

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0054-02

肿瘤抗原致敏树突状细胞协同 CD3AK 细胞的抗肿瘤作用

谢裕安, 罗小玲, 梁安民, 匡志鹏, 吴继宁 (广西医科大学肿瘤医院生物治疗研究中心, 南宁 530021)

树突状细胞(dendritic cells, DC)作为体内的专职抗原提呈细胞, 具有强大的激发初次免疫应答的独特功能, 在肿瘤免疫治疗中已显示出其重要的应用价值^[1-2]。CD3AK 细胞(anti-CD3 monoclonal antibody activated killer cells, CD3AK), 具有高效而广谱的抗肿瘤作用^[3]。本实验旨在探讨 DC 与 CD3AK 细胞联合应用能否产生协同抗肿瘤作用, 为肿瘤临床治疗提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

rhGM-CSF, rhIL-4 购自 Sigma 公司; 抗人 CD83 McAb 购自 PharMingen 公司; 抗 CD3McAb 由中国医学科学院天津血液研究所提供; rIL-2 为上海生化所产品, PHA 为广州医工所产品; 淋巴细胞分离液为上海生化试剂二厂产品; RPMI-1640 细胞培养基购自美国 GIBICO 公司; 放射性同位素⁵¹Cr 购自 Amersham。BEL-7402 肝癌细胞由本室传代培养。

1.2 肿瘤抗原肽的制备

常规培养细胞人肝癌细胞株 BEL-7402 细胞, 收集处于对数生长期的 BEL-7402 细胞并调整细胞浓度至 1×10^7 /ml, 反复冻融(-80℃/37℃) 4 次, 作为肿瘤相关抗原。

1.3 人外周血 DC 的体外诱导及肿瘤抗原冲击致敏 DC

取健康人抗凝外周全血用常规密度梯度离心法分离单个核细胞, 以含 15% FCS 的 RPMI-1640(完全培养基)调整细胞浓度至 3×10^6 /ml 加入 6 孔板中(3 ml/孔), 37℃; 5% CO₂ 孵箱培养 2 h, 轻轻吸弃非黏附细胞, 而获得贴壁的单核细胞, 每孔再加入含 rhGM-CSF 100 ng/ml 和 rhIL-4 100 ng/ml 的完全培养基, 常规培养, 每 3 天换液 1 次, 换液时加等浓度的 rhGM-CSF 和 rhIL-4。在培养的第 4 天将 DC 和 BEL-7402 肿瘤抗原共培养, 第 6 天收集 DC, 即为 BEL-7402 肿瘤抗原肽冲击致敏的 DC, 以抗 CD83McAb 特异显示诱导培养后的 DC。冲击后的细胞用培养基洗 2 遍, 重悬于 RPMI-1640 细胞培养液中备用。

1.4 人外周血 CD3AK 细胞的诱导及培养参照文献 [3] 进行

1.5 肿瘤抗原致敏 DC 协同 CD3AK 细胞的杀伤作用

采用 4 h ⁵¹Cr 释放试验, 实验中自然释放率均低于 20%。靶细胞为 BEL-7402 肝癌细胞, 效应细胞分 3 组, 分别为 CD3AK 细胞、CD3AK 细胞 + 肿瘤抗原致敏 DC(CD3AK 细胞: DC = 500: 1) 和肿瘤抗原致敏 DC, CD3AK 细胞与 BEL-7402 的效靶比分别为 50: 1, 25: 1。按下式计算各效应细胞的杀伤活性。

$$\text{杀伤活性}(\%) = \frac{\text{实验孔 cpm} - \text{自然释放孔 cpm}}{\text{最大释放孔 cpm} - \text{自然释放孔 cpm}} \times 100\%$$

1.6 统计学处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 采用 Pems 软件包计量资料的 *t* 检验进行统计分析。

2 结果与讨论

树突状细胞不仅是专职抗原提呈细胞, 更是一种天然的免疫佐剂, 具有重要的免疫调节功能^[1]。DC 能向 T 淋巴细胞提呈抗原并诱导肿瘤特异性 CTL 反应, 又对 CTL 细胞的细胞毒作用具有双向调节作用。CD3AK 细胞是由 anti-CD3McAb 活化的杀伤性 T 细胞, 具有高效激活与扩增, 体内外杀瘤活性高等特征, 临床应用 CD3AK 细胞治疗肝癌、肺癌、血液病等恶性肿瘤显示了良好的疗效^[3]。本实验结果表明, 肿瘤抗原致敏的 DC 能增强 CD3AK 细胞杀伤作用, CD3AK 细胞与肿瘤抗原致敏 DC 的混合物体外对 BEL-7402 肿瘤细胞的杀伤作用, 显著高于单纯 CD3AK 细胞($P < 0.01$), 结果见(表 1)。

DC 增强 CD3AK 细胞杀伤活性的可能机制为: DC 表面有大量的树突状突起, 使之有利于大量接触抗原并提呈给 CD3AK 细胞; DC 高表达 MHC I, II 类分子和 CD80/CD86 等共刺激分子, 为 CD3AK 细胞充分活化提供信号刺激; DC 分泌 IL-12 等多种细胞因子, 可维持和增强 CD3AK 的活性; DC 可通过分泌或外排一种具有抗原提呈能力的 exosome 小体来诱导免疫反应, 也增强了 CD3AK 细胞的抗肿瘤能力。有文献报道 DC 可作为一种效应细胞直接参与杀伤肿瘤细胞^[4], 但我们在实验中未发现人外周血 DC 在体外对 BEL-7402 肿瘤细胞有明显的直接杀伤作用。因而, DC 是否具有

[基金项目] 广西科技厅资助课题(编号: 桂科回 0009008)

[作者简介] 谢裕安(1964-), 男, 广西贵港人, 副教授, 主要从事肿瘤免疫与生物治疗研究

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0055-03

白血病细胞来源的树突状细胞在治疗白血病中的应用

王正飞 综述; 顾宗江, 张学光 审阅 (苏州大学医学生物技术研究所, 江苏 苏州 215007)

[摘要] 树突状细胞(DC)广泛分布于体内,是机体功能最强的抗原递呈细胞(APC),在免疫应答中起着桥梁作用。最近有文献报道,白血病细胞经诱导后能分化为DC,从而启动特异性的机体抗白血病免疫应答,使白血病的治疗取得了可喜进展。将白血病细胞诱导成为具有递呈肿瘤抗原特性的DC,激发自体特异性细胞毒性T淋巴细胞的产生,对白血病细胞产生杀伤作用,表明白血病细胞来源的DC的诱导方案,其细胞生物学特性及白血病的治疗具有广泛的应用前景。

[关键词] 树突状细胞; 白血病细胞; 诱导分化

[中图分类号] R730.59; R392 [文献标识码] A

白血病是血液系统恶性增殖性疾病。白血病细胞失去进一步分化成熟的能力而停滞在细胞发育的阶段,并在骨髓呈现克隆性增殖并播散到外周血或浸润其它脏器。近几年来,以DC为基础的白血病免疫疗法取得了重大进展。其中比较引人注目的一种方法是直接将白血病细胞诱导成为具有递呈肿瘤抗原特性的DC,从而激发自体特异性细胞毒性T淋巴细胞的产生,对白血病细胞产生杀伤作用。本文将对此研究进展作一介绍。

1 白血病细胞来源的DC治疗白血病的理论基础

以DC为基础的白血病的免疫疗法一般包括:①用凋亡肿瘤细胞或细胞裂解物负载DC。②用肿瘤抗原多肽负载DC。③用基因修饰白血病细胞。④肿瘤细胞与DC融合。这些方法在基础实验中都取得了一定的疗效,但往往也存在一些缺陷,如在临床上不易获得足量的肿瘤细胞及操作有一定的繁琐性。

传统的DC是从CD34⁺或CD14⁺细胞在细胞因子作用下诱导分化而来的。但是要得到临床治疗所需要的数量,则需要大量的前体细胞的体外培养性诱导。如果能直接将白血病细胞诱导成为具抗原递呈功能的细胞,则有以下几个优

点:①省缺了需与DC发育同步化的抗原负载步骤;②自身作为免疫原,无需鉴别肿瘤抗原;③能产生针对大量多肽的T细胞应答,避免了白血病细胞逃避针对一种多肽的特异性CTL应答;④能够绕过体内DC数量和功能上的异常^[1];⑤避免了应用白血病细胞未加选择的表位(包括自身抗原,如核蛋白、DNA或RNA)抗原多肽负载,理论上可减少发生自身免疫性疾病的机率。因此,白血病细胞来源的DC与来源于正常前体和负载外源性白血病抗原的DC相比,可能更好的直接激发细胞毒性T淋巴细胞(T_C)^[2]。

直接杀伤肿瘤细胞的效应,仍有待进一步研究。本文对DC在CD3AK细胞抗肿瘤中的作用作了初步探讨,力图为临床提供一种肿瘤免疫治疗新策略。

2 白血病来源的DC的培养方案

1994年,Santiago-Schwarz发现,诊断为AML-M2白血病病人的外周血肿瘤细胞,在GM-CSF,SCF,TNF- α 作用下,能形成单核-DC样集落,且能在IL-6作用下分化成熟^[3]。1997年,Choudhury^[4]首次报道CML细胞在GM-CSF,IL-4,TNF- α 培养条件下能产生DC。其后,有关白血病细胞诱导分化为DC不断被报道。一般来说,主要采用以下一些细胞因子诱导。

[基金项目] 本课题受江苏省自然科学基金项目(BI98100)资助

[关键词] 树突状细胞; 肿瘤抗原; 抗肿瘤作用

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

[参考文献]

- [1] 曹雪涛. 以树突状细胞为基础的肿瘤免疫与基因治疗研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6(3): 169-171.
- [2] Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity[J]. Nature, 1998, 392: 245-252.
- [3] 梁安民, 莫钦国, 袁卫平, 等. CD3AK细胞治疗原发性肝癌的实验及临床应用研究[J]. 中国肿瘤临床与康复, 1998, 5(5): 6-8.
- [4] 石军, 池田和真, 金田衣代. 树突状细胞对肿瘤细胞株的直接杀伤作用[J]. 中国基层医药, 2002, 9(8): 676-678.

[收稿日期] 2003-07-16

[修回日期] 2003-11-15

表1 肿瘤抗原致敏DC对CD3AK体外杀伤活性的影响 (n=12)

组别	杀伤率(%)	
	50:1	25:1
CD3AK + DC + BEL-7402	78.96 ± 10.35	60.85 ± 6.49*
CD3AK + BEL-7402	58.21 ± 8.88	36.67 ± 7.64
DC + BEL-7402	6.97 ± 0.53	4.89 ± 0.91

* 与其他组比较, P < 0.01

2.1 GM-CSF

GM-CSF 是淋巴细胞、单核细胞、成纤维细胞和内皮细胞分泌的 20~30 kD 的糖蛋白,是第一个被发现的体外诱导髓系 DC 产生的重要的细胞因子。其主要功能是延长造血细胞存活,促进 CD34⁺ 细胞和单核细胞分化为表达 CD1a, CD14 的巨噬样细胞,通过增强 MHC-II 类分子的表达而提高抗原递呈功能。

2.2 IL-4

IL-4 是活化的 T 细胞等分泌的 18~20 kD 的糖蛋白,能阻断单核细胞向巨噬细胞分化而促使其向 DC 分化。IL-4 也能抑制巨噬细胞的生长。GM-CSF 与 IL-4 的联合应用,是诱导白血病细胞分化为 DC 的最基本方法。多数情况下,IL-4 的加用能使 CD14 的表达下调,但对其它分子则影响不大^[5]。

2.3 TNF- α

TNF- α 是巨噬细胞等分泌的 17 kD 的糖蛋白。仅用 GM-CSF 时,CD34⁺ 细胞可分化为单核细胞、巨噬细胞和粒细胞。而 TNF- α 与 GM-CSF 的联用,能减少粒细胞产量,通过上调 GM-CSF 受体而增加对 GM-CSF 的反应性,进而增加 DC 产量。另外,TNF- α 也能介导 DC 发育成熟,上调激发 T 细胞能力^[4]。Harrison^[5]认为,加 TNF- α 的时机并不影响白血病细胞来源的 DC 发育。在收获前 24 h 给予 TNF- α ,足以诱导 DC 的成熟而不引起明显的细胞死亡^[6]。

2.4 SCF

SCF 通过 c-kit 和 flk2 介导生物学效应。尽管 SCF 本身并不能直接诱导 DC 的产生,但初步实验显示其有促进细胞的扩增和存活的,尤其是在无血清培养的情况下生长的因子^[6]。使用 SCF 培养 AML 2 周后,白血病细胞大多仍能增殖和分化;而无 SCF 时,2 周内大多数 AML 细胞会凋亡。SCF 与受体结合后,能使前体细胞进入有丝分裂,增强对其它具有增殖和分化效应的细胞因子如 GM-CSF,FL 等的反应性。

2.5 FL

FL 能刺激造血干细胞(除红系前体细胞外)的增殖,动员干/祖细胞前体细胞至外周血。FL 能增加造血干/祖细胞分化为 DC 的绝对数量,并能显著增强针对于可溶性抗原的特异性 T, B 淋巴细胞反应。FL 应用于培养白血病细胞后,能显著提高 DC 的数量^[7]。

2.6 CD40L

CD40L 是主要由活化的 T 细胞表达的分子量为 40 kD 的膜型糖蛋白。已有实验证实 CD40 信号能在体内替代 Th 细胞的部分功能。Choudhury 认为,GM-CSF 和 IL-4 联用 CD40L 后,不但能促进 AML 髓系单核细胞产生 DC,还能激活 T 细胞,赋予其 CTL 的能力。CD40L 同 TNF- α 一样,能促进白血病细胞分化为 DC,甚至有些研究表明 CD40L 效果可能更好,故最近 CD40L 已有取代 TNF- α 的趋势^[8]。

2.7 IFN

IFN- α 能上调 CML 病人 DC 上 MHC I, MHC II 及协同刺

激分子的表达^[9],显著提高 CML-DC 激发 T 细胞的能力;而 IFN- γ 则能上调 HLA-MF1,但并不诱导协同刺激分子或黏附分子的显著上调。

除上述细胞因子外,还可采用钙离子载体(CI)。CI 能影响不同阶段的髓系细胞的分化,其机制可能是能诱导生物学活性成分的分泌,这些成分(可能是细胞因子或趋化因子)通过结合细胞表面上的特异性受体而以自分泌形式提供诱导向 DC 分化与激活的信号。研究表明,CI 处理的髓系白血病细胞发生完整的形态变化,仅需培养 72~96 h。许多免疫表型的变化,包括 CD14 下调表达;MHC, CD40, CD86 上调表达;表达 CD54 及 CD83,在培养的 20 h 内就会发生。另外,用 CI 处理后 20~40 h 内,增强 T 细胞的致敏能力也有明显改变^[10]。此外,也由文献报道,佛波酯醇 PMA^[11]和 bryostatin-1^[12]能有效诱导白血病细胞分化为 DC。

在体外培养时间方面,一般需 7~14 d。延长培养时间,会减少培养细胞的存活率。在培养基使用方面,实验研究可采用添加牛血清的培养基。但为了应用于临床,一般采用添加自体血清的培养基或无血清培养基培养。无血清培养时,细胞存活率会下降^[13]。CD1a 表达会比采用牛血清培养时稍低些,但产生的 DC 在协同共刺激方面的调节能力相似^[14]。

至今,已有不少细胞因子的组合被提出。这些组合或多或少存在着一些不足,如培养时间较长、细胞存活率较低。这使得白血病来源的 DC 在临床上的广泛应用受到明显的限制。最近,Panoskaltis 等^[6]人报道,应用 GM-CSF, SCF, FL 培养 AML, CML, CMML, ALL 病人的白血病细胞 3 d,再加用 TNF- α ,就能获得具 DC 形态、表型和功能的细胞。此种细胞因子组合,除了 T-ALL 外,能使所有样本经培养后产生 DC。此种培养方案具有培养时间短(3~5 d)、存活率高(无血清培养时约为 85%)的优点。但也存在着不足之处,如 DC 得率较低,大约只有 10%(0.5%~26.7%),故最佳的细胞因子组合尚有待于进一步深入的研究。

3 白血病细胞来源的 DC 的生物学特性

3.1 白血病细胞来源的 DC 的形态

白血病细胞来源的 DC 比白血病细胞略大,聚集成簇,具典型的树突状形态。电子显微镜下可见胞浆中细胞器较成熟,有丰富的线粒体,核/浆比值减少,异染色质丰富,胞核成分叶状。

3.2 白血病细胞来源的 DC 的表型

白血病细胞经诱导成 DC 后,表面协同共刺激分子和黏附分子表达上调。但大多数白血病细胞来源的 DC 与正常人 CD14⁺ 或 CD34⁺ 前体细胞来源的 CD83⁺ 的成熟 DC 相比,是相对不成熟的。例如,Narita 诱导了 30 例 AML,发现 21 例获得了 DC 表型,但其中仅 8 例表达 CD83,20 例表达 CD1a^[13]。

3.3 白血病细胞来源的 DC 的功能

白血病细胞来源的 DC 能有效激发 T 细胞,与未培养的骨髓单个核细胞相比,其同种异体或自体混合淋巴细胞反应

强 10~30 倍。Harrison^[2]认为,同种异体激发能力与 3 种特异性 DC 表面分子 MHC II, CD83, CD86 表达有关。经 CML-DC 激发的 T 细胞与仅用 IL-2 扩增的 T 细胞相比,其对 CML 的细胞毒性提高 4~6 倍,而对 MHC 相符的正常骨髓细胞反应性低。集落形成实验也显示,DC 激发的 T 细胞能使骨髓白血病细胞集落数目减少,且集落平均大小也下降^[4]。

4 白血病细胞来源的 DC 的应用前景

白血病细胞来源的 DC 的潜在应用包括:①作为肿瘤免疫佐剂运用,使体内产生抗白血病 T 细胞免疫应答。②体外激发诱导产生白血病特异性 T 细胞以鉴别免疫源性的白血病抗原。③体外激发抗白血病自体 T 细胞用于同种异体或自体 T 细胞作为过继免疫治疗^[15]。

目前,国外已有人开展了将白血病细胞来源的 DC 活化的 T 细胞应用于临床的研究。Calxton 选择了 5 例处于晚期的 IFN 抵抗性的 CML,分别收集 CML 细胞和 T 细胞。CML 细胞用 GM-CSF, IL-4, TNF- α 培养 12~18 d, T 细胞用 OKT-3 单抗和 IL-2 激发,培养 6~7 d,洗去细胞因子后,将 T 细胞和 DC 以 10:1 共育,经无菌质控和流式质控后,冻存备用。其中有 2 例接受了 DC 活化 T 细胞的回输。每次回输间隔不少于 28 d。初步疗效结果表明白血病细胞数量有所下降,且未见明显的副反应。故 Calxton^[16]认为,DC 活化的淋巴细胞治疗 CML 是可行和安全的。

5 结语

尽管白血病细胞来源的 DC 已逐步开始应用于临床研究,但尚有许多问题有待于解决。当前的大量工作主要集中于通过特征性形态和相应的功能(如活化的初始型 T 细胞)而定义为 DC,至于起源和分化途径则少有研究。目前,已有人报道了 CD4⁺ CD56⁺ 的白血病细胞能分化为浆系 DC^[17]。这类 DC 可能在 T 细胞刺激能力、细胞因子的产生及在 Th1/Th2 应答的极化上不同于髓系来源的 DC。更有甚者,DC 的免疫刺激特征有赖于成熟状态。因此,如何获得临床上所需的且有功能性的白血病来源 DC,尚有待于进一步的深入研究。白血病细胞诱导分化为 DC,极大的丰富了免疫学的基础理论,同时,也为白血病的临床治疗开辟了一条崭新的道路。

[参考文献]

[1] Mohty M, Jarrossay D, Zandotti C, *et al.* Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment [J]. *Blood*, 2001, 98(13): 3750-3756.

[2] Harrison BD, Adams JA, Briggs M, *et al.* Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2001, 97(9): 2764-2771.

[3] Schwarz FS, Coppock DL, Alexander A, *et al.* Identification of a malignant counterpart of the monocyte-dendritic cell progenitor in

an acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 1994, 84(9): 3054-3062.

- [4] Choudhury A, Gajewski JL, Liang JC, *et al.* Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 1997, 89(4): 1133-1142.
- [5] Brouwer RE, Hoorn M, Nelemans CK, *et al.* Expression and induction of costimulatory and adhesion molecules on acute myeloid leukemic cells: Implications for adoptive immunotherapy [J]. *Human Immunology*, 2000, 61(6): 565-574.
- [6] Panoskaltis N, Belanger TJ, Jane L, *et al.* Optimal cytokine stimulation for the enhanced generation of leukemic dendritic cells in short-term culture [J]. *Leukemia Res*, 2002, 26(2): 191-201.
- [7] Woiciechowsky A, Regn S, Kolb HJ, *et al.* Leukemic dendritic cells generated in of FLT3 ligand have the capacity to stimulate an autologous leukemia-specific cytotoxic T cell response from patients with acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2001, 15(2): 246-55.
- [8] Claxton D, Choudhury A. Potential for therapy with AML-derived dendritic cells [J]. *Leukemia*, 2001, 15(4): 668-669.
- [9] Paquette RL, Hsu N, Said J, *et al.* Interferon-alpha induces dendritic cell differentiation of CML mononuclear cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Leukemia*, 2002, 16(8): 1484-1489.
- [10] Koski GK, Schwartz GN, Weng DE, *et al.* Calcium ionophore-treated myeloid cells acquire many dendritic cell characteristics independent of prior differentiation state, transformation status, or sensitivity to biologic agents [J]. *Blood*, 1999, 94(4): 1359-1371.
- [11] Westers TM, Stam AG, Scheper RJ, *et al.* Rapid generation of antigen-presenting cells from leukaemic blasts in acute myeloid leukaemia [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2003, 52(1): 17-27.
- [12] Roddie PH, Horton Y, Turner ML. Primary acute myeloid leukaemia blasts resistant to cytokine-induced differentiation to dendritic-like leukaemia cells can be forced to differentiate by the addition of bryostatin-1 [J]. *Leukemia*, 2002, 16(1): 84-93.
- [13] Narita M, Takahashi M, Liu A, *et al.* Leukemia blast-induced T-cell anergy demonstrated by leukemia-derived dendritic cells in acute myelogenous leukemia [J]. *Exp Hematol*, 2001, 29(6): 709-719.
- [14] Oehler L, Berer A, Keil F, *et al.* Generation of dendritic cells from human chronic myelomonocytic leukemia cells in fetal calf [J]. *Leuk Lymphoma*, 2000, 38(5-6): 577-586.
- [15] Orsini E, Foa R. Dendritic cell generation for leukemia immunotherapy [J]. *Leukemia Res*, 2002, 26(4): 409-410.
- [16] Claxton DF, Mannis JM, Champlin R, *et al.* Therapeutic potential of leukemia-derived dendritic cells: Preclinical and clinical progress [J]. *Crit Rev Immunol*, 2001, 21(1-3): 147-155.
- [17] Chaperot L, Bendriss N, Manches O, *et al.* Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells [J]. *Blood*, 2001, 97(10): 3210-3211.