

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.04.004

## IFN- $\alpha$ 联合 GM-CSF 诱导胃癌患者外周血单个核细胞分化为树突状细胞

牛超, 许建婷, 徐东升, 李薇, 崔久冕, 金浩范( 吉林大学第一医院 肿瘤中心, 吉林 长春 130021 )

**[摘要]** **目的:** 探索干扰素- $\alpha$  (interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ) 联合粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 体外诱导胃癌患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 向树突状细胞 (dendritic cell, DC) 分化的可能性。**方法:** 10 例胃癌患者 PBMC 分别用 GM-CSF 100 ng/ml 联合 IFN- $\alpha$  500 IU/ml (命名为 IFN- $\alpha$  DC) 或 GM-CSF 100 ng/ml 联合 50 ng/ml IL-4 (命名为 IL-4 DC) 体外培养, 然后用 CD40L/LPS 诱导 DC 成熟。Giemsa 染色法观察 IFN- $\alpha$  DC 和 IL-4 DC 的形态, 流式细胞术分析 IFN- $\alpha$  DC 和 IL-4 DC 表面 CD1a、CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 的表达情况, 同种异体混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reaction, MLR) 检测不同的成熟 DC 刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖的能力。**结果:** IFN- $\alpha$  DC 和 IL-4 DC 均呈现典型 DC 形态。IFN- $\alpha$  DC 和 IL-4 DC 分别在诱导第 3 天和第 5 天时, 细胞表面 CD1a、CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 表达达到较高水平, 成熟 IFN- $\alpha$  DC 表面 CD83 [ (78.25  $\pm$  15.36) % vs (50.14  $\pm$  10.24) % ,  $P < 0.05$  ] 和 CD86 [ (84.84  $\pm$  10.12) % vs (62.93  $\pm$  15.12) % ,  $P < 0.05$  ] 的表达均高于成熟 IL-4 DC。成熟 IFN- $\alpha$  DC 刺激异体 T 淋巴细胞增殖能力强于未成熟 IFN- $\alpha$  DC ( $P < 0.05$ )。在 DC 与 T 细胞数量比为 1:40 和 1:20 时, 成熟 IFN- $\alpha$  DC 刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖的能力明显强于成熟 IL-4 DC [ (39.43  $\pm$  9.21) % vs (27.34  $\pm$  10.63) % , (60.31  $\pm$  7.86) % vs (48.63  $\pm$  6.25) % ; 均  $P < 0.05$  ]。**结论:** 相比常用的 IL-4 联合 GM-CSF 诱导方法, IFN- $\alpha$  联合 GM-CSF 可以在更短时间内将胃癌患者 PBMC 诱导成具有更强刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖能力的 DC 细胞, 这可能与其表面 CD83 和 CD86 表达增高有关。

**[关键词]** 树突状细胞; 干扰素- $\alpha$ ; 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; IL-4; 胃癌

**[中图分类号]** R392.12; R735.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)04-0404-05

## Dendritic cells induced by IFN- $\alpha$ combined with GM-CSF from peripheral blood mononuclear cells of gastric cancer patients

Niu Chao, Xu Jianting, Xu Dongsheng, Li Wei, Cui Jiwei, Jin Haofan (Cancer Center, First Hospital Affiliated to Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the possibility of inducing dendritic cells (DCs) by interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in gastric cancer patients. **Methods:** PBMCs from 10 gastric cancer patients were cultivated using granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 100 ng/ml combined with IFN- $\alpha$  500 IU/ml (named IFN- $\alpha$  DC) or IL-4 50 ng/ml (named IL-4 DCs) and then CD40L and LPS were added to induce DC maturation. The morphologic features of IFN- $\alpha$  DCs and IL-4 DCs were observed by Giemsa staining. The expressions of CD1a, CD80, CD83, CD86 and HLA-DR on the surface of IFN- $\alpha$  DCs and IL-4 DCs were assayed by flow cytometry. The abilities of IFN- $\alpha$  DCs and IL-4 DCs to induce the proliferation of allogeneic T cells were determined by mixed lymphocyte reaction (MLR). **Results:** Both IFN- $\alpha$  DCs and IL-4 DCs displayed typical DC features in morphology. The expressions of CD1a, CD80, CD83, CD86 and HLA-DR in IFN- $\alpha$  DCs and IL-4 DCs were achieved at high levels at 3 d and 5 d after induced. Mature IFN- $\alpha$  DCs expressed a higher value of CD83 [ (78.25  $\pm$  15.36) % vs (50.14  $\pm$  10.24) % ,  $P < 0.05$  ] and CD86 [ (84.84  $\pm$

**[基金项目]** 吉林省科技厅国际合作项目资助 (No. 20100749), 吉林省科技厅双十工程重大科技攻关项目资助 (No. 11ZDGG003)。Project supported by the International Cooperation Projects of Science and Technology Bureau of Jilin Province (No. 20100749), and the Major Scientific Research Projects of Double Tenth Engineering of Science and Technology Bureau of Jinlin Province (No. 11ZDGG003)

**[作者简介]** 牛超 (1983 - ), 男, 吉林省长春市人, 硕士, 主要从事肿瘤免疫细胞治疗的基础研究。E-mail: niuchao1983@163.com

**[通信作者]** 金浩范 (Jin Haofan, corresponding author), E-mail: kinhf1968@hotmail.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130722.1256.005.htm>

10.12% vs [ 62.93  $\pm$  15.12 ]%,  $P < 0.05$ ) than mature IL-4 DCs. Mature IFN- $\alpha$  DCs was stronger than immature IFN- $\alpha$  DCs on the ability to induce proliferation of allogeneic T cells ( $P < 0.05$ ). At the ratios of DCs: T cell being 1:40 and 1:20, mature IFN- $\alpha$  DCs had a stronger ability to induce proliferation of allogeneic T cells than did mature IL-4 DCs ([ 39.43  $\pm$  9.21 ]% vs [ 27.34  $\pm$  10.63 ]%,  $P < 0.05$ ; [ 60.31  $\pm$  7.86 ]% vs [ 48.63  $\pm$  6.25 ]%,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** IFN- $\alpha$  combined with GM-CSF can induce the differentiation of DCs from PBMCs of gastric cancer patients, which have a shorter culture period and stronger ability to induce the proliferation of allogeneic T cells than traditional DCs induced by IL-4 and GM-CSF. It may result from the up-regulation of CD83 and CD86 expressions on IFN- $\alpha$  DCs.

[ **Key words** ] dendritic cell; interferon- $\alpha$ ; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL-4; gastric cancer

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(4): 404-408 ]

肿瘤已成为 21 世纪严重威胁人类健康的重大疾病,患者免疫系统对肿瘤的耐受是肿瘤发生、发展的重要原因。树突状细胞(dendritic cell, DC)是人体内功能最强的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC),它能够调节机体免疫反应,启动细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)对肿瘤细胞的特异性杀伤作用<sup>[1-2]</sup>。现有研究<sup>[3]</sup>表明,许多肿瘤患者体内 DC 处于功能失调状态,不能很好地识别肿瘤细胞,因而无法有效启动机体针对肿瘤的杀伤。DC 体外诱导技术能够恢复 DC 的功能,将其回输体内可以增强患者免疫系统的抗肿瘤功能。目前,临床上多使用 IL-4 联合粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)体外诱导 DC,本研究探索使用干扰素- $\alpha$ (interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ )联合 GM-CSF 体外诱导胃癌患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)向 DC 转化的可能性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对象及主要试剂

胃癌术后患者 10 例,中位年龄 55 岁(42 ~ 75 岁),男女各 5 例。淋巴细胞分离液(比重 1.077  $\pm$  0.002 g/ml, pH = 6.5 ~ 7.5)购自上海试剂二厂,单克隆抗体 CD1a-PE、CD80-PE、CD83-APC、CD86-PE-CY5 和 HLA-DR-APC 均购自美国 BD 公司, RPMI 1640 培养液和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, IFN- $\alpha$  购自美国 Peprotech 公司, rhGM-CSF 购自美国 Shering-Plough 公司, IL-4 购自德国 Meltenyi 公司, CD40L 购自美国 R&D Systems 公司, LPS 购自美国 Sigma 公司。CellTrace™ CFSE cell proliferation kit 购自美国 Invitrogen 公司, Diff-Quik™ 染色试剂盒购自德国 SIEMENS 公司。

### 1.2 GM-CSF 联合 IFN- $\alpha$ 或 IL-4 体外诱导 DC 分化

抽取胃癌患者外周抗凝血 50 ml,经淋巴细胞分离液分离 PBMC,用 RPMI 1640 培养液调整细胞密

度为  $3 \times 10^6$  个/ml,接种于 6 孔板中,每孔 3 ml, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 2 h 后,去除未贴壁的细胞。GM-CSF 联合 IFN- $\alpha$  诱导 DC 组(IFN- $\alpha$  DC)加入含有 rhGM-CSF 100 ng/ml、IFN- $\alpha$  500 IU/ml 和 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液;GM-CSF 联合 IL-4 诱导 DC 组(IL-4 DC)加入 rhGM-CSF 100 ng/ml、IL-4 50 ng/ml 和 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,两组均于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。第 3 天, INF- $\alpha$  DC 组部分孔中加入 CD40L 20 ng/ml 和 LPS 2.5 EU/ml 诱导 DC 成熟,24 h 后收集细胞。第 5 天, INF- $\alpha$  DC 组剩余孔和 IL-4 DC 组加入 CD40L 和 LPS (浓度同第 3 天)诱导 DC 成熟,24 h 后收集细胞。

### 1.3 Giemsa 染色观察诱导后 DC 的形态特征

收集成熟的 IFN- $\alpha$  DC 和 IL-4 DC 以及单核细胞,调整细胞密度为  $2.5 \times 10^5$  个/ml,用细胞离心涂片器  $40 \times g$  离心 5 min 甩片,待载玻片完全干燥后,使用 Diff-Quik™ 染色试剂盒进行 Giemsa 染色(按说明书操作)。正置显微镜下,先用 40 倍物镜观察细胞,再使用油镜观察细胞。典型 DC 细胞形态为:细胞膜表面不光滑、有树突状突起,细胞核深染,细胞核居中或靠近细胞膜,细胞内有时可呈现空泡结构。

### 1.4 流式细胞术检测细胞表型

在培养第 3 天和第 5 天收集 IFN- $\alpha$  DC 和 IL-4 DC 细胞,分别与 CD1a、CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 荧光抗体在室温下孵育 10 min, PBS 洗涤 1 次后,用 BD Calibur 流式细胞仪进行检测,采用 Flowjo 7.1.3 软件分析实验数据。

### 1.5 混合淋巴细胞反应检测 IFN- $\alpha$ DC 刺激 T 细胞增殖的能力

将成熟 IFN- $\alpha$  DC、未成熟 IFN- $\alpha$  DC 或同一患者的 PBMC 分别与羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)标记的同种异体 T 淋巴细胞(健康志愿者外周血经尼龙毛柱孵育获得)进行同种异体混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)。IFN- $\alpha$

DC(或PBMC)与T细胞按1:80、1:40和1:20的数量比混合,对照组不加DC只加入同种异体T淋巴细胞。混合培养5d后,收集细胞,PBS洗涤1次,加入CD3荧光抗体在室温下孵育10min,PBS洗涤1次后,用BD Calibur流式细胞仪进行检测。采用Flowjo7.1.3软件分析CD3<sup>+</sup>T细胞密度降低情况,计算出T细胞的增殖比例。

1.6 混合淋巴细胞反应检测 IFN- $\alpha$  对 DC 刺激 T 细胞增殖能力的影响

实验组将成熟 IFN- $\alpha$  DC 和 IL-4 DC 分别与 CFSE 标记的同种异体 T 细胞按照 1:20 和 1:40 的比例混合,对照组不加 DC 只加入同种异体 T 淋巴细胞,培养 5 d 后,收集细胞,PBS 洗涤 1 次,加入 CD3 荧光抗体在室温下孵育 10 min,PBS 洗涤 1 次后,用 BD Calibur 流式细胞仪进行检测。采用 Flowjo7.1.3 软件分析 CD3<sup>+</sup>T 细胞密度降低情况,获得 T 细胞的增殖比例。

1.7 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS13.0 软件分析,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体外诱导 DC 的生长特点与形态特征

胃癌患者 PBMC 贴壁后,细胞仍为圆形,细胞表面光滑,GM-CSF 联合 IFN- $\alpha$  或 IL-4 培养的第 1 天,两组中大部分细胞仍然贴壁,少部分细胞悬浮,光镜下可见诱导的细胞体积增大;第 3 天时,两组的大部分细胞表现为多形性,细胞表面不再光滑,部分细胞可见到有树状突起。经 LPS 和 CD40L 诱导成熟后,两组细胞表面有明显突起,均呈现典型的 DC 形态特征。Giemsa 染色结果(图 1)显示:单核细胞核居中,胞质内空泡少,细胞表面光滑;经 GM-CSF 联合 IFN- $\alpha$  或 IL-4 诱导培养后,细胞核靠近细胞膜,胞质内空泡增多,细胞膜变得不再光滑,有树突状突起,

两组 DC 细胞形态上未见明显差异,均符合 DC 的典型形态特征。

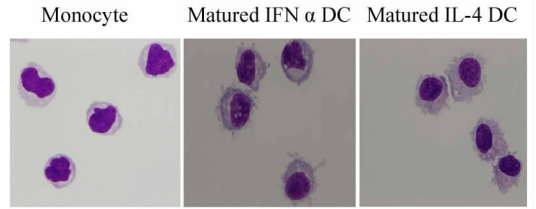


图 1 Giemsa 染色法观察单核细胞、成熟 IFN- $\alpha$  DC 和成熟 IL-4 DC 的形态特征(×1000)

Fig. 1 Morphological characteristics of monocyte mature IFN- $\alpha$  DC and mature IL-4 DC observed by Giemsa staining (×1000)

2.2 GM-CSF 联合 IFN- $\alpha$  或 IL-4 诱导后 DC 的表型

GM-CSF 联合 IFN- $\alpha$  组细胞表面 CD1a、CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 在培养第 3 天和第 5 天时表达无统计学差异,表明各种分子表达已经达到峰值,因此在第 3 天即开始诱导 DC 成熟。然而 GM-CSF 联合 IL-4 组在培养第 5 天时,细胞表面 CD80[(52.14 ± 16.44)% vs (18.21 ± 10.56)% ,  $P < 0.05$  ]、CD83 [(15.14 ± 6.89)% vs (8.21 ± 4.56)% ,  $P < 0.05$  ]和 CD86 [(32.14 ± 8.14)% vs (18.25 ± 7.69)% ,  $P < 0.05$  ]表达高于第 3 天,而 CD1a 和 HLA-DR 表达无明显差异,因此在第 5 天开始诱导成熟。

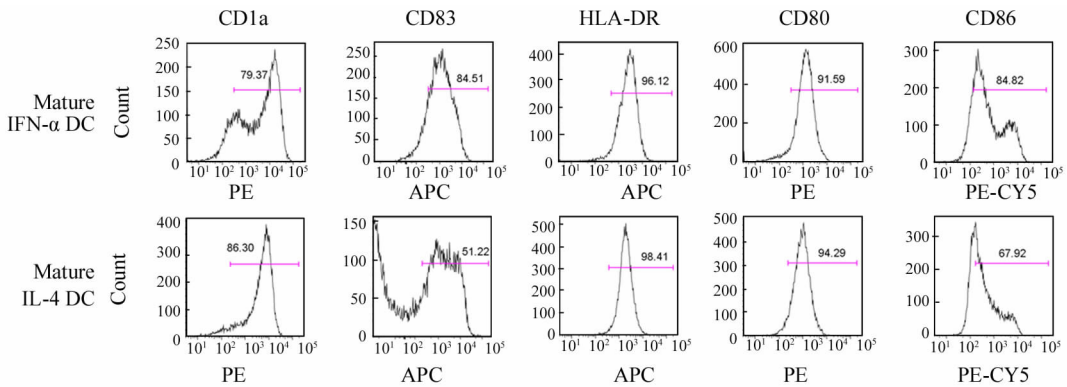
比较两组未成熟 DC 表面分子表达的情况(表 1)发现,未成熟 IFN- $\alpha$  DC 的 CD83 和共刺激分子 CD80、CD86 表达水平高于未成熟 IL-4 DC ( $P < 0.05$ )。两组成熟 DC 表面均高表达 CD1a、HLA-DR、CD80 和共刺激分子 CD83、CD86,其中 IFN- $\alpha$  DC 表面 CD83 和 CD86 表达水平高于 IL-4 DC ( $P < 0.05$ )。两组 DC 成熟前后除 CD1a 表达无明显差异外,CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 的表达均为成熟 DC 高于未成熟 DC ( $P < 0.05$ ) (表 1,图 2)。

表 1 IFN- $\alpha$  DC 和 IL-4 DC 的免疫表型(%)

Tab. 1 Immunophenotype of IFN- $\alpha$  DC and IL-4 DC(%)

Immunophenotype	IFN- $\alpha$ DC		IL-4 DC	
	Immature	Mature	Immature	Mature
CD1a	65.39 ± 18.46	69.46 ± 23.45	68.29 ± 19.36	71.27 ± 21.26
CD80	70.14 ± 15.37 <sup>△</sup>	85.36 ± 10.13	52.14 ± 16.44	82.14 ± 12.22
CD86	37.17 ± 11.21 <sup>△</sup>	84.84 ± 10.12 <sup>*</sup>	32.14 ± 8.12	62.93 ± 15.12
CD83	20.14 ± 12.15 <sup>△</sup>	78.25 ± 15.36 <sup>*</sup>	15.14 ± 6.89	50.14 ± 10.24
HLA-DR	75.19 ± 5.64	90.36 ± 5.69	76.27 ± 8.39	92.27 ± 6.37

<sup>△</sup>  $P < 0.05$  vs immature IL-4 DC group; <sup>\*</sup>  $P < 0.05$  vs mature IL-4 DC group

图2 成熟 IFN- $\alpha$  DC 与 IL-4 DC 免疫表型Fig. 2 Immunophenotype of mature IFN- $\alpha$  DC and IL-4 DC

### 2.3 成熟 IFN- $\alpha$ DC 增强异体 T 淋巴细胞增殖能力

随着 DC 比例的升高,成熟 IFN- $\alpha$  DC 刺激的 T 细胞增殖比例逐渐增加,但未成熟 IFN- $\alpha$  DC 刺激的 T 细胞增殖比例逐渐趋于稳定,单个核细胞刺激 T 细胞增殖比例未见明显变化(表 2)。在 DC 与 T 细胞数量比为 1:80 时,成熟 IFN- $\alpha$  DC 刺激 T 细胞增

殖比例高于未成熟 IFN- $\alpha$  DC 和单个核细胞 [(24.77  $\pm$  7.10)% vs (8.77  $\pm$  2.03)%、(3.27  $\pm$  0.69)%], 均  $P < 0.05$ 。说明相同条件下,刺激异体 T 淋巴细胞增殖能力由高到低依次为成熟 IFN- $\alpha$  DC、未成熟 IFN- $\alpha$  DC 和单个核细胞(均  $P < 0.05$ )。

表 2 IFN- $\alpha$  DC 和单个核细胞刺激异体 T 淋巴细胞增殖(%)Tab. 2 Proliferation of allogenic T cells induced by IFN- $\alpha$  DC or mononuclear cells(%)

Group	1:80	1:0	1:20
Mature IFN- $\alpha$ DC	24.77 $\pm$ 7.10 *	39.43 $\pm$ 9.21 *	60.31 $\pm$ 7.86 *
Immature IFN- $\alpha$ DC	8.77 $\pm$ 2.03 $\Delta$	19.90 $\pm$ 3.14 $\Delta$	21.87 $\pm$ 5.03 $\Delta$
Mononuclear cells	3.27 $\pm$ 0.69	5.06 $\pm$ 1.41	6.14 $\pm$ 1.69

\*  $P < 0.05$  vs immature IFN- $\alpha$  DC;  $\Delta P < 0.05$  vs mononuclear cells

### 2.4 IFN- $\alpha$ 培养增强 DC 刺激异体 T 淋巴细胞增殖能力

随着 DC 比例的升高,IFN- $\alpha$  DC 组与 IL-4 DC 组 DC 刺激的 T 细胞增殖的能力均逐渐增强。在 DC:T 细胞为 1:40 [(39.43  $\pm$  9.21)% vs (27.34  $\pm$  10.63)%],  $P < 0.05$  和 1:20 时 [(60.31  $\pm$  7.86)% vs (48.63  $\pm$  6.25)%],  $P < 0.05$  时,成熟 IFN- $\alpha$  DC 组的 T 细胞增殖均显著高于 IL-4 DC 组。结果说明,IFN- $\alpha$  DC 细胞刺激 T 细胞增殖的能力要明显强于 IL-4 DC 细胞。

## 3 讨论

世界卫生组织在 2006 年提出癌症是一类慢性疾病。癌症是机体内部环境紊乱的结果,因此治疗癌症应恢复机体内部环境的稳定,而过继细胞免疫治疗是目前认为有希望恢复机体平衡的有效治疗手

段<sup>[4-5]</sup>。DC 是人体内功能最强的抗原提呈细胞,能够诱导初始型 T 细胞向 CTL 细胞分化<sup>[6-7]</sup>,在抗原加工、处理及提呈中起重要作用<sup>[8-10]</sup>。DC 与肿瘤的发生、发展有密切关系,实体瘤内浸润 DC 数量多的患者大部分预后较好,这是 DC 作为免疫治疗手段的基础<sup>[11-13]</sup>。自 20 世纪 90 年代首次报道 DC 疫苗用于治疗 B 细胞淋巴瘤<sup>[14]</sup>以来,多项临床试验<sup>[15-17]</sup>结果显示,DC 疫苗在肿瘤的治疗中已经取得显著疗效,能够逆转肿瘤病人的免疫耐受状态,诱导肿瘤特异性免疫反应。仅 2011 年和 2012 年发表的进入 I、II 期临床试验的 DC 疫苗就有近 30 项,其中负载肿瘤抗原的类型有单一或复合的 TAA 多肽、肿瘤裂解物和凋亡的肿瘤细胞等,其治疗的肿瘤包括恶性黑色素瘤、多发性骨髓瘤、结肠癌、前列腺癌和胰腺癌等<sup>[18-20]</sup>。DC 疫苗能够诱导主动性免疫,刺激机体产生有效的免疫应答,预防肿瘤复发,且安全无毒

副作用, 这些优点使其成为理想肿瘤细胞疫苗的不二选择。

DC 疫苗制备的重要环节包括 DC 的培养与抗原负载, 其中 DC 前体细胞的来源与诱导至关重要。目前临床试验研究中的 DC 大多以 IL-4 联合 GM-CSF 诱导肿瘤患者 PBMC 获得<sup>[2]</sup>。本研究利用 IFN- $\alpha$  联合 GM-CSF 将肿瘤患者 PBMC 成功诱导成 DC, 诱导后的 DC 形态与 IL-4 DC 相同。未成熟 IFN- $\alpha$  DC 培养第 3 天时, 细胞表面 CD1a、CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 的表达已经达到峰值, 而未成熟 IL-4 DC 需要至第 5 天时才能够达到峰值, 说明 IFN- $\alpha$  DC 诱导时间明显短于 IL-4 DC。成熟 IFN- $\alpha$  DC 表面 CD1a、CD80 和 HLA-DR 的表达与成熟 IL-4 DC 基本一致, 而 CD83 和 CD86 的表达要高于成熟 IL-4 DC。CD83 和 CD86 是 DC 细胞激活 T 细胞的共刺激分子, 其高表达有利于 T 细胞反应的发生。本研究中, 成熟 IFN- $\alpha$  DC 刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖的作用强于成熟 IL-4 DC, 可能与细胞表面共刺激分子 CD83 和 CD86 高表达有关。因此可以推断成熟 IFN- $\alpha$  DC 较成熟 IL-4 DC 在激活 T 细胞反应方面的效果更佳, MLR 实验结果也证明了这一观点。

由于 IFN- $\alpha$  和 GM-CSF 均是临床常用的药物, 本研究成功利用 IFN- $\alpha$  和 GM-CSF 将肿瘤患者 PBMC 诱导出具有显著功能的 DC, 其优点有: (1) 诱导时间短, 能更加及时地用于临床治疗; 加速 DC 疫苗生产周期, 降低 DC 疫苗生产成本, 更利于 DC 疫苗的制备。(2) 共刺激分子表达高, 有利于 DC 激起体内特异性 T 细胞发生免疫应答, 能够提高 DC 疫苗治疗的疗效, 但具体临床疗效仍有待于进一步试验证实。总之, 本研究建立了一种体外诱导 DC 的新方法, 为 DC 的进一步临床应用奠定了基础。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Radford KJ, Caminschi I. New generation of dendritic cell vaccines [ J ]. Hum Vaccin Immunother, 2013, 9( 2 ) [ Epub ahead of print ].

[ 2 ] Cintolo JA, Datta J, Mathew SJ, et al. Dendritic cell-based vaccines: Barriers and opportunities [ J ]. Future Oncol, 2012, 8( 10 ): 1273-1299.

[ 3 ] Mantia-Smaldone GM, Chu CS. A review of dendritic cell therapy for cancer: Progress and challenges [ J ]. BioDrugs, 2013 [ Epub ahead of print ].

[ 4 ] Kalinski P, Muthuswamy R, Urban J. Dendritic cells in cancer immunotherapy: Vaccines and combination immunotherapies [ J ]. Expert Rev Vaccines, 2013, 12( 3 ): 285-295.

[ 5 ] Gattinoni L, Powell DJ, Rosenberg SA, et al. Adoptive immunotherapy for cancer: Building on success [ J ]. Nat Rev Immunol, 2006, 6( 5 ): 383-393.

[ 6 ] Koido S, Homma S, Okamoto M, et al. Combined TLR2/4-activated dendritic/tumor cell fusions induce augmented cytotoxic T lymphocytes [ J ]. PLoS One, 2013, 8( 3 ): e59280.

[ 7 ] Cui H, Zhang W, Hu W, et al. Recombinant mammaglobin a adenovirus-infected dendritic cells induce mammaglobin a-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes against breast cancer cells *in vitro* [ J ]. PLoS One, 2013, 8( 5 ): e63055.

[ 8 ] Kalantari T, Kamali-Sarvestani E, Ciric B, et al. Generation of immunogenic and tolerogenic clinical-grade dendritic cells [ J ]. Immunol Res, 2011, 51( 2/3 ): 153-160.

[ 9 ] Dong R, Moulding D, Himoudi N, et al. Cells with dendritic cell morphology and immunophenotype, binuclear morphology, and immunosuppressive function in dendritic cell cultures [ J ]. Cell Immunol, 2011, 272( 1 ): 1-10.

[ 10 ] Dubsky P, Saito H, Leogier M, et al. IL-15-induced human DC efficiently prime melanoma-specific naive CD8<sup>+</sup> T cells to differentiate into CTL [ J ]. Eur J Immunol, 2007, 37( 6 ): 1678-1690.

[ 11 ] Tada F, Abe M, Hirooka M, et al. Phase I/II study of immunotherapy using tumor antigen-pulsed dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma [ J ]. Int J Oncol, 2012, 41( 5 ): 1601-1609.

[ 12 ] Oshita C, Takikawa M, Kume A, et al. Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: Phase II clinical trial [ J ]. Oncol Rep, 2012, 28( 4 ): 1131-1138.

[ 13 ] Alfaro C, Perez-Gracia JL, Suarez N, et al. Pilot clinical trial of type 1 dendritic cells loaded with autologous tumor lysates combined with GM-CSF, pegylated IFN, and cyclophosphamide for metastatic cancer patients [ J ]. J Immunol, 2011, 187( 11 ): 6130-6142.

[ 14 ] Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells [ J ]. Nat Med, 1996, 2( 1 ): 52-58.

[ 15 ] Galluzzi L, Senovilla L, Vacchelli E, et al. Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy [ J ]. Oncoimmunology, 2012, 1( 7 ): 1111-1134.

[ 16 ] Zimmer A, Bouley J, Le Mignon M, et al. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy [ J ]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129( 4 ): 1020-1030.

[ 17 ] Hong S, Li H, Qian J, et al. Optimizing dendritic cell vaccine for immunotherapy in multiple myeloma: Tumour lysates are more potent tumour antigens than idiotype protein to promote anti-tumour immunity [ J ]. Clin Exp Immunol, 2012, 170( 2 ): 167-177.

[ 18 ] Engell-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, et al. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: Assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters [ J ]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58( 1 ): 1-14.

[ 19 ] Ridgway D. The first 1000 dendritic cell vaccinees [ J ]. Cancer Invest, 2003, 21( 6 ): 873-886.

[ 20 ] Andoh Y, Makino N, Yamakawa M. Dendritic cells fused with different pancreatic carcinoma cells induce different T-cell responses [ J ]. Onco Targets Ther, 2013, 6: 29-40.

[ 收稿日期 ] 2013-02-13

[ 修回日期 ] 2013-05-09

[ 本文编辑 ] 黄静怡