

[文章编号] 1007-385X(2007)06-0575-03

· 短篇论著 ·

人外周血树突状细胞体外稳定、高效培养的新方法

Culture of dendritic cells from human peripheral blood *in vitro*: a stable and highly effective method

朱学军*, 李晓惠, 夏 雯, 张文曦, 陈健一(江苏省中医院 血液科, 南京 210029)

[摘 要] 目的: 建立稳定、高效的人外周血树突状细胞(dendritic cells, DC)体外培养的新方法。方法: 离心获取人外周血白膜层细胞, 裂解去除红细胞后获得全部白细胞, 贴壁培养 1 h 获得单核细胞, 加入重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF) 1 000 U/ml + 重组人白细胞介素-4(rhIL-4) 500 U/ml, 体外培养 7 d 获得 DC, 以流式细胞术分析表型, 体外混合淋巴细胞反应检测细胞抗原提呈功能。结果: 从 100 ml 全血分离获得具有较好活力的贴壁单核细胞仅需 2 h; 部分肿瘤患者应用传统分离方法不能获得单个核细胞, 用新方法仍能从患者外周血稳定地获得足够数量的单核细胞。新方法培养生成 DC 的数量为传统方法培养生成 DC 数量的 1.8 ~ 2.6 倍; 其中 40% ~ 85% 为 CD1a⁺, 表达高水平的 HLA-DR、CD80、CD86, 体外可以强烈刺激同种 T 细胞增殖。结论: 建立了更为稳定的、得率更高的 DC 体外扩增培养的新方法。

[关键词] 树突状细胞; 细胞因子; 肿瘤; 免疫治疗

[中图分类号] R73-35 [文献标志码] A

在过去的十余年中, 已经建立了从人外周血、脾脏、骨髓体外培养获得大量 DC 的多种方法^[1-2]。其中被最为广泛采用的方法是由 Sallusto 等^[3]建立, 但此方法培养 DC 的操作烦琐, 影响因素较多, 不同批次培养差异较大, 故难以对 DC 实施质控, 影响对临床疗效的判定, 大大降低了 DC 临床应用的可行性。因此, 需要建立操作更为简单、产量和纯度更为稳定的 DC 培养方法。本研究采用外周血白细胞直接贴壁获得单核细胞, 加入细胞因子培养, 获得 DC 的产量是传统方法的 1.8 ~ 2.6 倍, 建立了更为稳定、得率更高的体外扩增培养 DC 的新方法, 此方法的建立将有利于 DC 免疫治疗肿瘤的顺利开展。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

rhGM-CSF 购自厦门特宝公司; rhIL-4 购自德国 Cellgenix 公司; 红细胞裂解液 Fastblood 购自上海飞捷公司; 丝裂霉素 C、淋巴细胞分离液(Histopaque, 1.077g/ml) 购自 Sigma 公司; 抗 HLA-DR、抗人 CD1a、抗人 CD83、抗人 CD80、抗人 CD86 荧光标记单克隆抗体、同亚型对照抗体均购自 BD PharMingen 公司; 无血清培养液 Cellgro DC 购自 Cellgenix 公司。

1.2 白细胞分离

新鲜分离的健康志愿者及肿瘤患者的抗凝外周全血 200 ml, 混匀后取其中的 100 ml 用于常规方法 DC 培养; 另外 100 ml 倒入 2 支灭菌的 50 ml 尖底离心管, 拧紧管盖后, 1 000 × g 离心 15 min, 吸取中间的白膜层细胞 5 ~ 10 ml(带有部分红细胞及血浆), 放入新的 50 ml 尖底离心管, 加入红细胞裂解液

Fastblood 1 20 ml, 拧紧管盖后轻缓颠倒混匀 5 次, 静置 3 min, 再加入红细胞裂解液 Fastblood 2 20 ml, 立即颠倒混匀 5 次, 200 × g 离心 5 min, 倒去上清后留下底部沉淀, 倒入生理盐水 50 ml, 拧紧管盖后颠倒混匀数次, 使底部沉淀全部散开, 200 × g 离心 5 min, 倒去上清, 再重复洗细胞 2 次, 即获得纯化的白细胞。

1.3 树突状细胞培养

上述分离获得的白细胞, 用培养液悬浮细胞成 5×10^6 /ml, 每瓶 20 ml, 加入 250 ml 培养瓶(Nunc 公司)中, 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养 1 h 后, 吸出培养上清, 加入预热的培养液轻轻洗培养瓶去除非贴壁细胞, 即获得贴壁的单核细胞。每瓶加入 Cellgro DC 培养液 30 ml、GM-CSF 1 000 U/ml、hIL-4 500 U/ml, 培养 72 h 后, 补加 30 ml 培养液及细胞因子, 培养至第 7 天收集悬浮细胞即为 DC, 命名为白细胞来源 DC(WDC)。

DC 的常规培养参照本课题先前建立的方法^[1]。简言之, 取另外一半的 100 ml 抗凝外周全血, 经淋巴细胞分离液梯度离心分离获得单个核细胞, 用培养液悬浮细胞成 2×10^6 /ml, 每瓶 20 ml, 加入 250 ml 培养瓶, 后继培养过程同上, 生成的 DC 命名为单个核来源 DC(MDC)。

1.4 DC 的免疫表型检测

待检细胞加入荧光抗体, 置 4 °C 标记 30 min

[作者简介] 朱学军(1971 -), 男, 江苏省常州市人, 硕士, 主治医师, 主要从事造血细胞分化发育及肿瘤免疫治疗的研究

* Corresponding author. E-mail: zhuxj2@sina.com

后,洗细胞 2 次,细胞悬于 PBA 中,流式细胞术 (Coulter, FC500) 检测细胞表面免疫表型。

1.5 DC 的同种混合淋巴细胞反应

取无关健康者外周血,经淋巴细胞分离液离心后获得单个核细胞,37 °C 培养 2 h 去除贴壁细胞,非贴壁细胞作为同种异体 T 细胞。WDC、MDC 用丝裂霉素 C 灭活后分别用作刺激细胞,分别以 0.33×10^3 /孔、 1×10^3 /孔、 3.3×10^3 /孔、 10×10^3 /孔加入 96 孔圆底培养板,每组各 3 个复孔,每孔再加入同种 T 细胞 3.3×10^5 个,终体积为 200 μ l,培养 96 h,培养结束前 4 h 每孔加入 MTT 20 μ l,以 DMSO 溶解产物,酶标仪 (Bio-Rad) 上测定各孔 *D* 值,结果取 3 孔平均值。

1.6 统计学处理

SPSS 8.0 软件进行分析,采用两小样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 体外培养生成 WDC 的形态与免疫表型

1 例健康志愿者、2 例恶性黑色素瘤患者、1 例 B 细胞淋巴瘤患者采集抗凝外周全血。用新方法建立 DC 的起始培养可在 2 h 内完成。而用传统方法,获得单个核细胞后建立 DC 的起始培养需要 4 ~ 6 h。

新方法培养 4 d,培养孔中即可见部分悬浮细胞,6 ~ 7 d 时大部分细胞悬浮不贴壁,相差显微镜可见伸展的大量胞质突起,为典型的 DC 形态。

收集培养 7 d 的悬浮细胞,FACS 显示,各次培养获得的 WDC 中,40% ~ 85% 的细胞表达 CD1a,低表达 CD80、CD83,高表达 HLA-DR、CD86(图 1),为不成熟 DC 表型,与同期培养的 MDC 相似。

2.2 体外培养生成 WDC 的产率

4 例患者外周血经新方法培养均获得大量 WDC。1 例淋巴瘤患者外周血培养获得的 WDC 数量最高,为 2.3×10^7 个,是同等量外周血应用传统培养方法获得 MDC 数量的 2.6 倍。其余 2 例外周血培养获得 WDC 数量分别为传统方法培养获得 MDC 的数量的 1.8 和 2.2 倍。另外 1 例恶性黑色素瘤患者外周血培养获得的 WDC 数量最低,为 0.6×10^7 个;而此患者 100 ml 外周血同时以传统方法培养根本不能获得 MDC,因为经淋巴细胞分离液离心后,获得的中间界面细胞极少,贴壁培养几乎未获得贴壁的单核细胞。

2.3 WDC 的免疫刺激性

经新方法培养获得的 WDC,体外同种异体混合淋巴细胞反应可强烈激发同种 T 淋巴细胞增殖,与传统方法培养获得的 MDC 相近(图 2),表明通过新

方法制备到的 WDC 具有较强的抗原提呈能力,进一步诱导成熟后可以用于肿瘤的临床免疫治疗。

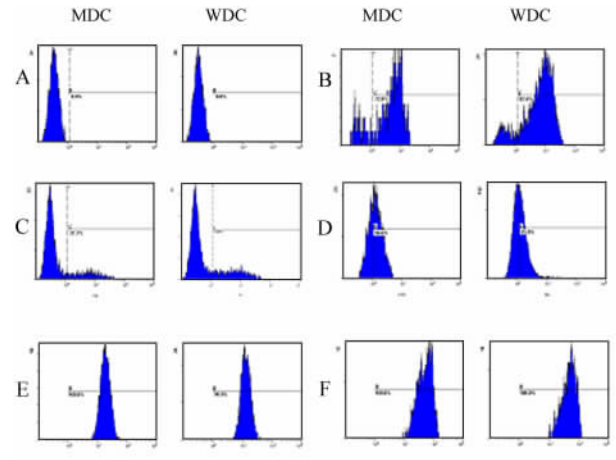


图 1 培养生成的 MDC、WDC 免疫表型分析

A: Control; B: CD1a; C: CD83;
D: CD80; E: CD86; F: HLA-DR

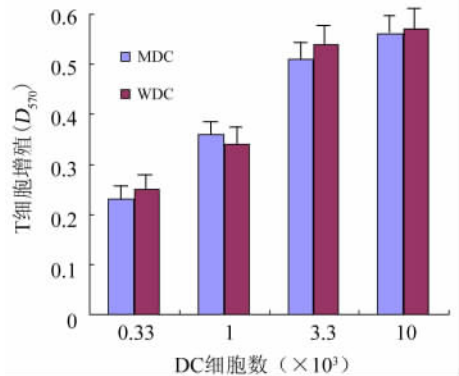


图 2 MDC、WDC 的体外同种 T 细胞刺激性

3 讨论

随着 DC 体外大量培养扩增技术的建立,DC 已成为探索体内外免疫应答机制的有力工具,同时被用于多种恶性肿瘤的临床治疗研究。目前 DC 疫苗已经被试用于淋巴瘤、骨髓瘤、白血病、肾癌、前列腺癌、恶性黑色素瘤、乳腺癌、胶质瘤等多种恶性肿瘤的治疗^[4-10],至 2006 年底仅由美国 NIH 组织的 DC 疫苗治疗肿瘤的临床试验项目已经超过 70 项,全球达到数百项,接受治疗的患者超过万例。但目前国内外开展的 DC 免疫治疗存在治疗策略单一、应用的时机不恰当、技术不标准等诸多缺陷,使得部分治疗的效果有限,有时甚至得到相反的效果,有一部分临床试验因疗效不佳而中期停止。其中制备的 DC 质量不佳,

是限制临床疗效发挥的一个重要环节。

本研究成功建立了 DC 体外培养的新方法,操作过程简单,从 100 ml 全血建立 DC 起始培养的时间从传统的 4~6 h 减少为 2 h,不易造成污染,易于被各级医院的实验室人员掌握,稳定地开展此方面工作。生成的 DC 具有典型的形态、免疫表型,具有较强的体外刺激同种 T 细胞增殖的能力,生成 DC 的数量约为传统方法的 2 倍。尤其重要的是,对于使用传统方法不能获得 DC 的少部分肿瘤患者,用此方法仍可培养获得满足临床治疗需要数量的 DC。

大部分恶性肿瘤患者在接受免疫治疗前,已经做了数次化疗,部分患者外周血血细胞减少,其中部分患者外周血经淋巴细胞分离液离心后,只能获得极少量的单个核细胞,则不能得到治疗用量的 DC,个别患者甚至得不到 DC(本课题组在临床实践中遇到 3 例),大大影响了免疫治疗的可实施性和疗效。以本研究中的 1 例恶性黑色素瘤患者为例,其血常规白细胞 $4.2 \times 10^9/L$,单核细胞 6%,进一步以流式细胞仪检测 CD14⁺单核细胞占 5.2%,外周血涂片先令分类可见单核细胞 5%,表明此患者外周血确实含有数量正常的单核细胞,但经淋巴细胞分离液分离后,仅得到约 1×10^7 单个核细胞,建立培养后,几乎未得到 DC。换用其他两个厂家的淋巴细胞分离液,仍为此结果,排除了淋巴细胞分离液质量问题的可能。原因可能是化疗或者肿瘤分泌的某些物质改变了患者外周血单个核细胞的密度,经 1.077 g/ml 淋巴细胞分离液离心后,大部分单个核细胞未能被截留在中间界面层,而沉降到底部,因此不能通过密度梯度离心的方法分离获得单个核细胞。

由于淋巴细胞分离液对单个核细胞分离的得率约 60%~80%,加上反复离心收集,会造成部分单个核细胞的丢失。而使用直接裂解红细胞的方法,白细胞几乎未丢失,其中的粒细胞在之后的 DC 培养中经贴壁方法被去除,生成 DC 的产量大大增加。但以往用的各种红细胞裂解液,均需要血液量的 10 倍以上,裂解时间长达 10 min 以上,对白细胞的活性损伤较大,不易控制,获得的白细胞往往因为裂解过度而不能培养出 DC,而缩短裂解时间,又会残留过多红细胞,影响 DC 培养。本研究采用新的红细胞裂解液,加入

血液体积 2 倍的裂解液,混匀后放置 2~3 min 即可充分裂解红细胞,白细胞损伤较小,在本研究中 4 例外周血均稳定培养获得 DC。但此方法存在的不足是裂解液加入时间过长会影响细胞活性,导致生成 DC 的数量减少。

总之,本研究建立了更为稳定、得率更高的 DC 体外扩增培养的新方法,为传统方法制备 DC 失败的肿瘤患者提供新的途径。

[参考文献]

- [1] 朱学军,曹雪涛,于益芝,等. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1997, 4(4): 302-306.
- [2] 朱学军,曹雪涛,马施华,等. 人骨髓、脐血 CD34⁺干细胞体外扩增的树突状细胞的表型及其 T 细胞刺激活性分析[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1996, 6(1): 26-29.
- [3] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin 4 and down regulated by tumor necrosis factor alpha[J]. J Exp Med, 1994, 179(4): 1109-1118.
- [4] Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4): 296-306.
- [5] Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(8): 630-641.
- [6] Antonia S, Mule JJ, Weber JS. Current developments of immunotherapy in the clinic[J]. Curr Opin Immunol, 2004, 16(2): 130-136.
- [7] Hsueh EC, Morton DL. Antigen-based immunotherapy of melanoma: canvaxin therapeutic polyvalent cancer vaccine[J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(6): 401-407.
- [8] Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients[J]. Blood, 2002, 99(5): 1517-1526.
- [9] Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, et al. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature cryopreserved peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells[J]. J Exp Med, 2002, 195(10): 1279-1288.
- [10] Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, et al. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34⁺ progenitor-derived dendritic cell vaccine[J]. Cancer Res, 2001, 61(17): 6451-6458.

[收稿日期] 2007-10-05

[修回日期] 2007-11-03

[本文编辑] 郁晓路