

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0243-05

人外周血单核细胞来源的 DC 体外分化成熟影响因素的研究

束永前¹, 朱一蓓², 戴俊², 席弘², 黄勇², 吴明媛², 夏瑜², 张学光²(1. 江苏省人民医院肿瘤中心, 南京 210029; 2. 苏州大学医学生物技术研究所, 江苏苏州 215007)

[摘要] 目的: 探讨不同因素对人外周血单核细胞来源的树突状细胞(DC)体外分化成熟的影响。方法: 通过流式细胞仪表型分析、混合淋巴细胞反应、抗原摄取能力检测、DC对T细胞的趋化能力及对IL-10的拮抗效应的测定,研究了TNF- α , FL, sCD40L, CD40mAb, gp130, IL-10等不同因素对DC的体外分化成熟及功能的影响。结果: CD40信号和TNF- α 都可以有效地使DC上调表达共刺激分子CD80, CD86并进而促进DC激发T细胞的增殖和活化及对T淋巴细胞的趋化作用,但在体外培养体系中,sCD40L能有效地拮抗IL-10的抑制效应,而TNF- α 则明显不如sCD40L有效;激发型gp130单克隆抗体和人重组FL可以显著地促进DC的体外扩增,但是无明显地促进DC分化成熟和促进DC激发T细胞的功能。结论: CD40和TNF- α 都具有促进DC分化、成熟的能力,但CD40的作用明显优于TNF- α 。

[关键词] 树突状细胞; 体外诱导; 共刺激分子; CD40; TNF- α

[中图分类号] R730.59; R392.12 [文献标识码] A

The Affecting Factors of Inducing Human Peripheral Blood Monocyte-Derived Dendritic Cells *in vitro*

SHU Yong-qian, ZHU Yi-bei, DAI Jun, XI Hong, HUANG Yong, WU Ming-yuan, XIA Yu, ZHANG Xue-guang(People's Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210029, China; 2. Biotechnology Institute, Soochow University, Suzhou 215007, China)

[Abstract] **Objective:** To study the affecting factors on the differentiation, maturation and function on the human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells (DC). **Methods:** Through DCs' surface molecules analysis, mixed-lymphocyte reaction, FITC-Dextran capture, cell counting and chemotaxis activity of T lymphocytes, we compared functions of DC stimulated with different cytokines including TNF- α , FL, sCD40L, CD40mAb, gp130 and IL-10. **Results:** Both CD40- and TNF- α signalling are able to promote differentiation and maturation of DC, including upregulation of costimulatory molecules expression, such as CD80 and CD86, enhancement of DC-mediated MLR, promotion of T cell chemotactic ability to DC; CD40 signalling counteracted the inhibitory effects of IL-10 on DC more efficiently than TNF- α signalling; The agonist gp130 mAb and human recombinant FL can remarkably promote the proliferation of DC *in vitro*, while there are no distinct effects on DCs' differentiation, maturation and ability to activate T cells. **Conclusions:** CD40 signalling is more powerful than TNF- α , and plays a unique role to obtain more mature and functional DC *in vitro*.

[Key words] dendritic cells; induction *in vitro*; costimulatory molecules; CD40; TNF- α

* 树突状细胞(dendritic cells, DC)是机体内最重要的抗原递呈细胞(antigen presentation cell, APC),也是机体初次免疫应答的有力启动者,在机体抗肿瘤免疫应答中占有极其重要的地位^[1,2]。它作为一种天然的免疫佐剂,近年来,在肿瘤免疫的运用中得到高度重视,并已试用于临床,取得了一定的疗效。如何使体外诱导的DC完全成熟并具有天然DC的抗原提呈功能

是目前提高临床治疗效果亟待解决的问题。研究表

[基金项目] 江苏省医学重点实验室、江苏省卫生厅科研基金(H20010)及江苏省卫生厅科技重大攻关项目(H200211)

[作者简介] 束永前(1963-),男,江苏苏州人,副教授,主任医师,主要从事肿瘤化疗及生物治疗研究

[通讯作者] 张学光, E-mail: smbxuegz@public1.sz.js.cn

明,DC的分化成熟与其微环境中存在的炎性因子相互作用以及与T,B细胞相互接触所提供的刺激信号密切相关。一些细胞因子(TNF- α ,CD40L等)可促进DC的前体细胞分化为DC,使DC成熟并具有生物学功能^[3-5],而肿瘤微环境中存在的一些抑制性因子如IL-10,VEGF等则对DC的成熟和功能产生负性作用^[6-7]。鉴于,我们对体外诱导的外周血单核细胞来源的DC用不同手段进行处理,通过不同因素对DC分化成熟的影响的探讨,为建立人外周血单核细胞来源的树突状细胞体外诱导扩增优化方案寻找可行的细胞因子组合。

1 材料与方 法

1.1 试剂和仪器

人重组GM-CSF购自北京医科大学;人重组IL-4,IL-10为美国R&D公司产品;人重组TNF- α 由日本东京大学松岛冈次教授惠赠;胎牛血清(FCS)、RPMI-1640培养基、丝裂霉素、植物血凝素(PHA)均购自美国Sigma;淋巴细胞分离液Ficoll为上海生化试剂二厂产品;鼠抗人CD14,CD19,CD1 α ,CD80,CD86,HLA-DR单克隆抗体和FITC标记的羊抗鼠IgG抗体为法国Immunotech公司产品;sCD40L、FL、抗CD40^[14]和抗gp130激发型单克隆抗体本室自行研制;MTT,AET为Sigma公司产品;24孔Transwell板为美国Corning Costar公司产品;³H-TdR为中国原子能研究所产品;流式细胞仪为Coulter公司产品;液体闪烁计数仪为Beckman公司产品;恒温离心机为法国Jouan公司产品。

1.2 DC的诱导

取正常志愿者外周血100 ml,用Ficoll分离获得单个核细胞,用RPMI-1640洗涤2遍,用含10%人AB型血清的RPMI-1640稀释到 3×10^6 /ml,加入6孔培养板(2 ml/孔)中,5% CO₂,37℃培养2 h,轻轻洗出悬浮细胞,在培养板中加入含GM-CSF(100 ng/ml),IL-4(50 ng/ml)和10% FCS的RPMI-1640,5% CO₂,37℃培养,3 d换液1次。在培养的第6天将细胞分为3组,一组在培养基中加入抗CD40激发型单克隆抗体(5 μ g/ml)或sCD40L(5 μ g/ml)或抗gp130激发型单克隆抗体(10 μ g/ml)或Flt-3配体(FL,50 ng/ml)或TNF- α (10 ng/ml),继续培养3 d;一组分别加入TNF- α (10 ng/ml)+IL-10(20 ng/ml)或sCD40L(5 μ g/ml)+IL-10(20 ng/ml)或IL-10(20 ng/ml)继续培养4 d;另一组仍用原方案继续培养至第9天。

1.3 T细胞的分离

将上一步获得的非黏附细胞调整到 5×10^7 /ml与绵羊红细胞(SRBC,经1% AET处理1 h)按1:100混

合,5% CO₂37℃培养1 h,轻轻加在Ficoll上离心(1 500 r/min,30 min),取下层的SRBC层细胞,加入50% FCS和10%二甲亚砜,-80℃冻存备用。

1.4 细胞表型分析

于培养的第9天收集各组细胞,采用间接或直接免疫荧光法标记细胞,经流式细胞仪分析细胞表型。

1.5 DC摄取抗原能力的检测

分别收集经不同因素诱导培养第7,9天的DC,各分为2组,用含10% FCS的RPMI-1640的培养基调整细胞浓度至 3×10^5 /ml,加入FITC-Dextran(1 mg/ml;m. w. ,40 000),混匀后分别置于37℃和4℃,共培养90 min后取出,用冷PBS洗涤3遍,再悬于0.5 ml PBS中于流式细胞仪上进行分析。

1.6 DC对T细胞的激发

将T细胞用含10%人AB型血清的RPMI-1640稀释成 3×10^6 /ml,加入96孔培养板(100 μ l/孔),按1:10,1:50的比例加入DC,5% CO₂,37℃培养72 h后,加入³H-TdR(1 μ Ci/孔),继续培养12 h,收集细胞,液体闪烁测量装置测定cpm值,计算刺激指数(SI):SI=试验组cpm/阴性组cpm

1.7 DC对T细胞趋化能力的检测

收集经不同细胞因子组合培养第9天的DC,用10% FCS RPMI-1640调整细胞浓度;取24孔Transwell培养板(孔径5 μ m),将DC加入培养板下室(最适体积0.6 ml),于上室加入100 μ l经分离纯化的T细胞,T:DC=1:5,置于5% CO₂,37℃培养4 h,收集下室细胞,经流式细胞仪检测CD3含量。各组以空白培养基及未作Transwell孔为对照。

1.8 统计学分析:采用非配对的t检验

2 结 果

2.1 DC形态学的观察

贴壁细胞经过8 d诱导后,除加入IL-10组外,余各组均可见有胞体拉长、具有树突状突起外形,呈半悬浮生长的细胞,不同组间细胞数量有一定差异(见图1,2)。

2.2 DC细胞表型分析

经免疫荧光法测定,除加入IL-10组外,余各组诱导的细胞均表达CD1 α ,CD80,CD86和HLA-DR等树突状细胞的相关抗原。其中经TNF- α 激发后或用CD40激发型单抗或可溶性CD40配体等激发的DC上调表达CD80,CD86分子;gp130激发型单抗激发也能使DC的CD80,CD86表达有所增加;而加入FL仅能诱导细胞数量增加,而对其CD80,CD86的表达无明显影响(见表1)。

2.3 IL-10 对 DC 分化发育的影响

体外 DC 诱导培养中,单独加入 IL-10,培养细胞贴壁生长,呈巨噬细胞样外观。表型分析显示,CD1 α , CD80, CD83 和 HLA-DR 等表面标志表达均明显下降,而 CD14 高表达。表明 IL-10 能阻止 DC 前体细胞或单核细胞向 DC 途径分化,而介导向巨噬细胞分化。若在加入 IL-10 的同时加入 TNF- α 或 sCD40L,则显示 sCD40L 能完全拮抗 IL-10 对 DC 分化、成熟过程的抑制作用,而 TNF- α 则不能有效地拮抗 IL-10 的抑制效应(见表 2)。

图 1 经 sCD40L 和 TNF- α 激发后,相差显微镜下观察 DC 形态

Fig. 1 Photographs of DC induced with different cytokine combinations for 8 days($\times 200$)

A: Photograph of DC induced with GM-CSF + IL-4 + sCD40L;
B: Photograph of DC induced with GM-CSF + IL-4 + TNF- α

图 2 不同因素对 DC 增殖的影响($\times 10^5/ml$)
Fig. 2 The proliferation of DC cultured with different cytokine ($\times 10^5/ml$)

表 1 不同因素刺激 DC 的表型分析(阳性细胞 %)

Tab. 1 Phenotype analysis of DC induced with different cytokine (positive cell %)

Groups	RPMI-1640 (control)	TNF- α	CD40L	CD40mAb	gp130mAb	FL
CD1a	50.6 \pm 10.9	56.6 \pm 20.3	69.4 \pm 13.6	66.2 \pm 5.4	54.1 \pm 6.7	49.1 \pm 7.0
CD80	52.8 \pm 17.8	87.3 \pm 3.8 Δ	93.6 \pm 1.9 \blacktriangle	86.2 \pm 2.5 Δ	71.1 \pm 17.1	64.2 \pm 7.2
CD86	52.5 \pm 5.9	83.7 \pm 4.9 Δ	91.9 \pm 7.4 \blacktriangle	87.8 \pm 9.2 Δ	73.5 \pm 15.4	61.7 \pm 7.4
CD83	34.9 \pm 2.1	40.7 \pm 1.9	62.4 \pm 6.3 Δ	63.5 \pm 8.2 Δ	38.7 \pm 11.2	36.9 \pm 12.1
HLA-DR	71.8 \pm 3.7	83.2 \pm 6.4	88.5 \pm 7.1	83.9 \pm 6.4	76.7 \pm 2.4	73.8 \pm 3.8

$\Delta 0.01 < P < 0.05$, compared with control group; $\blacktriangle P < 0.01$, compared with control group

表 2 TNF- α 或 sCD40L 拮抗 IL-10 对 DC 的抑制分化效应(阳性细胞 %)

Tab. 2 Phenotype analysis of DC induced with IL-10

Groups	CD1a	CD80	CD83	HLA-DR	CD14
A	50.6 \pm 10.9	52.8 \pm 17.8	17.7 \pm 9.67	1.8 \pm 3.7	15.7 \pm 5.6
B	32.7 \pm 9.7 \blacktriangle	18.9 \pm 9.8 \blacktriangle	15.3 \pm 8.1	22.6 \pm 10.2 \blacktriangle	69.9 \pm 13.1 \blacktriangle
C	47.2 \pm 8.7	52.1 \pm 5.7	15.9 \pm 2.6	68.5 \pm 17.5 Δ	10.2 \pm 3.1 Δ
D	50.3 \pm 12.1 Δ	90.6 \pm 5.8 Δ	52.1 \pm 7.1 Δ	71.3 \pm 12.2 Δ	9.3 \pm 0.4 Δ

A: GM-CSF + IL-4; B: A + IL-10; C: B + TNF- α ; D: B + sCD40L; $\blacktriangle P < 0.01$, compared with group A; $\Delta P < 0.01$, compared with group B

2.4 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,外周血单核细胞经 GM-CSF + IL-4 诱导分化的未成熟 DC 摄取 FITC-Dextran 的能力很强,经 sCD40L,CD40mAb 或 TNF- α 激发诱导后,其摄取 FITC-Dextran 的能力明显下降(见图 3)。

图 3 流式细胞仪测定不同因素诱导的 DC 对抗原的摄取能力

Fig.3 The uptake capacities of DC induced with different cytokine

- A: GM-CSF + IL-4; B: GM-CSF + IL - 4 + TNF- α ;
- C. GM-CSF + IL-4 + FL; D: GM-CSF + IL-4 + sCD40L;
- E. GM-CSF + IL-4 + CD40mAb; F: GM-CSF + IL-4 + gp130

2.5 ³H-TdR 测定混合淋巴细胞反应(MLR)

经各种因素处理后的 DC 均可激发 T 细胞的增殖,但其激发效率各不相同(见图 4)。经 TNF- α ,CD40 单抗或可溶性 CD40 配体以及 gp130 激发型单抗诱导的 DC,在体外刺激 T 淋巴细胞增殖反应的能力均有明显增强,而加入 FL 诱导培养的 DC 对 T 淋巴细胞增殖激发作用无明显影响。

2.6 DC 对 T 细胞趋化能力的检测

DC 能够分泌趋化物质有助于 T 细胞向 DC 的趋化,并与 T 细胞紧密结合,相互作用。本实验结果表明,未成熟 DC 经 sCD40L,CD40mAb 或 TNF- α 激发成熟后,对 T 淋巴细胞的趋化作用明显高于未激发组和 FL 组(见图 5)。

3 讨论

DC 作为一种重要的抗原递呈细胞(APC)在肿瘤免疫治疗中,日益受到人们的重视,DC 疗法已经在非

何杰金氏淋巴瘤^[8]、黑色素瘤^[9]、多发性骨髓瘤^[10-11]、前列腺癌^[12]和肾癌^[13]等恶性疾病治疗中取得了一定的疗效。

图 4 ³H-TdR 掺入法测定不同因素诱导的 DC 在体外对 T 细胞的激发增殖作用

Fig.4 The capacities of DC stimulating mixed lymphocyte proliferation

- A: GM-CSF + IL-4; B: GM-CSF + IL-4 + TNF- α ;
- C: GM-CSF + IL-4 + FL; D: GM-CSF + IL-4 + sCD40L;
- E: GM-CSF + IL-4 + CD40mAb; F: GM-CSF + IL-4 + gp130

图 5 流式细胞仪分析不同因素诱导的 DC 对 T 淋巴细胞的趋化作用

Fig.5 The capacities of DC attracting T lymphocytes

- A: 10% FCS RPMI-1640; B: GM-CSF + IL-4;
- C: GM-CSF + IL-4 + TNF- α ; D. GM-CSF + IL-4 + FL;
- E: GM-CSF + IL-4 + sCD40L; F: GM-CSF + IL-4 + CD40mAb

目前研究显示,体外采用骨髓、脐血 CD34⁺的造血干细胞、外周血 CD14⁺单核细胞均可诱导扩增 DC。由于外周血单核细胞获取容易,应用外周血诱导 DC 仍是目前临床试验研究的主要方法,然而,在 DC 临床试验性应用过程中发现,体内抗肿瘤的作用远不如体外实验或动物实验所获的结果,而且,如果仅仅应用未成

熟的 DC 往往只能导致机体的免疫耐受。因此,如何使体外诱导的 DC 充分发育成熟为功能性的 DC,从而在回输患者体内后,能有效地启动机体对肿瘤细胞的免疫应答是采用 DC 疗法治疗肿瘤的关键性问题。在本研究中,我们采用细胞因子、激发型抗体(CD40 和 gp130)等多种因子对体外培养的 DC 进行诱导。结果表明,通过激发 DC 表面的 CD40 分子可以有效地使 DC 上调表达协同刺激分子 CD80, CD86 并进而促进 DC 激发 T 细胞增殖和活化的功能;而 gp130 分子或采用 FL 等因子激发 DC 后,虽然可以促进 DC 的扩增,但是并不能明显上调 DC 表达 CD80, CD86 或促进 DC 激发 T 细胞的功能。

CD40/CD40L 是介导 DC 功能的重要分子。业已表明,CD40L 与 DC 表达的 CD40 相互作用后,能诱导 DC 的分化成熟^[8]。我们的实验结果也表明,CD40 分子的配基化(sCD40L)或交联(CD40mAb)可以显著地增加诱导的 DC 数量,还可使 DC 上调表达共刺激分子 CD80, CD86 和分泌 IL-12, 提高 DC 激发同种异体混合淋巴细胞反应的能力,下调 DC 摄取抗原的功能,增强 DC 对 T 细胞的趋化能力。

另有研究发现,肿瘤微环境中存在着肿瘤细胞释放的 IL-10, TGF- β 和 VEGF 等炎性抑制因子。这些因子对 DC 的分化发育及功能均有显著的抑制作用,提示肿瘤局部 DC 的功能缺陷可能与肿瘤细胞分泌的抑制因子有关。我们的实验也证实了 IL-10 在体外能明显抑制 PBMC 向 DC 的分化与成熟,促进 PBMC 向巨噬细胞系的异向分化;但我们也同时发现,在 DC 不成熟期加入 IL-10 的同时加入 sCD40L, DC 可以进一步地分化成熟而免于 IL-10 的负性作用,这一发现表明 sCD40L 可以完全拮抗 IL-10 对 DC 成熟的抑制效应;而 IL-10 和 TNF- α 同时作用,则显示 TNF- α 并不能有效地拮抗 IL-10 的抑制效应,这可能进一步提示了经 sCD40L 或 TNF- α 诱导的 DC 的成熟的程度不同,其原因可能在于配基化具有更强的活化 DC 的效应,而经 TNF- α 诱导的 DC 具有异质性。

[参考文献]

- [1] Schuler G, Steinman RM. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors[J]. *J Exp Med*, 1997, 186: 1183-1187.
- [2] Hart DN. Dendritic cells: Unique leukocyte populations which

- control the primary immune response[J]. *Blood*, 1997, 90: 3245-3287.
- [3] Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, *et al.* Bone marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines[J]. *Stem cells*, 1997, 15: 94-103.
- [4] Brossart P, Grunebach F, Stuhler G, *et al.* Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor[J]. *Blood*, 1998, 92: 4238-4247.
- [5] Mackey MF, Gunn JR, Maliszewsky C, *et al.* Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol*, 1998; 16: 2094-2098.
- [6] Allavena P, Piemonti L, Longoni D, *et al.* IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophage[J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28: 359-369.
- [7] Buelens C, *et al.* Interleukin 10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with IL-4 and GM-CSF[J]. *Eur J Immunol*, 1997, 27: 756-762.
- [8] 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.
- [9] Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy[J]. *Annu Rev Med*, 1999, 50: 507-529.
- [10] Titzer S, Christensen O, Manzke O, *et al.* Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cells: Immunological and clinical aspects[J]. *Br J Haematol*, 2000, 108: 805-816.
- [11] Reichardt VL, Okada CY, Liso A, *et al.* Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study. *Blood*, 1999, 93: 2411-2419.
- [12] Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, *et al.* Infusion of Dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific membrane antigen peptides: A phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease[J]. *Prostate*, 1999, 38: 73-78.
- [13] Holtl L, Rieser C, Papesch C, *et al.* Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendrite cells[J]. *J Urol*, 1999, 161: 777-782.
- [14] Zhou ZH, Wang JF, Wang YD, *et al.* An agonist anti-human CD40 monoclonal antibody that induces dendritic cell formation and maturation and inhibits proliferation of a myeloma cell line[J]. *Hybridoma*, 1999, 18: 471-478.

[收稿日期] 2003 - 10 - 09

[修回日期] 2003 - 11 - 28