

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.03.018

## 自制细胞冻存液对树突状细胞存活率及活性的影响

赵满仓, 魏文青\*, 刘晶, 张艳, 付瑶, 安萍(北京军区总医院中心实验科, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 用自制的改良细胞冻存液冻存树突状细胞(dendritic cells, DCs), 观察冻存复苏后 DCs 的细胞存活率及体外诱导 CIK(cytokine induced killer cell)对肿瘤细胞的杀伤作用。方法: 从外周血分离、培养获得 DCs, 分别用 3 种冻存液冻存: (1) 含 10% 二甲亚砜(DMSO)、20% 牛血清的 RPMI 1640 培养液; (2) 日本 ZENOAQ 公司的 Cellbanker 细胞冻存液; (3) 自制细胞冻存液(含 DMSO、羟乙基淀粉及细胞稳定剂)。每组 DCs 分 6 管, 于  $-80^{\circ}\text{C}$  和  $-196^{\circ}\text{C}$  各冻存 3 管, 分别于冻存后第 30、60 和 180 d 复苏, 用锥虫蓝染色法测定细胞存活率, 用 MTT 法检测冻存复苏后 DCs 活化的 CIK 对 K562 细胞的杀伤活性。结果: 每组 3 种冻存液冻存的 DCs 随着冻存时间的延长, 冻存复苏 DCs 的存活率和活性均有轻度下降, 但经统计学分析 3 种冻存液的冻存效果无明显差别。结论: 自制的改良细胞冻存液能够替代传统冻存液和进口冻存液用于 DCs 的冻存, 有良好的推广前景。

**[关键词]** 树突状细胞; 细胞冻存液; 存活率; 杀伤活性

**[中图分类号]** R730.5; R392.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2009)03-0296-04

## Effect of modified cell freezing medium on survival rate and activity of dendritic cells

ZHAO Man-cang, WEI Wen-qing\*, LIU Jing, ZHANG Yan, FU Yao, AN Ping (Central Laboratory, General Hospital of Beijing Military Area Command, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the survival rate and activity of dendritic cells (DCs) to induce the activation of cytokine induced killer cell (CIK) after DCs being preserved in modified cell freezing medium (CFM). **Methods:** PBMC-derived DCs were preserved in three different CFMs at  $-80^{\circ}\text{C}$  and  $-196^{\circ}\text{C}$ , respectively. CFM I was RPMI 1640 containing 10% DMSO, 20% FCS; CFM II was Cellbanker (ZENOAQ company, Japan); CFM III was modified CFM containing DMSO, hydroxyethylamyle and cell stabilizer. Survival rate of DCs and antitumor activity of DCs activated CIK (DC-CIK) were measured by Trypan blue dye exclusion method and MTT after DCs being preserved in three different CFMs for 30, 60 and 90 d at  $-80^{\circ}\text{C}$  or  $-196^{\circ}\text{C}$ , respectively. **Results:** Survival rate and activity of DCs preserved in three different CFMs were only slightly reduced as storage period was increased, and there were no significant differences among three CFMs. **Conclusion:** Modified CFM can substitute traditional and imported Cellbanker CFM in DCs freezing with bright future.

**[Key words]** dendritic cell; cell freezing medium; survival rate; killing activity

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(3): 296-299]

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是已知功能最强的抗原提呈细胞, 是机体 T 淋巴细胞特异免疫应答的直接启动和调控者, 在机体的抗肿瘤免疫应答中发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。由于机体内天然 DCs 含量少, 难以满足临床应用的需要, 因此需要通过体外培养获得大量成熟的 DCs<sup>[3-5]</sup>。成熟 DCs 需要大量细胞因子维持, 花费高、易污染, 不利于 DCs 的临床应用, 因此可将制备出的 DCs 冷冻保存<sup>[6-7]</sup>。为了保持冻存 DCs 的存活率和活性, 选择合适的冷冻保存方法就显得尤为重要<sup>[8-9]</sup>。传统 DCs 的冻存方法是采用含有 10% DMSO、20% FCS 的冻存液二步降温

法, 其缺点是冻存液中含有 FCS 会影响 DCs 的临床应用, 细胞冷冻时需要特殊的程控降温仪; 进口的冻存液不含 FCS, 且可直接冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱, 但价格过高限制其临床应用。本研究自制 DCs 冻存液, 分别于  $-80^{\circ}\text{C}$  和  $-196^{\circ}\text{C}$  冻存 DCs, 测定 DCs 的存活率和生物活性, 并与两种常用冻存液做比较, 以期研发一种经济、实用、高效的 DCs 冻存液。

**[作者简介]** 赵满仓(1957-), 男, 河北省邢台市人, 主任技师, 主要从事医学检验和肿瘤免疫治疗的基础研究

\* 通讯作者( Corresponding author). E-mail: wqwei2000@yahoo.com.cn

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料

(1)常用传统细胞冻存液:含 10% 二甲亚砜、20% FCS 的 RPMI1640 培养液;(2)进口冻存液:Cellbanker 细胞冻存液(日本 ZENOAQ 公司产品)。锥虫蓝、MTT、重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(hGM-CSF)购自北京化学试剂公司;K562 细胞由军事医学科学院五所惠赠;IL-2、CD3-McAb 和 IL-4 由卫生部北京老年医学研究所惠赠。无血清淋巴细胞培养基 U15-816(PAA 公司产品)购自上海微科生化试剂有限公司。-80 °C 低温冰箱为日本三洋公司产品。

### 1.2 改良 DCs 冻存液的制备

每 100 ml 冻存液中含二甲基亚砜 8.4 ml、17.5% 羟乙基淀粉 57.6 ml 和细胞稳定剂 34 ml。细胞稳定剂由甘油和 人血清白蛋白以一定比例混合而成。

### 1.3 DCs 和 CIK 的制备

取肝素抗凝的健康志愿者外周血 20 ml,用淋巴细胞分离液密度梯度离心(2 400 × g, 20 min),轻轻吸取灰白色层的单个核细胞,置于 15 ml 离心管中,用 RPMI 1640 培养液离心洗涤 3 次(2 000 × g, 5 min)。用无血清培养基 U15-816 悬浮细胞,调整细胞密度为 1 × 10<sup>5</sup>/ml,加入细胞培养瓶中,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 2 h 后,轻摇细胞瓶,将悬浮的细胞吸到另一培养瓶中,调整密度为 1 × 10<sup>6</sup>/ml,用含有 IL-2 1 000 U/ml、CD3-McAb 100 ng/ml 的 U15-816 诱导 CIK 细胞,每 2~3 d 半量换液,第 11 天时收集 CIK 备用。贴壁细胞用含有 100 ng/ml hGM-CSF 和 1 000 U/ml IL-4 的 U15-816 继续培养,2~3 d 半量换液,到第 11 天时收集诱导的 DCs 细胞。用锥虫蓝染色计数活细胞数。将一部分细胞做杀伤活性测定,另一部分细胞冻存。

### 1.4 DCs 的冻存

将 DCs 用上述 3 种冻存液分别稀释成(2~5.5) × 10<sup>5</sup>/ml,每种冻存液冻存 6 管 DCs。取其中 3 管置于 -80 °C 低温冰箱保存,另外 3 管置 -196 °C 液氮中保存。并分别于 30、60 和 180 d 从各冻存液中取出 1 支,复苏细胞,用锥虫蓝染色检测 DCs 成活率。

### 1.5 MTT 法检测 DC-CIK 的杀伤活性

培养第 11 天的 CIK 和复苏后再培养 2 d 的 DCs 按 5:1 比例相混合,调整细胞数为 1 × 10<sup>6</sup>/ml,用含有 IL-2(1 000 U/ml)、hGM-CSF(100 ng/ml)的

U15-816 培养 4 d,即共培养的 DC-CIK,调整密度为(3~5) × 10<sup>5</sup>/ml,加入含有 K562 细胞的 96 孔细胞培养板中(20:1 比例),以此作为实验组。另外单独加入 DC-CIK 和单独加入 K562 细胞,每组 5 复孔,作为对照组。置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中继续培养 48 h,离心弃上清,每孔加 20 μl MTT(5 mg/ml),放置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 4 h,离心弃上清,每孔加二甲基亚砜 100 μl,振荡溶解。15 min 后酶标仪 570 nm 波长测 D 值。计算 DC-CIK 的杀伤活性。杀伤活性(%) = [1 - (实验组 D - 单独 DC-CIK 组 D) / 单独 K562 细胞 D] × 100%

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件包进行处理,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析和 t 检验, P < 0.05 有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 3 种不同冻存液冻存的 DCs 的成活率

从外周血中分离出 6.8 × 10<sup>5</sup>/ml 单个核细胞,经培养、诱导成 DCs,第 11 天时细胞增殖至 3.9 × 10<sup>9</sup>/ml,增值约 500 倍,测定细胞的存活率为 99%。

DCs 经过不同时间、不同温度、不同冻存液的冷冻保存后复苏,测定其存活率,结果见表 1。从表 1 可以看出,随着冻存时间的延长,各冻存液组 DCs 的存活率仅有不同程度的轻度降低,各冻存液组 DCs 存活率无显著性差异( P > 0.05)。表明 3 种细胞冻存液冻存 DCs 效果相当。

表 1 3 种不同冻存液冻存 DCs 的存活率(%)

Tab.1 Survival rate of DCs preserved in three different cell freezing media ( CFM ) (%)

| Group          | Time( t/d ) |            |            |
|----------------|-------------|------------|------------|
|                | 30          | 60         | 180        |
| Modified CFM   |             |            |            |
| -80 °C         | 95.2 ± 6.0  | 94.6 ± 5.7 | 93.2 ± 5.3 |
| -196 °C        | 95.4 ± 5.8  | 95.2 ± 5.1 | 94.8 ± 6.2 |
| Cellbanker CFM |             |            |            |
| -80 °C         | 95.4 ± 5.9  | 94.8 ± 6.1 | 93.8 ± 5.7 |
| -196 °C        | 96.4 ± 6.3  | 96.1 ± 6.5 | 95.2 ± 7.1 |
| Normal CFM     |             |            |            |
| -80 °C         | 95.2 ± 5.9  | 94.8 ± 5.1 | 92.6 ± 7.1 |
| -196 °C        | 96.2 ± 6.1  | 95.4 ± 5.7 | 94.6 ± 6.0 |

## 2.2 3种不同冻存液冻存的 DCs 复苏后与 CIK 共培养对肿瘤细胞的杀伤活性

DCs 经过不同冻存液的不同时间、不同温度冷冻保存后复苏, 与 CK 共培养诱导 DC-CIK, 测定其对肿瘤细胞的杀伤效果, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 随着冻存时间的延长, 各组 DC-CIK 对肿瘤细胞的杀伤效率都有轻度的降低, 各冻存液组的杀伤活性无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。表明 3 种冻存液冻存后复苏 DCs 的活性相似。

表 2 3 种不同冻存液冻存 DCs 复苏后与 CIK 共培养对肿瘤细胞的杀伤活性(%)

Tab.2 Antitumor activity of DC-CIK after DCs being preserved in three different CFM(%)

| Group          | Time(t/d)  |            |            |
|----------------|------------|------------|------------|
|                | 30         | 60         | 180        |
| Modified CFM   |            |            |            |
| -80 °C         | 30.4 ± 4.7 | 28.6 ± 4.5 | 27.6 ± 5.0 |
| -196 °C        | 30.5 ± 4.0 | 28.8 ± 4.8 | 28.2 ± 5.1 |
| Cellbanker CFM |            |            |            |
| -80 °C         | 31.0 ± 4.3 | 29.4 ± 4.4 | 28.1 ± 5.0 |
| -196 °C        | 31.4 ± 4.1 | 29.5 ± 5.4 | 29.3 ± 4.9 |
| Normal CFM     |            |            |            |
| -80 °C         | 30.3 ± 5.2 | 28.6 ± 6.4 | 26.1 ± 5.6 |
| -196 °C        | 30.6 ± 5.1 | 28.4 ± 5.8 | 27.6 ± 4.6 |

## 3 讨论

DCs 是机体内功能最强的抗原提呈细胞, 其最大特点是能激活初始 T 细胞, 活化机体免疫应答。DCs 激发 T 细胞增殖及抗原提呈能力是巨噬细胞的 100 ~ 10 000 倍<sup>[10-11]</sup>。目前国内、外将 DCs 用于恶性肿瘤的治疗已成为过继性细胞免疫疗法的重要手段之一。为使患者在治疗中得到同批次培养的 DCs, 体外扩增出的 DCs 需要冷冻保存。建立安全有效的 DCs 冻存方法是 DCs 过继免疫治疗的前提和基础。国内、外一些学者针对该问题积极探索最佳的 DCs 冻存方法<sup>[12-14]</sup>。目前国内传统使用的 DCs 细胞冻存方法是采用含 10% DMSO、20% FCS 的冻存液, 用程控降温仪降至 -80 °C 后, 置于液氮中保存。该方法优点是细胞保存时间长, 缺点是冻存液中含

有的 FCS 会对人体过继免疫治疗产生一定影响; 需要特殊的程控降温仪。而进口的冻存液保存效果好, 不含 FCS, 且可直接冻存于 -80 °C 低温冰箱, 但价格过高限制了它的临床应用。

为了既节约经费, 又达到理想的冻存效果, 本研究配制了不含牛血清的冻存液, 并与常用冻存液(含 10% DMSO 和 20% FCS)和进口冻存液(日本 Cellbanker 细胞冻存液)进行对比实验。实验结果表明, 用上述 3 种细胞冻存液冻存的 DCs, 经过 6 个月的观察, DCs 细胞的存活率和活性无显著性差异, 表明自制的冻存液完全可以替代常用和进口冻存液用于 DCs 的保存。实验结果显示 DCs 在 -80 °C 和 -196 °C 液氮中保存效果相当, 故选择 -80 °C 低温冰箱保存 DCs 既方便又稳定。

本研究结合传统冻存液配制方法, 在原有的基础上进行了改进, 降低了二甲基亚砷的用量, 新添加了羟乙基淀粉和细胞稳定剂。经过反复摸索, 采用了甘油和人血清白蛋白混合液经不同比例混合后加到上述冷冻液中作为细胞稳定剂, 经过对比试验, 效果满意。

从冻存时间来看, 3 组冻存液结果没有明显差别。但随着冻存时间的延长, 细胞存活率呈下降趋势, 对 DCs 的治疗效果会有一些影响。所以建议冻存 DCs 时不超过 60 d, 这样有利于临床患者治疗和疗效观察的连续性。

## [参考文献]

- [1] Eichler H, Nguyen XD, Roelen D, et al. Multicenter study on *in vitro* characterization of dendritic cells[J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(1): 21-29.
- [2] Heo YJ, Son CH, Chung JS, et al. The cryopreservation of high concentrated PBMC for dendritic cell (DC)-based cancer immunotherapy[J]. *Cryobiology*, 2009, 58(2): 203-209.
- [3] 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.
- [4] Meidenbauer N, Andreesen R, Mackensen A. Dendritic cells for specific cancer Immunotherapy[J]. *Biol Chem*, 2001, 382(4): 507-520.
- [5] 张玉梅, 孙桂芝, 周同. 体外培养人树突状细胞分化成熟特性分析[J]. *中国微循环杂志*, 2006, 10(1): 9-12.
- [6] 曹翊婕, 王晶, 吕高辉. 树突状细胞免疫治疗肿瘤研究现状[J]. *黑龙江医学*, 2006, 30(9): 671-673.
- [7] 王峻, 蒲晓麟, 刘福银, 等. 树突状细胞疫苗对自体肺癌细胞的杀伤作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(1): 25-30.
- [8] 孟冬梅, 赵春亭, 王宝中, 等. 人 K562 白血病细胞来源的树突状细胞低温冻存方法的研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2004, 12(6): 788-792.

- [ 9 ] Westermann J, Körner IJ, Kopp J, *et al.* Cryopreservation of mature monocyte-derived human dendritic cells for vaccination influence on phenotype and functional properties[ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2003, 52( 3 ): 194-198.
- [ 10 ] Thomas R, Lipsky PE. Dendritic cells: origin and differentiation [ J ]. *Stem Cells*, 1996, 14( 2 ): 196-206.
- [ 11 ] Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity[ J ]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 311 ( 1 ): 17-58.
- [ 12 ] 谢丽华, 杨兵, 郭光华, 等. 冻融人脐血树突状细胞瘤苗的生物学特征[ J ]. *山西医科大学学报*, 2008, 39( 7 ): 603-606.
- [ 13 ] 陈素钻, 陈康文, 俞晶, 等. 冻存后人脐血 DC 介导的食管癌细胞瘤苗实验研究[ J ]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16( 7 ): 1075-1079.
- [ 14 ] 郭光华, 谢丽华, 陈素钻, 等. 冻存对脐血树突状细胞介导的食管癌细胞瘤苗的影响[ J ]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13( 18 ): 1375-1379.
- [ 收稿日期 ] 2009-03-03 [ 修回日期 ] 2009-04-06
- [ 本文编辑 ] 韩丹

## · 科技动态 ·

### CD24 和 Siglec-10 选择性抑制组织损伤诱导的炎症反应

面对外源性的感染和机体内的损伤,免疫细胞都能通过模式识别受体( pattern recognition receptors, PRRs )引发机体的炎症应答<sup>[1]</sup>。但机体是如何通过这些共同的受体来识别外源病原体相关的模式分子( Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs )和由损伤细胞释放的内源性危险相关模式分子( danger-associated molecular patterns, DAMPs ),从而保证引发的相应的免疫应答来应对这种威胁。新的研究发现存在一条信号通路能够对 DAMPs 诱导的应答起到抑制作用,而对 PAMPs 无反应。

在对乙酰氨基酚( acetaminophen, AAP )诱导小鼠的肝损伤模型中,Chen 等<sup>[2]</sup>发现对正常小鼠亚致死量的 AAP 可引起 CD24 缺陷小鼠的快速死亡,并且血清中的炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、趋化因子 CCL-2 和丙酰转氨酶( alanine transaminase, ALT )的含量大幅上升,同时伴随着肝出血和肝坏死。这些结果表明,在 AAP 诱导的肝损伤模型中,CD24 能通过抑制炎症反应保护小鼠。那么 CD24 是通过何种途径发挥功能的呢?

研究找到了 CD24 的一种新配体,高速迁移率族蛋白 B1( high mobility group box 1, HMGB1 )能直接和特异地与 CD24 分子相互作用。HMGB1 是典型的 DAMPs 之一,从损伤细胞被释放出来。用 HMGB1 的抗体封闭其功能后, AAP 处理 CD24 缺陷的小鼠依然能存活,并且 ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 CCL-2 的水平显著下降。CD24 与 HMGB1 作用后,抑制 HMGB1 通过其 PRRs 诱导的炎症反应,是通过 CD24 结合到唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素( sialic acid-binding immunoglobulin like lectin 10, Siglec10 )后将信号传递至胞内的。Siglec10 同样能够与 HMGB1 结合,但必须依赖于 CD24,揭示它们通过形成三聚体发挥功能。鼠源 SiglecG( 人源的 Siglec10 的同种分子 )缺陷小鼠经过亚致死量的 AAP 处理后,炎症反应增强,产生超敏反应,75% 的小鼠死亡,用 HMGB1 的抗体同样可抑制炎症反应和小鼠的死亡。

DCs 既能与 HMGB1 相互作用产生免疫应答,又同时表达 CD24 和 Siglec1G。与正常 DCs 相比, HMGB1 刺激 CD24 或 SiglecG 缺陷小鼠 DCs 能显著活化 NF- $\kappa$ B 和上调 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达。重要的是, CD24 或 SiglecG 不能影响典型的 PAMPs/LPS 对 DC 的 NF- $\kappa$ B 的活化和炎症因子的表达。致死量的 LPS 对 CD24 或 SiglecG 缺陷小鼠的死亡缺陷曲线同样不产生影响。

这些结果揭示, CD24-SiglecG 通路能够选择性抑制核内的 DAMPs/HMGB1 诱导的炎症反应,而对外源的 PAMPs/LPS 无影响。该研究同时进一步证明 CD24-SiglecG 能够与胞内的 DAMPs/HSP70 和 HSP90 作用并抑制它们诱导的炎症反应。因此, CD24-SiglecG 介导的通路可能是区分机体损伤和感染的重要途径之一。

[ 方宏亮 摘译, 万涛 审阅。 [ 1 ] Bianchi ME, Manfredi AA. *Science*, 2009, 323( 5922 ): 1683-1684;

[ 2 ] Chen GY, Tang J, Zheng P, *et al.* *Science*, 2009, 323( 5922 ): 1722-1725 ]

热烈庆贺本刊成为  
中国中文核心(肿瘤学)期刊