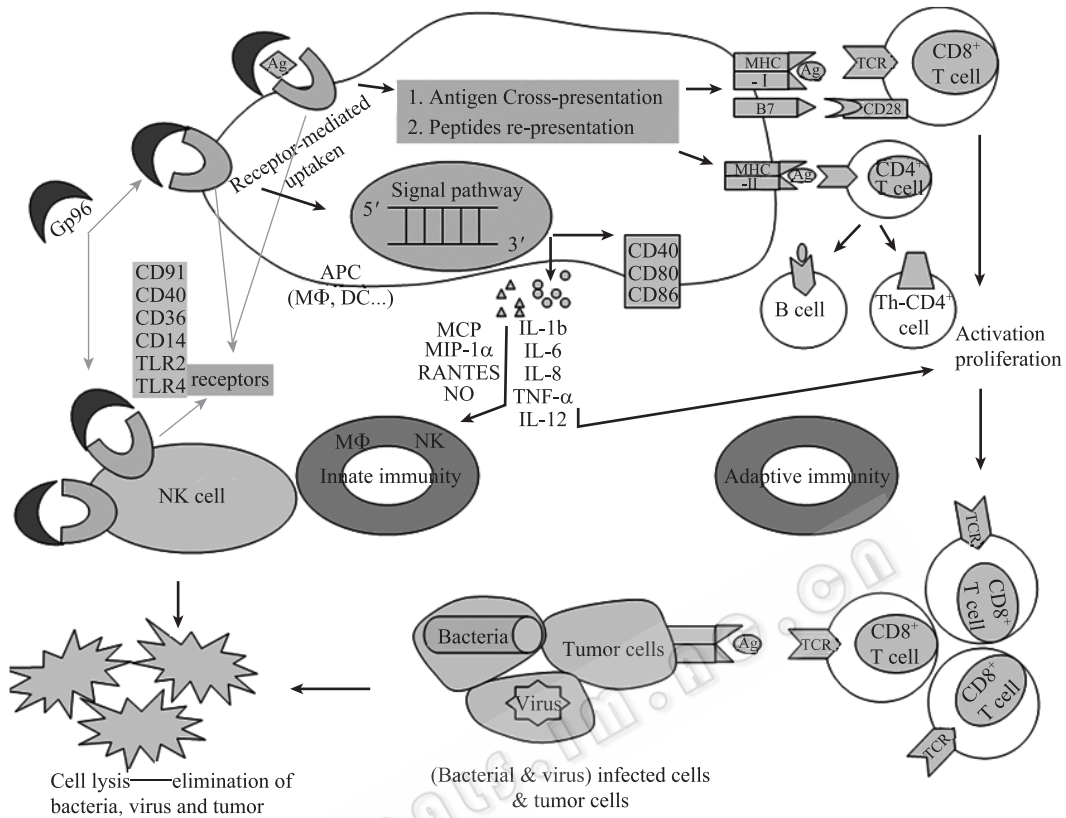


图1 Gp96介导免疫反应的可能机制

Fig. 1 Proposed mechanism of action for Gp96 in immune responses.

Toll样受体 (Toll like receptors, TLRs) 可能是另一种 Gp96 受体。TLR 多表达于 DC 等抗原提呈细胞, 主要识别脂多糖等病原体保守结构。Brent 等用缺失了脂多糖 (LPS) 信号转导途径的细胞系研究发现, Gp96 在内质网中选择性地结合 TLR2 和 TLR4。这说明胞外 Gp96 很可能和 T 细胞表面受体结合, 通过 MyD88-NF-κB 等多条信号途径, 启动细胞活化进程, 上调 MHC 和 CD80、CD86 共刺激分子等表达, 分泌 TNF-α、IL-6 等细胞因子^[12]。同时, Gp96 也是 TLRs 成熟及发挥功能的必要因子, 在 Gp96 缺陷型 MΦ 中, 胞内和细胞表面 TLRs 信号通路都受到抑制, 从而影响 MΦ 分泌促炎症因子^[12-13]。

2.2 Gp96 与 DC

DC 是体内功能最强的 APC, 是连接抗原与免疫应答细胞以激发有效免疫应答反应的桥梁。非成

熟态 DC 具很强的抗原捕获能力, 当 DC 受到抗原、细胞因子等刺激后, 转化为成熟的 DC, 高表达 MHC 分子、B7-2 及 CD40 等共刺激分子, 并能分泌细胞因子, 具有很强的抗原递呈能力及活化 T 细胞的功能。一般情况下, 外源性抗原由 MHC-II 类分子呈递, 但是在许多情况下观察到外来抗原通过 MHC-I 类分子向 CTL 的呈递——称为抗原交叉呈递 (Antigen cross presentation), 对 CTL 的激活过程为交叉激活 (Cross priming)。DC 是进行交叉呈递最有效的细胞。Gp96 通过与 DC 表面的受体相互作用, 经由 DC14/TLR2 和 DC14/TLR4 介导的信号转导途径诱导 DC 成熟, 并将其结合的抗原肽经 MHC-I 类分子再递呈到细胞表面, 从而与特异性 CTL 结合, 激活抗病原或抗肿瘤免疫应答^[13,15](图 1)。

Srivastava 等研究发现, 当胞外 Gp96 与 DC 共

同孵育时,可诱导 DC 分泌细胞因子 (IL-12, IL-1 β , TNF- α , GM-CSF 等) 和趋化因子,从而趋化 DC 并诱导其成熟^[15-16]。另外, Gp96 与 DC 的作用还可使诱导型一氧化氮合酶 (Inducible nitric oxide synthase, iNOS) 活化,使 M Φ 和 DC 产生 NO^[17]; 此外, Basu 等发现坏死细胞 (而不是凋亡的细胞) 能从胞内释放 Gp96、钙网霉素、HSP90、HSP70 到细胞外环境,不成熟 DC 可因与这些 HSP 作用而成熟^[18]。由于 HSP 在组织中广泛存在且含量丰富,故推测在细胞遭受感染、中毒或物理损伤时,从细胞内释放出的 HSP 可能成为一种内在的“危险信号”,向 APC 或 DC 发出警示信息,并通过活化 DC 启动针对病损因子的免疫反应 (图 1)。这些都提示 Gp96 作为一种危险信号在天然免疫中发挥着重要作用。

2.3 Gp96 与天然免疫

Gp96 以一种协同有效的方式触发了病原体防御的天然和特异性防御系统。

越来越多的资料显示 Gp96 具有天然免疫佐剂的作用: Gp96 能非特异地激活 APCs 表达 TNF- α 、IL-12 等细胞因子和上调 CD86、CD80 共刺激分子及 MHC 类分子,给 CTL 提供一个促炎性细胞因子环境和共刺激分子,激发免疫应答^[15-16]; 另外, Gp96 还可特异结合并激活中性粒细胞 (PMNs) 和单核细胞,增强其吞噬作用——Gp96 刺激的 PMNs,特别是单核细胞,使之释放大量的 IL-8 (一种强力 PMNs 趋化因子) 从而诱发 PMNs 的聚集^[17]。此外, Banerjee 等研究发现,增加 Gp96 在 Th 细胞表达推迟其向 Th2 表型转化,用抗体阻断 Gp96 诱导的信号通路则消除了 CD4⁺ T 细胞体外增殖,同时还下调 Th2 型细胞因子的分泌^[19](图 1)。因此,了解天然免疫系统与 Gp96 相互作用的机制有助于合理地调节免疫反应,包括免疫激活和免疫耐受。

2.4 Gp96 参与获得性免疫/抗肿瘤免疫

Gp96 在激活获得性免疫和抗肿瘤免疫方面发挥着十分重要作用,其机制主要集中于: 结合 APC, TLR 的翻译后折叠,抗原交叉呈递以及激活 CTL、

NK 细胞活性、抗体依赖性细胞毒性作用等方面。

Gp96-抗原肽在加工处理过程中,通过 APCs 表面 Gp96 特异性的受体, Gp96 可以快速、有效地从细胞外被摄取,将具有免疫原性的肽转移到 MHC- I 类提呈途径,最终激活 CTL。Srivastana 等针对 Gp96 能结合肽的生物学特性推测其参与免疫应答的机制如下^[15,20]: 1) Gp96 是细胞表面的一个抗原呈递分子,它与 APC 表面的受体或配基结合,直接把肽呈递给获得性免疫系统; 或者 Gp96 将其结合的抗原肽转移到细胞表面的 MHC- I 类分子上进而促进抗原特异性 CTL 的活化或加强效应细胞 (T 细胞) 对靶细胞的识别; 2) 存在于细胞内质网中的 Gp96、抗原肽、MHC- I 类分子形成三聚体复合物,经过高尔基体转移到细胞膜表面,进而活化 T 细胞,产生特异性细胞免疫; 3) 在细胞病理性溶解后, Gp96-肽复合物被释放到胞外,在 APC 膜表面 Gp96 受体的介导下与 APC 膜表面 MHC- I 类分子共同内吞入细胞。

在抗肿瘤免疫的研究中, Wills 等对 HSP 激活免疫反应提出了 3 个可能机制^[21]: 1) HSP 是一个危险信号,从坏死的肿瘤细胞中释放出来,直接将信号传递给免疫细胞而产生炎症反应; 2) 释放的 HSP 伴随有肿瘤抗原肽,通过专职 APC 进行抗原呈递并激活肿瘤特异性 T 细胞; 3) HSP 本身可以增强肿瘤细胞处理和呈递内源性肿瘤抗原的能力,直接将抗原呈递给肿瘤特异性 T 细胞。Singh Jasujia 等研究认为,当肿瘤细胞或感染细胞溶解后, Gp96-肽复合物被释放出来并与 M Φ 表面的受体 (CD91 等) 结合而内化,然后被转运到非酸性小室或相似的小室中,通过依赖 ATP 的机制释放出肽分子,与 M Φ 本身的 Gp96 结合,再与 MHC- I 类分子结合形成稳定的三聚体复合物,从而激活 CTL^[22]。另有文献报道: Gp96 除了通过受体介导的直接激活 APC 外,它又可作为载体结合抗原肽,经受体介导胞吞后呈递特异性肽复合物,刺激特异性 CTL 增殖及进一步激活 APCs^[23]。

3 Gp96 在抗感染与抗肿瘤免疫中的应用研究

目前,越来越多的研究者关注于 Gp96 在抗肿瘤和抗感染的治疗性和预防性疫苗中的应用,但仅局限于小鼠模型和临床试验。

3.1 Gp96 作为免疫佐剂在抗病原体感染中的研究

Gp96 特异性结合抗原肽,介导并增强抗原递呈的特性吸引着大批学者将其作为一种免疫佐剂应用于细菌及流感、乙型肝炎、艾滋病、猪蓝耳病等病原感染的研究中。

Zugel 等从感染细菌(李斯特菌和肺结核杆菌)的细胞中提取 Gp96-抗原肽复合物,免疫小鼠后发现能诱发显著的特异性 CTL 反应,并能保护机体免受细菌感染^[23]。Suto 等和 Blachere 等分别用体内纯化和体外重组方法得到的 Gp96-肽复合物应用于泡状口炎病毒(VSV)的研究,证实了对 CD8⁺ T 淋巴细胞的激活作用^[15,24]。Heikema 等把含 A 型流感病毒(IAV)核蛋白(NP)编码序列的质粒转染仓鼠细胞,以 Gp96 制备物作为疫苗免疫小鼠,产生了针对 NP 的细胞免疫应答,提示对于已知抗原,这是一个生产以 Gp96 为基础的疫苗的很好方式^[24-25]。

田波、孟颂东课题组等先后研究了 Gp96-抗原肽复合物在 HBV 感染中的应用^[28-32]。他们发现 Gp96 能特异结合乙肝病毒(HBV)表位肽,并将结合的多肽交叉呈递给 MHC-I 类分子,从而激活病毒特异性 CTL 反应,极大地提高了细胞免疫水平^[28]。该实验室在随后试验中还发现了 Gp96 的免疫佐剂功能, Gp96 与 HBV 表位肽联合免疫小鼠能在一定剂量范围内(<50 μg)增强肽特异性细胞免疫,当超出该剂量则会发生抑制效应;同时还发现 Gp96 的 N 端 22~355aa 也具有剂量依赖型免疫佐剂功能,而其 C 端则不具该功能^[29],随后他们研究造成该现象的原因可能是与 Gp96 的 C 端参与调节性 T 细胞(Treg)的免疫调节有关^[31]; Gp96 与其 N 端在抗原肽结合能力、抗原交叉呈递以及 T 细胞激活等方面

极其相似,但二者所诱发的 Treg 则大不相同——N 端结合、呈递抗原肽与 MHC-I 分子及激活 CTL 的功能, C 端则可能主要与 TLR4 或 TLR2 相互作用和激活 Treg;在转基因小鼠模型研究表明,激活 TLR4 提高细胞表面的 Gp96 水平能增强抑制 Treg 功能。

Gong 等将 Gp96/N336 与 HIV-1 的 p24 蛋白原核融合表达(p24N336),免疫小鼠所引发的抗体水平是联合免疫 p24 蛋白和 Gp96/N336 两种蛋白的近 10 倍,他们认为这是由于融合 Gp96 与抗原蛋白的表达能极大提高 Gp96-抗原肽与 APC 结合的几率,从而增强抗原呈递,激发更强的体液免疫应答^[33]。Pakravan 等发现 Gp96 的 C 末端也具有免疫佐剂功能:他们将 Gp96 的 C 末端与 Her2/neu 融合表达以及联合二者免疫小鼠发现,与联合二者相比,融合蛋白(Gp96C-Her2/neu)能诱发更强的 CTL 反应,并提高了 IFN-γ 分泌水平,病灶区 Treg 细胞数目下降;此外还发现 Gp96 的 C 末端的免疫佐剂效应具有位置趋向性——即只有融合于靶抗原的 N 端才能发挥其佐剂功能^[34-35]。

另外,本实验室现已经建立了 Gp96 的猪源温控型原核发酵系统和禽源酵母表达系统,以此研究 Gp96 的蛋白佐剂功能及其应用。我们发现,在小鼠和猪体内, Gp96 与猪蓝耳病(PRRS)亚单位疫苗联合免疫所产生的 PRRSV 特异性中和抗体滴度是单独免疫亚单位疫苗的 3~4 倍;ELISPOT 以及淋巴细胞增殖实验也证实 Gp96 同样能显著提高病毒特异性细胞免疫。鉴于以上因素,我们今后将加强并推广 Gp96 作为蛋白佐剂在家禽、家畜(猪)的抗感染免疫中的研究应用。

3.2 Gp96 与肿瘤免疫治疗

以往的治疗肿瘤方案是从癌症病人细胞表面找到肿瘤特异性抗原,制成肿瘤疫苗去治疗肿瘤;实际应用中由于个体的差异,甚至同一瘤体的抗原多样性等因素严重影响该方法的治疗效果。随着 Gp96 研究的进一步加深,发现了抗原肽与 Gp96 的结合不但能诱发 APC 的成熟、分泌细胞因子和趋化因子,

作用于 MΦ、NK 细胞和嗜中性粒细胞等参与的自然免疫,还能引发 APC 对抗原肽的再呈递和交叉呈递,激活抗原特异性的获得性免疫应答 (图 1)。

20 世纪末,人们对基于 Gp96-抗原肽复合物疫苗的研究处于探索阶段。Srivastava 等最早创立了从肿瘤细胞中提取 Gp96-肽复合物的方法,用病人自身肿瘤制备 Gp96-抗原肽复合物疫苗,可产生特异性的免疫应答。Suto 等研究发现,来源于不同纯系小鼠肉瘤细胞的 Gp96 能够在不同纯系小鼠之间建立起针对肉瘤细胞表面抗原的细胞免疫应答,这种免疫诱导作用不受 MHC-I 类抗原限制,且有激活多个 CTL 克隆的现象^[15]。Tamura 等用 Gp96-肽复合物可有效地缩小肿瘤体积,有的肿瘤甚至完全消退,转移灶数目明显减少;而非同种的 Gp96-肽复合物不能抑制肿瘤生长,具有明显的种属特异性^[36]。Janetzki 等进行了 HSP-肽复合物治疗肿瘤患者的前期研究^[37]: 12 例进展期黑色素瘤患者接受从自身肿瘤组织中提取 Gp96 的治疗,无严重与 Gp96 相关的不良反应及自身免疫性反应发生,其中 6 例患者引发 MHC-I 分子限制性的抗肿瘤 CD8⁺ T 淋巴细胞,INF-γ 分泌增加,有的患者肿瘤坏死超过 50%,有 8 例患者 NK 细胞数量增加。另有学者用切除的转移性黑色素瘤制备 Gp96 疫苗对黑色素瘤进行治疗,随访期内 28 例病人中有 2 例肿瘤消退,3 例病情稳定,免疫注射后大多数病人抗黑色素瘤特异 T 细胞反应明显增强;免疫组化显示肿瘤组织 MHC-I 类分子及肿瘤抗原表达增高,实验也显示用自体 Gp96 疫苗治疗转移性黑色素瘤是可行的,未见明显毒性作用^[38-39]。

进入 21 世纪后,研究者们已经将基于 Gp96-抗原肽复合物 (Oncophage[®], 之后改名为 Vitespen[®]) 的疫苗应用于人类癌症相关的肿瘤病的临床研究,并呈现较强的预防和治疗效果^[40]。2005 年 6 月,欧洲药品监管机构 (EMA) 批准了 HSPPC-96 (Oncophage[®], 由 Antigenics Inc. 生产) 应用于肾细胞癌的治疗; 2008 年 4 月,俄罗斯军事与大众健康机

构也批准将 Vitespen[®] 应用于肾细胞癌患者术后辅助治疗; 2009 年,EMA 和美国食品和药物管理局 (FDA) 也批准将 Oncophage[®] 应用于神经胶质瘤的治疗^[40]。但是到目前为止, Oncophage[®]/Vitespen[®] 在诸如黑色素瘤等其他肿瘤病中的应用仍未通过相关医药机构的认可,只是有大量的临床实验研究: Heike 等和 Hertkorn 等将其应用于晚期胃癌的 I 期临床; Eton 等、Belli 等和 Testori 等分别运用 Oncophage[®] 治疗黑色素瘤四期的病患,分别进入了 I、II、III 期临床试验阶段;此外, Oncophage[®] 在针对慢性感染期的粒细胞白血病患者、卵巢癌四期患者、胰腺癌一至三期患者的治疗也已经进入了 I 期临床试验;对淋巴瘤和结肠直肠癌患者的治疗也进入了 II 期临床试验^[11]。

但是,对于 HSP-肽复合物用作疫苗还需要考虑到治疗剂量、免疫部位等安全性问题。Chandawarkar 等发现 HSP-肽复合物免疫小鼠具有剂量限制性,只有最适剂量才能产生有效地保护性免疫应答,而高于或低于最适剂量则不能产生^[14]。Menoret 等对于免疫注射部位的研究表明皮内注射 Gp96 效果最好,这与皮内 APC 细胞的含量丰富,可以有效地呈递抗原有关;皮下注射也同样有效,但需要 5~10 倍皮内注射剂量。腹腔内注射效果稍差,而静脉内和肌肉内免疫无效^[40]。

由于 Gp96 的遗传单态性,可载所有外源肽分子并呈递给自身的 MHC-I 类分子,激发 CTL 反应,因此 Gp96 介导的免疫保护作用可以适应不同的肿瘤类型和不同的肿瘤患者,在同种间不受 MHC 限制。另外, Gp96 多肽复合物还可激发记忆性 T 细胞反应,因此它可作为治疗制剂或疫苗,在肿瘤的治疗中具有非常光明的应用前景。

尽管 Gp96-抗原肽复合物疫苗已经取得了显著的疗效,但是在其制备和应用过程中还存在不少问题:首先,至今学者们仍未找到一种如何快速、稳定及大量获得 Gp96-抗原肽复合物的方法,在一定程度上限制了疫苗的来源;其次,肿瘤细胞会分泌

IL-10、TGF- β 等抑制型细胞因子，影响 DC 的成熟和功能，从而限制了 Gp96-抗原肽复合物疫苗的免疫治疗效果；此外，在 Gp96 结合的特异性抗原肽的分析和鉴定等都是疫苗研发过程中亟待进一步的研究的重要问题。

4 展望

目前，Gp96 在抗感染免疫和其在肿瘤组织中的表达以及其在肿瘤发生、发展中的作用越来越受到关注，但对于其作用机理仍需要进一步研究，Gp96 在肿瘤的发生和免疫逃避中到底扮演了一个什么样的角色也需深入研究，从而对 Gp96 参与的复杂多样的天然免疫调节和抗原提呈过程有新的认识，为肿瘤的预防和治疗以及抗病原疫苗的研发提供重要理论依据。此外，由于临床标本不易取得，有的即使获得肿瘤组织，许多时候得到的 Gp96-肽复合物量太少，而且其提取、纯化过程复杂，限制了它的临床应用。因此，如何改进 Gp96 的纯化方式及纯化效率，如何改变免疫途径，如何将 DC 与 Gp96 进行有机的结合等，如何更有效地激发 Gp96 的天然和适应性免疫反应，都是需要进一步深入研究的问题。

REFERENCES

- [1] Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 1988, 22: 631–677.
- [2] Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996, 381(6583): 571–579.
- [3] Berwin B, Rosser MF, Brinker KG, et al. Transfer of GRP94 (Gp96)-associated peptides onto endosomal MHC class I molecules. *Traffic*, 2002, 3(5): 358–366.
- [4] Bolhassani A, Rafati S. Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7(8): 1185–1199.
- [5] Linderoth NA, Popowicz A, Sastry S. Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen Gp96 (Grp94). *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5472–5477.
- [6] Dollins DE, Warren JJ, Immormino RM, et al. Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Mol Cell*, 2007, 28(1): 41–56.
- [7] Thorne ME, McQuade KL. Heat-induced oligomerization of gp96 occurs via a site distinct from substrate binding and is regulated by ATP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(4): 1163–1171.
- [8] Ding FX, Wang F, Lu YM, et al. Multiepitope peptide-loaded virus-like particles as a vaccine against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, 49(5): 1492–1502.
- [9] Li Y, Song H, Li J, et al. Hansenula polymorpha expressed heat shock protein gp96 exerts potent T cell activation activity as an adjuvant. *J Biotechnol*, 2011, 151(4): 343–349.
- [10] Arnold-Schild D, Hanau D, Spohner D, et al. Receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol*, 1999, 162: 3757–3760.
- [11] di Pietro A, Tosti G, Ferrucci PF, et al. Heat shock protein peptide complex 96-based vaccines in melanoma: how far we are, how far we can get. *Hum Vaccin*, 2009, 5(11): 727–737.
- [12] Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol*, 2002, 23(11): 509–512.
- [13] Dai J, Liu B, Caudill MM, et al. Cell surface expression of heat shock protein gp96 enhances cross-presentation of cellular antigens and the generation of tumor-specific T cell memory. *Cancer Immunol*, 2003, 3: 1–11.
- [14] Chandawarkar RY, Wagh MS, Srivastava PK. The dual nature of specific immunological activity of tumor-derived gp96 preparations. *J Exp Med*, 1999, 189(9): 1437–1442.
- [15] Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science*, 1995, 269(5230): 1585–1588.
- [16] Zheng H, Dai J, Stoilova D, et al. Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *J Immunol*, 2001, 167(12): 6731–6735.
- [17] Radsak MP, Hilf N, Singh-Jasuja H, et al. The heat shock protein gp96 binds to human neutrophils and monocytes and stimulates effector functions. *Blood*, 2003, 101(7): 2810–2815.
- [18] Basu S, Binder RJ, Suto R, et al. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which

- deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol*, 2000, 12(11): 1539–1546.
- [19] Banerjee PP, Vinay DS, Mathew A, et al. Evidence that glycoprotein 96(B2), a stress protein, functions as a Th2-specific costimulatory molecule. *J Immunol*, 2002, 169(7): 3507–3518.
- [20] Srivastava PK, Udono H, Blachere NE, et al. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics*, 1994, 39(2): 93–98.
- [21] Wills AD, Malkovasky M. Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol Today*, 2000, 21(3): 129–132.
- [22] Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, et al. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol*, 2000, 30(8): 2211–2215.
- [23] Liu B, Dai J, Zheng H, et al. Cell surface expression of an endoplasmic reticulum resident heat shock protein gp96 triggers MyD88-dependent systemic autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15824–15829.
- [24] Zügel U, Sponaas AM, Neckermann J, et al. Gp96-peptide vaccination of mice against intracellular bacteria. *Infect Immunol*, 2001, 69(6): 4164–4167.
- [25] Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, et al. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med*, 1997, 186(8): 1315–1322.
- [26] Blachere NE. The role of heat shock proteins in antigen presentation by MHC class I molecules[D]. Bronx: Fordam University, 1998.
- [27] Heikema A, Agsteribbe E, Wischut J, et al. Generation of heat shock protein-based vaccines by intracellular loading of gp96 with antigenic peptides. *Immunol Lett*, 1997, 57(1/3): 69–74.
- [28] Li H, Zhou M, Han J, et al. Generation of murine CTL by a hepatitis B virus-specific peptide and evaluation of the adjuvant effect of heat shock protein glycoprotein 96 and its terminal fragments. *J Immunol*, 2005, 174(1): 195–204.
- [29] Li HT, Yan JB, Li J, et al. Enhancement of humoral immune responses to HBsAg by heat shock protein gp96 and its N-terminal fragment in mice. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(19): 2858–2863.
- [30] Li Z, Dai J, Zheng H, et al. An integrated view of the roles and mechanisms of heat shock protein gp96-peptide complex in eliciting immune response. *Front Biosci*, 2002, 7: d731–d751.
- [31] Liu Z, Li XH, Qiu LP, et al. Treg suppress CTL responses upon immunization with HSP gp96. *Eur J Immunol*, 2009, 39(11): 3110–31120.
- [32] Gong XY, Gai WW, Xu JQ, et al. Glycoprotein 96-mediated presentation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific human leukocyte antigen class I-restricted peptide and humoral immune responses to HIV-1 p24. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(11): 1595–1600.
- [33] Pakravan N, Hashemi SM, Hassan ZM. Adjuvant activity of GP96 C-terminal domain towards Her2/neu DNA vaccine is fusion direction-dependent. *Cell Stress Chaperones*, 2010, 16(1): 41–48.
- [34] Pakravan P, Soleimanjahi H, Hassan ZM. GP96 C-terminal improves Her2/neu DNA vaccine. *J Gene Med*, 2010, 12(4): 345–353.
- [35] Tamura Y, Peng P, Liu K, et al. Immunotherapy of tumors with antologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*, 1997, 278(5335): 117–120.
- [36] Janetzki S, Blachere NE, Srivastava PK. Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes and memory T cells by immunization with tumor-derived heat shock protein gp96. *J Immunother*, 1998, 21(4): 269–276.
- [37] Lau R, Wang F, Jeffery G, et al. Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J Immunother*, 2001, 24(1): 66–78.
- [38] Belli F, Testori A, Rivoltini L, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J Clin Oncol*, 2002, 20(20): 4169–4180.
- [39] Tosti G, di Pietro A, Ferrucci PF, et al. HSPPC-96 vaccine in metastatic melanoma patients: from the state of the art to a possible future. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(11): 1513–1526.
- [40] Ménoret A, Chandawarkar RY, Srivastava PK. Natural autoantibodies against heat-shock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins. *Immunology*, 2000, 101(3): 364–370.