

宫颈癌患者外周血来源的树突状细胞的生物学特性观察

彭永排¹, 林仲秋¹, 李志雄³, 曹开源², 康金玉¹, 谢宇芬¹

(1. 中山大学附属第二医院妇产科, 广东 广州 510120;

2. 中山大学中山医学院免疫学教研室, 广东 广州 510080; 3. 德国 Hamburg 大学骨髓移植中心)

摘要【目的】探讨宫颈癌患者外周血来源的树突状细胞(DC)的生物学特性。【方法】14例Ib期及以上的宫颈癌患者为研究组, 24例健康女性为对照组。外周血经密度梯度离心得到单个核细胞, 其中附壁成分在含GM-CSF/IL-4的完全淋巴细胞培养液培养。光镜和电镜观察培养细胞的形态变化。培养7d后, 计算树突状细胞的产量, 流式细胞术分析HLA-ABC、HLA-DR、CD40、CD80、CD1a和CD14的表达, 同种异体淋巴细胞的混合淋巴反应(MLR)检测树突状细胞刺激淋巴细胞增殖能力。【结果】经过7d培养, 两组均诱导出典型形态和表型的DC。宫颈癌患者单位体积外周血的未成熟DC(ImDC)的产量为 $67.3 \times 10^6 \pm 33.8 \times 10^6$, 较对照组低($P < 0.05$)。研究组的CD40、CD80和CD1a的平均荧光强度(MFI)分别为 18 ± 9 , 15 ± 6 和 71 ± 11 , 均较对照组低($P < 0.05$); 而两组ImDC的HLA-ABC、HLA-DR表达强度相似($P > 0.05$)。相同PBL/DC比值, 研究组ImDC刺激同种异体淋巴细胞增殖能力下降($P < 0.05$)。【结论】宫颈癌患者的外周血单个核细胞培养的树突状细胞(ImDC)和健康对照组的ImDC具有免疫学差异, 提示在应用树突状细胞进行免疫治疗时应考虑这种差异。

关键词: 宫颈癌; 树突状细胞; 单核细胞; 共刺激分子; 免疫治疗

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

文章编号: 1672-3553(2003)06-0547-05

Characteristics of Dendritic Cells Derived From Peripheral Blood of Patients with Invasive Cervical Carcinoma

PENG Yong-pai¹, LIN Zhong-qiu¹, LI Zhi-xiong¹, CAO Kai-yuan², KANG Jin-yu¹, XIE Yu-fen¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Immunology, SUN Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou 510080, China; 3. Bone Marrow Transplantation Center, University of Hamburg, Germany)

Abstract: 【Objective】To investigate the biological characteristics of dendritic cells derived from peripheral blood of patients with advanced cervical carcinoma. 【Methods】14 patients with cervical carcinoma at stages of Ib or above were assigned to study group and 24 cases of healthy females were assigned to control group. Leukocytes were isolated by density centrifugation. Adherent fractions were incubated in present of GM-CSF/IL-4 for 7 days. The yield of immature DCs (ImDCs) was calculated and the morphological change of the cultured cells was observed by light microscopy and electronic microscopy. The surface expressions of HLA-ABC, HLA-DR, CD40, CD80, CD1a and CD14 were analyzed by FCM. The ability of DCs to stimulate the proliferation of lymphocytes was determined by allogeneic MLR. 【Results】Morphologically and phenologically typical DCs were obtained from two groups after culture for 7 days. The yield of ImDCs from unit volume peripheral blood (calculated as 1000ml peripheral blood) in study group was $67.3 \times 10^6 \pm 33.8 \times 10^6$, significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). The MFIs of CD40, CD80 and CD1a expressed on ImDC in study group

收稿日期 2003-05-30

基金项目 广东省自然科学基金资助项目(99M04803G); 中山大学附属第二医院科研基金资助项目(F000099124)

作者简介 彭永排(1971-), 男, 广东揭西人, 硕士, 医师; 林仲秋, 教授, 通讯作者, 课题负责人. E-mail: linzhongqiu@hotmail.com

were 18 ± 9 , 15 ± 6 and 71 ± 11 , respectively, significantly lower than that in control group ($P < 0.05$), while the expressions of HLA-ABC, HLA-DR did not differ between two groups. Moreover, the ability of DCs to stimulate the proliferation of lymphocytes in study group was lower than that in control group. 【Conclusion】 Our data show that ImDCs derived from monocytes of patients with cervical cancer present different immunological characteristics compared to that of healthy females. Impaired DCs' function should be considered when immunotherapy is to be performed.

Key words: cervical carcinoma; dendritic cells; monocytes; costimulatory molecules; immunotherapy

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(6)547 ~ 551]

以树突状细胞(Dendritic cells, DC)为基础的抗肿瘤免疫治疗已经证实是一种非常有前途的免疫治疗方法。由于T细胞活化的MHC限制,临床应用的DC细胞必须使用肿瘤患者自身的DC细胞,而恶性肿瘤病人的DC性质必将影响免疫治疗效果。本研究采用最常用方法刺激外周血单核细胞诱生DC细胞,比较宫颈癌病人和健康妇女的DC产量、与抗原提呈相关的表面分子的表达和刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力,了解宫颈癌病人外周血诱生DC的特性,为临床应用以DC为基础的免疫治疗提供帮助。

1 材料和方法

1.1 研究对象

病例选自2001年2月至2001年12月我院妇科住院的Ib及以上的宫颈癌患者14例,平均年龄40岁(29~56岁),排除现症感染、糖尿病和自身免疫性疾病。病例手术后经病理证实,对照组24例,健康女性捐血者,排除现症感染、糖尿病和自身免疫性疾病,平均年龄41岁(30~47岁)。

1.2 细胞和主要试剂

靶细胞:HeLa细胞,购自中山大学附属肿瘤研究所;混合淋巴反应中异体淋巴细胞:作者本人的外周血淋巴细胞。RPMI1640粉剂(Gibco),胎牛血清(FCS)(杭州四季青),重组人白介素4(rhIL-4)(加拿大真达公司)、重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)(加拿大真达公司),重组人白介素2(rhIL-2)(加拿大真达公司),FITC标记的兔抗鼠血清单抗(PharMing公司,美国),完全淋巴细胞培养液按文献[1]配制。

1.3 细胞分离和培养

单个核细胞分离和树突状细胞的培养:病例组和对照组均在术前抽取静脉血 6×10^{-3} L,利用密

度梯度离心法分离白细胞,去除非黏附细胞,黏附细胞以淋巴细胞完全培养液加rhGM-CSF 10^6 U/L, rhIL-4 5×10^{-2} g/L培养,隔天换液半量并补充细胞因子。异体淋巴细胞的分离及保存:静脉血经上述方法分离,其中非黏附部分细胞即为外周淋巴细胞,并且在MLR试验前48 h完成。以淋巴细胞完全培养液和rhIL-2 10^{-2} g/L培养。隔天换液半量并补充细胞因子。

1.4 流式细胞术

培养第7天取悬浮细胞,洗涤、浓缩。分别加FITC标记的鼠单抗HLA-ABC, HLA-DR, CD40, CD80, CD1a和CD14标记检测细胞。所有样本在FACScaliber流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国)上分析。平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)表示标记分子的表达强度。

1.5 混合淋巴反应

刺激细胞取自培养7 d的树突状细胞(DCs),使用前以丝裂霉素去活性。 $(^3\text{H-Tdr})$ 流插入试验检测细胞增殖。96孔培养板每孔再加异体反应细胞 2×10^5 /孔。实验组每孔加丝裂霉素处理过的DC分别为 20×10^3 /孔、 6×10^3 /孔、 2×10^3 /孔,共同培养120 h。对照组不加DC。结束培养前18 h在96孔板中加入 $10 \mu\text{L}$ 浓度为1 mCi/L预温的 $(^3\text{H-Tdr})$ ($(^3\text{H-亮氨酸})$)。继续培养18 h后用液体闪烁计数器记录每孔细胞的每分钟计数值(CPM)。每组设3复孔,结果取3孔平均值。

1.6 DCs产量的计算

收集培养的7 d的细胞,以光镜下台盼蓝染色计算典型形态细胞数目。

1.7 统计学分析

计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本的均数比较采用 t 检验,多样本均数比较采用方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 培养细胞的形态

贴壁的细胞加入 rhGM-CSF 和 rhIL-4 培养 24 d 后, 呈散在葡萄串状聚集。第 5 天, 细胞体积继续增大, 表面呈毛刺样改变, 簇状悬浮细胞增多。培养第 7 天, 部分细胞呈团状悬浮, 细胞大小不一, 形态不规则, 相差显微镜可见伸展的大量毛刺, 为典型的树突状细胞形态。培养板上留有少许贴壁伸展的巨噬细胞(图 1A)。电镜摄影 培养 7 d 的树突状细胞进行电镜摄影观察。透视电镜显示细胞体积显著增大, 胞浆中富含线粒体, 表面大量皱褶和不规则突起(图 1B)。

2.2 流式细胞术分析树突状细胞表型

培养 7 d 后的贴壁细胞 95% 以上表达 HLA-ABC, 85% 以上表达 HLA-DR, 84% 以上表达 CD40、CD80, 而单核细胞特异性标志 CD14 少于

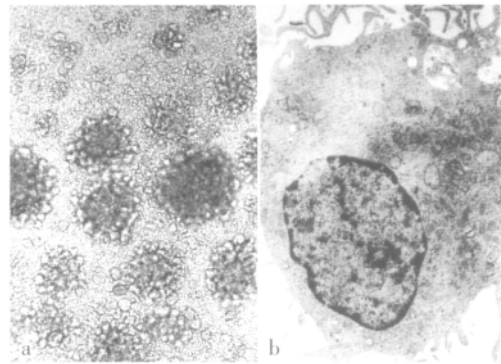


图 1 培养 7 d 细胞图片

Fig. 1 Appearance of the cells cultured on day 7

A: photo by phase-contrast microscopy (magnification $\times 400$). B: photo by electronic microscopy (magnification $\times 10\,000$)

5%, 80% 以上的细胞表达树突状细胞特异性标志 CD1a。培养的 7 d 与培养 5 d 的细胞流式细胞术比较见图 2。

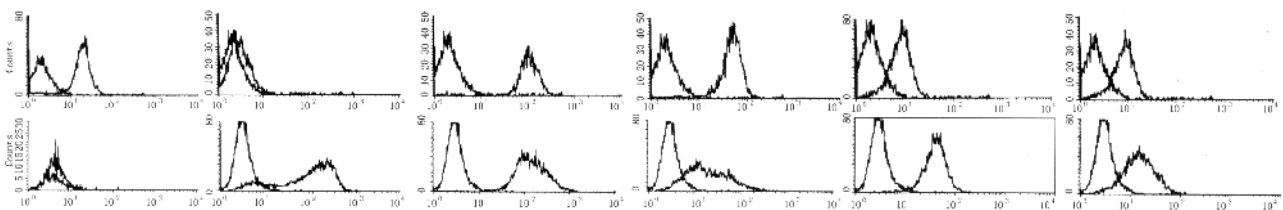


图 2 培养 7 d 与培养 5 d 的细胞流式细胞术分析

Fig. 2 Comparative FACS analysis of cells cultured on day 5(A line) and on day 7(B line)

2.3 树突状细胞的产量比较

表 1 显示, 单位体积外周血经密度梯度离心后, 宫颈癌患者的 PBMC 数量比对照组低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 经过 7 d 培养, 宫颈癌患者的 DC 产量比对照组低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 DC 转化的百分数, 两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 两组 PBMC 数量、DC 产量和转化率比较

Table 1 Comparison of the numbers of PBMC, the yield of DC and the transformation rate

Group	n	PBMC ($\times 10^9$)	DC ($\times 10^6$)	DC in percent PBMC
Control	24	1.36 \pm 0.27	90.5 \pm 36.2	6.33 \pm 3.20
Patient	14	1.01 \pm 0.42 ¹⁾	67.3 \pm 33.8 ²⁾	6.07 \pm 4.10 ³⁾

Compared with control group: *t* test, 1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.05$, 3) $P > 0.05$

2.4 两组 DC 表面分子的平均荧光强度(MFI)比较

表 2 显示, 两组 DC 表面分子 HLA-ABC、HLA-DR 的平均荧光强度(MFI)比较差异无统计学

意义 ($P > 0.05$), 宫颈癌患者 DC 的 CD40、CD80 和 CD1a 的平均荧光强度比对照组低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 两组 DC 表面分子的平均荧光强度(MFI)比较

Table 2 Comparison of MFI of DCs between two groups

Group	n	HLA-ABC	HLA-DR	CD40	CD80	CD1a
Control	24	329 \pm 189	66 \pm 28	49 \pm 15	27 \pm 11	91 \pm 28
Patient	14	326 \pm 156 ¹⁾	64 \pm 19 ¹⁾	18 \pm 9 ²⁾	15 \pm 6 ²⁾	71 \pm 11 ²⁾

Compared with patient group: *t* test, 1) $P > 0.05$; 2) $P < 0.01$

2.5 混合淋巴反应比较

异体淋巴细胞反应体系中,随着 DC 比例增加,宫颈癌患者组和对照组两组均表现为刺激异体淋巴细胞增殖能力增强,并且差异有统计学意义($P < 0.05$)。相同的 DC/PBL 比例,宫颈癌患者组的刺激异体淋巴细胞增殖能力比对照组低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。异体淋巴细胞 CPM 值比较见图 3。

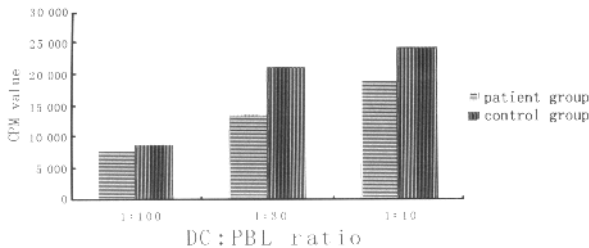


图 3 两组树突状细胞混合淋巴反应比较

Fig. 3 Mixed Lymphocyte Stimulating Capacity of DCs from patients and from healthy females ($^3\text{H-TDR}$ test)

3 讨论

DC 是一种最强的专职抗原提呈细胞,在激活 T 淋巴细胞和 B 细胞的特异性免疫反应中起重要的作用。体外实验和动物实验表明,DC 疫苗具有肯定的治疗性免疫作用。黑色素瘤、多发性骨髓瘤和肾癌的临床试验也得出令人鼓舞的结果。这表明,以 DC 为基础的抗肿瘤免疫治疗是一种非常具有前途的免疫治疗方法^[2]。

临床免疫治疗 DC 的主要来源是外周血单核细胞诱生的 DC。已经证实,联合应用粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)和白介素 4(IL-4)刺激外周血单核细胞在可以生成具有强大的抗原提呈能力的 DC 细胞^[3],这也是目前最常用的生产 DC 的方法。然而,以往研究的数据均是从健康个体得来的,因此,了解恶性肿瘤病人自身来源的 DC 的特性更具有临床价值。宫颈癌病人存在多方面的免疫抑制,病人外周血单核细胞抗原提呈能力低下是其中之一^[4]。由病人单核细胞体外培养所得到的 DC 的特性目前还不清楚。

3.1 宫颈癌病人单核细胞可诱生成典型的 DC 细胞

迄今为止,仍没有特异性抗原可以鉴别 DC 细胞,主要是通过形态特征、表面分子表达和 MLR 反应综合判定。单核细胞经过 7 d 培养丢失 CD14 抗

原,表达 CD1a 抗原,光镜和电镜检测到典型的树突状细胞形态,并且具有刺激同种淋巴细胞增殖能力。细胞经 GM-CSF/IL-4 5~7 d 培养,未经肿瘤坏死因子等细胞因子刺激,所诱生的是未成熟 DC (ImDC)。宫颈癌患者和健康女性的单核细胞经过 7 d 培养,无论从细胞形态、表面分子表达和 MLR 试验,均符合 ImDC 的特征。

3.2 宫颈癌病人来源 DC 存在免疫学差异

单位体积外周血经密度梯度离心后,病人的附壁单核细胞数量较健康对照组少,最终 DC 产量也较对照组小。然而,单核细胞转化率和对照组的差别没有统计学意义。说明宫颈癌病人的附壁单核细胞可以成功诱导成典型的 ImDC,并且其反应性良好。而引起 DC 产量的差异主要与来源的单核细胞的性质有关,如病人的单核细胞黏附性下降^[5]。在培养前的淘洗分离过程中,黏附性差的单核细胞更易于丢失。

两组 DC 的 HLA-ABC、HLA-DR 表达相似。但病人组的共刺激分子 CD40、CD80 和相对特异性分子 CD1a 平均表达强度较对照组低。MLR 反应也显示,病人组 DC 刺激同种异体淋巴增殖反应能力较对照组低。这提示,宫颈癌病人来源的 DC 存在某种程度免疫学差异。

3.3 CD40 和 CD80 表达强度下降,可能影响其抗原提呈功能

DC 细胞表达的共刺激分子 CD40 和 CD80 与其功能有非常密切的关系。T 细胞的激活需要两个信号:抗原特异性的第一信号和由共刺激分子和可溶性因子提供的第二信号。若仅有第一信号,T 细胞将进入无反应状态或者免疫耐受,甚至引起程序性死亡^[6]。CD40 通过与活化的 T 细胞上 CD40L 的相互作用,不仅通过作用于 B 细胞,调节机体体液免疫应答,而且可以增强 T 细胞、DC、巨噬细胞的免疫功能,诱导细胞因子的产生,从而调节机体的细胞免疫应答。CD40 和 CD40L 相互作用,可以上调 APC 的 B7.1 和 B7.2 等共刺激分子的表达,从而提供 CD4+T 细胞活化所必须的第二信号^[7]。CD80 即 B7-2 分子,也是一重要共刺激分子,其受体 CD28 表达于 CD4+,CD8+T 细胞上,CD28 与 CD80 相互作用可以诱导 T 细胞亚群合成多种淋巴因子,包括 IL-2, TNF- α , TNF- γ 和 GM-CSF^[8]。因此,CD40、CD80 的表达影响 T 细胞活化。宫颈癌患者外周血诱生的 DC 表达强度分别为健康对照组的 1/3 和 1/2,提示宫颈癌病人的 MoDC 可能影响抗

原提呈作用,影响抗肿瘤免疫应答。

3.4 对临床免疫治疗的意义

有作者利用其他方法刺激外周血单核细胞诱生 DC,观察到恶性肿瘤病人来源的 MoDC 具有不同于健康人的 MoDC 的特性。Vakkila 等^[9]报道,儿童恶性肿瘤患者外周血诱生的 DC 持续表达 CD64 分子,而健康儿童外周血诱生的 DC 并不存在这种现象。Onishi 等^[10]认为晚期肿瘤患者的 MoDC 存在一种较短寿命的亚群。培养超过 7 d 较短寿命的亚群死亡;幸存的 MoDC 无论是表面分子表达、MLR 和抗原提呈能力均与健康人相似。说明恶性肿瘤病人来源的 MoDC 具有一定程度的免疫学异常。宫颈癌病人来源的 ImDC 是否由于“短寿命亚群”的影响而导致免疫学上的差异还有待进一步研究。总而言之,为获得最佳的抗肿瘤免疫治疗效果,需针对肿瘤病人自身来源的 DC 的特性选择更合适的治疗方案。

参考文献:

- [1] 巴德年. 当代免疫学技术与应用 [M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联出版社, 1998. 156 ~ 158.
- [2] Steinman R M, Dhodapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future[J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(4): 459.
- [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 downregulated by tumor necrosis factor alpha[J]. *J Exp Med*, 1994, 179(4):

1109.

- [4] Bjercke S, Onsrud M, Gaudernack G. Suppressive effect of monocytes in vitro in patients with carcinoma of the uterine cervix[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1986, 65(6): 619.
- [5] Hersh E M, Gschwind C, Morris D L, et al. Deficient strongly adherent monocytes in the peripheral blood of cancer patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1982, 14(2): 105.
- [6] Yellin M J, Brett J, Baum D, et al. Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals[J]. *J Exp Med*, 1995, 182(6): 1857.
- [7] Yellin M J, Sinning J, Covey L R, et al. T lymphocyte T cell-B cell-activating molecule/CD40-L molecules induce normal B cells or chronic lymphocytic leukemia B cells to express CD80 (B7/BB-1) and enhance their costimulatory activity[J]. *J Immunol*, 1994, 153(2): 666.
- [8] Tatari-Calderone Z, Semnani R T, Nutman T B, et al. Acquisition of CD80 by human T cells at early stages of activation: functional involvement of CD80 acquisition in T cell to T cell interaction[J]. *J Immunol*, 2002, 169(11): 6162.
- [9] Vakkila J, Vettenranta K, Sariola H, et al. Poor yield of dendritic cell precursors from untreated pediatric cancer [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10(6): 787.
- [10] Onishi H, Morisaki T, Baba E, et al. Dysfunctional and short-lived subsets in monocyte-derived dendritic cells from patients with advanced cancer[J]. *Clinical Immunol*, 2002, 105(3): 286.

(编辑 张恩健)

· 简 讯 ·

中国学子获本年度美“青年科学家奖”最高奖

美国《科学》杂志和阿默舍姆生物科学公司 23 日联合公布了本年度“青年科学家奖”评选结果, 31 岁的留美中国研究人员王磊因在研究生命遗传“蓝图”方面取得的成就而荣膺最高奖。“青年科学家奖”每年除在不同国家评出地区性获奖者外, 还确定一名最高奖得主。王磊是 1995 年该奖创设以来第二位获最高奖的中国学子。他 1997 年北京大学毕业, 赴美后就读于加州大学伯克利分校并获博士学位, 目前在加州大学圣迭戈分校从事博士后研究。蛋白质是构成所有生物有机体的物质基础, 不同生物体内的天然蛋白质都由 20 个相同的氨基酸组成。但为什么只有 20 个氨基酸而不是更多呢? 在攻读博士期间, 王磊对这一基础性问题产生了浓厚兴趣, 并通过研究成功找到了往活细胞的天然蛋白质内插入额外氨基酸的办法。王磊在接受新华社记者采访时介绍说, 他所从事的研究有三个重要意义。一是有助于加深对生命起源和进化的了解, 比如他的研究不仅显示“合成蛋白质所需的 20 个氨基酸并非上限, 蛋白质中可以加入更多氨基酸”, 同时也证明利用人为方法来扩充生物体的遗传密码是可能的。其次, 在活细胞中引入新氨基酸也为生命科学研究开辟了一个崭新的领域, 使在活体内精确研究生命过程成为可能。另外, 添加新氨基酸还有可能制造出更为优质的新型蛋白质, 这些蛋白质在生物制药和材料科学等领域都会有应用价值。王磊的博士生导师舒尔茨教授评价说, 王磊的研究实际上为开发新型基因工程技术奠定了基础。“他的工作意味着将来也许可以不受普通生物体所含的 20 个氨基酸限制, 制造出具有新奇特性的蛋白质甚至是完整的生物体。”近年来, 王磊共在《科学》、美国《全国科学院学报》和《美国化学学会杂志》等权威学术期刊上发表十余篇论文, 目前拥有 5 项专利。2002 年, 他还获得美国发明学院“学生发明者”最高奖。王磊向记者表示, 他将来能有机会携所学回国效力。

来源: 新华网 2003-10-24