

临床级树突状细胞的分离和培养

王 坤^{1,2} ,吴一龙² * ,周 清^{1,2} ,林嘉颖² ,徐崇锐^{1,2} ,杨学宁²

Large-scale Generation of Mature Clinical Grade Dendritic Cells

WANGKun^{1,2} ,WUYi -long² ,ZHOUQin g^{1,2} ,LINJia -ying² ,XUCHON g-rui^{1,2} ,YANGXue -ning²

1. 3rd Hospital affiliated of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Lung Cancer Research Institute & Cancer Center, Guangdong Provincial People's Hospital (* Correspond author)

Abstract: Objective To study the method for generation of large-scale matured dendritic cells from non-proliferating progenitors in patient's blood. **Methods** The procedure uses 5% AB human plasma in the place of 10% fetal calf serum and involves two steps. The first step is to work on a 5 ~ 7-day culture of plastic-adherent blood monocytes in medium supplemented with rhGM-CSF and rhIL-4. The second step is to expand the monocyte-conditioned medium mimicking TNF- α . **Results** There was no significant difference observed in dendritic cells yield and purity when 5% AB human plasma replaced 10% fetal calf serum. Dendritic cells expressed CD83 $^{+}$ and CD86 $^{+}$ and had a higher percentage of CD45 $^{+}$ and CD11b $^{+}$. **Conclusion** We suggest that these matured dendritic cells will be effective in vivo as adjuvant for active immunotherapy.

Keywords: Dendritic Cell; Monocyte Conditioned Medium Mimic; Mature Regulation; Immunotherapy

摘要: 目的 探讨从患者外周血树突状细胞前体培养足够数量的树突状细胞及调控其成熟的方法。
方法 完全培养基用 5% 人 AB 型血浆代替 10% 胎牛血清, 培养过程分两阶段, 第一阶段: 从患者外周血分离出能黏附塑料的单核细胞, 在 GM-CSF+IL-4 存在条件下培养 5~7d; 第二阶段, 加入模拟单核细胞条件性培养液或 TNF- α 促进树突状细胞分化成熟。
结果 5% 人 AB 型血浆代替 10% 胎牛血清后, 在树突状细胞的获得率和纯度方面无统计学差异, 模拟单核细胞条件性培养液使树突状细胞表达更高比例的成熟标志 CD83 $^{+}$, 具有更强的刺激 T 细胞的能力。
结论 通过以上方法培养的成熟树突状细胞将能有效地应用于临床免疫治疗。

关键词: 树突状细胞; 模拟单核细胞条件培养液; 成熟调控; 免疫治疗

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2004) 08-0458-03

0 引言

树突状细胞 (Dendritic cell, DC) 是人体内功能最强, 也是体内唯一能活化静息 T 细胞的抗原递呈细胞。近年来国内外研究表明, DC 在体外和体内都能诱导细胞毒性 T 淋巴细胞发挥特异性肿瘤杀伤作用, 成熟的 DC 是激发免疫反应的关键。但由于体内 DC 含量少, 难以满足临床应用的需要, 因此获得大量成熟的 DC 是临床应用的基础。本实验研究了从患者外周血树突状细胞前体培养足够数量的 DC 及调控其成熟的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂 培养基 RPMI-1640 购自 Gibco 公司; 细胞因子人重组 IL-4、GM-CSF、IL-2、IL-1、PGE2、IL-6 及 TNF- α 购自 PeproTechEC 公司。荧光抗体: PE 标记的鼠抗人 CD14 单抗、CD83 单抗、HLA-DR 单抗、FITC 标记的鼠抗人 CD86 单抗、CD40 单抗、HLA-A、B、C 单抗及羊抗鼠二抗购自 Pharmin-gen 公司; MTT 和 DMSO 为 Sigma 公司产品; 淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 正常人 AB 型血浆由广州市中心血站提供。完全培养基两种: 一种为 RPMI-1640+10% 胎牛血清, 另一种为 RPMI-1640+5% AB 型血浆。

1.2 病例选择 15 例经病理证实为肺癌患者, 年龄 29~78 岁, 平均年龄 58.6 岁, 男 11 例, 女 4 例, 鳞癌 2 例, 腺癌 13 例。

1.3 DC 的体外培养及成熟 采集肿瘤患者外周血 20ml, 肝素抗凝 (20U/ml)。将全血用 RPMI-

收稿日期: 2004-05-10; 修回日期: 2004-06-10

基金项目: 卫生部科学基金项目 (98-2-377); 广东省科技厅重点攻关项目 (99M04903G, 2KM04402S)

作者单位: 1. 510630 广州, 中山大学附属第三医院胸外科; 2. 广东省人民医院肿瘤中心, 广东省肺癌研究所 (* 通讯作者)

1640 对倍稀释,充分混匀。取 50ml 离心管,加入 10ml Ficoll - PaquePlus (淋巴细胞分离液),在其上缓慢加入 20ml 血液,2000 rpm 离心 20min, 小心吸取富含单个核细胞的细胞层 (PBMC), 用 5 倍体积的 PBS 洗涤 2 次: 1500 rpm 离心 10min。用 RPMI-1640 洗涤 1 次, 1500 rpm 离心 5min, 用 0.2% 胎盘蓝进行活细胞计数。10 例患者随机使用一种完全培养液重悬细胞, 调整细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 12 孔板, 每孔 2×10^6 , 37% CO_2 培养箱孵育 2h。轻摇培养板, 用吸管取出上清及非贴壁细胞留作后用, 剩余的贴壁细胞用温 RPMI-1640 洗涤 2 次, 加入 RPMI-1640, 24h 后小心取出上清, 再加入完全培养基内含 rhGM-CSF 1000U /ml, rhIL-4 1000 U/ml, 37% CO_2 培养箱孵育 5~7 天收获未成熟 DC。含人 AB 型血浆的完全培养基培养的 DC 自第 6 天始随机加入 TNF- 10ng/ml 或模拟单核细胞条件培养液 (monocyteconditionedmediummimic, MCMmimic; IL-1 10ng/ml、PGE₂ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、IL-6 1000U /ml 及 TNF- 10ng/ml) 第 9~10d 收获成熟 DC。

1.4 DC 的获得率与纯度 用倒置显微镜下观察第 1、3、5、7 和 9 天的 DC 生长及形态学变化情况, 进行 DC 的获得率与纯度的计算。

$$\text{DC 获得率} = \frac{\text{第 9 天收获的 DC 细胞数}}{\text{第 1 天孵育的单个核细胞总数}} \times 100\%$$

$$\text{DC 纯度} = \frac{\text{第 9 天收获的 DC 细胞数}}{\text{第 9 天收获的 DC 细胞数} + \text{单个核细胞数}} \times 100\%$$

1.5 流式细胞仪细胞表型检测 用流式细胞标记液 PBA (0.01M PBS+2% BSA+ 0.01% NaN₃) 悬浮细胞 $5 \sim 10 \times 10^5/\text{ml}$, 加入离心管 (100 μl /管), 再加入荧光标记的一抗 100 μl , 单抗浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4%, 30min, PBS 洗 2 次, 加入羊抗鼠 IgG 荧光二抗 200 μl /管, 悬浮细胞, 二抗浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4% 暗处标记 30min, PBS 洗 2 次, 细胞悬于含有 1% 多聚甲醛的 PBS 荧光染色细胞保存液中。流式细胞仪 (美国 Bio-RAD 公司) 表型分析。

1.6 混合淋巴细胞培养 (MLR) 刺激细胞: 收集第 9~10d DC 组, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 加入丝裂霉素 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37%, 30min 处理并充分洗涤, 再调整细胞密度为 $10 \times 10^4/\text{ml}$ 、 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 、 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 。效应细胞: 按上述方法分离同种异体来源的 PBMC, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。U 形底 96 孔板, 每孔加刺激细胞和效应细胞各 100 μl , 每个样品设 3 个复孔, 并设空白对照。37% CO_2 培养 5d。加入 MTT 20 μl , 37% CO_2 孵箱培养 4h, 离心, 小心吸去 180 μl 培养液, 加入 DMSO 100 μl , 在微量振荡器上振荡 15min。酶标仪 570nm 处测 OD

值, 计算刺激指数, $SI = \frac{\text{试验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}}$ 。

1.7 统计学处理 使用 SPSS 10.0 软件进行数据的多变量方差分析。

2 结果

2.1 DC 体外培养形态

患者外周血单个核细胞 (PBMC), 贴壁培养 2h, 获得贴壁细胞。第 1 天, 细胞贴壁, 体积小, 多为圆形, 有少量半悬浮细胞; 第 3 天, 半悬浮细胞逐渐增加, 细胞呈聚集现象, 体积略增大, 有大突起; 第 5 天, 大部分细胞脱壁悬浮, 体积增大, 形状不规则; 第 7 天, 细胞体积大, 脱壁悬浮, 有毛刺状突起; 第 9 天, 细胞突起变细, 变多, 为典型的 DC 形状。

2.2 DC 获得率、纯度和成熟时间

完全培养基中用人 AB 型血浆取代胎牛血清, 发现在 DC 获得率、纯度和成熟所需时间上两者无统计学显著性差异 ($F = 1.165$, $P > 0.05$, 见表 1)。

表 1 两种不同完全培养基培养 DC 的比较

	DC 获得率 (%)	DC 纯度 (%)	成熟所需时间
含人 AB 型血浆培养基	9.73 ± 3.10	82.31 ± 10.48	9.2 ± 0.45
含胎牛血清的培养基	9.48 ± 3.02	83.22 ± 11.02	9.4 ± 0.55

2.3 DC 细胞表型分析

经直接免疫荧光法测定, MCM-mimic 和 TNF- 诱导的第 9 天细胞均高表达共刺激分子 CD86、CD80、MHC 分子 HLA-DR 和共刺激分子 CD40。而 MCM-mimic 组刺激的 DC 和 TNF- 相比, CD83 上调性表达更为显著 ($F = 230.437$, $P < 0.01$, 见表 2)。

表 2 两种成熟刺激因子刺激 DC 后的表型比较

	TNF-	MCM-mimic
CD80	88.78 ± 9.67	95.78 ± 2.71
CD86	88.97 ± 10.19	95.63 ± 2.67
HLA-DR	93.05 ± 8.86	96.64 ± 2.20
CD40	77.68 ± 10.12	84.16 ± 6.78
CD83	28.72 ± 3.91	82.98 ± 6.97

与 TNF 组比, * $P < 0.01$

2.4 DC 激发 T 细胞增殖能力的测定

实验结果显示, 患者体外培养的 DC 具有激发同种异体外周血 T 细胞增殖的作用, 且以 MCM-mimic 诱导成熟的 DC 刺激 T 细胞增殖反应能力更强 ($F = 37.67$, $P < 0.01$, 见表 3)。

3 讨论

DC 作为体内唯一能活化初始 T 细胞的抗原递

表 3 两种成熟刺激因子刺激 DC 后的增殖能力

	1 10	1 50	1 100
TNF	7.64 ±1.18	4.56 ±1.09	2.10 ±0.56
MCM-mimic	13.36 ±1.58 *	11.04 ±1.11 *	9.32 ±1.21 *

与 TNF 组比, * $P < 0.01$

呈细胞, 其特点是高水平的表达与 T 细胞激活有关的第一信号和第二信号分子 (MHC- I、II 类抗原和 B7~1、B7~2、CD40 等共刺激分子), 并能高效的摄取和处理外源性抗原和向 T 细胞递呈抗原, 建立初级免疫反应, 这些特点使 DC 成为一个理想的生物免疫佐剂和肿瘤抗原载体^[1,2]。然而, 天然存在的 DC 的数量极少, 广泛分布于机体所有组织和器官, 约占外周血中单个核细胞的 1%, 从而限制了在临床上的应用。近年来采用细胞因子体外诱导 DC 方面已取得重大进展, 满足了人们对 DC 的研究需要, 使得科研工作者有机会去提高它的生物学效能。

DC 一种来源于骨髓、脐血的很稀少但能增殖的 CD34⁺ 前体细胞^[3], 另一种来源于外周血的很多但不能增殖的 CD14⁺ 单核细胞 (monocyte-derived DCs, Mo-DCs)。在临床应用方面, 与脐血、骨髓来源相比, 成人外周血来源 DC 培养方法的好处除了取材容易和供者适用性外, 还具有成熟阶段易于调控的优点。从外周血来源获取大量未成熟 DC, 使对培养 DC 进行调控并用于临床成为可能。特别是对于肿瘤免疫的研究, 外周血来源 DC 是目前公认获得成熟 DC 的最佳途径^[4]。

目前, 体外培养 DC 的大多数培养基中加用胎牛血清, 而胎牛血清相对于人体是一种异体蛋白, 应用人体会产生过敏反应。为了更安全地应用于临床, 我们应用含人 AB 型血浆的培养基进行培养, 通过相差显微镜、流式细胞仪观察, 混合淋巴细胞反应检测发现, 在相同剂量细胞因子诱导下, 同样可以得到较高纯度和获得率、递呈能力强的 DC。

DC 在分化成熟过程中具有未成熟 (immature) 与成熟 (mature) 两个阶段, 这两个阶段的 DC 具有不同的生物学特性与功能。研究表明成熟的 DC 能激发免疫反应, 而不成熟 DC 则引起免疫耐受。到目前为止, 有证据表明应避免使用不成熟的 DC, 因此种细胞是很差的免疫原并诱导产生调节性 T 细胞^[5,6]。GM-CSF 是诱导 DC 的关键因子, IL-4 可抑制巨噬细胞形成。目前常用的促进 DC 成熟的细胞因子为 TNF-_α。目前不清楚哪一种方法得到的成熟 DC 诱导肿瘤特异性 T 细胞反应最好, 但 MCM

或 MCMmimic 有成为标准的趋势。我们研究发现, 培养 6 天的 DC 加入促成熟物质 TNF-_α 后, 成熟 DC 的特征标志 CD83⁺ 达到 (28.72 ±3.91%), 而用 MCM- mimic 后 CD83⁺ 达到 (82.98 ±6.97%), 显著高于 TNF-_α 组。应用 MCM- mimic 促成熟的 DC 激发 T 细胞的能力也显著高于 TNF-_α 组。从外周血来源, 经 GM-CSF+IL-4 培养所得 DC 多为未成熟 DC, 这样的 DC 脱离特定细胞因子环境后会完全改变性状, 显然不适用于临床应用^[7]。临床级 DC 必须具有完全成熟, 并具有稳定的性状, 即便脱离体外细胞因子培养环境, 也能保持性质稳定。我们的研究证实, 体外培养 5~7 天的 DC 若脱离细胞因子 3 天内即变得贴壁, 失去 DC 性状, TNF-_α 组使得部分 DC 稳定, 而经 MCM- mimic 处理后的 DC, 即便脱离细胞因子 3 天仍保持 DC 的全部性状。这表明经 MCM- mimic 处理后成熟、均一的 DC 是适用于临床应用的。

目前, 肿瘤抗原体外冲击的 DC 疫苗回输治疗肿瘤方法已经引起人们极大的兴趣。本研究建立了适合临床应用的 DC 分离、培养及鉴定的实验条件, 为今后肿瘤患者临床应用 DC 疫苗提供了良好的基础。

参考文献:

- [1] Dallal RM, Lotze MT. The dendritic cell and human cancer vaccines [J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12 (5): 583-588.
- [2] Banchereau J, Schuler G, Thurner B, Palucka AK, et al. Dendritic cells as vectors for therapeutic [J]. Cell, 2001, 106 (3): 271-274.
- [3] Gatti E, Velleca MA, Biedermann B, Cetal. Large-scale culture and selective maturation of human朗格汉斯细胞 from granulocyte-colony stimulating factor-mobilized CD34⁺ progenitors [J]. J Immunol, 2000, 164 (7): 3600-3607.
- [4] Turley SJ, Steinman RM, Mellman I, et al. Prostaglandin and culture of dendritic cells. In: Lotze MT, Thomson AW. Dendritic Cells: Biology and Clinical Application [J]. San Diego, Calif: Academic Press, 1999: 544.
- [5] Dhodapkar MV, Steinman RM. Anti-CD40-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8⁺ regulatory T cells in vivo in humans [J]. Blood, 2002, 100 (1): 174-177.
- [6] Roncarolo MG, Levin J, Gao MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells [J]. J Immunol, 2001, 167 (2): F5-F9.
- [7] Romani N, Reider D, Heuer M, et al. Generation of matured dendritic cells from human blood. Animal models and clinical application [J]. J Immunol Methods, 1996, 196 (2): 137-151.

[编辑: 张麟; 校对: 刘红武]