

[文章编号] 1007-385X(2003)01-

DC 瘤苗的研究新进展

骆云雅 综述, 张 梅 审阅(西安交通大学第一附属医院血液科, 西安 710061)

[摘要] 树突状细胞是目前发现的功能最强的抗原递呈细胞,在免疫应答中发挥重要作用。近来,树突状细胞成为肿瘤和免疫学研究的热点,特别是 DC 瘤苗在肿瘤免疫治疗中的应用前景诱人。本文综述了 DC 的免疫学活性,抗原摄取和递呈途径,体外诱导扩增及其瘤苗构建和应用的研究进展。

[关键词] 树突状细胞;瘤苗;免疫治疗

[中图分类号] R730.51 **[文献标识码]** A

* 机体的免疫应答首先由抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC)捕获、加工和处理抗原,再将抗原递呈给 T、B 淋巴细胞,从而引发一系列的免疫应答。树突状细胞(dendritic cell, DC)作为功能最强的 APC,能激活静息型 T 细胞(naive T cell),激发初始免疫应答,在体内发挥强大的免疫监视功能。肿瘤患者体内 DC 功能缺陷,不能有效递呈肿瘤抗原,导致免疫无能或免疫耐受,使肿瘤得以发生发展^[1]。随着 DC 体外诱导扩增技术的发展及分子生物学技术和基因工程技术应用于 DC 瘤苗构建方法的发现,DC 瘤苗用于肿瘤免疫治疗的实验和临床研究更趋成熟,DC 瘤苗有望成为肿瘤免疫治疗的一种有效方式。本文就 DC 的免疫学活性、抗原摄取和递呈途径、体外诱导扩增及其瘤苗构建和应用的研究进展进行综述。

1 DC 的抗原递呈功能是 DC 瘤苗抗肿瘤免疫治疗的基础

DC 在体内分布广泛,普遍存在于除脑组织外的各种组织和器官中,在遇到外来抗原时可捕获、处理抗原。处于组织间隙的 DC 为未成熟 DC(imature dendritic cell, iDC),被认为是次级淋巴组织 T 细胞富集区域中存在的成熟 DC(mature dendritic cell, mDC)的前体,具有强大的抗原摄取能力^[2],但因其表面表达低水平的 MHC I 类, MHC II 类及共刺激分子,因而不能有效的将抗原递呈给 T 淋巴细胞,对 T 细胞的刺激能力较低。捕获加工处理抗原后, iDC 丧失抗原摄取能力,向次级淋巴器官迁移,同时逐渐成熟。mDC 表面共刺激分子(CD80、CD86)、MHC I 类分子、T 细胞黏附分子(CD48、CD58)表达上调,其利用内吞抗原有效合成 MHC II 类分子-肽复合物的能力也得到进一步加强,并分泌一些细胞因子,如 IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 等。

DC 通过巨胞饮作用(macropinocytosis)、吞噬作用及受体介导的内吞作用来摄取抗原^[3]。外源性抗原被 DC 摄取处理后,与 MHC II 类分子结合,并借助高表达的共刺激分子 CD86 等将抗原多肽递呈给 CD4⁺ T 细胞,促使其发生克隆增殖分化,并分泌 IL-12 以加强免疫应答。与 MHC II 类抗原递呈途径相比,对 MHC I 类抗原递呈研究较少。MHC I 类分

子不聚集于 iDC 表面,但是其膜表面表达水平在成熟过程中被上调,同时可能有部分伴随着 MHC II 类分子到达细胞表面。MHC I 类分子限制的抗原被递呈给 CD8⁺ T 细胞,诱导机体产生抗原特异性 CTL,在抗肿瘤免疫中意义重大。

2 DC 的体外大量诱导扩增是 DC 瘤苗抗肿瘤免疫治疗的前提

虽然 DC 在体内分布广泛,但数量极少,外周血单个核细胞中 DC 的比例还不到 1%,在淋巴器官中虽数量较多但难以收集,而且由于分离出的 DC 具有异质性,难以满足对 DC 的基础研究及临床应用的需要。此外,体内的 DC 因为肿瘤分泌的一些因子,如 IL-10, TGF, VEGF 限制其成熟而发生功能缺陷。因此,利用 DC 的前体细胞体外诱导分化扩增 DC 是研究 DC 瘤苗的必要途径。

2.1 CD34⁺ 干细胞诱导分化扩增 DC

CD34⁺ 干细胞可从骨髓(BM)、脐血(CB)、外周血(PB)分离纯化而来。CD34⁺ 干细胞在 GM-CSF 和 TNF- α 的作用下可增殖分化为 DC,而 c-kit 配体可提高 DC 的产量,肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和 PMA 也是有效的 DC 分化扩增的激活因子^[5]。Hogihara 等^[6]利用鼠基质(HESS-5)建立了一种新的 DC 培养体系,利用这种培养体系从 CD34⁺ 脐血(UCB)中诱导扩增出 DC,未成熟及成熟的 UCB-DC 分别具有葡聚糖摄取能力及有效的刺激异基因淋巴细胞增殖能力。

为了探讨由不同来源的 CD34⁺ 干细胞诱导分化的 DC 在表型及功能上是否有差异, Servido^[7]将体外诱导的 CD34⁺ BM-DC 及 CD34⁺ PBSC-DC 进行多方面的比较,如细胞内吞能力、混合白细胞反应、免疫表型分析等。结果发现,与 BM-DC 相比较, PBSC-DC 不能摄取可溶性抗原,但是混合白细胞反应强,表面共刺激分子表达更高。他们认为, BM-DC 可用于负载特异性抗原肽,而功能上比较成熟的 PBSC-DC 更适

合应用于基因治疗。

2.2 单核细胞诱导分化扩增 DC

Garderet 等^[8]总结了外周血单核细胞体外诱导扩增 DC 的基本过程,包括用白细胞提取法收集外周血单个核细胞,淘选法分离单核细胞,人血清培养基(含患者自体血清或 AB 血清)或无血清培养基 + GM-CSF + IL-4 与单核细胞共同培养。另一种方法就是从脐血单核细胞诱导扩增 DC^[9],培养条件与外周血单核细胞诱导 DC 相同。比较这些 CB 黏附细胞来源的 DC (CB-DC) 和 PB 黏附细胞来源的 DC (PB-DC) 的表型和功能后发现,第 7 天的 CB-DC 表达较低水平的 CD80, CD1a, CD83 和 CMRF-44,但刺激异基因脐血淋巴细胞和外周血淋巴细胞增殖的能力与 PB-DC 相似,成熟前摄取吞噬 FITC-葡聚糖的能力也与 PB-DC 相当。

到目前为止,大多数研究应用单核细胞起源的 DC (MoDC)。在体外使大量单核细胞分化为 DC,虽然需要外源性细胞因子刺激和较长培养时间(6 天或更长),但是因其具有产量大,纯度高,易获得等优点,更能满足实验和临床研究的需要。

2.3 白血病细胞诱导分化扩增 DC

抗原递呈是肿瘤免疫的关键环节。若能将白血病细胞直接诱导分化为 DC,则 DC 表面既能高表达 MHC II 类分子及共刺激分子,又能表达白血病抗原,在 DC 瘤苗抗白血病免疫中发挥巨大作用。有人曾尝试利用细胞因子组合诱导白血病细胞株(KG-1)分化为 DC^[10],诱导出的细胞形态不规则,膜上有明显的树突状突起;表型上,表达 MHC II 类分子,共刺激分子 CD80, CD86, CD83;功能上,具有吞噬乳胶颗粒和诱导异基因 T 淋巴细胞反应能力。从急性髓性白血病患者体内分离出的白血病细胞亦可在体外被诱导分化为 DC^[11],从一位急性早幼粒细胞白血病(AML)患者体内分离出的白血病细胞与 GM-CSF + IL-4 + TNF- α 共培养 10 天后,表现出典型的树突状细胞特征,其白血病起源可由 t(15;17) 的 DNA 探针进行原位杂交来证实。

3 DC 瘤苗的体外构建是 DC 瘤苗的抗肿瘤免疫治疗的关键

体外进行抗原负载的 DC 回输后可打破对肿瘤相关抗原的耐受,并且可以诱导体内的抗肿瘤细胞毒性免疫应答。在 DC 的功能研究及体外培养技术得以发展的基础上,大量的研究方向集中在完善 DC 对抗原的负载即 DC 瘤苗的构建上。

3.1 抗原肽冲击构建 DC 瘤苗

3.1.1 已知抗原肽冲击 DC

DC 在体外可被合成肽或来自肿瘤相关抗原(TAA)的蛋白冲击致敏,这些 TAA 包括 MAGE-1, MAGE-3, MUC1, Her-2/neu, CEA, Melan/MART 等。这些抗原肽可被直接应用,也可在其表位锚点进行单一氨基酸替代以便与 MHC I 类分子更紧密结合,增强其诱导 CTL 反应的能力。

对 16 例处于进展期的黑色素瘤患者的研究发现^[12], HLA-A2 结合的抗原肽(tyrosinase, Melan-A/Mart-1 或 gp100) 或 HLA-A1 结合的抗原肽(MAGE-1/MAGE-3)联合 KLH 冲击致敏 MoDC,回输后所有患者都发生了针对 KLH 的迟发性超敏反应(DTH),11 例发生针对抗原肽的 DTH。独特型蛋白(Id-protein)可通过 DC 的交叉递呈(cross-presenting)激发 Id 特异性 CD4⁺T 细胞,通过 Id 负载的 DC 回输,可诱导 B 细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤患者体内针对独特型的体液和细胞反应^[13]。

3.1.2 全肿瘤抗原冲击 DC

只有一部分肿瘤,其肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原已知,大部分肿瘤尚未明确,因而将整个肿瘤细胞作为抗原来源不失为一种可取的方法。例如将 DC 与肿瘤溶解物^[14],凋亡或坏死细胞共培养^[15],或将 DC 与肿瘤细胞融合^[16],将白血病原始细胞诱导为 DC,使之既具有 DC 特征,又表达白血病抗原^[10],等等,均已有报道。

在鼠模型中^[14],体外用负载了肿瘤溶解物的 DC 作为刺激剂可驯化同系鼠 T 细胞,导致肿瘤特异性 T 细胞增殖及细胞因子的产生;在临床实验中,负载了黑色素瘤细胞溶解物和匙孔血蓝蛋白(KLH)的 DC 疫苗免疫后产生了 KLH 特异性 T 细胞反应,并产生记忆性 CTL。将肿瘤细胞与 DC 细胞融合,可以获得既具有 DC 特殊功能又表达肿瘤抗原的杂合体,这种杂合体细胞表达 MHC-I, MHC-II 类抗原,协同刺激分子以及 DC 特异性或肿瘤细胞表面分子,输注以后可以产生抗癌作用。

3.2 基因转染构建 DC 瘤苗

3.2.1 抗原基因转染 DC

将编码肿瘤抗原的 DNA 和 RNA 分子转入 DC 可提供较大范围的抗原表位递呈,并且增加了 MHC I 类和 MHC II 类分子递呈抗原肽的能力,HLA 限制性的抗原选择也可被避免。而且,肿瘤抗原编码基因导入 DC 后能在 DC 内持续表达肿瘤抗原,可以克服由于 DC 上抗原-MHC 复合物解离或细胞 MHC 分子降解对其诱导 T 细胞免疫应答产生的不利影响。把这种 DC 瘤苗应用于动物模型,已成功观察到肿瘤的退行性变。Zum 等^[17]通过逆转录病毒将肿瘤相关抗原 HER2 转入 DC,将来自一名伴有 HER2 过表达的乳腺癌患者的 T 细胞成功诱导扩增为 HER2 特异性 CTL 和 Th1 克隆。另外,也可将差异筛选获得的肿瘤特异性表达的 mRNA 导入 DC,用于肿瘤的免疫治疗,这样既可避免诱发自身免疫性疾病,又可诱导强烈的特异性抗肿瘤免疫应答。

3.2.2 免疫辅助分子基因转染 DC

DC 也可被编码免疫调节因子的基因转染,如细胞因子(IL-2, IL-12, IL-18, GM-CSF)以及共刺激分子(B7)等,转染后的 DC 可以更强的诱导免疫应答。利用腺病毒载体将 CD40L 转入 DC 输入荷瘤鼠体内,可诱导出保护性抗原特异性免疫应答,并且可阻止 DC 产生自然凋亡及 Fas-FasL 诱导的凋亡,拮抗 IL-10 等对 DC 功能的抑制作用。Nishioka 等^[18]将 IL-12 基因修饰的 DC 细胞直接注入黑色素瘤和肉瘤小

鼠模型的肿瘤病灶中,可以诱发抗肿瘤免疫,IL-12 基因的转染可以促进 DC 细胞的成熟,表现为 MHC- I ,MHC- II 和共刺激分子的表达增加。

利用基因工程技术构建 DC 瘤苗面临的一个难题就是转导率不高。为了提高转导率,研究者作过多种尝试。Nishimura 等^[19]比较了在不同时间,不同速度,不同转速下离心力加强腺病毒介导的基因转导效率后发现,最好的离心转导条件是:RS 2 000 xg,T 37℃ ,Tm 2 h,MOI(high multiplicity of infection) 10。转导率提高达 86% 以上。而 Viggo^[20]报告,mRNA 电穿孔与质粒 DNA 电穿孔相比有明显提高的转导率,前者转导率为 89%,后者则为 40%。更重要的是,编码 Melan-A 的 mRNA 电穿孔的 DC 可强烈激活 Melan-A 特异性的 CTLs 克隆增殖,优于 mRNA 脂质体转导的 DC 或 mRNA 直接冲击的 DC。

总之,DC 瘤苗是肿瘤免疫治疗的新方向,可行性试验已证实抗原冲击的 DC 可用来激发体内的抗原特异性 T 细胞反应,临床 I , II 期试验也取得了可喜的成就。但是 DC 瘤苗真正广泛应用于临床将有一段距离,我们必须解决以下问题:数量大纯度高的 DC 的诱导;特异性肿瘤抗原的选择;DC 瘤苗构建方式的改善;合适的 DC 瘤苗回输时间,方式,剂量的选择等等。随着 DC 瘤苗进一步研究的开展,DC 瘤苗应用于临床肿瘤免疫治疗指日可待。

[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, 166(1): 678-689.

[2] Peter B, Stefan W, Wolfram B, *et al.* Dendritic cells in cancer vaccines[J]. Exp Hematol, 2001, 29: 1247-1255.

[3] Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines[J]. Cell, 2001, 106(3): 255-258.

[4] Nina B. Processing and presentation of antigen by dendritic cells: Implications for vaccines[J]. Trends Mol Med, 2001, 7: 1154-1162.

[5] Ramadan G, Schmit RE, Schubert J. *in vitro* generation of human CD86⁺ dendritic cells from CD34⁺ haematopoietic progenitors by PMA alone in serum-free medium[J]. Clin Exp Immunol, 2001, 125(2): 237-244.

[6] Hogihara M, Lic, Gansuud B, *et al.* Extensive and long-term *ex vivo* production of dendritic cells from CD34⁺ umbilical cord blood bone marrow cells by novel culture system using mouse stroma[J]. J Immunol Methods, 2001, 253(1-2): 45-55.

[7] Servido F, soligo D, Lambertenghi, *et al.* Functional differences between dendritic cells derived from CD34⁺ bone marrow and pe-

ripheral blood stem cells[J]. Haematologica, 2000, 85(4): 352-355.

- [8] Garderet L, Cao H, Salamero J, *et al.* *in vitro* production of dendritic cells from human blood monocytes for therapeutic use[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2001, 10(4): 553-567.
- [9] Zheng Z, Takahashim, Narita M, *et al.* Generation of dendritic cells from adherent cells of cord blood by culture with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2000, 9(4): 453-464.
- [10] Hulette BC, Rowden G, Ryan CA, *et al.* Cytokine induction of a human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1) to a CD1a⁺ dendritic cell phenotype[J]. Arch Dermatol Res, 2001, 293(3): 147-158.
- [11] Naritam, Takahashim, Li A, *et al.* Generation of dendritic cells from leukemia cells of a patient with acute promyelocytic leukemia by culture with GM-CSF, IL-4 and TNF- α [J]. Acta Haematol, 2001, 106(3): 89-94.
- [12] Garin J, Diez R, kieffer S, *et al.* The phagosome proteome: Insight into phagosome functions[J]. J Cell Biol, 2001, 152: 165-180.
- [13] John M, Timmerman, Debrak, *et al.* Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma clinical and immune response in 35 patients[J]. Blood, 2002, 99(5): 1517-1526.
- [14] Mule JJ. Tumor vaccine strategies that employ dendritic cells and tumor lysate: Experimental and clinical studies[J]. Immunol Invest, 2000, 29(2): 127-129.
- [15] Jenne L, Arrighi JF, Jonuleit H, *et al.* Dendritic cells containing apoptotic cells prime human CD8⁺ T cells for efficient tumor cell lysis[J]. Cancer Res, 2000, 60: 4446-4456.
- [16] Kuyler A, Stuhler G, Walden P, *et al.* Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccine with tumor cell-dendritic cell hybrids[J]. Nat Med, 2000, 6: 332-336.
- [17] Zum, Metzger J, Hermann C, *et al.* The generation of both T killer and Th cell clones specific for the tumor-associated antigen HER2 using retro virally transduced dendritic cells[J]. J Immunol, 2001, 107(3): 1712-1719.
- [18] Nishioka Y, Hirao M, Robbins PD, *et al.* Induction of systemic and therapeutic antitumor using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express IL-12[J]. Cancer Res, 1999, 59(16): 4035-4041.
- [19] Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T, *et al.* Novel centrifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence protein gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells[J]. J Immunol Methods, 2001, 253(1-2): 114-124.
- [20] Viggo F, Van T, Peter P, *et al.* Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells[J]. Blood, 2001, 98(1): 45-56.

[收稿日期] 2002 - 09 - 09

[修回日期] 2002 - 11 - 05