

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0134-04

DC 联合小剂量 IL-2 大量扩增白血病特异性 CTL 的实验研究

楼敬伟, 杨建民, 贾新颜, 陈 莉, 章卫平, 周 红, 王健民(第二军医大学附属长海医院血液科, 上海 200433)

[摘 要] **目的:** 建立和优化体外大量扩增白血病特异性 CTL 的方法。**方法:** 用 1×10^7 FBL3 细胞冻融产物(FBL3-LY)冲击的 DC 每 10 天 1 次对 C57BL/6 小鼠反复接种, 在第 3 次接种 5 d 后处死小鼠制备脾 T 细胞, 每周用 FBL3-LY 冲击的 DC 刺激, 体外培养 10 d 后加入小剂量的 IL-2。**结果:** 共培养至 21 d, T 细胞可扩增 100 倍以上, 其中 CD8⁺ 细胞比率明显增高。乳酸脱氢酶释放试验证实扩增所得 CTL 对 FBL3 细胞具有高效的杀伤作用($81.84 \pm 8.68\%$), 而对 K562 细胞无特异性杀伤作用。**结论:** FBL3-LY 冲击的 DC 联合小剂量 IL-2 可大量扩增 FBL3 白血病特异性 CTL, 该方法的建立对提高白血病特异性 CTL 免疫治疗的临床疗效具有重要意义。

[关键词] 树突状细胞; 免疫治疗; 白血病细胞冻融产物; CTL

[中图分类号] R392.12 [文献标识码] A

Large-Scale Expansion of Leukemia Specific CTLs Using Lysates-Pulsed Dendritic Cell and Low-Dose IL-2 for Adoptive Immunotherapy

LOU Jing-wei, YANG Jian-min, JIA Xin-yan, CHEN Li, ZHANG Wei-ping, ZHOU Hong, WANG Jian-min
(Department of Hematology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[**Abstract**] **Objective:** To determine the parameters settings for in vivo induction and in vitro expansion of leukemia-specific CTL. **Methods:** C57BL/6 mice were vaccinated repeatedly with 1×10^7 DCs pulsed with 5×10^7 FBL3- lysates (FBL3-LY) every 10 days. mice were sacrificed and the spleen T cells were collected and purified. Five days after the third immunization, T cells were restimulated weekly with FBL3-HS pulsed DC(30 Gy irradiated), and low-dose IL-2 was added 10 days following. **Results:** Three weeks' co-culture of splenocytes T cells from the vaccinated mice with FBL3-LY pulsed DC in the presence of low dose IL-2 resulted in more than 100-folds' expansion of leukemia specific CTLs, which had a higher percentage of CD8⁺ T cell. The expanded CTLs had potent cytotoxic activity against the parental FBL3 cells ($81.84 \pm 8.68\%$) tested in standard LDH release assay, but no cytolytic activity above background was observed against the k562 leukemia targets. **Conclusion:** This regime could be considered as practical alternatives to the existing clinical immunotherapy strategies.

[**Key words**] dendritic cell; immunotherapy; leukemia lysates; CTL

近年来,应用树突状细胞(DC)在体内外诱导、扩增肿瘤特异性 CTL 的研究已经成为肿瘤免疫治疗的热点之一。将肿瘤特异性抗原有效地负载 DC, 诱导并扩增白血病/肿瘤特异性 CTL 已成为以 DC 为基础的免疫治疗疗效的中心环节^[1]。由于 DC 对肿瘤抗原多肽的识别、递呈具有不确定性, 在体外诱导、扩增肿瘤特异性 CTL 的效率也有很大的差异。我们采用白血病细胞冻融产物负载 DC 体内接种, 随后在体外用该细胞

联合小剂量 IL-2 与 T 细胞共培养, 建立了大量扩增白血病特异性 CTL 的可行性方案, 为进一步的临床应用创造了条件。

[基金项目] 国家 863 计划(2002AA205051)资助项目

[作者简介] 楼敬伟(1969-), 男, 浙江东阳人, 主治医师, 博士, 主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究

[通讯作者] 王健民

1 材料与方法

1.1 主要材料

小鼠红白血病 FBL3 细胞株由第二军医大学免疫教研室惠赠。K562 细胞由本中心实验室长期保种。C57BL/6 小鼠(6~8 周龄,雌性)购自中国科学院上海市实验动物中心。RPMI-1640 培养基为美国 GIBCO 公司产品,新生牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品(56℃ 灭活 30 min)。完全培养液由 RPMI-1640 + 10% 新生牛血清配置。GM-CSF 购自美国 R&D 公司,IL-4 购自 Peprotech 公司;IL-2 为美国 Angin 公司产品。

1.2 DC 的培养

取 4~6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠,颈椎脱臼法处死后常规分离两下肢股骨和胫骨,用完全培养液制备浓度为 1×10^6 /ml 骨髓单个核细胞悬液,分别加入 5 ng/ml 和 2 ng/ml 浓度的重组鼠 GM-CSF 和 IL-4,充分混匀后加至一次性使用的 6 孔板中,置 37℃,5% CO₂ 培养箱中在饱和湿度条件下培养,隔日半量换液,第 9 天收获培养板中的悬浮细胞作为成熟 DC 直接备用。

1.3 FBL3 冻融产物的制备

取处于对数生长期的 FBL3 细胞悬液 40 ml,室温下 1 500 r/min × 10 min 离心后弃去上清,用完全培养液重悬,调整细胞浓度至 1×10^7 /ml 后将细胞悬液移至多个 2 ml 冻存管中,液氮 - 37℃ 水浴各 15 min × 6 个循环反复冻融,0.22 mm 滤器滤过后备用,其细胞浓度按冻融前计数计算。

1.4 DC 疫苗的制备和接种

收集培养第 8 天的 DC,按肿瘤细胞冻融产物:DC = 5:1 的比率加入 FBL3-LY,置 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 8 h 后收集配成 DC 浓度为 2×10^7 /ml 的疫苗。取 6~8 周龄的 C57BL/6 小鼠,每 10 天在腹股沟及胸壁腋侧等部位皮下多点注射疫苗 0.5 ml,共接种 3 次。

1.5 脾 T 细胞的制备

第 3 次接种 5 d 后处死 C57BL/6 小鼠,常规灭菌后在无菌操作台中分离脾脏、制备脾细胞,在完全培养液中置 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 90 min,轻柔地吸取不贴壁细胞配成 4×10^7 /ml 的浓度。取 0.5 ml 加至经 5 ml 37℃ 预热的完全培养液预冲洗的尼龙毛柱中,随后加入 0.2 ml 完全培养液,置 37℃,5% CO₂ 饱和湿度培养箱中孵育 1 h,用 37℃ 预热的完全培养液缓慢洗脱,收集洗脱液,1 500 r/min × 10 min 离心后用完全培养液重悬,取 1×10^6 细胞用流式细胞仪检测其 CD3⁺、CD8⁺ 和 CD4⁺ 细胞比率。

1.6 淋巴细胞增殖试验

将接种小鼠脾 T 细胞浓度调整至 1×10^6 /ml,按每孔 100 ml 的体积加至 U 形底 96 孔培养板,按 DC:脾 T 细胞 = 1:10 的比例,加入等体积经 FBL3-LY 冲击并经 30 Gy 照射灭活的 DC 悬液,同时设未经接种的小鼠脾 T 细胞和单用 FBL3-LY 刺激的对照组,每组设 3 个复孔。置 37℃,5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 76 h,每孔加入 50 ml(1 mci)3H 脱氧胸腺嘧啶后置培养箱中继续培养 18 h,收集细胞用 Wallac 1450 闪烁仪测定每分钟放射性计数(CPM)。

1.7 FBL3 特异性 CTL 的体外扩增

将接种小鼠脾 T 细胞配成 1×10^6 /ml 的悬液,按 DC:T 细胞 = 1:10 的比例加入经 FBL3-LY 冲击的 DC(30 Gy 照射后),以每孔 3 ml 的体积接种于 6 孔板中,第 7 天用相同数量的 FBL3-HS 重复冲击 1 次,第 10 天后加入 100 U/ml 的 IL-2。培养第 14 天取 1×10^6 T 细胞用流式细胞仪检测 CD3⁺、CD8⁺ 和 CD4⁺ 细胞比率,并用 LDH 释放法检测其对白血病细胞的杀伤作用。其余细胞继续培养 1 周后收集培养所得细胞计数。

1.8 LDH 法测定细胞毒活性

取处于对数生长期的 FBL3 细胞和 K562 细胞为靶细胞,用完全培养基调整细胞浓度至 5×10^5 /ml,以每孔 100 ml 的体积加入 96 孔培养板。按效应细胞:靶细胞 = 20:1 的比例,加入体外扩增的 CTL100 ml,用正常 C57BL/6 小鼠脾 T 细胞和接种小鼠脾 T 细胞作对照,每组各设 3 个复孔。置 37℃,5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 18 h 后 1 000 r/min × 10 min 离心,取 100 ml 上清与 100 ml 底物工作液混合作用 20 min,加入 0.1 mol/L 柠檬酸 25 μl 终止酶促反应。在酶标仪上测定各孔 OD 值,计算杀伤效率。

杀伤活性率(%) =

$$\frac{\text{效靶细胞混合释放 OD 值} - \text{自然释放组 OD 值}}{\text{最大释放组 OD 值} - \text{自然释放组 OD 值}} \times 100\%$$

1.9 数据处理和统计分析

所有实验数据采用 SPSS 11.0 统计软件进行自动组间对照分析,P 值 < 0.05 为相差显著。

2 结果

2.1 FBL3-LY 冲击的 DC 接种后,小鼠脾脏 T 细胞比率增加

在 FBL3-LY 冲击的 DC 第 3 次接种 5 d 后处死 C57BL/6 小鼠,每只小鼠可获得约 1×10^8 脾细胞,流式细胞仪检测发现其 CD3⁺ 细胞比率为 $72.73 \pm 1.57\%$,显著高于未接种小鼠脾细胞的 $59.58 \pm 2.24\%$ ($P = 0.001$),CD3⁺ 细胞中 CD8⁺/CD8⁻ 细胞比值为 0.702,而未接种小鼠脾细胞为 0.885,两者

相差显著($P < 0.01$)。提示经 FBL3-LY 冲击的 DC 接种后,小鼠脾脏 T 细胞比率增加,尤其是以 $CD4^+$ T 细胞增殖为主。经过尼龙毛柱富集后, $CD3^+$ 细胞比率均可达 96% 以上。

2.2 FBL3-LY 冲击的 DC 更有效刺激脾淋巴细胞增殖

为明确 FBL3-LY 冲击的 DC 在体内诱导 FBL3 特异性 CTL 的作用及不同的抗原处理方式对 T 细胞增殖的影响,我们对接种小鼠的脾细胞在体外进行了淋巴细胞增殖试验。发现接种小鼠的脾细胞对相同抗原的增殖反应均显著高于普通的脾细胞,即 FBL3-LY 冲击的 DC 刺激下,CPM 均数: $8\ 162.0 \pm 210.03$ vs $3\ 563.0 \pm 248.34$ ($P < 0.01$)。同一种脾细胞,FBL3-LY 冲击的 DC 可较单用 FBL3-LY 更好地刺激脾淋巴细胞增殖,CPM 均数: $8\ 162.0 \pm 210.03$ vs $7\ 425.7 \pm 459.04$ 。

2.3 IL-2 对 FBL3 特异性 T 细胞的增殖作用及剂量

我们进一步比较了两种脾细胞在 100 U/ml IL-2 作用下的增殖反应,发现接种小鼠的脾 T 细胞的增殖反应(CPM 均数: $7\ 602.0 \pm 327.69$)显著高于未接种小鼠脾 T 细胞($3\ 947.0 \pm 439.23$, $P < 0.01$),提示该 IL-2 产品在此浓度下即可较好地刺激 FBL3 特异性 T 细胞的增殖而对普通 T 细胞作用较弱,从而使 FBL3 特异性 CTL 获得优势扩增。因此我们采用 100 U/ml 作为 CTL 体外扩增实验中 IL-2 的剂量。

2.4 FBL3 冻融产物冲击促使 T 细胞显著增殖

将 DC 与接种小鼠脾 T 共培养 3 d 后可见大量 T 细胞开始凋亡,培养板中的细胞数量显著减少,在第 6 天前后可见部分 T 细胞体积显著增大,周围有少量形态不规则的 T 细胞聚集,第 7 天用相同数量的热休克 FBL3 冻融产物重复冲击后,可以见到该类细胞显著增多,在第 10 天前后可在局部形成较为密集的 T 细胞群,用玻璃滴管将其吹散并加入 100 U/ml 的 IL-2,继续培养 48 h,可见到 T 细胞迅速扩增。计数结果为 $(5.47 \pm 2.05) \times 10^6$ /ml,用流式细胞仪检测其 $CD3^+$ 细胞比率为 $98.13 \pm 0.45\%$,而 $CD8^+$ 细胞比率也由扩增前的 $43.22 \pm 1.49\%$ 上升到 $76.57 \pm 5.11\%$ ($P < 0.01$)。取 1×10^7 所得细胞,用原培养液加等体积完全培养液分至新 6 孔板中,继续在 100 U/ml 的 IL-2,每周用 FBL3-LY 冲击 1 次的条件下培养 8 d 后,可获得总数为 $1.32 \pm 0.27 \times 10^9$ 的 T 细胞。

2.5 FBL3 冻融产物冲击的 DC 的脾 T 细胞对 FBL3 细胞的杀伤率增高

为明确接种小鼠脾 T 细胞和扩增所得 T 细胞的 FBL3 特异性细胞毒作用,我们用 LDH 释放法比较了两者对 FBL3 和 K562 细胞的杀伤作用(表 2),并以未

接种小鼠脾细胞为对照。结果经 FBL3 冻融产物冲击的 DC 接种小鼠的脾 T 细胞对 FBL3 细胞的杀伤率($68.54 \pm 6.69\%$)显著高于未接种小鼠脾 T 细胞($29.75 \pm 6.36\%$) ($P < 0.01$),提示致敏的小鼠脾 T 细胞对 FBL3 细胞具有增强的杀伤效应,而在对其进行体外扩增后,对 FBL3 细胞的杀伤率进一步上升至 $81.84 \pm 8.68\%$,显著高于扩增前的接种小鼠脾 T 细胞($P < 0.01$)。三者对 K562 细胞的杀伤率无显著差异,说明该杀伤作用具有白血病细胞特异性。

表 2 脾 T 细胞对不同靶细胞的杀伤率(%) ($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Kill ratio of splenocytes to different target cells
(%) ($\bar{x} \pm s$)

Groups	FBL3	K562
T cells from expansion	81.84 ± 8.68	39.95 ± 6.83
Spleen T cells from the vaccinated mice	68.54 ± 6.69	34.12 ± 4.40
Spleen T cells from the unvaccinated mice	29.75 ± 6.36	31.65 ± 3.64

3 讨论

肿瘤细胞逃脱机体免疫监督和抑制作用的机制相当复杂,目前认为主要包括:1)MHC 分子的缺失,使在细胞免疫中起主导地位的 T 细胞无法识别并杀伤肿瘤细胞;2)缺乏共刺激因子表达,从而在体内诱导 T 细胞耐受;3)分泌抑制性细胞因子,抑制机体对肿瘤的细胞和体液免疫反应。上述各种机制作用的最终结果是造成宿主体内缺乏肿瘤细胞特异性 CTL 或者 CTL 功能低下,缺乏有效的抗肿瘤免疫反应^[2]。

目前用于递呈的肿瘤抗原主要包括肿瘤特异性多肽、肿瘤细胞凋亡/冻融产物、肿瘤 RNA 冲击的 DC 或者用肿瘤相关多肽基因转染的 DC 等^[3],在实验中我们采用了 FBL3 细胞冻融产物作为白血病抗原,作为最常用的全肿瘤抗原制备方式,肿瘤细胞冻融产物具有其独特的优点,主要包括:1)应用全肿瘤细胞抗原可以同时诱导针对多种抗原表位的特异性 $CD4^+$ 辅助 T 细胞和特异性 $CD8^+$ CTL 反应,获得更广谱的 T 细胞免疫反应,从而减少肿瘤细胞通过表型变异(丢失肿瘤细胞相关抗原)逃脱机体免疫识别的可能^[4],而应用单一的 T 细胞识别表位抗原肽则由于 MHC 分子的限制而较难同时

诱导上述两种 T 细胞亚群; 2) 全肿瘤细胞抗原的制备通常较为简单, 无需使用新鲜的活肿瘤细胞、建立肿瘤细胞株或鉴定肿瘤细胞相关抗原, 而这些在临床实践中均具有一定的困难; 3) 采用全肿瘤抗原可以避免确定和产生个体化肿瘤多肽的繁杂过程, 而由 DC 来完成对肿瘤多肽的选择, 因而可将所有可与其 MHC 分子结合的多肽包括在内^[5]。Maier 等^[6]采用肿瘤冻融产物联合 KLH 冲击 DC, 每周 1 次结内注射 1×10^6 DC 治疗 10 例皮肤 T 细胞淋巴瘤患者, 结果接受冻融产物冲击的 DC 治疗的 8 例患者都出现了抗淋巴瘤作用(完全缓解 1 例, 部分缓解 4 例), 2 例中位部分缓解 10.5 个月后疾病进展的患者用新出现的肿瘤制备冻融产物接种后重新出现治疗反应, 证明了应用肿瘤细胞冻融产物诱导肿瘤特异性免疫反应的可行性。在本研究中, 我们证实了用 FBL3 冻融产物冲击的 DC 接种 C57BL/6 小鼠, 可使小鼠脾脏中 CD3⁺ 细胞数增多, 并经体外杀伤试验证实了致敏的脾细胞具有白血病特异性细胞毒作用, 证实了应用白血病抗原冲击的 DC 在体内诱导白血病特异性 CTL 的可行性。尤为重要的是, 在研究中我们发现经抗原冲击的 DC 接种的小鼠脾 CD3⁺ 细胞中以 CD4⁺ 细胞为主, 由于 CD4⁺ 细胞在肿瘤特异性 CTL 的诱导和维持中发挥辅助作用, 并且对 MHC II 阳性肿瘤具有直接的杀伤功能, 或者可通过激活巨噬细胞等发挥杀伤效应^[7], 因而具有重要的意义。

在研究中, 我们采用接种小鼠的脾 T 细胞作为培养起始细胞, 用 FBL3-LY 冲击的 DC 提供刺激抗原, 进行了体外扩增白血病特异性 CTL 的研究。通过 10 d 的培养使非特异性 T 细胞大量凋亡后, 我们在培养体系中加入其浓度可有效刺激 FBL3 特异性 T 细胞增殖, 而对非特异性 T 细胞增殖只有轻度影响的 IL-2 (100 U/ml), 在避免 T 细胞非特异性增殖的同时, 有效地提高了 CTL 的扩增效率, 最终可使其扩增 100 倍以上, 并经细胞毒杀伤试验证实了所得细胞的白血病特异性, 为大量制备白血病特异性 CTL 提供了可行方案。

本实验结果表明采用 FBL3 冻融产物可以有效

地刺激 DC 成熟, 制备的 DC 疫苗可以在体内诱导白血病特异性 CTL。在此基础上, 我们通过联合应用体内接种和体外扩增的方法, 建立了大量扩增白血病抗原特异性 CTL 的方法, 并经体外杀伤试验证实了其 FBL3 特异性。该方法的建立为进一步改善供体淋巴细胞输注等过继性细胞免疫治疗的疗效带来新的希望。

[参考文献]

- [1] Zhou Y, Bosch ML, Salgaller ML, *et al.* Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of anti-tumor immunity[J]. *J Immunother*, 2002, 25(4): 289-303.
- [2] Slingluff CL, Jr Colella TA, Thompson L, *et al.* Melanomas with concordant loss of multiple melanocytic differentiation proteins: Immune escape that may be overcome by targeting unique or undefined antigens[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2000, 48(12): 661-72.
- [3] Zhang X, Gordon JR, Xiang J. Advances in dendritic cell-based vaccine of cancer[J]. *Cancer Biother Radiopharma*, 2002, 17(6): 601-619.
- [4] Adams M, Navabi H, Jasani B, *et al.* Dendritic cell based therapy for cervical cancer: Use of DC pulsed with tumour lysate and matured with a novel synthetic clinically non-toxic double stranded RNA analogue poly [I]: Poly [C(12)U] (Ampligen R)[J]. *Vaccine*, 2003, 21(7-8): 787-790.
- [5] Morisaki T, Matsumoto K, Onishi H, *et al.* Dendritic cell-based combined immunotherapy with autologous tumor-pulsed dendritic cell vaccine and activated T cells for cancer patients: Rationale, current progress, and perspectives[J]. *Hum Cell*, 2003, 16(4): 175-182.
- [6] Maier T, Tun-Kyi A, Tassis A, *et al.* Vaccination of cutaneous T-cell lymphoma patients using intranodal injection of autologous tumor lysate pulsed dendritic cells[J]. *Blood*, 2003, 102(7): 2338-2344.
- [7] Yanai F, Ishii E, Kojima K, *et al.* Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4⁺ T lymphocytes: Analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and fas-deficient target cells[J]. *J Immunol*, 2003, 170(4): 2205-2213.

[收稿日期] 2004-10-18

[修回日期] 2005-02-10

[本文编辑] 王莹

欢迎订阅《中国肿瘤生物治疗杂志》