

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0299-03

Flt3-L 与 GM-CSF 体外诱导急性髓系白血病患者 DC 功能比较研究

易良才, 高霞, 张连生, 柴晔, 张玉芳, 宋飞雪, 刘瑛, 曾鹏云(兰州大学第二附属医院血液科, 兰州 730030)

树突状细胞(dendritic cell, DC)是迄今已知功能最强的抗原提呈细胞, 而成为肿瘤生物学治疗领域备受瞩目的焦点^[1]。fms 样酪氨酸激酶 3 配体(Flt3-L、简称 FL)是一种新近发现的细胞因子, 具有强大的刺激多能造血干细胞增殖的能力^[2], Flt3-L 和 GM-CSF 作为诱导 DC 的两种基本生长因子, 研究比较二者在生物治疗中的作用特点, 显然对更好的实现它们在临床中的应用具有重要的现实意义。目前国内有关此方面尚未见报导。本研究对 AML-CR 患者的骨髓单个核细胞(BMNC)采用 FL/GM-CSF 单因子培养, 通过流式细胞仪分析其表型特点, ELISA 测定 IL-12_{p70}、INF- α , 收集阳性细胞体外激发增殖 auto-T 细胞测试以期了解 FL 与 GM-CSF 对 AML-CR 的 BMNC 细胞作用的异同。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI-1640 粉剂购自美国 Hyclone 公司; 新生牛血清购自兰州生物制品研究所; 淋巴细胞分离液购自上海华晶生物制品有限公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品; 10% 二甲基亚砜为 Bioscience 公司产品; rhFlt3-L、rhGM-CSF 购自 Immunix 公司; 免疫吸附磁珠 CD_{1a} 单抗购自 Coulter Immunotech 公司, LPS(Sigma *E. coli* O111:B4)。

1.2 标本采集

采集 AML 完全缓解期患者骨髓 5 ml, 均符合 FAB 诊断标准为 M2a 型 6 例, M3 型 2 例, M1 型 1 例, M5b 型 1 例。男性 7 例、女性 3 例; 中位年龄 27(14~51)岁。AML-CR 患者的骨髓经 Ficoll 淋巴细胞分离液室温 2 000 r/min 离心 20 min; 取界面环层细胞, 用 PBS 液洗涤 3 次后加培养液并计数, 即为去除 T 细胞的骨髓 MNC(TD-MNC); 取 Ficoll 液面下的细胞, 以 PBS 液洗涤后, 加 8.3 g/L Tris-NH₄Cl 溶解红细胞, 离心去上清, 再加 PBS 液洗涤 3 次, 重悬于培养液, 计数, 即为 T 细胞。调整细胞浓度为 1 × 10⁶/ml 使用含小牛血清 40%, RPMI-1640 液 50%, 二甲基亚砜(DMSO)10% 的冷冻保存液将上述所得两种细胞均保存于 -194℃ 液氮中备用。

1.3 DC 的诱导

在准备诱导 DC 前将冻存的 TD-MNC 先行复苏并用 RPMI-1640 液洗涤 2 遍后重新计数细胞。用含体积分数为 10% 的小牛血清的 RPMI-1640 制成浓度为 1 × 10⁶/ml 的细胞悬液加入 12 孔培养板, 5% 的 CO₂, 37℃ 条件下培养。对每一标本的各孔中分别加入 50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml 的 rhFlt3-L/rhGM-CSF 培养, 每 3 天换液 1 次, 至第 8 天添加 1 μg/ml LPS。再继续培养 24 h 收集培养液中成簇生长的细胞, 流式细胞仪行免疫表型鉴定, 并收集培养上清, 用 ELISA 法检测其中 IL-12_{p70}、INF- α 的含量。

1.4 流式细胞仪

本实验对所培养细胞在培养前后分别进行下列表面抗原检测: CD1a, CD80, CD86, CD83, HLA-DR, CD11C, CD123, CD13。其中 CD1a, CD83 被认为是 DC 的标志, CD80, CD86 是重要的共刺激分子, 将表达 CD1a 或 CD83 同时共表达 CD80, CD86 的细胞确定为 DC; CD11C, CD13 被认为是主要表达于髓系 DC(MDC, DC1)表面, 而淋系 DC(LDC, DC2)高表达 CD123 等淋系特征标志。采用 CD1a 免疫磁珠阳性选择法收获 DC 后, 送体外激发增殖 T 细胞检测。

1.5 体外激发增殖 T 细胞能力检测

将复苏后的 T 细胞用含体积分数为 10% FCS 的 RPMI 调整成 10⁶/ml, 分别加入 24 孔培养板和 96 孔培养板, 按 1:40 加入培养活化的 DC 或未经活化的未成熟 DC。在体积分数为 5% CO₂、37℃ 条件下培养 72 h 后, 收集 24 孔培养板中细胞送流式细胞仪检测其 CD4, CD8 表型变化; 并添加 MTT 溶液(5 mg/ml)入 96 孔培养板, 继续培养 4 h, 570 nm 波长比色, 观察增殖情况。

1.6 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计学分析, student *t* 检验。

2 结果与讨论

目前, 越来越多的实验表明 FL 和 GM-CSF 是体内诱导 DC 的两种基本生长因子^[3]。本次实验我们通过单用 FL/GM-CSF 进行培养发现 FL 与 GM-CSF 在体外对人的 AML-BMNC 均可产生明显的促进增殖的作用:

培养至第 48 小时部分细胞体积开始变大,至 72 h 开始有 5~10 个细胞的零散集簇及小集落形成,并可见形态呈“幔状”或“毛刺”样轻度改变,至 5~7 d 集落产生速度明显加快,数量明显增多,并在第 8 天活化后上述趋势又逐渐减弱,集落渐减。

本研究发现随 FL 浓度的增加(50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml),同一培养后的浓度亦随之增加(分别为 1.21 ± 0.23 、 2.29 ± 0.16 、 $3.05 \pm 0.47 \times 10^6$)且在浓度组间存在显著性差异($P < 0.05$),但这种差异并不存在于 GM-CSF 的组间。

在对 10 份 AML-CR 患者 BMNC 的在添加细胞因子前及培养结束后分别经流式细胞仪进行分析发现:在体外,FL 与 GM-CSF 均可有效诱导,扩增 DC,培养后 CD1a,CD83 表达均显著提高($P < 0.01$,表 1);但培养后 GM-CSF 组 DC2 数量要明显少于 FL 组,考虑可能是由于 FL 不仅可以作用于 CD34⁺ 的造血干祖细胞,而且还可以诱导淋系祖细胞及前 B 细胞,但在淋系前体细胞表面缺乏 GM-CSF 的受体,故 GM-CSF 不能作用于这类细胞衍化生成相应的淋系 DC。这一情况与 Brasel K 等在鼠体内观察到的情况基本相符^[4]。

表 1 AML-CR 患者骨髓 MNC 培养前后的细胞表型变化(样本数 = 10)

组别	抗原阳性率(%)							
	CD1a	CD80	CD86	CD83	HLA-DR	CD123	CD11c	CD13
培养前	0.62 ± 0.04	3.14 ± 0.08	6.12 ± 1.07	0.57 ± 0.05	5.25 ± 1.06	12 ± 1.93	41.12 ± 5.54	34.02 ± 0.61
A1	36.22 ± 3.65	44.71 ± 5.23	43.25 ± 5.76	33.43 ± 7.56	41.79 ± 5.42	32 ± 1.34	54.05 ± 0.23	37.81 ± 0.14
A2	35.67 ± 2.57	42.54 ± 3.18	44.29 ± 1.91	35.39 ± 4.23	43.08 ± 2.75	15.51 ± 2.89	57.04 ± 4.33	25.14 ± 0.48
培养后								
B1	34.26 ± 3.24	43.31 ± 6.47	42.15 ± 5.26	32.56 ± 3.44	38.86 ± 10.38	37.64 ± 4.48	55.22 ± 3.37	28.14 ± 0.77
B2	33.62 ± 2.84	43.42 ± 4.36	41.38 ± 1.26	35.81 ± 7.17	39.34 ± 5.87	9.43 ± 6.53	50.02 ± 5.72	27.78 ± 2.43
C1	32.70 ± 3.08	41.32 ± 2.07	38.76 ± 1.12	32.57 ± 1.31	36.43 ± 7.22	47 ± 1.85	51.13 ± 3.08	27.52 ± 0.25
C2	28.48 ± 2.61	43.15 ± 5.47	40.55 ± 2.29	30.48 ± 2.07	36.42 ± 1.38	13.25 ± 7.02	54.23 ± 7.8	28.14 ± 0.91

培养后组 A 为 FL/GM-CSF: 200 ng/ml; 培养后组 B 为 FL/GM-CSF: 100 ng/ml; 培养后组 C 为 FL/GM-CSF: 50 ng/ml。A1 - C1 组为 Flt3-L 组, A2 - C2 组为 GM-CSF 组。(student *t* 检验, $P < 0.01$)

但仅用 FL 培养的 DC 表面多低表达代表 DC 成熟的共刺激分子(CD80, CD86, HLA-DR)。持续用 GM-CSF 培养可显著提高 CD80, 其他共刺激分子提高较微弱,提示 GM-CSF 在 DC 成熟,活化中具有潜在作用。我们此次尝试常见的外源性感染因子 LPS 是否可以使 FL/GM-CSF 单独培养的 AML-CR 患者 DC 成熟中发现在 24 h 的共育后,DC 的体积、形态未发生明显变化,但 CD80, CD86, HLA-DR 的表达明显升高,提示 LPS 是 DC 强大的活化剂,但 LPS 对 AML-CR 患者 DC 长时间刺激后 DC 明表面共刺激分子表达情况如何仍需我们继续做深入研究。

INF- α 和 IL-12_{p70} 是已知重要的细胞因子。其中 INF- α 具有上调细胞表面 MHC-I 类分子,活化巨噬细胞、NK 细胞^[5],直接诱导 BCL-XL 和间接诱导 IL-15 而起到阻止 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞凋亡^[6],及上调活化 T 细胞表面 TRAIL^[7]等多重免疫作用。IL-12_{p70} 则是重要的 Th₁ 类细胞因子,其具有诱导、活化 T 和 NK 细胞增殖、诱生 LAK 细胞活性的作用^[7]。人体内,DC2 的前体细胞即 pDC (plasmacytoid DC) 是最重要的 I 型干扰素

(INF- α)产生细胞;DC1 是主要的 IL-12_{p70} 产生细胞。本次实验 ELISA 法发现:两组在 IL-12_{p70} 的产出上无显著性差异,但 FL 组 INF- α 产量却是 GM-CSF 组的近 10 倍($P < 0.05$)。同时 IL-12_{p70} 产量与 FL 的剂量呈正相关,但在 GM-CSF 组并不存在这种关系。这一结果进一步说明:FL 具有同时扩增 DC1、DC2 的能力,而 GM-CSF 则以扩增 DC1 为主。

对培养 8 d 经 LPS 活化的 DC 刺激 auto-T 细胞增殖实验发现经活化刺激 FLDCS 激发 CD8⁺ 细胞与 CD4⁺ 细胞同时大量增殖而 GM-CSF 组则主要表现为 CD8⁺ 细胞的增殖。MTT 结果再次说明只有经过 LPS 短暂活化后 DCS 才具备有效的刺激 T 细胞扩增、递呈抗原的能力,未经活化 DC 不能有效激发异基因 T 细胞的增殖:其 570 nm 波长吸光度值分别是 1.14 ± 0.05 (FL 组)、 1.06 ± 0.04 (GM-CSF 组);要显著低于 LPS 活化 DC 组: 1.65 ± 0.12 (FL 组)、 1.58 ± 0.07 (GM-CSF 组) ($P < 0.01$)。

免疫逃逸是肿瘤的重要发生机制。DC 是迄今已知功能最强的抗原递呈细胞,是触发免疫应答的核心

因素之一。通过生物学治疗的手段重建 AML 患者在化疗完全缓解或造血干细胞移植后的免疫监控能力,已被证实是一种清除微小残留病(MRD)颇具前景的途径^[14]。据统计迄今已有 30 个独立的临床实验推介应用 DC 瘤苗,GM-CSF 作为传统的诱导因子的作用也在逐渐被人们所熟知,寻找新的更有效的细胞因子完善 DC 瘤苗的制备一直是 DC 生物治疗的热点。FL 做为一种新近发现的生长因子,其 II 期临床实验中已显示出易耐受和无明显不良反应(是否与 FL 产生 DC2,活化 Th2 导致免疫耐受有关?)的优势,此次我们对 FL 免疫作用初探亦证实了其在肿瘤生物治疗中将会具有广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

[1] Brossart P, Wirths S, Brugger W, *et al.* Dendritic cells in cancer vaccines[J]. *Exp Hematol*, 2001, 29(11): 1247-1255.
[2] 张之南, 杨天楹, 郝玉书 主编. 血液病学[M], 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 917-919, 971-973.
[3] Pulendran B, Smith JL, Caspary G, *et al.* Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. [J]. *Pro Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(3): 1036-1041.

[4] McKenna HJ, Stocking KL, Miller KE, *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells[J]. *Blood*, 2000, 95(11): 3489-3497.
[5] Farrar JC, Murphy KM. Type I interferons and T helper development[J]. *Immunol Today*, 2000, 10: 484-489.
[6] Akbar AN, Lord JM, *et al.* INF-alpha and INF-beta : A link between immune memory and chronic inflammation. *Immunol Today*, 2000, 7: 337-342.
[7] Kayapaki N, Yamaguchi N, *et al.* Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs[J]. *J Exp Med*, 1999, 189: 1451-1460.
[8] Kenneth Brasel, Thibaut De Smedt, Jeffery L. Smith, *et a.* Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures[J]. *Blood*, 2000, 96: 3029-3039.
[9] Brasel K, Maraskovsky E, Pulendran B, *et al.* Preferential expansion of myeloid type dendritic cells *in vivo* after administration of GM-CSF into mice: A comparative analysis with Flt3 ligand generated dendritic cells[J]. *Blood*, 1997, 90: 170a.

[收稿日期] 2005 - 08 - 30

[修回日期] 2005 - 09 - 26

[本文编辑] 王莹