论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0422-03

胃癌患者外周血 MoDCs 功能活性检查及意义

雷 晓,余佩武,饶 芸,石 彦,吴 淼,周立新 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆,400038)

提 要:目的 以胃癌患者外周血单个核细胞培养树突状细胞(monocyte derived dendritic cells, MoDCs)为研究对象,检测功能表达,分析其临床意义,并初步探索改进 MoDCs 功能的方法。**方法** 胃癌患者及健康成人外周血单个核细胞体外经 GM-CSF/IL-4 诱导培养 MoDCs,检测其 CD40、CD80 和 CD83 表达。在 DCs 培养中分别加入不同浓度 LPS 和 TNF-α,检测对 DCs 表面分子表达及 T 淋巴细胞刺激增值作用的改变。**结果** 胃癌患者外周血培养获成熟 MoDCs 数量较少,其 CD40、CD80、CD83 表达较正常对照显著下调,对 T 淋巴细胞的刺激增殖作用显著低于正常。LPS(100 ng/ml)和 TNF-α(1 000 U/ml)能刺激 CD40、CD80 和 CD83 表达上调并改善其活化 T 淋巴细胞功能。**结论** 胃癌患者 MoDCs 与正常成人相比有很大差异,免疫功能差。LPS、TNF-α 可显著改善 MoDCs 功能状态,可作为以 DCs 为基础的胃癌生物治疗细胞来源。

关键词:树突状细胞;外周血单个核细胞;LPS;TNF-α;胃癌

中图法分类号:R392.4;R331.14;R735.2 **文献标识码**:A

Generation and preliminary analysis of monocyte derived dendritic cells from peripheral blood of gastric cancer patients

LEI Xiao, YU Pei-wu, RAO Yun, SHI Yan, WU Miao, ZHOU Li-xin (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To detect the surface molecule expression, function and clinical pathological relations of MoDCs from gastric cancer patients, so as to investigate the status of MoDCs. **Methods** Peripheral blood monocytes of 45 gastric adenocarcinoma patients and 10 health donors were prepared by Ficoll-Hypaque gradient. MoDCs were generated by 7-day culture with GM-CSF and IL-4. The expression of CD40, CD80, and CD83 were detected by flow cytometry and were analyzed with the clinical pathological informations. MoDCs were also used in mixed lympocytes reaction to demonstrate their ability to stimulate lymphocyte proliferation. LPS and TNF-α were added into DCs culture with different concentration. Phenotype and function of modulated MoDCs were detected by flow cytometry and MLR. **Results** MoDCs generated from gastric cancer patients expressed lower level of CD40, CD80 and CD83, have lower function in MLR than control, which was correlated with lymph node metastasis and TNM classification. The expressions of CD40, CD80 and CD83 could be partially upregulated by adding LPS and TNF-α in culture. The stimulation function of MoDCs was significantly increased as compared with that of untreated control. **Conclusion** Immune dysfunction of MoDCs existed in gastric cancer patients and could be reversed by LPS and TNF-α, which may ensure the future usage in DC based immunotherapy.

Key words: dendritic cells; peripheral blood monocytes; lipopolysaccharide; tumor necrosis factor-alpha; stomach neoplasms

树突状细胞(dendritic cells,DCs)作为功能强大的抗原递呈细胞,其在胃癌生物治疗研究中的深受重视[1]。其中,外周血单个核细胞来源 DCs(monocyte derived dendritic cells, MoDCs)由于具有获取方便性和可重复性,是当前临床以 DCs 为基础的肿瘤生物治疗研究的主要细胞来源。但前期研究表明,胃癌患者 MoDCs 表面分子表达与正常对照相比有很大差异[2],处于抑制状态。直接应用培养的 MoDCs 进行抗胃癌生物治疗不能获得良好的免疫激发效果,需要采用一

作者简介:雷 晓(1970-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤外科治疗方面的研究。电话:(023)66692865,E-mail: lei_xiaoxiao@mail.yahoo.com.cn

通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@sina.com

收稿日期:2005-06-13;修回日期:2005-09-13

定的免疫手段改进 MoDCs 功能状态。本研究分析培养获得 MoDCs 免疫分子表达及刺激 T 细胞增殖能力特点，联系临床病理分析 MoDCs 功能状态，并采取 LPS、TNF-α 等改良培养措施促进 DCs 功能，以期为临床 DCs 为基础的胃癌生物治疗提供一定实验基础和理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

胃癌外周血标本来源于2003年4月至2005年3月我科住院手术的45例患者，术前均未接受化疗和放疗。其中男性37例，女性8例，年龄(54.0±10.2)岁。术中见肿瘤位于胃窦9例、胃体15例、胃底21例。术后病理报告高分化腺癌4例、中分化腺癌19例，低分化腺癌及黏液腺癌22例。肿瘤浸润深度胃黏膜及黏膜下3例、肌层16例、浆膜面26例。淋巴结转移阳性39例、阴性6例。TNM 分期Ⅰ期2例、Ⅱ期7例、Ⅲ期15例、Ⅳ期21例。对照外周血标本源于本院血库健康献血者，共10例。

1.2　外周血 MoDCs 常规分离培养

术前1 d采取外周静脉血40 ml，肝素抗凝，按1∶2体积比缓慢加于 Ficoll 淋巴细胞分离液(天津生物)表面，20 ℃下2 500 r/min 离心30 min，收集白膜层，PBS 离心洗涤5 min×2次，RPMI1640 培养液重悬，加入24孔板，37 ℃、5% CO_2 培养6 h后吸弃悬浮细胞，加入含 rhGM-CSF 及 rhIL-4(均购于 Pepro Tech)培养液，终浓度分别为500 U/ml 及1 000 U/ml，隔日轻振培养板后换液。于7 d吹打收集悬浮细胞，为患者 MoDCs。同样方法分离培养健康成人志愿者 MoDCs 作为对照。

1.3　外周血 MoDCs 功能调节培养

DC 培养3 d时分别加入不同浓度 TNF-α(Sigma)或/和 LPS(Sigma)，其中 LPS 终浓度为分别为10、20、50和100 ng/ml；TNF-α 终浓度分别为100、500、1 000和2 000 U/ml。继续同常规方法培养。

1.4　MoDCs 免疫表型检测

MoDCs 稀释至1×10^6个/ml，加入流式检测管，离心弃上清，分别加入抗 CD83-FITC、抗 CD40-PE 及抗 CD80-PE-Cy5 及同型对照抗体(均购于 Immnotech)，混匀后 RT 避光孵育15 min，1 ml PBS 稀释后上机。流式细胞仪(Beckman Coulter XL)以荧光微球调校，对照抗体标记细胞调节非特异性表达率<0.5%后检测 MoDCs 各表面分子表达，每样本检测>5 000个细胞。

1.5　成熟 MoDCs 计数

采用定量流式细胞术对获得 DC 中成熟 MoDCs 进行计数。收获细胞悬液计量后取100 μl，加入900 μl PBS 稀释，各取稀释悬液100 μl，加入流式检测管，分别加入抗 CD83-FITC 及同型对照抗体，常规孵育后上机检测，以流量200 μl 为限，对照调零后检测 $CD83^+$ 细胞含量，并推算原细胞悬液中 $CD83^+$ MoDCs 总量。

1.6　MoDCs 刺激淋巴细胞增值反应

T 淋巴细胞采于健康成人外周血20 ml，经 Ficoll 离心、收集白膜、尼龙毛柱孵育后过滤获得，苔盘蓝检查细胞活力>97%，调细胞浓度为5×10^6/ml，加入园底96孔板，每孔100 μl。MoDCs 复苏后经 ^{60}Co 照射(3 000 rad)，调细胞浓度至5×10^4/ml，按 T∶DC=100∶1、200∶1、500∶1、和1 000∶1比例加入96孔板，每梯度设3复孔，以空白淋巴细胞为对照。培养48 h，结束前6 h 加入 ^{3}H-TdR。收集细胞后以液相闪烁计数仪(Beckman LS 6500)检测 cpm，计算均值。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计程序进行 t 检验和相关性分析。

2　结果

2.1　胃癌患者 MoDCs 形态、数量及表面分子表达

胃癌患者 MoDCs 培养7 d可于光镜下见大量悬浮 DC，胞体较大，形态多样，表面众多树枝样、帆样突起，部分呈"太阳状"外观，外观形态与健康成人来源 MoDCs 无明显差异，见图1。

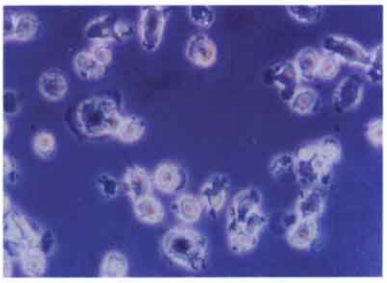


图1　培养7 d的胃癌患者 MoDCs　(LM×400)

采用定量流式细胞术分析所得 MoDCs 中 $CD83^+$ DC 数量，结果显示正常成人外周血40 ml 最终可获得(5.4±2.5)×10^6个 $CD83^+$ DC，胃癌患者等量外周血可得(2.7±2.5)×10^6个 $CD83^+$ DC，两者差异非常显著($P<0.01$)。

检测 MoDCs 上相关表面分子表达率发现，胃癌患者 MoDCs 上 CD40、CD80 及 CD83 均显著低于健康成人来源 MoDCs($P<0.01$)(表1)。

表1　胃癌患者及健康成人 MoDCs 相关表面分子表达[$(\bar{x}\pm s)$%]

	CD40	CD80	CD83
健康对照 MoDCs	76.6±8.8	82.6±8.0	90.8±4.7
胃癌患者 MoDCs	43.4±8.5[a]	60.1±7.9[a]	54.0±10.6[a]

a：$P<0.01$，与健康对照 MoDCs 比较

2.2　胃癌 MoDCs 表面分子表达与临床病理相关性

胃癌患者 MoDCs 各表面分子表达率结合者临床病理情况进行 spearman 等级资料相关分析，结果显示胃癌淋巴结转移情况和 TNM 分期与 MoDCs 的 CD83 表达间呈显著负相关($r=-0.397$，$P<0.01$；$r=-0.425$，$P<0.01$)，淋巴结转移阳性和 TNM 分期越晚，CD83 表达越低。不同肿瘤部位、病理类型、分化程度间未见 MoDCs 的 CD83 表达差异显著性($P>0.05$)。CD40 和 CD80 表达在不同病理情况间差异无显著性($P>0.05$)。

2.3　胃癌 MoDCs 刺激 T 淋巴细胞增殖能力变化

胃癌患者 MoDCs 可刺激 T 淋巴细胞增殖，在500∶1比例及更高时细胞增殖显著高于空白淋巴细胞组，但均显著低于正常

对照来源 MoDCs($P<0.01$)。

2.4 LPS 和 TNF-α 对胃癌 MoDCs 表面分子表达的调节作用

培养中添加 LPS 后,各表面分子在 50 ng/ml 时表达较不加 LPS 空白对照增高显著($P<0.05$),但进一步增加 LPS 浓度到 100 ng/ml 各表面分子表达与 50 ng/ml 相比,增加不显著($P>0.05$)。培养中添加 TNP-α 后,在浓度为 1 000 U/ml 时各表面分子较对照增高显著($P<0.05$),但进一步增加 TNF-α 浓度到 2 000 U/ml 各表面分子表达较 1 000 U/ml 增加不显著($P>0.05$)。

在培养中同时添加 LPS(100 ng/ml)和 TNF-α(1 000 U/ml),获得 MoDCs 的 CD40、CD80 和 CD83 表达分别为 64.3%,75.1% 和 72.5%。其中 CD40 和 CD80 表达较单独添加同浓度 LPS 或 TNF-α 时表达均有增高显著($P<0.05$),但 CD83 增高不显著($P>0.05$)。

2.5 LPS 和 TNF-α 对胃癌 MoDCs 刺激淋巴细胞增值能力的调节作用

LPS 和 TNF-α 处理后 MoDCs 刺激 T 淋巴细胞增值能力在 T:DC 在 200:1 和 100:1 时,均较无处理胃癌 MoDCs 有显著增强($P<0.05$, $P<0.01$)。联合应用 LPS 和 TNF-α 处理的胃癌 MoDCs,其刺激 T 淋巴细胞增值能力有进一步增强,在 100:1 比例时刺激增值效应高于单用 LPS 或 TNF-α 处理的胃癌 MoDCs($P<0.05$)。

3 讨论

树突状细胞为基础的肿瘤免疫治疗(dendritic cells based tumor immunotherapy)是目前临床肿瘤免疫研究的热点和治疗的新方法[3]。临床以 DCs 为基础的肿瘤免疫治疗研究中,选用的 DCs 来源上可以分为直接 DCs 与培养 DCs。直接 DCs 包括肿瘤组织浸润 DCs(tumor infiltrating dendritic cells,TiDCs)和外周血 DCs(peripheral blood DCs,PDCs)。间接 DCs 包括骨髓培养来源 DCs、脐带血来源 DCs、外周血单个核细胞来源 DCs(monocyte derived dendritic cells, MoDCs)等。TiDCs 及 PDCs 数量较少,分离困难,并且可能存在功能缺陷;骨髓来源 DCs 分离培养需要干细胞生长因子,成本高;脐带血 DCs 来源稀少,无法反复获取,均在临床实际治疗研究中应用较少。相对而言,MoDCs 因为其取材方便、数量充足,以及可重复获取等优势,在当前的恶性肿瘤生物治疗中有较好的应用价值。

如何得到足够数量和较高免疫功能的 MoDCs 是研究重点之一。为此本研究以胃癌为研究对象,首先分析经胃癌患者外周血分离培养 MoDCs 免疫表型,发现 CD40、CD80 和 CD83 表达均较对照显著降低,并且降低程度与胃癌淋巴结转移情况和 TNM 分期相关。分析还显示经胃癌患者外周血最终获得的 MoDCs 也显著低于对照,刺激淋巴细胞增值效应也较对照显著降低。这些结果提示胃癌患者 MoDCs 数量不足,功能处于抑制状态,其 MoDCs 直接应用将不能产生良好的免疫激发效应[4]。

有研究报道,对 DCs 进行"后期成熟"处理(post maturation)有助于提高培养 DCs 成熟度,增强免疫刺激的效果。其方法是将培养的 DCs 体外使用 IL-1β、IL-6、TNF-α 及 PGE2 等多种细胞因子继续处理 3 d,促进 DCs 的 CD83 表达,上调 CD40、CD80/CD86 等与 T 细胞激活相关的协刺激分子[5]。但这些处理方法目前缺乏应用规范,对胃癌患者 MoDCs 的效果少有报道。目前 DCs 研究中常用的两种处理手段是 LPS 和 TNF-α。研究表明,LPS、TNF-α 等促进胃癌 MoDCs 成熟的机制与活化 DCs 上 Toll 样受体通路,最终活化 NF-κb,以促进 DCs 成熟有关[6,7]。为研究 LPS 和 TNF-α 对于胃癌 MoDCs 免疫表型,成熟度及刺激淋巴细胞增值能力的影响,我们将二者分别和混合加入胃癌 MoDCs 培养,结果显示一定浓度的 LPS 和 TNF-α 处理可显著上调 MoDCs 表面分子表达、增强其刺激淋巴细胞增值能力。两种处理手段联合使用,虽然不能进一步促进 DCs 成熟(CD83 表达无进一步增高),但可进一步提高 CD40 和 CD80 表达,增强 MoDCs 刺激淋巴细胞增值能力。因此,LPS 和 TNF-α 处理可在进一步的以 DCs 为基础的胃癌生物治疗研究中联合应用,以获得功能更好的 MoDCs,最终获得良好的免疫激发效果。

参考文献:

[1] 雷 晓,余佩武. 树突状细胞疫苗与胃肠道肿瘤免疫治疗研究进展[J]. 中国胃肠外科杂志, 2000, 3(2): 128-130.

[2] 张 坤,余佩武,高朋芬,等.胃癌患者外周血 DCs 细胞表型变化研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(13): 1207-1209.

[3] REINHARD G, MARTEN A, KISKE S M, *et al*. Generation of dendritic cell-based vaccines for cancer therapy[J]. Br J Cancer, 2002, 86(10): 1529-1533.

[4] DHODAPKAR M V, STEINMAN R M, KRASOVSKY J, *et al*. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells[J]. J Exp Med, 2001, 193(2): 233-238.

[5] THURNER B, RODER C, DIECKMANN D, *et al*. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application[J]. J Immunol Methods, 1999, 223(1): 1-15.

[6] ARDESHNA K M, PIZZEY A R, DEVEREUX S, *et al*. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells[J]. Blood, 2000, 96(3): 1039-1046.

[7] LYAKH L A, KOSKI G K, TELFORD W, *et al*. Bacterial lipopolysaccharide, TNF-alpha, and calcium ionophore under serum-free conditions promote rapid dendritic cell-like differentiation in $CD14^+$ monocytes through distinct pathways that activate NK-kappa B[J]. J Immunol, 2000, 165(7): 3647-3655.

(编辑 陈聪连)