

文章编号:1005-6947(2005)03-0178-05

· 胃癌专题研究 ·

胃癌患者外周血来源树突状细胞诱导培养及表型分析

张坤¹, 余佩武¹, 高朋芬², 饶云¹

(第三军医大学西南医院 1. 普通外科 2. 眼科, 重庆 400038)

摘要:目的 分析胃癌患者外周血单个核细胞,经诱导培养获取树突状细胞(DC)的形态学特点及表面分子表达的特点,为基于DC的胃癌生物学治疗提供实验基础。方法 胃癌患者外周血单个核细胞经GM-CSF,IL-4及TNF- α 诱导培养,获取成熟DC。利用光镜、电镜观察其形态特点。利用流式细胞术检测其表面分子表达特点。结果 诱导培养7d即可获取成熟DC,细胞表面出现大量典型树枝状突起;细胞表面分子表达随细胞的成熟而逐渐升高,至培养7d时逐渐趋于稳定。结论 胃癌患者外周血单个核细胞经GM-CSF,IL-4及TNF- α 诱导培养,可获得大量成熟DC。所获取DC具备典型形态学特点及表面分子表达特点。该研究结果可作为胃癌生物学治疗进一步研究的基础。

关键词:胃肿瘤/血液;树突细胞;表型

中图分类号:R735.2;R329.24

文献标识码:A

Study on the induction culture and phenotypes of dendritic cells originating from peripheral blood of gastric cancer patients

ZHANG Kun¹, YU Pei-wu¹, GAO Peng-fen², RAO Yun¹

(1. Department of General Surgery 2. Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To analyse the morphological and phenotypic characteristics of dendritic cells obtained by induction of peripheral blood monocytes of gastric cancer patients and provide an experimental basis of dendritic cells for the biological treatment of gastric cancer. **Methods** Peripheral blood monocytes of gastric cancer patients were co-cultured with GM-CSF, IL-4 and TNF- α to obtain the dendritic cells. The morphological characteristics of the dendritic cells were observed by light and electron microscopes and the phenotypes were studied by flow cytometry. **Results** Mature dendritic cells were obtained seven days after induction culture. These cells showed numerous typical dendritic protuberances on their surface. The phenotypes of the cells increased gradually with their maturation and reached stable levels seven days later.

Conclusions Mature dendritic cells could be obtained from peripheral blood monocytes of gastric cancer patients after induction culture with GM-CSF, IL-4 and TNF- α . The obtained cells had typical morphological and phenotypic characteristics. These cells could be used for further research in the biological treatment of gastric cancer.

Key words: STOMACH NEOPLASMS/blood; DENDRITIC CELL; PHENOTYPE

CLC number: R735.2; R329.24

Document code: A

胃癌是严重威胁人类健康的高发恶性肿瘤之一,传统的治疗手段,如手术、放疗、化疗的治疗效

果均较差,不能显著提高胃癌患者的5年生存率。近年来基于树突状细胞(dendritic cell, DC)的抗肿瘤生物学治疗,为克服胃癌的威胁带来新的希望。DC广泛分布于全身各脏器,但数量很少,仅占外周血单个核细胞总数的1%以下。因此获取一定量有功能的DC是进一步研究其生物学特性的关键。本实验采用贴壁培养法,自胃癌患者外周血诱导培养获取大量具有典型形态学特征的DC,分析其形态

收稿日期:2004-06-28; 修订日期:2005-01-10。

作者简介:张坤(1973-),男,山东沂水人,第三军医大学西南医院博士研究生(现为南京军区福州总医院主治医师),主要从事胃肠道肿瘤外科治疗与生物治疗方面的研究。

通讯作者:张坤 电话:13763810980(手机),0591-87892650(H); E-mail:zhangkun73@yahoo.com.cn。

特点及表面分子表达变化的特点。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基 (Gibcol Brl USA), 淋巴细胞分离液 (TDB), 重组人单核巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF, Promega USA), 重组人白细胞介素 4 (rhIL-4, R&D System), 肿瘤坏死因子 α (TNF- α , R&D System)。

1.2 实验方法

1.2.1 胃癌患者外周血 DC 的分离培养 无菌、肝素钠抗凝胃癌患者外周全血 80 mL。淋巴细胞分离液 (Ficoll-paque) 2 500 r/min, 30 min 离心, 分离并收集单个核细胞。1 000 r/min, 10 min PBS 离心洗涤细胞 2 次。用经 37℃ 预温、含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基充分吹打重悬离心沉淀细胞。37℃, 饱和湿度, 5% CO₂ 孵育箱静置培养。2.5 h 后吸除培养基, 去除未贴壁细胞, 并加入细胞因子使其终浓度为 rhGM-CSF 100 ng/mL, rhIL-4 50 ng/mL。24 h 后补加细胞因子 1 次。静置培养 6 d 后, 加入 TNF- α 20 ng/mL, 第 7 天收获 DC。

1.2.2 DC 形态学观察 取均匀悬浮生长的 DC, 倒置显微镜下观察其形态特点并拍照。取均匀悬浮 DC, 送扫描电镜及透射电镜检查, 观察其超微结构特点。

1.2.3 培养 DC CD83, CD1a, CD80 及 HLA-DR 表型检测 培养第 3, 7, 14 天, 分别取悬浮生长 DC, 制备均匀单细胞悬液。PE-CD80, PE-CD1a, PE-HLA-DR, PE-IgG1 (对照), FITC-CD83, FITC-IgG2b (对照) 直标荧光单克隆抗体, 充分震荡均匀染色 (4℃, 避光, 30 min) 后, 行流式细胞仪细胞表型检测。

1.3 统计分析

所得数据取平均值, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 采用 SPSS 统计程序进行统计分析; 均数的比较用 *t* 检验及单因素方差分析, 率的比较用卡方检验及多个独立样本比较的秩和检验, 确定差异显著性。 *P* < 0.05 为统计学差异的界值。

2 结 果

2.1 培养的 DC 形态特点

DC 诱导培养第 2 天, 可见细胞聚集成团, 悬浮

生长, 多为比较规则的圆形, 细胞表面尚未形成明显的毛刺样突起。培养第 7 天, 细胞数量增多, 分散悬浮生长, 细胞表面有大量细小毛刺样突起形成 (图 1)。培养第 7 天透射电镜观察, 可见悬浮生长 DC 细胞表面具有典型的形态学特征 - 由胞膜伸出长短不一的突起, 细胞核形状不规则, 多偏于一侧; 胞浆中富含线粒体, 吞饮小泡及大泡较多, 溶酶体较少 (图 2)。扫描电镜观察, DC 表面粗糙, 胞体向周围伸出大量树枝状或裙褶状不规则突起, 使细胞表面呈现密集的绒毛状 (图 3)。

图 1 DC 诱导培养第 7 天 (倒置显微镜 $\times 200$)

图 2 DC 诱导培养第 7 天 (TEM $\times 4 000$)

图 3 DC 诱导培养第 7 天 (SEM $\times 2 500$)

2.2 培养 DC CD83, CD1a, CD80 及 HLA-DR 表型检测

DC 诱导培养第 7 天, 第 14 天细胞表面分子表

达与培养 3d 比较, 经统计学分析有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。而培养第 7 天与第 14 天比较差异无显著性 ($P > 0.05$) (图 4, 附表)。

(1) FITC-对照

(2) CD83

(3) PE-对照

(4) CD80

(5) CD1a

(6) HLA-DR

图 4 培养 7d DC 表型流式图

附表 DC 表型表达的变化 ($\bar{x} \pm s, \%$)

时相点(d)	细胞表型			
	CD83	CD1a	CD80	HLA-DR
3	7.562 ± 0.179	3.224 ± 0.376	7.38 ± 0.093	12.76 ± 0.240
7	75.54 ± 0.726 ¹⁾	64.94 ± 0.516 ¹⁾	61.56 ± 0.273 ¹⁾	62.5 ± 0.657 ¹⁾
14	76.04 ± 0.095 ^{1),2)}	67.96 ± 0.384 ^{1),2)}	65.66 ± 0.556 ^{1),2)}	67.48 ± 0.280 ^{1),2)}

注:1)与培养 3d 比较, $P < 0.01$; 2)与培养 7d 比较, $P > 0.05$

3 讨论

DC是机体内重要的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)。DC捕获、加工处理抗原后将抗原信息进一步提呈,激活后续特异性细胞和体液免疫反应^[1]。因此,DC在自身免疫性疾病、移植物排斥反应、肿瘤免疫治疗及人类免疫缺陷病毒(HIV)感染治疗等方面都具有重要意义^[2]。人体内DC大多处于成熟状态,表达低水平的共刺激分子和黏附分子,体外激发同种混合淋巴细胞反应(MLR)的能力较低,但具有极强的抗原内吞能力,在摄取抗原或接受某些刺激因素(如LPS)后则可以分化成熟。DC系统作为机体内免疫反应的启动子和调节子,具有激活CD8+CTL和CD4+T辅助细胞的能力,控制着机体内的免疫反应过程。成熟的DC是机体内最有效、功能最强的APC,通过激活辅助性T细胞(Th)和杀伤性T细胞(Tc),甚至B细胞,诱导逐步放大的级联特异性免疫反应,因而已成为抗肿瘤免疫的中心环节。DC对T细胞的激活,依赖主要组织相容性复合体(MHC)递呈的特异肿瘤抗原与受体结合以及抗原递呈细胞表面的共刺激分子与T细胞表面特异受体结合的双信号激活途径^[3]。目前研究表明:CD83是成熟DC所特有的膜标志分子,成熟DC表面同时还可以表达丰富的协同刺激分子(B7),主要包括B7-1(CD80)和B7-2(CD86),通过和T细胞膜表面的相应配体CD28和CTLA-4相互作用而活化T辅助细胞(Th),并使Th细胞产生大量细胞因子,如白细胞介素2(IL-2),IL-6,干扰素- γ (IFN- γ),GM-CSF,TNF- α 等,进一步调节活化的Th细胞,以增强机体的细胞免疫和体液免疫功能,发挥主动免疫的抗肿瘤作用。

目前一致认为,DC是具有典型树枝状突起,膜表面高表达MHC-II类分子,能移行至淋巴器官和刺激初始型T淋巴细胞增殖活化,并具有一些相对特异性表面标志的一类细胞,在分布和功能上表现出很强的异质性。与DC的抗原提呈功能相适应,成熟DC具备4个主要特征:(1)细胞形态不规则,细胞膜具有较强的伸缩能力,甚至可以扩展到数百微米;扩展的形式主要有树突、伪足、面纱等,表现为细胞表面的大量树枝状突起。(2)细胞表面具有丰富的有助于抗原提呈的分子,如高表达MHC-I,

II,共刺激分子B7-1,B7-2,细胞黏附分子ICAM-1,ICAM-3以及淋巴细胞功能相关抗原-3(LFA-3)等。(3)在混合淋巴细胞反应中具有激活静止T淋巴细胞的能力。(4)具有向局部淋巴细胞T细胞区迁移的能力;不同淋巴器官内的DC表型存在差异,可能与其功能有关。

本实验通过将获取的胃癌患者外周血单个核细胞经细胞因子体外诱导分化,获得具有典型光镜、电镜形态特征的DC。DC表面毛刺样突起随着细胞的分化成熟而逐渐增多,与既往研究中所发现的体外诱导培养DC表面树枝状突起随培养时间推移而增多、变长的形态变化规律相符。文献^[4]报道,体外诱导培养的DC至7d左右其表面分子到达较高水平且趋于稳定。本实验结果显示,诱导培养7d后,其细胞表面分子表达分别与培养早期比较相差非常显著($P < 0.01$),与文献报道结果相一致。

DC主要分为髓系和淋巴系来源两大类:骨髓来源的DC分布较为广泛,参与抗原的摄取、加工和处理,提呈抗原给T淋巴细胞并引起T细胞的活化。DC前体细胞由骨髓进入外周血,再分布至全身各组织。CD34+干细胞经GM-CSF和TNF- α 刺激后可出现含有粒细胞、巨噬细胞、DC三系细胞的克隆。淋巴组织起源的DC则主要分布于胸腺髓质和脾脏T淋巴细胞聚集区,可杀伤表达Fas的被激活T淋巴细胞,限制CD8+T细胞增殖,诱导对自身及部分外来抗原的免疫耐受。

作为DC来源的巨噬-DC二向分化祖细胞,在不同微环境、不同细胞刺激因子和不同诱导分化途径中,可分化为巨噬细胞或者DC。有学者^[5]发现,在DC培养基中仅加入GM-CSF和IL-4只能培养出不成熟的DC,只有加入另外的一种或多种细胞因子(如TNF- α ,IFN- β ,IFN- γ ,IL- β ,PGF2等)才能诱导成熟的DC。由于非成熟的DC与成熟的DC功能差异大,非成熟DC的抗原摄取功能强,而成熟DC刺激T细胞反应能力强,因而在应用DC进行免疫治疗时,宜依据应用目的选择不同发育程度的DC。在决定DC是否可以发育成熟的调控因素中,GM-CSF,IL-4,TNF- α 是极其重要的三大细胞因子,其中GM-CSF和IL-4使DC前体细胞向巨噬细胞分化受抑制^[6],使之分化成为CD14-CD1a-的非成熟DC。另外IL-4还充当Th2细胞诱导的IL-12 p70的辅助因子,加强具有生物活性的IL-12 p70

异二聚体的产生,使 Th2 细胞辅助细胞免疫,增强抗肿瘤免疫。加入 TNF- α 后,DC 前体细胞即分化为 CD1a + CD83 + 的成熟 DC^[7];用 CD34 + 的 DC 前体细胞培养成熟 DC 时,会出现相同现象。外周血来源的 DC 只有在 TNF- α 存在时才表达成熟 DC 的特征性表面抗原 CD83 +,且 TNF- α 介导 DC 的进一步成熟^[8]。另外,FLT-3 配体(FLT-3 ligand)作为一种能够刺激早期造血的细胞因子,可调节最原始的造血干/祖细胞的增殖和分化^[9]。其与 GM-CSF, IL-4, TNF- α 或 IFN- γ 联合应用,可促进来自骨髓的 CD34 + 祖细胞分化、发育产生 DC。

本实验中在 DC 培养过程中加入 GM-CSF, IL-4, 诱导单个核细胞向 DC 方向生长分化^[10],同时抑制粒细胞、巨噬细胞的产生,可获得纯净 DC,维持诱导培养 DC 的强抗原提呈能力^[11];加入 TNF- α 促进 DC 的成熟,使 DC 具有强的刺激 T 淋巴细胞的活性^[12]。结果获得具有典型形态学及细胞表面分子表达特征的 DC,且细胞数量较多,可以满足进一步研究的需要。

参考文献:

[1] Fazekas DS, Smith LA, Bosco J, *et al*. Experimental models linking dendritic cell lineage, phenotype and function [J]. *Immunol Cell Biol*, 2002, 80(5): 469 - 476.
 [2] 唐朝晖, 邹声泉, 邱文洪, 等. 癌细胞裂解物修饰的 DC 疫苗体外诱导 T 细胞特异抗肺癌免疫 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(4): 283 - 286.

[3] Matthias S, Jochen S. Dendritic cell vaccination; new hope for the treatment of metastasized endocrine malignancies [J]. *Ternd Endocrinol Metab*, 2003, 14(4): 158 - 162.
 [4] Phennapha K, Nigel HR. Peripheral blood stem cell harvests from G-CSF-stimulated donors contain a skewed Th2 CD4 phenotype and a predominance of type 2 dendritic cells [J]. *Exper Hematol*, 2002, 30(5): 495 - 501.
 [5] Luft T, Pang KC, Thomas E, *et al*. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells [J]. *J Immunol*, 1998, 161(4): 1947 - 1953.
 [6] Jansen JH, Wientjens GJ, Fibbe WE, *et al*. Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4 [J]. *J Exp Med*, 1989, 170(2): 577 - 582.
 [7] 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 down-regulated by tumor necrosis factor α [J]. *J Exp Med*, 1994, 179(4): 1109 - 1118.
 [8] Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, *et al*. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro [J]. *Eur J Immunol*, 1997, 27(2): 431 - 441.
 [9] Mosley RL, Prahlad P, Vladimir P, *et al*. Flt3 ligand augmentation of T cell mitogenesis and expansion of type 1 effector/memory T cells [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2002, 2(7): 925 - 940.
 [10] Venu GP, George M, Alaap BS, *et al*. GM-CSF expands dendritic cells and their progenitors in mouse liver [J]. *Hepatology*, 2003, 37(3): 641 - 652.
 [11] Manfred BL, Gerold S. Immature, semi-mature fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? [J]. *Trend Immunol*, 2002, 23(9): 445 - 449.
 [12] Jin YD, Laphalle F, Gaetano C, *et al*. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow [J]. *Human Immunol*, 2004, 65(2): 93 - 103.

第四届布 - 加综合征诊疗进展学习班暨全国首届肝脏血管学术研讨会征文通知

由郑州大学(原河南医科大学)第一附属医院主办的国家级继续医学教育项目·第四届布 - 加综合征诊疗进展学习班暨全国首届肝脏血管疾病学术研讨会[项目编号:2005 - 04 - 01 - 050(国)]定于2005年5月在郑州召开,届时将邀请国内知名专家、教授做专题学术讲座和手术演示,欢迎从事肝脏血管疾病相关的内科、外科、影像和护理等医务人员踊跃投稿并参加会议。参会代表将获得国家级继续医学教育 I 类学分 12 分。

征文内容:肝脏血管疾病(包括门静脉、肝动脉和肝静脉等)的基础与临床研究;微创技术在肝脏血管疾病诊疗中的应用;内镜在门静脉高压症诊疗中的应用;影像学在肝脏血管疾病诊疗中的应用;肝脏血管疾病手术的护理体会。

征文要求:参加会议的论文必须是未公开发表过,用 Word 格式打印,附 500 字左右的摘要,注明作者单位及联系地址,欢迎以电子邮件形式投稿。

截稿日期:2005 年 4 月 30 日 收稿地址:郑州市建设东路 1 号·郑州大学第一附属医院普外科 党晓卫(请在信封上注明会议征文) 邮政编码:450052 联系电话:0371 - 6964308 电子信箱:V1_institutel086@163.com