

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.03.008

· 基础研究 ·

造血干细胞移植后淋巴细胞增殖症患者单个核细胞来源 DC 负载 EBV 抗原肽制备 DC-CIK

郭晓玲^{1,3}, 魏雅¹, 朱平², 牛志云¹, 蔡圣鑫¹, 张改玲¹, 达万明³, 潘峻¹(1. 河北医科大学第二医院血液内科, 河北石家庄 050051; 2. 北京大学第一医院血液内科, 北京 100034; 3. 解放军总医院血液内科, 北京 100036)

[摘要] 目的: 以造血干细胞移植后并发淋巴细胞增殖症(post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLD)患者外周血单核细胞培养诱导 DC, 负载抗原肽后制备 DC-CIK(cytokine-induced killer cell), 为探索新的 PTLD 治疗方法奠定基础。方法: 分离造血干细胞移植后 EBV(Epstein-Barr virus)感染致 PTLD 患者外周血单个核细胞, 贴壁细胞培养诱导 DC, 悬浮细胞诱导 CIK; 负载 EBV 抗原肽 LMP2 后建立 DC-CIK 共培养体系。流式细胞仪分析共培养前后细胞的免疫表型, ELISA 检测共培养前后细胞上清 IFN- γ 的分泌水平, 基因扫描仪分析 T 细胞受体(T cell receptor, TCR) β 家族基因谱。结果: 成功制备负载 EBV 抗原肽的 DC-CIK, HLA-DR⁺CD86⁺ DC 细胞从诱导前的 12.5% 增加到 91.17%; DC-CIK 共培养 14 d 后, 两例患者的 CIK 数量分别增加了 5.3 和 6.8 倍; CD3⁺、CD8⁺、CD3⁺CD8⁺ 以及 CD3⁺CD56⁺ 细胞比例在 DC-CIK 共培养后均明显升高(均 $P < 0.05$)。抗原肽负载的 DC-CIK 共培养体系中 IFN- γ 的分泌水平明显高于未经抗原肽负载的 DC 组[(1 332.6 \pm 92.38) pg/ml vs (693.42 \pm 62.41) pg/ml, $P < 0.01$]。DC-CIK 培养后细胞的 TCR β 家族基因在 5.2 家族出现单克隆表达峰。结论: EBV 抗原肽负载后 DC 可诱导 DC-CIK 共培养体系中 CD3⁺CD8⁺ 以及 CD3⁺CD56⁺ 细胞扩增, 并分泌高水平 IFN- γ , 为临床应用 DC-CIK 对移植后 EBV 感染致 PTLD 患者进行过继性细胞免疫治疗提供实验基础。

[关键词] 树突状细胞; CIK 细胞; EB 病毒; 移植后淋巴细胞增殖症; 过继性细胞免疫治疗

[中图分类号] R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)03-0285-07

Preparation of DC-CIK using EBV peptide-pulsed DC from peripheral blood mononuclear cells of post-transplant lymphoproliferative disorder patients after hematopoietic stem cell transplantation

GUO Xiao-ling^{1,3}, WEI Ya¹, ZHU Ping², NIU Zhi-yun¹, CAI Sheng-xin¹, ZHANG Gai-ling¹, DA Wan-ming³, PAN Ling¹(1. Department of Hematology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei, China; 2. Department of Hematology, First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China; 3. Department of Hematology, General Hospital of LPA, Beijing 100036, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a DC-CIK (cytokine-induced killer cell) co-culture system using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived-DC from hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) patients with post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) after pulsed with EBV-special peptides, so as to lay a foundation for new adoptive immunotherapy of patients with PLTD after HSCT. **Methods:** PBMCs were obtained from patients with PTLT after HSCT; DC was induced from adherent cells; and CIK was induced from suspension cells. DC was further pulsed with EBV-special peptides and co-cultured with CIK to establish the DC-CIK co-culture system; the immunophenotype of cells in DC-CIK system before and after co-culture were determined by FACS, IFN- γ secretion was assayed by ELISA, and TCR β genealogy was examined by genetic analyzer. **Results:** The ratio of HLA-DR⁺CD86⁺ DC increased from 12.5% to 91.17% after

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(No. C2008001097); 国家高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(No. 200800890011); 河北省卫生厅重点跟踪项目资助(No. GL200508)。Project supported by Natural Science Foundation of Hebei Province(No. C2008001097), and the Research Foundation for the Doctoral Program of Higher Institution of China(No. 200800890011), and the Key Follow-up Program of Health Bureau of Hebei Province(No. GL200508)。

[作者简介] 郭晓玲(1972 -), 女, 河北省石家庄市人, 博士, 博士后, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤免疫、移植免疫的研究

[通信作者] 潘峻(PAN Ling, corresponding author), E-mail: linger216@163.com

cytokine stimulation. After co-culture with DC for 14 d, the numbers of CIK in two patients with PTLD increased to 5.3 and 6.8 times, respectively. The ratios of CD3⁺, CD8⁺, CD3⁺CD8⁺, and CD3⁺CD56⁺ cells were significantly increased after DC-CIK co-culture. IFN- γ level in peptide-pulsed DC-CIK group was significantly higher than that in peptide-unpulsed DC-CIK group([1 332.6 \pm 92.38] pg/ml vs [693.42 \pm 62.41] pg/ml, $P < 0.05$); *TCR β* genealogy assay found the clone expansion peak of 5.2 *TCR β* subfamily in DC-CIK co-culture system. **Conclusion:** EBV peptide-pulsed DC can induce CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD56⁺ cell expansion in DC-CIK co-culture system with high level of IFN- γ . DC-CIK can be used as a new adoptive immunotherapy to HSCT patients with EBV infection and PTLD.

[**Key words**] dendritic cell (DC); cytokine-induced killer cell (CIK); Epstein-Barr virus(EBV); post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD); adoptive immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(3): 285-291]

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)感染是造血干细胞移植术后常见并发症,尤其是进行了无关供者异基因造血干细胞移植,或应用去T细胞移植和应用过ATG(anti-lymphocyte immunoglobulin)的移植患者,EBV感染的发生率可以达到10%~20%^[1-2]。移植术后EBV感染可引起受体淋巴细胞增生紊乱,即移植后淋巴细胞增殖症(post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLD),临床上表现为发热、淋巴结肿大、肝脾肿大、血液中淋巴细胞增多,可以出现异常淋巴细胞、嗜血细胞等,病情进展迅速,可以在短时间内造成患者的死亡,是最严重的移植并发症之一^[14]。目前治疗EBV感染尚无有效药物,单纯的抗病毒治疗常常不能有效控制病情,移植后的患者常常不能耐受化疗^[5-6]。利妥昔单抗(rituximab)和EBV抗原诱导的CTL细胞输注被证实有一定的疗效,但是CTL细胞培养和分选的时间长、数量少,常常不能在短时间内提供足够的细胞数量控制病情^[7-11]。本课题采集2例移植后EBV感染致PTLD患者的外周血单个核细胞,在体外培养DC,负载以EBV抗原肽,在体外刺激细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)的增殖,检测共培养前后DC-CIK细胞群的免疫表型以及T细胞基因图谱,并检测IFN- γ 的分泌水平,探索移植后EBV感染相关PTLD的治疗方法。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

AIM-V无血清培养基为Gibco公司产品,胎牛血清购自杭州四季青公司,细胞因子(人重组IL-2、IL-7、IL-15、IL-4、IL-6、IL-1 β 、IFN- α 、TNF- α 、PGE2和GM-CSF)以及单克隆抗体(McAb CD3, McAb CD28)均为PeproTech EC公司产品,PE标记的鼠抗人CD86单抗、CD80单抗、FITC标记的鼠抗人CD83单抗、HLA-DR单抗购自美国BD公司。基因扫描4

色荧光染料购自ABI公司。IFN- γ ELISA试剂盒购自晶美生物工程有限公司。LMP2肽由美国JPT公司生产,为混合不同的HLA分型的EBV抗原肽。细胞培养板及培养用具购自日本Falcon公司。流式细胞仪为美国BD公司产品,基因扫描仪PRISM 310 Genetic Analyzer为ABI公司产品。

1.2 标本的采集

留取2例造血干细胞移植术后EBV感染致PTLD患者的外周血标本。患者有发热,扁桃体、肝、脾、淋巴结肿大;EBV-DNA检测大于 1×10^6 拷贝,确诊为PTLD。标本采集已获得家属签署的知情同意书。取外周静脉血30 ml,利用破红法去除红细胞,使用含10%胎牛血清的AIM-V培养液调整细胞密度至 5×10^6 /ml,接种于六孔板,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养4 h后,吸取悬浮细胞并用AIM-V培养基洗2遍,用于培养CIK细胞;贴壁细胞用于培养DC。

1.3 DC的体外培养

将分离的贴壁细胞混悬于含10%胎牛血清的AIM-V培养液中,调细胞密度至 5×10^6 个/ml,培养于六孔板,每孔加入细胞悬液2 ml,并按液体总量添加细胞因子GM-CSF 1 000 IU/ml、IL-4 1 000 IU/ml,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养24 h后,加入TNF- α 1 000 IU/ml、IFN- α 1 000 IU/ml、IL-6 10 ng/ml、PGE2 1 μ g/ml、IL-1 β 10 ng/ml,诱导DC成熟。培养24 h后,部分培养孔加入LMP2肽5 ng/ml,3 h后按DC:CIK=1:5比例共同培养。每日于倒置显微镜下观察细胞形态并计数。

1.4 CIK的体外诱导增殖

将分离的悬浮细胞悬浮于含10%胎牛血清AIM-V培养基,调细胞密度至 2×10^6 /ml,取8 ml培养于10 ml培养瓶中,并按液体总量添加细胞因子IL-2 10 IU/ml、IL-7 5 ng/ml、IL-15 5 ng/ml,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。48 h后加入IFN- γ

1 000 IU/ml, 3 h 后与加入的 DC 继续共培养, 24 h 后换液, 并加入 IL-2 300 IU/ml、McAbCD3 25 ng/ml、McAbCD28 125 ng/ml、IL-7 5 ng/ml、IL-15 5 ng/ml。每 72 h 换液 1 次, 补加细胞因子 IL-2 300 IU/ml、IL-7 5 ng/ml、IL-15 5 ng/ml, 调细胞密度至 2×10^6 /ml 继续培养。体外培养 14 d, 每日于倒置显微镜下观察细胞形态并计数。

1.5 流式细胞学检测 DC-CIK 细胞群的免疫表型

应用流式细胞仪分析免疫表型。收集培养第 0 天和第 2 天的 DC 细胞, 加入荧光抗体和 PE 标记的鼠抗人 CD86 单抗、CD80 单抗、FITC 标记的鼠抗人 CD83 单抗、HLA-DR 单抗, 混匀避光孵育 20 min 后, 悬浮上机。收集 DC-CIK 共培养的细胞, 在培养的第 0、9、14 天取细胞, 应用流式细胞仪检测细胞表型 CD3、CD8、CD56 等的表达。

1.6 ELISA 法检测 CIK-DC 细胞群 IFN- γ 的分泌

收集培养前后的 CIK 细胞(包括单独培养的 CIK、无负载肽的 DC-CIK 和负载肽的 DC-CIK)。并复苏培养成熟的 DC, 接种于 96 孔板中, 加入混合 LMP2 肽, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 3 h。CIK 和 DC 细胞分别以 5:1、10:1 和 20:1 的比例混合, 各做 3 个复孔。此外, 分别在培养基中加入相同数量的 DC 作为空白对照。继续于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h, 平板离心机中以 $1\ 000 \times g$ 离心 8 min, 取上清, 3 倍稀释后, 使用 IFN- γ ELISA 试剂盒测定上清液中 IFN- γ 的含量。使用酶联免疫检测仪检测光密度(波长 450 nm), 复孔取平均值。每个标准品和标本的 *D* 值应减去零孔 *D* 值, 使用 SMA 3 000 绘制标准曲线并计算标本的 IFN- γ 含量。

1.7 DC-CIK 共培养后 T 细胞受体 β 家族的基因谱分析

取培养前及共培养后 CIK 细胞进行 T 细胞受体(T cell receptor, TCR) β 家族基因谱分析。收集 DC-CIK 共培养前后的细胞, 以 TRIzol 试剂盒(Gibco BRL 公司)提取单个核细胞总 RNA。取 3 μ g RNA, 采用六聚体随机引物及 M-MLV 反转录酶试剂盒(Promega)反转录合成 cDNA 第一链。取 1 μ l 逆转录产物、0.25 mmol/L dNTP、6 pmol 引物和 1 U 的 Taq 酶, 总反应体系为 25 μ l, 经过 94 °C 变性 5 min 后直接进入 PCR 循环, 循环条件为 93 °C、30 s、55 °C、30 s、72 °C、60 s, 共 30 个循环; 72 °C、10 min 延伸。PCR 产物冻存。根据 *TCR β* 的 25 个基因家族的序列设计相应的家族特异性上游引物, 其中 β V10、 β V19 是伪基因, 因而不采用; β V5、 β V13 各有两个分家族, 分别为 β V5.1、 β V5.2 以及 β V13.2、

β V13.2。在 *TCR β* 链 C 区设计一共用的下游引物。PCR 产物包括各个 *TCR- β* 基因家族的 CDR3 区。另外设计 *TCR- α* 链 C 区的一段序列引物作为内参标准。PCR 产物 1.5 μ l 经甲酰胺变性后, 加入 48 孔板, 装载到已灌好 POP-4 胶的 ABI310DNA 序列分析仪上进行毛细管电泳。根据计算机自动收集的数据, 经 Genescan 3.1 软件分析, 确定 PCR 产物的长度和荧光素强度。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.5 软件进行配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血单个核细胞诱导培养 DC

将 EBV 感染致 PTLD 患者的外周血标本去除红细胞后接种于培养板, 孵育 4 h, 收取贴壁细胞进行 DC 培养, 收取悬浮细胞进行 CIK 细胞培养。每天观察 DC 的数目和形态, 培养 48 h 后细胞数目无明显变化, 但倒置显微镜下可见部分细胞出现毛刺状突起, 呈现半贴壁状态, 且有细胞聚集成团的现象(图 1)。

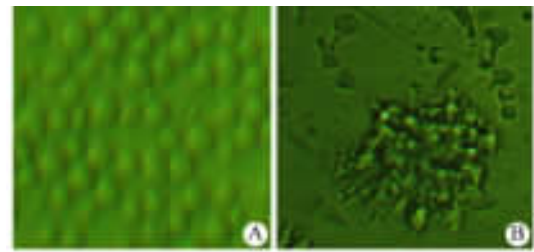


图 1 体外细胞因子刺激前后 DC 的形态($\times 100$)

Fig. 1 Morphology of DC before and after cytokine stimulation *in vitro*($\times 100$)

A: Before cytokine stimulation; B: 48 h after cytokine stimulation

2.2 DC 的免疫表型

患者 1 的单个核细胞来源的 DC 诱导培养后的 CD80/HLA-DR/CD83/CD86 表达如图 2 所示: 培养后 HLA-DR⁺CD86⁺ 的 DC 数目从培养前 12.5% 增加到 91.17%, CD80、CD83 也有明显增高。患者 2 来源的单个核细胞在培养前的表型: HLA-DR⁺CD86⁺ 细胞为 6.90%, CD83⁺ 细胞为 0.27%, CD80⁺ 细胞为 0.13%; 培养后 DC 的表型: HLA-DR⁺CD86⁺ 细胞为 76.79%, CD83⁺ 细胞为 3.17%, CD80⁺ 细胞为 11.87%。以上数据显示, 应用这种方法可以成功地诱导 DC 的分化成熟, 进而可以发挥其提呈抗原的作用。

2.3 体外 DC-CIK 共培养后的免疫表型

DC-CIK 在共培养后第 4 天起出现增殖, 倒置显微镜下可见细胞呈现集落样生长。培养 14 d 后, DC-CIK 数目较培养前有显著增加, 患者 1 和患者 2 来源的细胞数分别是培养前的 5.8 倍和 6.3 倍, 培养期内细胞存活率在 95% 以上。图 3、4 显示了患者 1 在 DC-CIK 培养前后细胞免疫表型检测结果, 显示在培养前 CD3⁺ CD8⁺ 的 T 淋巴细胞比例为 28.08%, 培养后增加了 1.88 倍; CD3⁺ CD56⁺ 为 NK

细胞的标记, 培养前为 1.27%, 培养后增加到 8.44%。另外, 以不负荷抗原肽的 DC-CIK 细胞共培养做对照, 显示加入抗原肽对细胞的增殖数目和免疫表型没有影响。患者 2 得到的检测结果和患者 1 的结果类似, 在共培养前, CD3⁺ CD8⁺ 细胞为 55.20%, CD3⁺ CD56⁺ 细胞为 1.03%; 在共培养第 14 天, CD3⁺ CD8⁺ 细胞为 76.90%, CD3⁺ CD56⁺ 细胞为 8.69%。

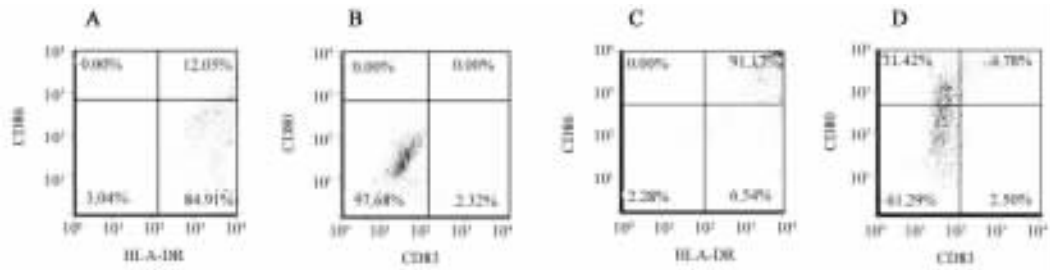


图 2 流式细胞仪检测 EBV 感染患者外周血单个核细胞来源 DC 的 CD86、HLA-DR、CD80 和 CD83 表达

Fig. 2 Expressions of CD86, HLA-DR, CD80 and CD83 on PBMC-derived DC in patients with EBV infection as determined by FACS

A, B: Before incubation; C, D: 48 h after incubation

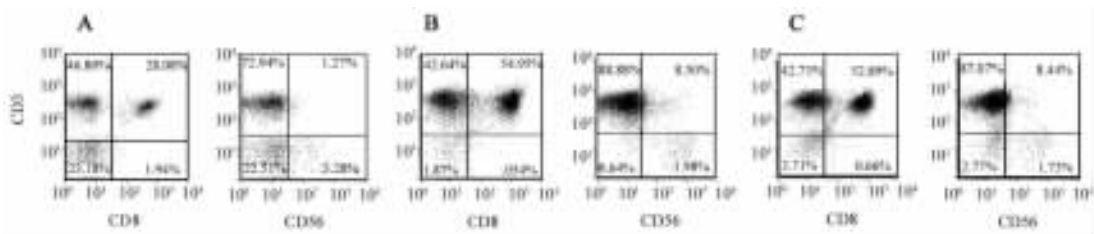


图 3 流式细胞仪检测患者 1 的 DC-CIK 在共培养前后细胞的表型

Fig. 3 Phenotypes of DC-CIK cells of No. 1 patient before and after co-culture as determined by FACS

A: Before co-culture; B: 14 d after co-culture without peptide; C: 14 d after co-culture with peptide

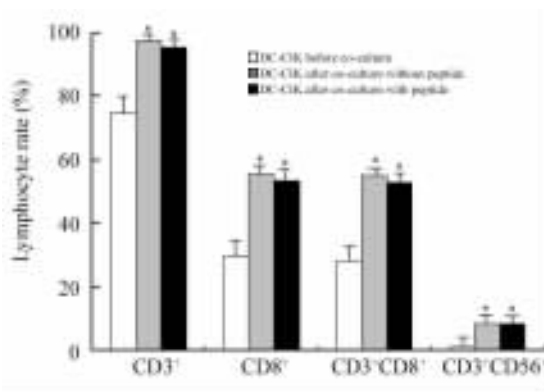


图 4 患者 1 的 DC-CIK 在共培养前后的表型

Fig. 4 Phenotypes of DC-CIK cells of No. 1 patient before and after co-culture

* P < 0.05 vs DC-CIK before co-culture

2.4 DC-CIK 细胞共培养前后 TCRβ 家族的基因谱

应用基因谱分析 DC-CIK 共培养前后 T 淋巴细胞的 TCRβ 24 个家族的基因克隆, 培养前峰型呈寡克隆型, 有几个家族有突出表达, 其余各家族峰型不明显, 峰值较低, 有散在家族出现高斯分布(图 5A); 空载 EBV 抗原肽 DC-CIK 共培养后, 有几个家族表达增高, 呈多克隆的表达(图 5B); 负载 EBV 抗原肽的 DC-CIK 共培养后, 基因扫描结果显示, 在 TCRβ 5.2 家族出现表达增强和聚集趋势, 出现单克隆表达峰, 而其他基因家族表达明显减弱甚至消失(图 5C)。

2.5 DC-CIK 细胞群 IFN-γ 的分泌水平

以 ELISA 法检测 DC-CIK 细胞群 IFN-γ 的分泌

水平,结果(图6)显示,以 CIK:DC 为10:1 时为例, IFN- γ 的分泌在负荷肽的 CIK 和负荷肽的 DC 共培养时最为显著,明显高于和不加肽 DC 共培养时 [(1 332.6 \pm 92.38) vs (693.42 \pm 62.41) pg/ml, $P < 0.05$],说明 CIK 可以识别负荷抗原肽的 DC;同时,均不负荷肽的 DC 和 CIK 共培养,以及负荷肽的 DC 和不负荷肽的 CIK 共培养,两种细胞群的 IFN- γ 分泌水平无差别 [(677.20 \pm 49.21) vs (702.46 \pm 57.21) pg/ml, $P > 0.05$]。综合以上结果,表明在 DC-CIK 的培养过程中,加入抗原肽可以提高 CIK 细胞 IFN- γ 的分泌,IFN- γ 的分泌具有抗原特异性。

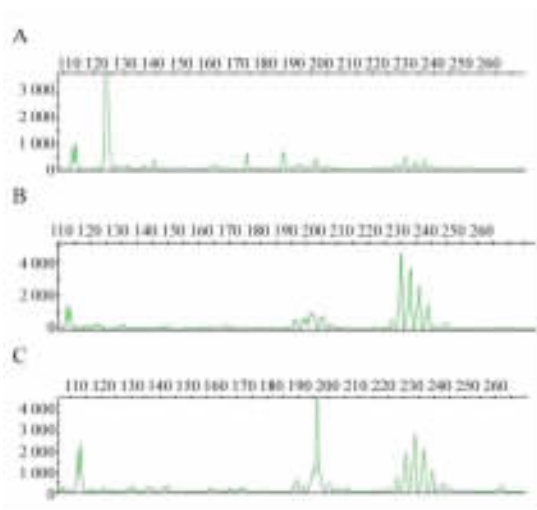


图5 DC-CIK 共培养前后 TCR β 家族的基因谱

Fig. 5 TCR β genealogy before and after DC-CIK co-culture

A: Before co-culture; B: After co-culture without peptide;
C: After DC-CIK co-culture with peptide

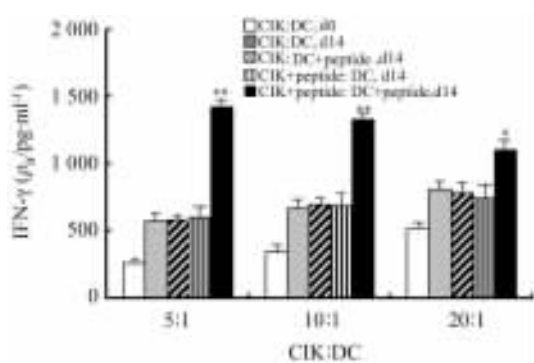


图6 不同细胞比例 DC-CIK 培养前后上清中 IFN- γ 的水平

Fig. 6 IFN- γ levels in supernatants in different groups before and after DC-CIK co-culture at different cell ratios

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs other groups

3 讨论

移植后淋巴细胞增殖症是一种严重的移植相关并发症,与 EBV 感染有直接关系,病情进展迅速,目前尚无有效药物治疗,可以在短时间内造成患者的死亡^[14]。应用 EBV 抗原刺激特异性的 CTL 细胞是目前研究较多的细胞免疫疗法,被应用于 EBV 病毒感染相关的肿瘤和移植并发症。但是 CTL 细胞的体外培养时间较长、一般克隆性的 CTL 增殖需要 3~4 轮的抗原刺激,时间 3~4 周,细胞数较少,不能满足临床上患者抢救治疗的需要^[7-10]。本研究应用 2 例造血干细胞移植术后 EBV 感染导致 PTLD 患者的外周血单个核细胞为研究对象,在体外培养 DC,负载 EBV 抗原肽;同时体外刺激 CIK 在较短时间内大量增殖,探索以 DC-CIK 治疗 EBV 感染相关疾病的细胞免疫治疗新方法。

DC 作为体内唯一能活化初始 T 细胞的抗原提呈细胞,是一个理想的生物免疫佐剂和肿瘤抗原载体^[12-15]。外周血来源的 DC 是目前公认获得成熟 DC 的最佳途径,经典培养 DC 的细胞因子组合是 GM-CSF 和 IL-4。细胞因子的配伍以及细胞因子加入的时间和顺序对 DC 的诱导具有重要的影响。本研究以 EBV 感染致 PTLD 患者的外周血单个核细胞为细胞来源,经过 GM-CSF 1 000 IU/ml、IL-4 1 000 IU/ml 刺激培养后,加入 TNF- α 1 000 IU/ml、IFN- α 1 000 IU/ml、IL-6 10 ng/ml、PGE2 1 μ m/ml、IL-1 β 10 ng/ml 诱导 DC,能够有效刺激 DC 的分化和活化,使 DC 的活化免疫表型 HLA-DR⁺ CD86⁺ 表达从培养前的 12.5% 增加到 91.17%。CIK 细胞表面既有 T 细胞表面标志(CD3),也有 NK 细胞表面标志(CD56),因而兼有 T 淋巴细胞的抗瘤活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤的特点^[16-18]。DC 细胞和 CIK 细胞的共培养有可能使肿瘤抗原被 DC 细胞摄取、处理,和相应的 HLA-I、或 HLA-II 分子结合,提呈于 DC 细胞的表面,为进一步诱导特异性 T 淋巴细胞抗肿瘤免疫反应提供基础。成熟的 DC 自身可分泌高水平的 IL-2、IL-12 和 IFN- α 等细胞因子,因此与 CIK 细胞共培养后可提高 CIK 的增殖活性和细胞毒作用。

为了获得能够杀伤 EBV 感染细胞的效应免疫细胞,本研究选取了 EBV 相关的抗原肽 LMP2,这些抗原肽是针对多种 HLA 分型的混合抗原肽,包括了最常见 HLA 分型,减少了不同患者 HLA 分型不同识别抗原肽不同的障碍。本研究使用的混合 EBV 抗原肽经过 DC 细胞的处理和提呈,可以刺激

识别 EBV 抗原肽的 T 淋巴细胞增殖。实验证实,以负荷和未负荷抗原肽的 DC 分别刺激 CIK 细胞增殖,虽然细胞数目没有差异,但是 IFN- γ 的分泌水平有显著的差异,这些差异是抗原特异性的。

效应细胞大量扩增是提高细胞免疫治疗疗效的保证。本研究应用多种细胞因子在体外扩增 CIK 细胞:IL-7 在维持 T 细胞内环境稳定和保持免疫记忆中起着一定作用,并且对于 T 细胞的成熟和增值有重要意义;IL-15 可以刺激 PHA 活化的外周血 T 细胞增殖,刺激活化的 B 细胞分泌抗体,促进 NK 细胞增殖和分泌细胞因子、增强 NK 细胞的细胞毒活性;IL-2 和 IL-12 对 CIK 细胞有促增殖作用,且 IL-12 能使 CIK 细胞群中含有高比例的对杀瘤活性起重要作用的 CD56⁺ 细胞^[20-22]。

本研究选取 2 例造血干细胞移植后 EBV 感染致 PTLN 患者,抽取少量外周血进行体外 DC 及 CIK 的培养,试图以最佳培养方案使之产生特异性克隆,产生特异性杀伤效应。经过摸索,本课题确立了一整套细胞培养方法。在 DC 的培养上,本课题采取 48 h 培养方案,在合理使用各种细胞因子刺激的基础上,快速地培养出成熟的 DC。区别于传统的外周血 DC 7~9 d 的培养方案。在 CIK 细胞的培养上,采用 14 d 培养法,确立了各种细胞因子不同的加入顺序。实验证实,与空载的 DC-CIK 细胞组比较,负载 EBV 抗原肽组的 DC-CIK 细胞 IFN- γ 分泌能力有较大提高,获得的效应细胞具有抗原特异性。此外应用基因扫描仪,对 DC-CIK 共培养得到的 *TCRB* 的 24 个家族基因的克隆性进行分析,培养前峰型呈寡克隆型,培养后在某一家族出现表达增强和聚集趋势,出现单克隆表达峰,提示培养得到的 T 细胞具有克隆性增殖特性,为体外分离抗原特异性的单克隆效应细胞提供可能。以上实验结果为今后临床上体外共培养 DC-CIK 和提高 CIK 的肿瘤杀伤活性提供了可借鉴的资料。

[参 考 文 献]

[1] Everly MJ, Bloom RD, Tsai DE, Trofe J. Post-transplant lymphoproliferative disorder [J]. *Ann Pharmacother*, 2007, 41(11): 1850-1858.

[2] Sundin M, Le Blanc K, Ringdén O, Barkholt L, Omazic B, Lergin C. The role of HLA mismatch, splenectomy and recipient Epstein-Barr virus seronegativity as risk factors in post-transplant lymphoproliferative disorder following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Haematologica*, 2006, 91(8): 1059-1067.

[3] Styczynski J, Einsele H, Gil L, Ljungman P. Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoprolifera-

tive disorder in hematopoietic stem cell recipients: A comprehensive review of reported cases [J]. *Transpl Infect Dis*, 2009, 11(5): 383-392.

[4] Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: Lessons from Epstein-Barr virus [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25(2): 587-617.

[5] Cohen JI, Bollard CM, Khanna R, Pittaluga S. Current understanding of the role of Epstein-Barr virus in lymphomagenesis and therapeutic approaches to EBV-associated lymphomas [J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(Suppl 1): 27-34.

[6] Khanna R, Moss D, Gandhi M. Technology insight: Applications of emerging immunotherapeutic strategies for Epstein-Barr virus-associated malignancies [J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005, 2(3): 138-149.

[7] Liu Z, Savoldo B, Huls H, Lopez T, Gee A, Wilson J, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the prevention and treatment of EBV-associated post-transplant lymphomas [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2002, 159(1): 123-133.

[8] Lucas KG, Salzman D, Garcia A, Sun Q. Adoptive immunotherapy with allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T-lymphocytes for recurrent, EBV-positive Hodgkin disease [J]. *Cancer*, 2004, 100(9): 1892-1901.

[9] Metes D, Storkus W, Zeevi A, Patterson K, Logar A, Rowe D. *Ex vivo* generation of effective Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes from the peripheral blood of immunocompetent Epstein-Barr virus-seronegative individuals [J]. *Transplantation*, 2000, 70(10): 1507-1515.

[10] Savoldo B, Goss JA, Hammer MM, Zhang L, Lopez T, Gee AP. Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) [J]. *Blood*, 2006, 108(9): 2942-2949.

[11] Savoldo B, Rooney CM, Quiros-Tejeira RE, Caldwell Y, Wagner HJ, Lee T. Cellular immunity to Epstein-Barr virus in liver transplant recipients treated with rituximab for post-transplant lymphoproliferative disease [J]. *Am J Transplant*, 2005, 5(3): 566-572.

[12] Dallal RM, Lotze MT. The dendritic cell and human cancer vaccines [J]. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12(2): 583-588.

[13] Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, et al. Dendritic cells as vectors for therapy [J]. *Cell*, 2001, 10(1): 271-274.

[14] Adema GJ. Dendritic cells from bench to bedside and back [J]. *Immunol Lett*, 2009, 122(2): 128-130.

[15] den Brok MH, Nierkens S, Figdor CG, Ruers TJ, Adema GJ. Dendritic cells: Tools and targets for antitumor vaccination [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2005, 4(5): 699-710.

[16] Petvises S, Pakakasama S, Wongkajornsilp A, Sirireung S, Panthangkool W, Hongeng S. *Ex vivo* generation of cytokine-induced killer cells (CD3⁺ CD56⁺) from post-stem cell transplant pediatric patients against autologous-Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines [J]. *Pediatr Transplant*, 2007, 11(5): 511-517.

- [17] Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(9): 1457-1462.
- [18] Linn YC, Lau SK, Liu BH, Ng LH, Yong HX, Hui KM. Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell [J]. *Immunology*, 2009, 126(3): 423-435.
- [19] Han S, Huang Y, Liang Y, Ho Y, Wang Y, Chang LJ. Phenotype and functional evaluation of *ex vivo* generated antigen-specific immune effector cells with potential for therapeutic applications [J]. *J Hematol Oncol*, 2009, 6(2): 34.
- [20] Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(11): 1191-1198.
- [21] Zoll B, Lefterova P, Ebert O, Huhn D, von Ruecker A, Schmidt-Wolf IG. Modulation of cell surface markers on NK like T lymphocytes by using IL-2, IL-7 or IL-12 *in vitro* stimulation [J]. *Cytokine*, 2000, 12(2): 1385-1390.
- [22] Chen HW, Liao CH, Ying C, Chang CJ, Lin CM. *Ex vivo* expansion of dendritic-cell-activated antigen-specific CD4⁺ T cells with anti-CD3/CD28, interleukin-7, and interleukin-15: Potential for adoptive T cell immunotherapy [J]. *Clin Immunol*, 2006, 119(1): 21-31.
- [收稿日期] 2010-02-22 [修回日期] 2010-04-16
[本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

Ca²⁺ 受体蛋白激酶介导非典型性固有免疫反应

微生物感染之后,固有免疫反应是机体免疫系统中最先被诱导产生的防御反应。不论动物还是植物,细菌鞭毛、核酸等不同病原微生物相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)或者(microbe-associated molecular pattern, MAMP)被识别后,细胞内的信号通路逐渐收敛,汇聚到包括 MAPK 级联信号在内的通用转录因子上,从而激发免疫反应。长期以来, Ca²⁺ 被认为是植物抵抗病原反应中关键的一种初级调节因子,但是 Ca²⁺ 信号如何被识别,如何参与到 MAMP 信号中的机制还不清楚。2010 年 3 月 18 日出版的 *Nature* 刊登了一篇关于 Ca²⁺ 受体蛋白激酶介导非典型性固有免疫反应新途径的论文。

作者首先通过体外激酶实验证明,作为拟南芥 fls2 受体配体的一种包含 22 个氨基酸肽段的细菌鞭毛组分 flg22,能够诱导植物细胞中三大 Ca²⁺ 受体之一的 Ca²⁺ 依赖蛋白激酶(Calcium-dependent protein kinases, CDPKs)的瞬时活化。此外,报告基因结果提示,以 flg22 诱导的早期功能基因 NHL10 的表达需要 CDPKs 的参与。在拟南芥中 CDPKs 家族包含 34 个成员,并不是所有的 CDPKs 家族成员都在拟南芥的叶中有表达;真正参与 flg22 诱导的 NHL10 基因表达的 CDPKs 只有 CDPK3、4、5、6、11 和 26。在进化过程中 CDPK4、5、6、11 有较多的同源性,属于同一亚家族,而且 CDPK4 和 11、CDPK5 和 6 是两对高度同源的基因。作者通过基因芯片检测了过表达组成性活化的 CDPK5 或者 CDPK11 的叶肉原生质体的基因表达,并与各种植物模式识别受体配体刺激或者病毒细菌感染的植株进行比较,发现大多数(244 种基因中的 171 种)CDPK5 和 CDPK11 早期诱导表达的基因同时也是 flg22 信号早期调控基因,这些基因中大部分都参与调控了植物防御相关代谢产物、细胞壁和氧化还原反应信号。进一步对基因芯片结果的分析发现,在 flg22 调控的早期基因中存在 4 种调控模式:以 FRK1 为代表的 MAPK 特异性调控基因;以 PHI-1 为代表的 CDPK 异性调控基因;以 NHL10 和 PER62 为代表的 CDPK-MAPK 协同调控基因以及以 WAK2 和 FOX 为代表的 MAPK 主导的 CDPK-MAPK 协同调控基因。为了充分说明 CDPKs 在 flg22 信号通路中的作用,作者通过 T-DNA 插入 CDPK5、6 和 11 的基因组序列技术分别得到了上述 3 中 CDPK 的单独无效突变株;同时,利用病毒诱导的基因沉默技术将 CDPK4 特异性地进行基因沉默得到 CDPK4 无效突变株。然后通过各单独 CDPK 无效株之间的基因组杂交,得到多个 CDPK 同时沉默的高阶突变株。在不同 CDPK 家族成员的单个无效突变株中,细菌感染后的 ROS 产生量以及细菌的 4 d 清除率都没有明显变化,提示了 CDPK 家族成员在体内功能上具有冗余性。然而,对于多个 CDPK 成员沉默的高阶突变株,细菌感染后的 ROS 产生量以及细菌的 4 天清除率和野生株相比都明显减少或降低。为了验证 CDPK 与 MAPK 通路之间的联系,作者在 CDPK 沉默的突变株中利用体外激酶实验检测了 MAPK 级联通路中 MPK3/6 的活性,CDPK 发现的缺失并不影响 MAPK 信号通路的活化,说明在 flg22 诱导的 CDPK 和 MAPK 这两条信号通路之间并不存在相互调控的关系。以前的报道认为,植物防御反应中,钙调蛋白和一种钙调蛋白活化的转录因子 MLO 发挥负向调控作用。本文的观点与之不同,认为特异性的 CDPKs 家族成员在植物早期的 MAMP 信号通路中发挥了关键的正向调控作用,揭示了 Ca²⁺ 信号通路的复杂性。

[姚 鸣 摘译, 李 楠 审阅. Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, Sheen J, et al. *Nature*, 2010, 464(18): 418-423]