

[文章编号] 1007-385X(2003)03-0175-05

肺癌患者外周血树突状细胞的生物学特性研究

黄建安¹, 朱一蓓², 古涛², 席泓², 王天立¹, 戴俊², 张学光²(1. 苏州大学附属第一医院, 江苏苏州 215006; 2. 苏州大学医学生物技术研究所, 江苏苏州 215006)

[摘要] **目的:** 探讨肺癌患者外周血来源的树突状细胞(dendritic cells, DC)生物学特性。**方法:** 从肺癌患者外周血分离获得单个核细胞,用细胞因子 GM-CSF (100 $\mu\text{g/L}$),IL-4 (50 $\mu\text{g/L}$)体外培养诱导。凋亡肿瘤细胞负载 24 h 后加入 TNF- α (10 $\mu\text{g/L}$)或 CD40 激发型单抗于培养 DC 中,继续诱导 3 ~ 4 d。分别测定 DC 的表型、DC 摄取抗原能力;混合淋巴细胞反应 (MLR)对 T 细胞增殖能力的测定;细胞计数和³H-TdR 掺入观察 DC 对 T 细胞的激发和扩增效应,并与健康志愿者外周血来源的 DC 进行比较。**结果:** 患者外周血单个核细胞和正常人外周血单个核细胞来源的 DC 均高表达 CD1 α , CD83, CD80, CD86 和 HLA-DR 等 DC 的相关抗原和共刺激分子;患者的未成熟 DC 能有效摄取 FITC-Dextran,经 TNF- α 或 CD40 激发型单抗激发诱导后,成为成熟和有功能的 DC,几乎完全失去对抗原的摄取能力,与健康人外周血来源 DC 组相比无明显差别 ($P > 0.05$);患者单个核细胞来源的 DC 在体外具有激发自体 and 同种异体外周血 T 细胞增殖的能力。**结论:** 肺癌患者的外周血来源单个核细胞可以诱导成为具有功能的成熟 DC。

[关键词] 肺癌; 树突状细胞; 外周血单个核细胞; CD40

[中图分类号] R392.11 [文献标识码] A

The Biological Characteristics of Dendritic Cells Derived from Peripheral Blood of Lung Cancer Patients

HUANG Jian-an, ZHU Yi-bei, GU Tao, XI Hong, WANG Tian-li, DAI Jun, ZHANG Xue-guang (Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital to Suzhou University, Suzhou 215006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the biological characteristics of dendritic cells (DC) derived from peripheral blood of patients with lung cancer. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 11 lung cancer patients and healthy donors respectively, cultured with GM-CSF (100 $\mu\text{g/L}$) and IL-4 (50 $\mu\text{g/L}$). After pulsed with apoptotic lung cancer cells for 24 h, TNF- α (10 $\mu\text{g/L}$) added or agonist CD40mAb (5 mg/L) for a further induction of 3 ~ 4 days. Phenotypes of DC were detected by FCM. The capacities for DC to uptake antigens were monitored at day 7 and day 11 detected by FITC-dextran uptake test. ³H-thymidine incorporation test was used to measure the proliferative capability of T cells. **Results:** Both DC derived from PBMC of lung cancer patients and from PBMC of healthy donors showed high expressions of CD1 α , CD80, CD83, CD86 and HLA-DR, which were known as associated markers of mature DC. The 7th day DC derived from lung cancer patients PBMC showed a strong capacity to uptake antigens. DC were induced by TNF- α or CD40mAb, then became mature. DC entirely lost their capacities of uptake antigens, while DC could stimulate autologous and allogenic T cells' proliferation. When matured DC co-incubated with autologous T cells for 48 h, activated T cells could be observed and the number of activated T cells was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The functional and mature DC could be induced from peripheral blood of lung cancer patients *in vitro*.

[Key words] lung cancer; dendritic cells; peripheral blood mononuclear cells; CD40

* 树突状细胞(dendritic cells, DC)是体内已知功能最强的抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APC),能摄取、加工及递呈抗原,并能刺激初始型 T 细胞(na-

[基金项目] 江苏省社会发展基金(BS2000038)和江苏省医学重点人才基金(RC2002032)

[作者简介] 黄建安(1960-),男,江苏省常州市人,主任医师,医学博士,主要从事呼吸系疾病的研究

[通讯作者] 张学光

ive T cells)的活化和增殖,从而启动机体的特异性免疫应答^[14],以 DC 为载体负载肿瘤抗原后,可以有效地激发机体的抗肿瘤免疫应答或激发细胞毒 T 细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)产生抗肿瘤效应^[5]。鉴此,DC 对于 CTL 识别和杀伤肿瘤细胞以及正常机体免疫监视功能的维持有着十分重要的意义。越来越多的研究表明,在荷瘤机体中,由于存在 APC 的功能缺陷,特别是 DC 的数量^[6]、功能和形态学的改变,可造成肿瘤细胞逃避机体的免疫监视^[7]。虽然肿瘤部位常存在着浸润的 DC 或 DC 的前体细胞,且这些细胞可以摄取肿瘤抗原并进行加工、处理,但是由于受到肿瘤微环境的影响,DC 的成熟和迁移产生了障碍,从而使 DC 不能充分激发 T 细胞产生免疫应答,甚至引起免疫耐受,造成了肿瘤的发生、发展和转移^[8-13]。

以免疫治疗为主的生物治疗作为一种新的肿瘤治疗方法,已经成为肿瘤联合治疗方案的组成之一,DC 作为体内功能最强的抗原递呈细胞,其在介导免疫应答中的作用正日益受到重视^[6]。DC 疗法的关键是体外肿瘤抗原负载 DC 的获得,并能有效地激发 T 细胞活化和增殖,从而能介导机体的抗肿瘤效应。本研究拟首先通过肺癌患者外周血分离获得树突状细胞的前体细胞,在体外采用多种细胞因子联合诱导,使其分化成熟为功能性 DC,并对其生物学特性进行探讨,以期开辟一条采用以 DC 为主的免疫疗法治疗肺癌的可行性途径。

1 材料与方法

1.1 试剂与细胞株

淋巴细胞分离液 Ficoll(上海生化试剂二厂);鼠抗人 CD1 α -PE, CD3-PE, CD4-PE, CD8-PE, CD14-PE, CD40-PE, CD80-PE, CD83-PE, CD86-PE, HLA-DR-PE 单克隆抗体均为法国 Immunotech 公司产品,人重组 GM-CSF 购自美国 R&D 公司;人重组 IL-4 购自北京医科大学免疫学 T 细胞实验室;小牛血清 FCS,杭州四季青公司;RPMI-1640 培养基 Gibco,美国产品;FITC-Dextran(4 kD)购自美国 Sigma 公司;顺铂(DDP),昆明药业产品;激发型 CD40 单克隆抗体由苏州大学生物技术研究所自行研制^[14];IL-12 酶标检测试剂盒、AnnexinV/PI 试剂盒购自法国 Immunotech 公司;³H-TdR 中科院上海核技术公司产品。流式细胞仪美国 Beckman-Coulter 公司产品;液体闪烁计数仪瑞典 Pharmacia 公司产品。恶性 B 淋巴细胞瘤细胞株 Daudi,肺腺癌细胞株 A549、SPC-A-1,小细胞肺癌细胞株 NICH-446 均购自美国 ATCC 公司。

1.2 病例选择

11 例肺癌患者,男 9 例,女 2 例。腺癌 7 例,小细胞肺癌 4 例。

1.3 诱导肿瘤细胞凋亡及凋亡率的测定

选用化疗药物顺铂(DDP, 0.5 mg/10⁷细胞),5% CO₂, 37℃ 4 h,洗涤,24 h 后 AnnexinV/PI 测定凋亡率。

1.4 DC 的诱导

无菌抽取肺癌患者肝素抗凝外周血 60 ml,常规 Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞(PBMC),用含 10% FCS 的 RPMI-1640 调整到 3 × 10⁶/ml,加入 6 孔培养板(2 ml/孔)中,5% CO₂, 37℃ 培养 2 h 后,吸出未贴壁细胞,用 37℃ 培养基轻洗,吸出悬浮细胞 -80℃ 冻存。贴壁细胞采用含 GM-CSF(100 μg/L),IL-4(50 μg/L),10% FCS 的 RPMI-1640,5% CO₂, 37℃ 培养,3 d 换液 1 次。

1.5 凋亡肺癌细胞负载 DC

在培养的第 7 天,以顺铂(DDP)诱导凋亡的相应肺癌细胞株进行抗原负载(凋亡细胞:DC = 1:1)。24 h 后分 2 组,一组加入激发型 CD40 单克隆抗体(5 mg/L),另一组加入 TNF- α (10 μg/L)继续诱导 3~4 d,收集细胞及培养上清液。抽取健康志愿者外周血(苏州血站),以诱导凋亡的 Daudi 作为负载抗原,以激发型 CD40 单克隆抗体诱导 DC 作为对照。

1.6 DC 的形态学观察

用双相倒置显微镜每日观察细胞生长及形态变化情况。

1.7 DC 分泌 IL-12 含量的测定

取第 11 天 DC 培养上清,按 Immunotech 公司 ELISA 试剂盒说明书介绍的方法测定 IL-12 的含量。

1.8 DC 摄取抗原能力的检测

收集经不同培养条件诱导培养至第 7 天和第 11 天的 DC,分别测定不同实验组 DC 的表型、DC 摄取抗原能力;用含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度至 3 × 10²/L,加入 FITC-dextran(1 g/L),混匀后分别置于 37℃ 和 4℃ 共培养 90 min,用冷 PBS 洗涤 3 遍,重悬于 0.5 ml PBS 中在流式细胞仪上进行分析。

1.9 成熟 DC 的表型分析

收集培养 11 d 后的细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞并调整细胞浓度为 5 × 10²/L,在 100 μl 细胞悬液中分别加入 PE 标记的抗人 CD1 α , CD80, CD83, HLA-DR, CD40, CD25, CD86 单克隆抗体,同时设小鼠 IgG1 抗体对照,4℃ 孵育 30 min 后用 PBS 洗涤 2 次,最后用 0.5 ml PBS 悬浮细胞于流式细胞仪上进行表型分析。

1.10 混合淋巴细胞反应(MLR)

以复苏的患者 T 细胞作为自体 T 细胞,以分离获得的健康人外周血 T 细胞作为异体 T 细胞备用。用含

10% FCS 的 RPMI-1640 将 T 细胞调整至 $2 \times 10^3/L$, 加入 96 孔培养板(100 μl /孔), 按 20:1, 50:1 的比例分别加入培养收集的 DC, 5% CO₂, 37°C 培养 56 h 后, 加入 ³H-TdR(1 μCi /孔), 继续培养至 72 h 终止。收集细胞, 采用液闪仪测定 cpm 值, 按以下公式计算刺激指数 (SI):

$$SI = \frac{\text{实验组 cpm} - \text{本底 cpm}}{\text{对照组 cpm} - \text{本底 cpm}}$$

1.11 统计学处理

使用 SPSS9.0 软件进行数据统计分析; $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤细胞凋亡的诱导

DDP 诱导的肺癌细胞经 AnnexinV/PI 测定凋亡率为 (65 ± 11.3)%。

2.2 DC 形态学的观察

贴壁细胞经过 8 d 诱导后可见胞体拉长、具有树突状突起外形, 并呈半悬浮生长(图 1)。

2.3 DC 细胞表型分析

经直接免疫荧光法测定, 患者和正常人单个核细

胞来源的第 11 天 DC 均高表达 CD40, CD1 α , CD80, CD86 和 HLA-DR 等共刺激分子和其它相关抗原分子, 经 CD40 激发型单抗刺激的 DC 和 TNF- α 组相比, CD25 和 CD83 的上调性表达更为显著($P < 0.05$, 见表 1)。

图 1 GM-CSF 和 IL-4 诱导第 8 天的 DC (×200)

Fig. 1 The 8th day DC induced by GM-CSF and IL-4 (×200)

表 1 患者和正常人单核细胞来源的 DC 表型分析 (n = 11)

Tab. 1 Phenotypes of DC derived from PBMC of lung cancer patients or healthy volunteers (n = 11)

	CD40 mAb	TNF- α	Healthy volunteers CD40 mAb
CD1 α	72.6 ± 5.9	56.6 ± 20.3	70.2 ± 13.6
CD40	98.6 ± 8.7	94.2 ± 11.2	97.8 ± 4.9
CD80	94.2 ± 2.5	91.9 ± 3.9	95.6 ± 1.9
CD83	79.7 ± 6.5*	54.7 ± 10.8	78.2 ± 9.8
CD86	97.3 ± 9.6	93.6 ± 9.7	96.9 ± 7.4
CD25	67.5 ± 8.1**	27.9 ± 7.8	65.3 ± 4.6
HLA-DR	86.2 ± 4.3	81.5 ± 3.4	88.5 ± 7.1*

Compared with TNF- α group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 DC 培养上清中 IL-12 的测定

患者和正常人单个核细胞来源的第 11 天 DC 的培养上清中, 均可检测到有 IL-12 的分泌, 其中经 CD40 激发型单抗刺激组产生的 IL-12 水平较 TNF- α 组高($P < 0.05$)

2.5 DC 摄取抗原能力的检测

通常认为, 未成熟 DC 具有较强的抗原摄取能力, 经抗原或微环境中炎性因子如 LPS, IL-1, TNF- α 等的作用, DC 摄取抗原的能力明显下降, 而加工、提呈抗原的能力则显著增强。我们的实验结果也表明, 患者

PBMC 经 GM-CSF 和 IL-4 联合诱导分化成为未成熟 DC, 具有很强的 FITC-dextran 摄取能力, 而经 CD40 激发型单抗或 TNF- α 激发诱导后, 几乎完全丧失对抗原的摄取能力, 与正常人组相比无明显差别($P > 0.05$)。

2.6 DC 激发 T 细胞增殖能力的测定

实验结果显示, 患者单个核细胞来源的 DC 在体外同样具有激发自体和同种异体外周血 T 细胞增殖的作用, 且以激发型 CD40 单抗激发组体外刺激 T 细胞增殖反应能力强($P < 0.05$, 见图 2)。

3 讨论

DC 负载抗原作为抗肿瘤免疫疗法中强有力的免疫疫苗,在治疗黑色素瘤^[15]、前列腺癌^[16]和 B 细胞淋巴瘤^[17]等恶性肿瘤中取得了一定的疗效。国际上已有多篇关于临床运用 DC 治疗恶性肿瘤的报道,但至今尚无关于特异性 DC 输注的细胞数量、次数、部位、途径和伴随的细胞因子的可行性方案;而且 DC 的输注有可能会伴随某些自身免疫反应;同时,对于晚期肿瘤患者,由于其主动免疫功能差,也在很大程度上影响了治疗效果。有研究证实,以肿瘤抗原特异性 DC 联合细胞因子体外活化和扩增的肿瘤抗原特异性 CTL 可在体内生存 20 d,且可到达肿瘤部位,而仅用细胞因子激发的 T 细胞仅能在体内生存几小时,且主要存在于血管周围。同时,经 DC 体外扩增的 CTL 细胞安全可靠、特异性强,扩增数量足够。

图 2 ³H-TdR 掺入试验检测 DC 对 T 细胞增殖的影响

Fig. 2 Proliferation of T lymphocytes stimulated by DC (³H-TdR incorporation test)

A: TNF- α stimulation group; B: CD40 mAb stimulation group; C: Healthy volunteer control

目前用于治疗 DC 疫苗大部分采用 DC 负载整体肿瘤细胞抗原、抗原多肽、肿瘤细胞裂解物以及采用 DC 与肿瘤细胞融合形成 dendritoma,但由于大部分肿瘤相关抗原尚未被发现,因此,采用肿瘤细胞株细胞作为物质基础,由 DC 从全部细胞抗原中选取肿瘤细胞抗原并对其加工、递呈,可能是一种简便而有实效的方法。采用凋亡的肿瘤细胞负载 DC,免去了繁琐的筛选肿瘤相关抗原过程,本实验采用了 3 种肺癌细胞株分别负载相应肺癌患者的 DC,均获得相似的结果。

近期研究发现:CD40 分子激发后的 DC 细胞 (conditioned DC) 可以不需 CD4⁺ Th 细胞的辅助,直接活化 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞 (CTL)^[3,4,18]。同时,DC 表面持续性表达 CD40 分子,而且在成熟过程中呈上调性表达,活化 T 细胞表面表达 CD40L,又可与 DC 表面的 CD40 相互作用,从而促进 DC 分化成熟。因此

CD40-CD40L 的相互作用不仅对 DC 的分化成熟,而且对抗原特异性 T 细胞激活具有重要的作用。本实验同时也观察了 CD40 mAb 激发 DC 表面 CD40 分子激活自体 T 细胞,为肺癌的生物学治疗提供实验依据。激发 CD40 促进 DC 成熟并具有扩增 CD8⁺ T 细胞的能力,可能是抗原负载后的 DC 在 CD40 mAb 作用下,递呈 MHC-I 类抗原的能力增强,且较单纯抗原负载快,同时可使 DC 的存活时间延长的缘故。

IL-12 是 T 细胞的分化因子,能促使 Th0 细胞向 Th1 细胞分化。DC 分泌 IL-12 量的增加是 CTL 激活过程中关键的一步,可促进 CTL 的增殖或穿孔素的产生,而且,IL-12 是体内最大限度扩增分泌 IFN- γ CTL 所必需的。我们的研究结果显示,抗原负载后 DC 尤其是 CD40mAb 诱导成熟的 DC 分泌 IL-12 的量明显增加。

本研究发现,DC 经 TNF- α 或 CD40 激发型单抗激发诱导后,可以成熟并具有功能,其成熟时几乎完全失去对抗原的摄取能力,与健康人外周血来源 DC 组相比无明显差别 ($P > 0.05$);患者单个核细胞来源的 DC 在体外具有激发自体 and 同种异体外周血 T 细胞增殖的能力,也证实了采用凋亡肺癌细胞提供肿瘤抗原负载 DC 在激发型 CD40 mAb 诱导下,不仅从肺癌患者外周血诱导出功能性 DC,而且可以有效促进患者自体 T 细胞增殖。这为体外采用抗原特异性 DC 激发自体肿瘤抗原特异性 T 细胞,并回输注给肿瘤患者的过继免疫疗法提供了新思路,值得予以重视。

[参考文献]

- [1] Schultze JL, Cardoso AA, Freeman GJ, et al. Follicular lymphomas can be induced to present alloantigen efficiently: A Conceptual model to improve their tumor immunogenicity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 8200-8204.
- [2] Cardoso AA, Schultze JL, Boussiotis VA, et al. Pre-B acute lymphoblastic leukemia cells may induce T-cell anergy to alloantigen [J]. Blood, 1996, 88: 41-48.
- [3] Restifo NP, Kawakami Y, Marincola F, et al. Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: Immunogenotherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I [J]. J Immuno Ther, 1993, 14: 182-190.
- [4] Khanna R, Cooper L, Kienzle N, et al. Engagement of CD40 antigen with soluble CD40ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells [J]. J Immunol, 1997, 159: 5782-5785.
- [5] Ridge JP, Rosa FD, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD⁺4 T-helper and a T killer cell [J]. Nature, 1998, 393: 474-478.
- [6] Jefford M, Maraskovsky E, Cebon J, et al. The use of dendritic cells in cancer therapy [J]. Lancet, 2001: 343-353.
- [7] Saito H, Tsujitani S, Kondo A, et al. Combined analysis of tumor neoangiogenesis and local immune response in advanced gastric carcinoma [J]. Oncol Rep, 1999, 6: 459-463.
- [8] Ellem KA, Schmidt CW, Li CL, et al. The labyrinthine ways of cancer immunotherapy T cell, tumor cell encounter: "how do I

- lose thee? Let me count the ways"[J]. *Adv cancer Res*, 1998, 75: 203-249.
- [9] Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, *et al.* Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells[J]. *J Immunol*, 1997, 159: 4772-4780.
- [10] Gabilovich DI, Chen HL, Girgis 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.
- [11] Geissmann F, Revy P, Regnault, *et al.* TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells[J]. *J Immunol*, 1999, 162: 4567-4575.
- [12] Koch F, Stanzl U, Jennewein P, *et al.* High level IL-12 production by murine dendritic cells: Upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10[J]. *J Exp Med*, 1996, 184: 741-746.
- [13] Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, *et al.* Interlukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells[J]. *Int Immunol*, 1994, 6: 1177-1185.
- [14] Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, *et al.* Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interlukin- 10[J]. *Eur J Immunol*, 1995, 25: 1943-1950.
- [15] Gruss HJ, Hirschstein D, wright B, *et al.* Expression and function of CD40 on Hodgkin and Reed-Sternberg cells and the possible relevance for Hodgkin's disease[J]. *Blood*, 1994, 84: 2305-2314.
- [16] Zhou ZH, Wang JF, Wang YD, *et al.* An agonist anti-human CD40 monoclonal antibody that induce dendritic cell formation and mature inhibits proliferation of myeloma cell line[J]. *Hybridoma*, 1999, 18: 471-478.
- [17] Timmerman JM, Levy R. Dendritic cells vaccines for cancer immunotherapy[J]. *Annu Rev Med*, 1999, 50: 507-529.
- [18] Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, *et al.* Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-2-specific membrane antigen peptides: A phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease[J]. *Prostate*, 1999, 38: 73-78.
- [19] Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, *et al.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells [J]. *Nat Med*, 1996, 2: 52-58.
- [修回日期] 2003 -03 -24 [修回日期] 2003 -06 -15

《肿瘤防治杂志》2004 年征订启事

《肿瘤防治杂志》由中华人民共和国卫生部主管,系中华预防医学会系列杂志。“以防为主(三级预防),预防并举”为本刊的办刊宗旨;以从事肿瘤基础研究与临床工作者以及医学院校师生为主要读者对象。主要栏目有:流行病学·预防医学、基础·临床研究、综述·讲座、短篇·病案报道、简讯等。本刊为国家新闻出版署“双效期刊”、“中国生物医学核心期刊”、“中国科技核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊”;被国际著名检索系统美国《化学文摘(CA)》及俄罗斯《文摘杂志(AJ)》收录。

本刊为月刊,112 页码,国际标准 A4 开本,每月底出版,每期定价 10 元,全年订价 120 元。刊号 CN37-1355/R, ISSN1009-4571,国内邮发代号 24-145,国际代号 4917BM。欢迎读者在当地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部邮购,每期需增加邮资费 2 元。

联系地址:山东省济南市济兗路 440 号

山东省肿瘤医院内 《肿瘤防治杂志》编辑部

电 话:(0531)7984777-82516

传 真:(0531)79844783

邮 编:250117

E-mail: zgzlx@public.jn.sd.cn