

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0105-05

肿瘤细胞分泌物抑制树突状细胞的生成和功能

李春昭¹, 侯春梅², 吴英², 张双喜², 郭子宽², 毛宁²(1. 北京军区总医院消化内科, 北京 100700; 2. 军事医学科学院基础医学研究所)

[摘要] **目的:** 探讨肿瘤细胞对人单个核细胞源树突状细胞(dendritic cells, DC)的生成和功能的影响。**方法:** 培养外周血单个核细胞源 DC, 体系中加入人肝癌细胞系 H7402, 结肠癌细胞系 HCT-8 及正常人骨髓基质细胞系 HFCL 的培养上清液, 以正常培养体系为对照。应用流式细胞技术检测 DC 的细胞表面标志及吞噬功能; 通过 [³H]-TdR 掺入法检测 DC 激活同种异体 T 淋巴细胞活化的能力。**结果:** H7402 和 HCT-8 细胞培养上清液作为条件培养的 DC, 低表达 CD1a 抗原、共刺激分子(CD86)及 MHC-II 类分子, 与对照及基质细胞组比较有明显差异。DC 成熟也受到抑制。此外, DC 对葡聚糖(Dextran)的吞噬功能下降, 对同种异体 T 淋巴细胞激活的能力较低。**结论:** 肿瘤细胞分泌的某些物质可抑制 DC 的生成及其相关功能, 这可能是肿瘤细胞逃避机体免疫监视的机制之一。

[关键词] 单个核细胞源树突状细胞; 肿瘤细胞; 免疫逃逸

[中图分类号] R392.12; R730.3 [文献标识码] A

Suppression of the Development and Function of Dendritic Cells by the Secretion of Tumor Cells

LI Chun-zhao¹, HOU Chun-mei², WU Ying², ZHANG Shuang-xi², GUO Zi-kuan², MAO Ning²(1. Department of Gastrointestinal Disease, Beijing Army General Hospital, Beijing 100700, China; 2. Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of tumor cells on the development and function of the mononuclear cell (MNC)-derived dendritic cells. **Methods:** The supernatants of cultured cell lines H7402 (human hepatocellular carcinoma), HCT-8 (human colon carcinoma) and HFCL (human bone marrow stromal cell) were collected and used as the conditional culture medium (CCM) for MNC-derived DC culture. The dendritic cells were characterized by phenotypic analysis. We evaluated the capacity of phagocytizing dextran, and the capacity to stimulate allogeneic T cells of MNC-derived DC. **Results:** Phenotypic analysis showed that dendritic cells cultured in the presence of supernatants of tumor cells expressed lower levels of CD1a, MHC II molecules (HLA-DR) and costimulatory molecules (CD86), all of which were significantly lower than those in control and HFCL groups (the negative control group). Also, they displayed a much lower capacity of phagocytizing dextran as shown by the FITC-dextran assay. Moreover, they were less efficient of inducing allogeneic T-cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction. **Conclusion:** These data show that tumor cells negatively regulate the production and function of DC, which might be one of the underlying mechanisms that play a role in the immune escape of tumor cells.

[Key words] mononuclear cell-derived dendritic cells; tumor cells; immune escape

* 宿主抗肿瘤免疫反应的缺陷是肿瘤逃避免疫系统控制的重要机制之一^[1]。树突状细胞(dendritic cell, DC)作为一种专职的抗原呈递细胞,能摄取和加工抗原,高水平表达 MHC 分子、共刺激分子、黏附分子和分泌高水平的细胞因子,有效激发 T 细胞免疫,是目前已

知体内功能最强的抗原呈递细胞,在肿瘤细胞免疫中

* [作者简介] 李春昭(1971-),女,河北保定人,主治医师,主要从事消化道肿瘤免疫治疗的临床及基础研究,现工作单位:北京军区总医院消化内科。

起着十分重要的作用^[2-3]。目前的研究表明,多数肿瘤病人的 DC 功能受到不同程度的抑制,不能有效激发机体 T 细胞免疫^[4]。为探讨肿瘤中 DC 数量和功能缺陷的机制,本实验观察了肿瘤细胞分泌物对人外周血单个核细胞来源 DC 的生成及功能的影响。

1 材料与方 法

1.1 标本来源及细胞系

正常人外周血取自解放军第 307 医院健康献血者。细胞系 HFCL(正常人骨髓基质细胞系)、H7402(人肝癌细胞系)、HCT-8(人结肠腺癌细胞系)均由本实验室常规传代培养。

1.2 主要试剂

重组人 GM-CSF、重组人 IL-4、重组人 TNF- α 购自 Peprotech 公司。FITC 或 PE 结合的抗人 CD1a, CD14, CD86, CD83, HLA-DR 单克隆抗体购自 BD 公司。FITC-Dextran(葡聚糖)购自 Sigma 公司。^[3H]-TdR 购自中国原子能研究所;完全培养基包括:RPMI-1640 培养液、10% 胎牛血清 FCS 均购自 Hyclone 公司。 2×10^{-3} mol/L L-谷氨酰胺, 1×10^{-5} mol/L 丙酮酸钠, 5×10^{-5} mol/L 2-巯基乙醇,青霉素、链霉素 100 U/ml, Ficoll 淋巴细胞分离液购自天津市川页生化制品有限公司。

1.3 肿瘤细胞培养上清液的制备

收集处于对数生长期的 HFCL, H7402 和 HCT-8 细胞,计数,以 2×10^4 /cm² 的密度种于培养瓶中,37℃、5% CO₂ 孵育箱中培养 5 d 后收集上清液,过滤。部分上清液用于一般理化性质测定(pH 值及热源检测),其余部分上清液于 -70℃ 冻存备用^[5]。

1.4 人外周血来源的树突状细胞体外培养

按参考文献[6]方法进行。密度梯度离心分离外周血单个核细胞(PBMC),37℃ 贴壁 2 h 后加入诱导体系培养。诱导体系为含重组人 GM-CSF 1 000 U/ml, IL-4 500 U/ml 的 RPMI-1640 完全培养基。实验组分别加入 20% H7402, HCT-8 及 HFCL 培养上清液,每组分别培养 2 瓶。第 5 天收集各组其中一瓶 DC,利用流式细胞技术进行表面标志和吞噬功能的检测。各组另一瓶 DC 经半量换液,并分别加入 rhTNF- α 1 000 U/ml 促进 DC 成熟。第 7 天收集细胞,重复上述表面标志测定和吞噬功能实验,同时,部分细胞用于混合淋巴细胞培养实验。

1.5 DC 表型的 FACS 分析

收集培养的 DC,用 FACS 标记液 PBA(PBS + 1% BSA + 0.02% Na₂S₂O₃)洗细胞,并调整为 1×10^9 L⁻¹ 细胞浓度,加入离心管,100 μ l/管,加入荧光标记抗体,

置 4℃ 避光标记 45 min 后,用 PBA 液洗细胞 2 次,细胞悬于 PBA 液中通过流式细胞仪(FACS Calibur, BD 公司)检测细胞表面表型。

1.6 DC 吞噬功能测定

收集培养 5 d 的 DC,以含 5% 马血清的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度为 1×10^9 L⁻¹,分实验组及对照组,于 37℃ 孵育 15 min 后,加入 FITC-Dextran 1 mg/ml 分别置 37℃, 0℃ 孵育 60 min,取出用冷 PBS 终止进一步吞噬,并洗细胞 3 遍后,通过流式细胞仪检测。

1.7 混合淋巴细胞反应

采用^[3H]-TdR 掺入法。收集培养的 DC,洗涤后调整细胞浓度为 5×10^9 L⁻¹。⁶⁰钴源照射(20 Gy),按每孔 1×10^3 , 1×10^4 或 5×10^4 细胞种于 96 孔培养板。尼龙毛柱法获取同种异体 T 淋巴细胞,调整细胞密度 1×10^9 L⁻¹,100 μ l/孔种于 96 孔板中。细胞共培养 96 h。于培养结束前 18 h 每孔加入 1 μ Ci^[3H]-TdR。多孔细胞收集器收集细胞,液体闪烁计数器测定 cpm 值。每组分设 3 个复孔,结果以 3 孔平均值 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

2.1 细胞培养上清液一般理化性质测定

各组条件培养液的 pH 值测定结果显示,肿瘤细胞培养上清液的 pH 值略偏酸性(常规培养组为 7.20,基质细胞组为 6.92, H7402 组为 6.54, HCT-8 组为 6.48)。热源测定结果,两肿瘤细胞组为阳性,常规培养及基质细胞组为阴性。各组培养液均用同一批号血清。

2.2 培养过程中各组 DC 生长状况和形态的观察

在培养第 3 天,贴壁的单核细胞聚集成均匀散布的小细胞团,部分细胞悬浮生长。培养第 5 天后,可见大部分细胞悬浮,形成较大的聚集体。细胞形态不规则,可见大量伸展的毛刺,为典型 DC 形态。但是,培养瓶底部仍留有少量贴壁伸展的巨噬细胞。加入 rhTNF- α 1 000 U/ml 后,第 7 天可见 DC 从聚集体中散落,悬浮于培养液中。

含有 20% 培养细胞上清液的 DC, HFCL 细胞组中 DC 形态与正常培养的 DC 无明显差别。含 H7402 细胞上清液和 HCT-8 细胞上清液组中,培养至第 3 天可见细胞聚集成大的细胞团,第 5 天时细胞团散开,较多贴壁伸展的巨噬细胞,典型的毛刺状细胞较少见。加入 rhTNF- α 1 000 U/ml 后,第 7 天可见部分细胞死亡,悬浮于培养液中(见图 1)。

2.3 不同培养组 DC 的表面标志变化

通过流式细胞术检测各不同培养组 DC 的细胞表型。结果如图 2 所示。在培养第 5 天,常规培养组细

胞即表达中等度的 CD1a, CD86 和 HLA-DR, 而 CD14 和 CD83 较低。rhTNF- α 刺激后, CD1a, CD86, HLA-DR 和 CD83 明显上升。骨髓基质细胞 HFCL 组与正常处理组相似。而肿瘤细胞培养上清液组培养的 DC 表达 CD1a, CD86, HLA-DR 和 CD83 的水平显著降低, CD14 的表达较高。结果提示, H7402 和 HCT-8 分泌物抑制 DC 生成和相关分子表达。所列数据为流式细胞术检测的各组细胞表面标志阳性率, 3 次重复实验, 其中的 1 次结果见表 1。

2.4 不同培养组 DC 的吞噬功能

树突状细胞对大分子物质葡聚糖(Dextran)的吞噬能力, 反映了 DC 对肿瘤抗原的处理和呈递能力。流式细胞术检测 DC 吞噬葡聚糖结果如图 3 所示, 常规处理组 DC 至培养第 5 天, 即对 Dextran 具有较强的吞噬能力, 经 TNF- α 刺激成熟后, 吞噬能力降低。肿瘤细胞培养上清液组 DC 的吞噬能力较对照组明显低下。

2.5 不同培养组 DC 刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖的能力

在常规培养组中, 成熟 DC 对同种异体 T 淋巴细胞具有很强的刺激增殖作用, H7402, HCT-8 组 DC 的刺激活性明显降低($P < 0.05$)。但用 HFCL 细胞上清液培养的 DC, 其刺激同种异体 T 淋巴细胞的能力没有受到影响(图 4)。

3 讨论

肿瘤细胞与机体免疫系统细胞之间的相互作用是决定肿瘤发生和发展的关键。体内外的各种实验已证实, 树突状细胞(DC)是一种功能极强的抗原呈递细胞, 在抗肿瘤免疫方面发挥着重要的作用^[2-3]。组织活检发现, 肿瘤组织中 DC 的存在与肿瘤患者的预后相关——肿瘤组织中 DC 的浸润常提示患者预后良好^[7]。既往研究还发现, 肿瘤组织中 DC 抗原呈递功能常低下, 不能有效地活化体内的特异性 CTL, 达到抗肿瘤免疫的目的^[4]。因此, 肿瘤中 DC 数量少且其功能障碍, 这是肿瘤细胞逃避机体免疫监视的重要因素。然而, 肿瘤中 DC 数量及功能低下的具体机制尚不明确。

本实验以 H7402 和 HCT-8 肿瘤细胞系为对象, 单个核细胞源 DC 培养体系中加入其培养上清液, 结果显示, 表达 DC 特异性标志 CD1a 的细胞量明显减少, 共刺激分子 CD86 及 MHC- II 类抗原分子 HLA-DR 的表达水平也显著下降, 与国内外报道相似^[8-9]。值得注意的是, 人正常骨髓基质细胞系组 DC 数量无明显变化。在通常情况下, 基质细胞分泌的细胞因子范围广泛, 包括 GM-CSF, IL-12 及 IL-15 等, 这些因子可能不是造成 2 组结果差异的主要原因。从各组条件培养液一般理化性质的测定上可以看出, 各组条件培养液的 pH 值有所不同; 热源测定结果显示肿瘤细胞培养上清液含有某些致热物质。血管内皮生长因子(VEGF)是多种实体瘤自分泌的细胞因子, 不但参与肿瘤组织内新生血管的形成, 促进肿瘤血液供应, 同时, VEGF 也是重要的 DC 生成及成熟的负调控因子^[5]。H7402 和 HCT-8 细胞分泌物使 DC 数量减少是否与 VEGF 有关, 有待进一步深入探讨。

图 1 不同培养条件下 DC 形态学观察(培养第 5 天)

Fig. 1 The morphology of DC cultured in different conditional culture media (Day 5)

表 1 不同条件培养组 DC 表面标志检测
(培养第 5 天结果)

Tab. 1 The phenotype of DC cultured in different conditional culture media(Day 5)

Groups	Expression of antigen (%)				
	CD1a	CD14	CD83	CD86	HLA-DR
Routine	67.0	10.7	11.9	88.2	84.1
Stromal cell	47.8	16.5	26.8	82.8	89.1
H7402	14.4	50.3	49.3	56.5	44.7
HCT-8	19.4	46.3	38.8	47.4	47.8

图2 不同条件培养组 DC 表面标志检测(培养第 5 天结果)

Fig. 2 The phenotype of DC cultured in different conditional culture media (Day 5)

图3 不同条件培养组 DC 吞噬功能检测(培养第 5 天结果)

Fig. 3 Phagocytic capacity of DC cultured in different conditional culture media (Day 5)

本研究显示,培养至第 5 天时, H7402 和 HCT-8 组 CD83 表达明显高于对照组及 HFCL 组, 而第 7 天时, 经 TNF- α 诱导后, H7402 和 HCT-8 组 CD83 阳性比例并未增加, 同时阳性率一直未达到对照及 HFCL 组水

平。结果表明肿瘤细胞培养上清液处理组 DC 在成熟过程中有其特殊性, 细胞成熟早, 且对 TNF- α 的诱导作用无反应性。H7402 和 HCT-8 细胞的分泌物改变了 DC 的成熟过程。

葡聚糖吞噬实验表明, H7402 和 HCT-8 组 DC 的吞噬能力减低。这种抑制作用可能由于该组 DC 比例较低, 也可能与实验组和对照组 DC 成熟程度差异有关。DC 的快速成熟改变了细胞正常的发育过程, 从而使细胞吞噬及抗原处理功能下降。

图 4 不同条件培养组 DC 刺激同种异体 T 淋巴细胞反应能力检测(第 7 天)

Fig. 4 The proliferation of allogeneic T cells stimulated by DC cultured in different conditional culture media (Day 7)

机体的抗肿瘤免疫反应主要由 T 细胞介导, DC 表面高表达共刺激分子和 MHC 抗原分子的特性使其具有很强的处理、加工抗原及刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖的能力。混合淋巴细胞培养结果显示, H7402 和 HCT-8 组 DC 对异体 T 细胞刺激活性较低, 提示肿瘤细胞分泌物使 DC 低表达 CD86 和 HLA-DR 分子, 不能有效刺激 T 淋巴细胞增殖。也可以推测, 肿瘤分泌的某些物质可抑制特异性 CTL 的活化, 甚至造成 T 细胞对肿瘤细胞的耐受。这可能是肿瘤逃避机体免疫监视的作用机制之一。

肿瘤残留病是肿瘤复发和发展的基础。残留病的发生与肿瘤细胞逃避免疫监视和机体免疫功能失常有关。因此, 如何激发机体免疫系统杀伤肿瘤细胞是关系病人转归的重要策略。体外培养功能正常的树突状细胞, 体外肿瘤抗原刺激制备疫苗, 可能是实现上述策略的具体步骤。

[参考文献]

- [1] Almand B, Clark JI, Nikitina E, *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: A mechanism of immunosuppression in cancer[J]. *J Immunol*, 2001, 67: 678-689.
- [2] Steinman RM. The dendritic cells and its role in immunogenicity. *Ann Rev Immunol*, 1991, 9: 271-296.
- [3] Bancherov J, Steinman RM. Dendritic cell and the control of immunity[J]. *Nature*, 1998, 392: 245-252.
- [4] Almand B, Resser JR, Lindman B, *et al.* Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(5): 1755-1766.
- [5] Gabrilovich DI, Chen HL, Gargis KR, *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells[J]. *Nat Med*, 1996, 2: 1096-1103.
- [6] 朱学军, 曹雪涛, 于益芝, 等. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1997, 4(4): 302-306.
- [7] 刘思纯, 袁世珍. 结直肠癌树突状细胞浸润及癌周淋巴细胞反应与预后的关系[J]. *新消化病学杂志*, 1997, 5(3): 156-157.
- [8] Katsenelson NS, Shurin GV, Bykovskaia SN, *et al.* Human small cell lung carcinoma and carcinoid tumor regulate dendritic cell maturation and function[J]. *Mod Pathol*, 2001, 14(1): 40-45.
- [9] 宋文刚, 于益芝, 曲迅, 等. 肿瘤细胞培养上清对小鼠骨髓来源的树突状细胞分化发育的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(2): 134-137

[收稿日期] 2002 - 01 - 21

[修回日期] 2002 - 03 - 20

第 8 届全国肿瘤生物治疗学术会议征文通知

中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会、中华医学会肿瘤学分会、中国抗癌协会生物治疗专业委员会和中国病理生理学会肿瘤免疫专业委员会联合主办, 由广州第一军医大学珠江医院承办, "第 8 届全国肿瘤生物治疗学术会议" 将于 2003 年 11 月 18 ~ 21 日(周二至周五)在广州市召开。诚邀国内各位专家与同行投稿与参加会议交流, 会议期间将邀请国内外著名专家介绍本领域新理论、新技术和应用现状以及发展趋势。

征文要求: 凡未在国内外公开刊物发表过的研究资料均可向会议投稿, 请向会议承办单位提交 800 ~ 1000 字中文摘要, 加盖单位公章(请附软盘, 用 word98 或 word2000 输入)。来稿经专家评审后选择优秀论文作大会发言。所接受的论文摘要将录入会议文集。

征文主题: 1. 肿瘤生物治疗的新理论与新策略; 2. 肿瘤生物治疗的新技术; 3. 肿瘤生物治疗的临床应用与评价; 4. 细胞治疗(包括造血干细胞和骨髓移植); 5. 细胞因子治疗; 6. 抗体治疗; 7. 疫苗治疗; 8. 基因治疗; 9. 中药治疗; 10. 与常规治疗相结合而组成的新疗法。

征文截稿日期: 2003 年 8 月 31 日(周日), 以邮戳为准。

来稿请挂号寄: 广州市工业大道中 253 号, 第一军医大学珠江医院细胞治疗中心(邮编 510282)郭坤元, 李江琪

中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会