维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)01-0019-04

慢性粒细胞白血病来源的DC细胞体外诱导高效而特异的抗肿瘤免疫

罗云萍[1]，李用国[2]，蔡大川[2]，任 红[2]

（1.重庆医科大学检验系临床血液学教研室 重庆 400016；2.重庆医科大学病毒性肝炎研究所 重庆 400010）

【摘 要】目的：选用慢粒患者的原代血细胞，经细胞因子组合联合诱导，生成携带白血病抗原信息的树突状细胞（Dendritic Cell，DC），为DC疗法在临床上的应用提供理论依据。方法：慢粒（急变期）病人的PBMC用GM-CSF+IL-4+TNF α诱导后进行形态和细胞表型的鉴定。应用同种混合淋巴细胞反应和细胞毒性实验、观察诱生之DC刺激淋巴细胞增殖的能力以及介导抗白血病特异性细胞毒性反应的能力。利用酶联免疫吸附实验检测DC产生IL-12及协助产生IFN-γ的能力。结果：诱生DC均具有DC的形态特征和超微结构。表达DC相关表面分化抗原。并可刺激T淋巴细胞产生较强的增殖效应。诱导出针对自身肿瘤靶细胞的特异性CTL反应。同时可不同程度的分泌IL-12和可协助T细胞产生IFN-γ。结论：慢粒细胞在适当的细胞因子的诱导下，可分化为具有DC形态的细胞，后者可诱导出高效而特异的抗肿瘤免疫。

【关键词】树突状细胞；抗肿瘤免疫；慢性粒细胞白血病；细胞因子

【中国图书分类法分类号】R733.71 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-05-22

Study on the antitumor immune effect induced by dendritic cells derived from chronic myeloid leukemia

LUO Yunping, et al

(Department of Hematology, Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective*: To study the antitumor immune effect of dendritic cells derived from chronic myeloid leukemia. *Methods*: Leukemia cells were cultured for 7-21 days with a cocktail of cytokines which included GM-CSF、IL-4 and TNF-α. The DCs from leukemia cells were analyzed on morphology and cellular structure under microscope. The phenotype of DCs were identified by FACS. In order to examine the immune function of DCs, first, mixed lymphocyte response (MLR) was performed by means of [^{3}H]-TdR incorporation to observe the ability of DCs stimulating lymphocyte proliferation;secondly,cytotoxicity assay was measured in vitro in a [^{51}Cr]-release assay to observe the ability of DC stimulating CTL proliferation;lastly, the IL-12 and INF-γ level in supernatant of DC culture were measured by ELISA. *Results*: It was proved that the DCs from CML showed a typical morphology of dendritic cell under microscope. They expressed the phenotypic antigen of APC according to different degree. It was found the DCs from leukemia cells can stimulate strong Allo-MLR and CTL reaction. These results showed that these DCs had the ability to stimulate T lymphocyte proliferation, and the special CTL could clear leukemia cells. It was also found there were IL-12 and IFN-γ in the supernatant of DC culture. It was proved that the DCs secreted IL-12 by itself and increased the secretion of IFN-γ of T lymphocyte. *Conclusion*: The chronic myeloid leukemia cells are able to be induced to DCs with typical morphology by cytokines. DCs derived from leukemia cells can stably express the phenotype molecule of APC. They have the ability to stimulate T lymphocyte proliferation and induce CTL which can clear leukemia cells, and the DCs can secret IL-12 and increase the secretion of IFN-γ of T cell.

【Key words】 Dendritic cell; Antitumor immunity; Chronic myeloid leukemia; Cytokines

慢性粒细胞白血病（Chronic Myeloid Leukemia，CML）患者在临床上对大剂量化疗较为敏感，但第一次缓解后仍有较高的复发率，即使进行骨髓移植仍有复发的可能，因此寻找有效的辅助治疗方法是治愈慢性粒细胞白血病的关键。对治疗缓解后的复发以及慢粒的急变，采用化疗后的生物治疗是当前研究的热点。

树突状细胞（Dendritic Cells, DC）因其独特的免疫学特性，在诱导特异性抗肿瘤免疫反应中起关

作者介绍：罗云萍（1961- ），女，副教授，博士，

主要研究方向：白血病的基础研究及免疫治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

键作用[1]。许多研究均证实，白血病细胞可在适当的细胞因子诱导下分化为具有免疫活性的DC。我们先前的实验也证实，建株的髓性白血病细胞可分化为DC。Choudhury等报道[2]，慢性粒细胞白血病（CML）细胞体外经GM-CSF、IL-4、TNF-α作用可以诱生成DC，并具有极强的抗原提呈能力。国内王黎明等也有类似的报导[3]。我们选用慢性粒细胞白血病(急变期)外周血细胞,于体外用细胞因子诱导其向DC分化，重点对它的特异性抗自身肿瘤免疫功能进行研究。

1 材料和方法

1.1 标本来源

采取慢性粒细胞白血病急变期病人外周血，患者诊断和分期依据国际骨髓移植登记组分期标准，骨髓象中，原始细胞占89%，外周血中原始细胞45%，ph染色体阳性。

1.2 树突状细胞的诱导培养

抽取患者外周血10ml，常规分离PBMC，以RPMI 1640完全培养基调节细胞浓度为2×10^6/ml、同时加入1000U/ml GM-CSF，500U/ml IL-4，在培养的第7天加入TNF-α 10*fg*/ml，培养14天，隔日补充上述细胞因子、补充量为首次浓度的1/2。培养诱导的细胞命名为CML-DC。

1.3 培养细胞的细胞表型鉴定

用FITC标记的CD1a、CD40、CD86、HLA-ABC、HLA-DR单克隆抗体标记诱导的CML-DC细胞后，经流式细胞仪（FACS）检测细胞表型。

1.4 培养细胞抗肿瘤功能鉴定

1.4.1 同种混合淋巴细胞反应（Allo-MLR） 用正常人外周PBMC、经IL-2刺激5天后作为效应细胞。刺激细胞为CML-DC（培养14d），用丝裂霉素去增殖。刺激细胞与效应细胞的比为1:20、1:10、1:1。在96孔圆底板中培养5天，培养结束前12h加入1 μci/孔 [^{3}H]-TdR，收集细胞、用液闪仪测定其CPM值。

1.4.2 [^{3}H]释放试验检测CTL细胞毒作用 参照孙为民、王惠琴介绍的方法略加改进[19]取正常人外周抗凝血，常规分离PBMC，孵育3h后取悬浮细胞。培养5天后作为反应细胞。选取培养7天和14天的CML-DC、用25*fg*/ml丝裂霉素培养40min，去增殖后作为刺激细胞。同时用CML-PBMC作对照。将刺激细胞与反应细胞以1:10的比例，培养两周，每5天用CML-DC（去增殖）刺激一次。培养结束后，收集细胞作为CTL效应细胞。将患者自身的PBMC，取10 μCi/ml[^{3}H]TdR加入上述细胞中、培养6h作为靶细胞。同时用HL-60细胞作为对照靶细胞。在96孔圆底细胞培养板中加入标记[^{3}H]的靶细胞，效应细胞与靶细胞的比例20:1，培养18h后，每孔加入含1mg/ml胰蛋白酶和10*fg*/ml DNA酶的RPMI1640培养液继续培养30min，离心3000转/min收集培养上清和细胞，用液闪计数仪测定其中[^{3}H]的CPM量，计算杀伤活性。

1.4.3 分泌IL-12的检测 将收集的CML-DC培养7天、14天、21天的培养上清，用ELISA法检测上清中IL-12的含量。

1.4.4 协同分泌IFN-γ的检测 常规分离健康人PBMC，并用前述CML患者外周白血病细胞以PBS洗涤后，与PBMC以1:20加于24孔板中培养6h后，将经CML细胞刺激的PBML与CML-DC混合培养72h后收集上清液，用ELISA法检测上清中IFN-γ的含量。

2 结 果

2.1 树突状细胞培养的动态观察

2.1.1 细胞数量及形态变化

从CML外周血PBMC培养DC细胞，初始浓度为2×10^6/ml，经细胞因子刺激后，随培养时间的延长、细胞数量逐渐减少，而细胞体积变大，细胞形态呈现边缘有刺状突起，培养14天左右，细胞数量更少约为1×10^3~1×10^4/ml，但可见大量的具有DC形态的细胞（图1、2）。

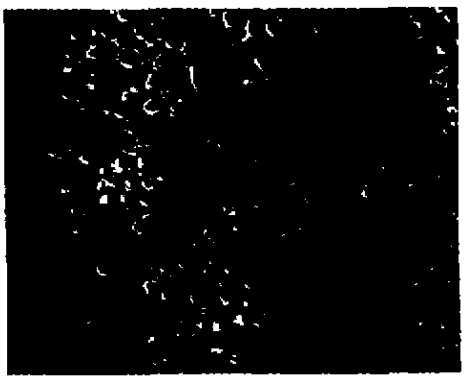


图1 培养14天光镜下CML-DC细胞的形态×400



图2 培养14天透射电镜下CML-DC的超微结构×10000

2.1.2 细胞表型的变化

DC相关分子的表达在第7天就开始出现，其CD1a、CD40、CD86、HLA-ABC、HLA-DR的表

维普资讯 http://www.cqvip.com

达到第14d达到高峰，一直保持到21天（图3）。

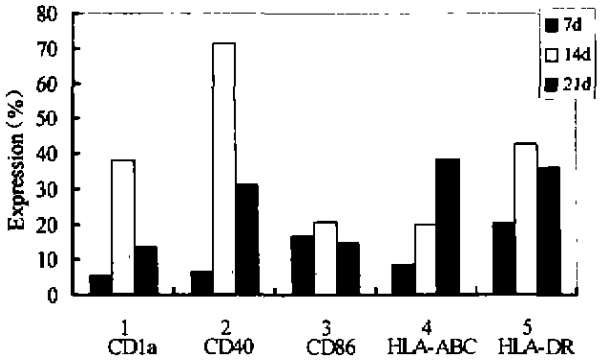


图3 CML-DC表面分子的表达

2.2 CML-DC功能检测

2.2.1 同种混合淋巴细胞反应（Allo-MLR）

用CML-DC细胞作为刺激细胞检测其刺激MLR反应，并用自身CML细胞作对照，结果提示：CML-DC对同种异体淋巴细胞有极强的刺激作用，其[^{3}H]掺入的CPM值明显高于对照，而且随DC数量增加，而刺激作用越强(图4)。

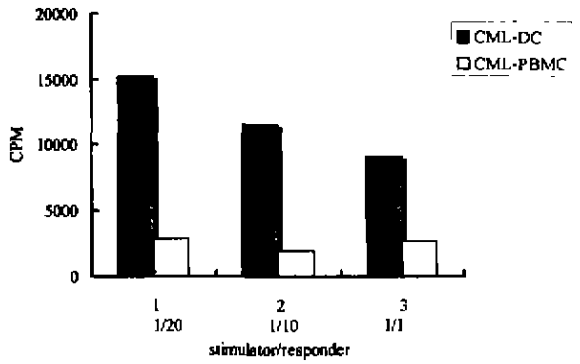


图4 CML-DC刺激同种淋巴细胞的增殖能力

2.2.2 CML-DC诱导产生的CTL对自身CML细胞的杀伤作用

用CML-DC刺激的效应CTL以自身CML细胞以及HL-60为靶细胞进行杀伤试验、结果显示，诱导14天的DC诱生的CTL对自身CML细胞有特异性杀伤作用，对HL-60也有一定杀伤作用，但较对自身CML细胞的杀伤作用为弱。而诱导7天的DC细胞未发现其有明显的刺激CTL产生杀伤活性的能力。

2.2.3 CML-DC分泌或协同分泌IL-12和IFN-γ的作用

经CML细胞肿瘤抗原刺激的PBMC与CML-DC混合培养72h后可见明显的IFN-γ分泌、与对照组比较增加近一倍（表1），同时检测到CML-DC有较高的IL-12的自分泌作用，从第7天开始，第14天达到高峰，一直持续到第21天（表2）。

表1 CML-DC协同T细胞分泌 IFN-γ（$\bar{x}\pm S$，n=3）

(pg/ml)	7d	14d	21d
CML-DC	38.9 ± 12.7	237.3 ± 124.7**	178.5 ± 56.3**
CML-PBMC	25.3 ± 14.3	23.5 ± 13.3	65.4 ± 45.0

** $P<0.01$

表2 CML-DC 分泌 IL-12

(pg/ml)	7d	14d	21d
CML-DC	158.9 ± 18.7*	330.3 ± 194.7*	326.5 ± 276.0**
CML-PBMC	85.4 ± 56.3	123.0 ± 93.0	55.3 ± 23.3

** $P<0.01$ * $P<0.05$

3 讨 论

慢性粒细胞白血病（CML）是一种起源于造血干细胞的恶性疾病，我们首次采用细胞因子GM-CSF、IL-4和TNF-α诱导慢性粒细胞白血病（急变期）患者的细胞向DC分化。实验证实这种诱导分化的DC与正常DC的形态和表型相似，都能表达抗原提呈相关分子，表明其诱导的DC为成熟型DC。在实验中发现，我们诱导的CML-DC与其它同类研究比较，CD1a的表达水平稍低[3,4]，分析原因。可能是大多数关于CML诱导DC的报道都为慢性粒细胞白血病的慢性期细胞，而我们选用的为急变期的病人。一般认为急性白血病细胞的DC诱导较慢性白血病细胞困难，但更深入的原因还有待进一步分析。

本文重点对CML-DC的抗自身肿瘤细胞特异性免疫功能进行了研究。DC细胞的主要功能是处理、加工和提呈抗原，激活T淋巴细胞，从而引发机体的免疫应答。功能成熟的DC具有极强的对T细胞的激活能力。我们采用同种异体混合淋巴细胞实验检测CML-DC对淋巴细胞的刺激作用，实验结果表明CML-DC对同种异体淋巴细胞具有强烈的刺激活力。有报道认为，DC细胞表面的共刺激分子表达的高低与DC细胞刺激同种异体混合淋巴细胞反应呈正相关[5]。而我们的实验显示CML-DC的CD86表达并不很高、而CD40有极强的表达，同样诱导了强烈的MLR反应，这可能是DC刺激T细胞后，T细胞表面的CD40L表达升高，这样后者可与高表达CD40的

维普资讯 http://www.cqvip.com

DC结合，从而可促进DC分泌IL-12，而IL-12又可刺激T细胞的增殖，通过DC与T细胞的相互作用，就使得免疫反应得到进一步增强。借助细胞因子诱生的CML-DC，可刺激PBMC为CTL细胞。通过对其杀伤自身靶细胞（CML细胞）的能力的观察，证明经诱导14天的DC细胞刺激的CTL对自身CML细胞有明显的杀伤活性，同时也能对其它肿瘤细胞（HL-60）起作用，但效果不如前者。而诱导7天的CML-DC作用不明显，可能是因为7天的DC还未成熟的缘故。

在培养上清中检测出较高水平的IL-12，证实CML-DC可分泌IL-12。随后，将这种CML-DC刺激经自身CML细胞作用的PBMC细胞，于刺激72h后可检测到IFN-γ。IFN-γ的分泌可能与CML-DC诱导的对靶细胞的杀伤作用有关。因为IFN-γ能增强CTL和NK细胞杀伤靶细胞的能力。同时分泌的IFN-γ又能明显增加抗原提呈细胞表达MHC'类抗原，增强抗原提呈细胞与T细胞的相互作用。进而增强T细胞辅助抗体产生和辅助细胞毒T细胞产生的能力。通过相互作用，进一步扩大免疫应答。

以上的实验结果证明，急变期CML的细胞在细胞因子的诱导能生成DC。更重要的是，用这种DC可诱导出特异性杀伤自身CML细胞的CTL细胞，为白血病的免疫治疗提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] 朱学军，楼国良，张明徽，等. 人急性早幼粒细胞白血病细胞诱导分化生成树突状细胞的体外研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，1998; 3:247-252.

[2] Choudhury A, Gajewski JL, Liang JC, et al. Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemia cellular cytotoxicity against philadelphia chromosome positive chromic myelogenous leukemia. Blood[J]. 1997; 89:1133-1139.

[3] 王黎明，陈姗姗，刘艳荣，等. 慢性髓性白血病来源的树突状细胞的功能研究[J]. 中国实验血液学杂志，2000;8:161-165.

[4] Frigu B, Chariance LD ,Payes J,et al. A convenient enzymelinked immunosorbent assay for testing wheather monoclonal antibodies recognize the same antigentic site[J]. J Immunol Method, 1983; 60:351-358.

[5] Choudhury BA, Liang JC, Thomas EK, et al. Dendritic cell derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autolegous, antileukemic T cell response[J]. Blood, 1999; 93:780-786.

（上接第18页）

参 考 文 献

[1] Witzenbicher B,Christman C,Schulze K,et al.Disturbance of the myocardial energy metabolism in A.SW/snj mice after viral infection (Coxsackie virus B_3)[J]. J Am Coll Cardiol.1991;17:264A.

[2] 郑富强. 细胞形态立体计量学[M]. 北京：人民卫生出版社，1990;157.

[3] 邵英杰、陈念祖，马爱群，等. 磷脂在大鼠心肌线粒体上的超微结构定位方法[J]. 解剖学杂志. 1992;15(1):36-37.

[4] Seligman AM,Karnovsky MJ,Wasserkrug HL,et al. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine(DAB) [J].J Cell Biol.1968;38:1-13.

[5] Ogawa K, Saito T, Mayabara H. The site of femicyianide reduction by reductase with mitochondria as studied by electron microscopy[J]. J Histochem Cytochem.1968;16(1):49-54.

[6] Halliwell B,chirico S.Lipid peroxidation:its mechanism, measurement,and significance[J].Am Clin Nutr,1993;57(s):715-719.

[7] Robinson NC.Specificity and binding affinity of phospholipids to the high affinity cardiolipin sities of beef heart cytochrome oxidase[J].Biochemistry.1982;21:184-192.

[8] Chien KR.Accelerated phospholipid degraration and associated membrance dysfunction in irreversible ischemic liver cell injury[J].J Biochem,1978;253: 4809-4816.

[9] Prasad K.Effect of oxygen free radical on cardiovascular function at organ and cellular levels[J].Am Heart J ,1989;117:1196-1198.

[10] 张福明，张淑琴，王相峰. 维生素C、E对病毒感染细胞活性的影响[J]. 营养学报，1996;18(4):489-491.

[11] Rose RC.Ascorbic acid metabolism in protection against free radicals:a radiation model[J].Biophys Res Commun,1990;169(2):430-433.