DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.036
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
1314 2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

# 技术方法

文章编号:1000-5404(2004)14-1314-03

## 临床用的抗肿瘤树突状细胞疫苗的制备及保存

## Preparation and cryopreservation of dendritic cell vaccine for clinical use

汪 灏,余佩武,郝 群,曾冬竹,张 坤,王月禾,雷 晓,石 彦,饶 芸,蔡志民 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨在体外制备可供临床使用的肿瘤树突状细胞疫苗的有效途径及冻存方法。方法 采用外周血单核细胞诱导DCs,自体胃癌细胞裂解抗原负载DCs,制备树突细胞疫苗。分别观察、检测了新鲜制备的DCs疫苗和冻存2周及2月的DCs疫苗的大体形态,免疫表型及刺激同种异体T淋巴细胞增殖的能力,并行细菌学检查。结果 新鲜制备的DCs疫苗高表达成熟DCs表面标志物HLA-DR、CD80及CD83,具有很强的刺激同种异体T淋巴细胞增殖的能力。疫苗冻存2个月以内,DCs细胞表型及刺激同种异体T淋巴细胞增殖的能力无明显下降。结论 采用本方法制备的DCs疫苗,无论从数量及质量均达到了临床应用的要求。并且证实疫苗冻存2月以内对疫苗质量无明显影响。

树突状细胞在抗肿瘤生物治疗中具有重要作用。大量的动物实验证实,树突状细胞可以诱导机体特异性免疫反应的发生,使机体得以抵御肿瘤的入侵或消灭机体现存的肿瘤[1,2]。以树突状细胞为基础的肿瘤疫苗已在一些类型的肿瘤中逐步开展[3]。制备可供临床使用的树突状细胞肿瘤疫苗是其进一步开展临床应用的前提。我们以胃癌细胞裂解物刺激DCs制备可供临床使用的DCs肿瘤疫苗,并对新鲜制备的DCs和经过不同时间冻存后复苏的DCs疫苗进行了检测,现报告如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要器材和试剂

RPMI1640培养基,FITC标记的抗人CD80抗体、抗人HLA-DR抗体及抗人CD83抗体(美国Gibco公司),淋巴细胞分离液(天津TBD生物技术发展公司),丝裂霉素C(日本临床化疗用药Potency),rhGM-CSF、rhIL-4(英国Promega公司),TNF-α(北京白鹭园生物技术有限公司),人AB型血清(本院血库)。超净工作台(美国NuAire公司),二氧化碳培养箱(美国Forma 3111型),流式细胞仪(美国Beckman公司)。

#### 1.2 DCs疫苗的制备(以下操作均在符合GMP标准的层流细胞培养间内进行)

1.2.1 外周血单核细胞(PBMC)的分离培养 无菌采集患者抗凝全血100 ml。50 ml离心管中加入20 ml淋巴细胞分离液(Ficoll-paque),再缓慢沿壁加入30 ml全血细胞悬液,以400× g,20 ℃离心30 min,收集界面单个核细胞于10 ml离心管中,以300× g,20 ℃离心10 min,弃上清。用PBS悬浮细胞1 000 r/min,5 min,洗细胞两次。把细胞加入50 ml培养瓶,8 ml RPMI1640完全培养基,37 ℃,5% $CO_2$ 孵箱培养2 h后去除非贴壁细胞,获得贴壁的单个核细胞。加8 ml RPMI1640完全培养基、GM-CSF、IL-4使其终浓度为:GM-CSF 100 ng/ml,IL-4 50 ng/ml。3 d换液。

1.2.2 胃癌细胞裂解抗原的获取 自体胃癌肿瘤组织(手术切除24 h以内)2 g用生理盐水洗净,锐利刀片切成5 $mm^3$ 碎块,置于生理盐水中,用100目网挤滤,收集细胞悬液,离心,弃上清。计数并取2× $10^8$ 细胞用生理盐水洗涤2遍,加入200 μl生理盐水,放入液氮中,10 min,迅速放入37 ℃水浴中,待其完全融化后,再次放入液氮中,反复3次,离心3 500 r/min,30 min,取上清将其稀释到1 ml,用微孔滤膜(0.22 μm)过滤,既得肿瘤抗原,4 ℃保存备用。

1.2.3 抗原的负载 培养细胞至第5天,加入肿瘤抗原液0.5 ml刺激,然后培养细胞至第7天加入TNF-α 20 ng/ml,第8天收获的细胞为负载肿瘤抗原的DCs疫苗。

#### 1.3 DCs疫苗的冻存及复苏

将2× $10^6$ DCs加入预先配好的1 ml冻存液[4]中,冻存液配制内容为:人AB型血清+二甲亚砜(DMSO)+25%葡萄糖。其配制比例为7∶1∶2。程序性逐级降温每分钟下降1 ℃,直到下降至-173 ℃,最后投入液氮中。

分别于冻存2周及2个月后将DCs复苏,检测其存活率:将冻存管从液氮中取出,迅速投入42 ℃温水中,不停搅动,直至管中液体完全溶解。将细胞悬液加入已加好培养液的培养瓶中,37 ℃培养箱中孵育24 h。观察细胞,台盼蓝染色计算细胞成活率。

#### 1.4 DCs疫苗的鉴定

分别采用下述方观对新鲜培养的DCs和冻存后复苏的DCs的形态及功能进行检测及评估。

作者简介:汪 灏(1971-),男,江苏省兴化市人,博士,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤综合治疗方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754000-54161

收稿日期:2003-08-11;修回日期:2004-05-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.4.1　DCs 疫苗的光镜观察　　观察 DCs 的大体形态。

1.4.2　DCs 疫苗表型检测　　收集 DCs, PBS 1 000 r/min 25 ℃ 10 min 离心洗涤 1 次, 弃上清, PBS 重悬细胞后分入 4 组试管, 每管 200 μl, 然后分别加入 FITC 标记的 HLA-DR、CD80、CD83 及阴性对照(IgG1)直标荧光抗体 10 μl。4 ℃ 30 min 避光染色。染色结束后每管加 1 ml PBS 稀释、上机检测。

1.4.3　T 淋巴细胞增殖实验　　采用尼龙毛柱法分离获取同种异体 T 淋巴细胞。将 T 淋巴细胞用培养基重悬, 调整细胞浓度为 $1\times10^6$/ml, 加入 96 孔板, 每孔 100 μl。待检的 DCs 加入终浓度 25 mg/L 的丝裂霉素 C, 37 ℃ 5%$CO_2$ 孵箱孵育 30 min 去除增殖能力。将 DCs 加入 96 孔板中, 每孔 100 μl, 调整 T 淋巴细胞数目与 DCs 数目之比为 10∶1、20∶1、100∶1 及 200∶1, 分别设 8 个复孔。空白对照组: 每孔加入培养液 100 μl。37 ℃、5%$CO_2$、饱和湿度下培养 3 d, 培养结束前 12 h 加入 $^3$H-TdR, 每孔实际放射比活度为 $3.7\times10^6$ Bq。ZT-Ⅱ型多头细胞收集器和"49"型玻璃纤维滤纸、大量 PBS 冲洗收集细胞, 10% 三氯乙酸及无水乙醇洗涤固定。滤纸片以 60 ℃烘干后放入盛有闪烁液的计数瓶中、Beckman 液闪计数仪测量 CPM 值。

1.4.4　细菌学、霉菌检查及内毒素检测　　树突状细胞培养第 8 天, 收获 DCs 疫苗后留取培养液继续培养 2 d, 在显微镜下检查有无细菌、霉菌生长。培养液送检行内毒素检测(鲎试剂检测法)。

## 2　结果

### 2.1　DCs 疫苗光镜观察

于培养的第 3 天即可见贴壁的单个核细胞呈豆芽状外观, 随后, 逐渐出现显著的树枝样突起, 第 4 天可见部分细胞悬浮, 第 7~8 天时大部分细胞悬浮。出现典型的树突状细胞形态, 细胞表面伸出树枝样突起, 不规则。从每 100 ml 外周血中平均可培养收获的 DCs 为(1.5~2.0)$\times10^7$。冻存 2 周及 2 个月的 DCs 疫苗复苏 24 h 后形态良好, 细胞表面仍可见大量树枝样突起。部分细胞形态皱缩, 经台盼蓝染色计数, 冻存 2 周及 2 个月的 DCs 细胞的存活率分别达 92% 和 87%。

### 2.2　DCs 疫苗表型的检测

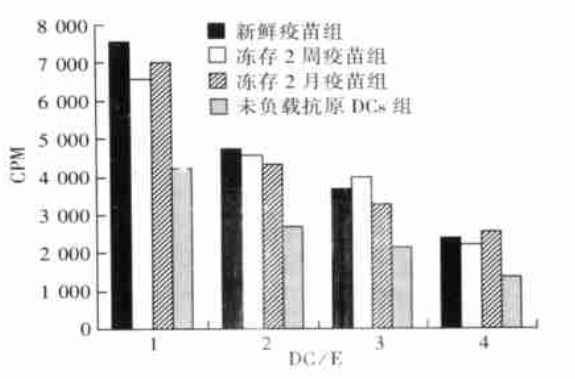
经检测, 新鲜 DCs 疫苗高表达成熟 DCs 表面标志物, HLA-DR、CD80、CD83 的表达率分别达 82.5%、90.0%、87.5%。冻存 2 周及 2 个月的 DCs 疫苗的 HLA-DR、CD80、CD83 的表达率也分别高达 80.4%、75.6%、82.3% 及 76.5%、77.2%、74.4%。

### 2.3　淋巴细胞增殖试验

新鲜 DCs 疫苗、冻存 2 周 DCs 疫苗及冻存 2 个月 DCs 疫苗组均具有很强的刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖的能力。随着 DC∶T 比例的下降, DCs 对同种异体淋巴细胞刺激能力逐渐下降, 但 DC∶T 比例降至 1∶200 时具有较强的刺激活性。见图 1。

### 2.4　细菌学、霉菌检查及内毒素检测

树突状细胞培养第 8 天, 收获 DCs 疫苗后留取培养液继续培养 2 d 在显微镜下检查均未发现细菌及霉菌生长。新鲜 DCs、冻存 2 周 DCs 及冻存 2 个月 DCs 疫苗培养液上清内毒素水平均为阴性。说明我们制备疫苗的过程中无病菌污染。




1~4: DC∶T 的比例分别为 1∶20, 1∶50, 1∶100, 1∶200

图 1　**DCs** 刺激同种异体 **T** 淋巴细胞增殖反应　($\bar{x}\pm s$, cpm)

## 3　讨论

DCs 在抗肿瘤免疫中可发挥重要作用。动物实验证明, 将 DCs 在体外诱导, 扩增并予以相应抗原刺激, 然后回输机体可以诱导出特异性的抗肿瘤免疫反应。我们在前期体外及动物实验 DCs 治疗胃癌成功的基础上[5,6], 进一步探索了可供临床使用的树突状细胞疫苗的制备及冻存方法。

### 3.1　DCs 的诱导及鉴定

成熟的人树突状细胞表面特征性的表达特异性抗原 CD83, 并高表达共刺激分子 CD80, CD86 及人白细胞分化抗原 HLA-DR, 这些表面分子具有向 T 细胞传递抗原肽, 并协同刺激激活 T 淋巴细胞的功能。DCs 在机体组织和外周血中含量极微, 在血液中仅占单个核细胞总数的 0.5%~1.0%, 难以分离、纯化。因此, 必须进行 DCs 体外培养, 诱导分化获取大量的 DCs 以满足对 DCs 疫苗临床治疗的需要。目前体外获取人 DCs 的常用方法包括[7~9]: ①外周血的 $CD14^+$ 单核细胞在粒巨集落刺激因子(GM-CSF)加白细胞介素-4(IL-4)的条件下诱导生成 DCs, 并添加 TNF-α, IL-1, 脂多糖(LPS), CD40 配体(CD40L)或单核细胞条件培养基等诱导 DCs 成熟。②来源于外周血, 脐血或骨髓的 $CD34^+$ 细胞在体外在添加 GM-CSF 和 TNF-α 的培养条件下可以发育成 DCs, 此外其他多种细胞因子的组合均可诱导出成熟的 DCs 如 GM-CSF、Flt-3L、CD40L、TGF-β1 及干细胞生长因子等[10]。

但是, 获取 $CD34^+$ 细胞费时费力, 成本高, 目前不适合临床常规采用。而外周血 $CD14^+$ 单核细胞获取相对容易。我们采用了经人外周血单核细胞诱导生成 DCs 疫苗。每个患者抽外周血 100 ml 的情况下 DCs 细胞产量达(1.5~2.0)$\times10^7$ 个细胞。细胞数量达到了

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

目前临床应用的要求。经光镜及流式细胞仪检查，我们培养的树突状细胞有明显的树突状突起，细胞表面表达高水平的CD83，CD80及HLA-DR等免疫分子表型，提示我们诱导出了成熟的树突状细胞。

3.2 肿瘤抗原的负载

目前DCs的临床应用研究中，很多都采用特异性抗原肽在体外负载DCs制备疫苗。但由于绝大多数肿瘤的抗原是未知的，影响了DCs疫苗在大多数实体肿瘤中的应用。如果用自体肿瘤细胞裂解抗原体外致敏DCs，就能克服特异性抗原肽刺激存在的某些缺陷，如无须明确肿瘤抗原，由多个不同的肿瘤抗原刺激DCs，从而诱导针对不同抗原决定族的CTL克隆。我们的实验也证实，负载胃癌裂解抗原的DCs疫苗可在体外激发明显的同种异体T淋巴细胞增殖反应，具有很强的生物活性。

3.3 疫苗的冻存

一个疗程疫苗的临床治疗往往需要多次注射DCs细胞。如果每次都采用新鲜培养的DCs细胞将给患者本人身心及经济带很大的负担，并增加污染的机会。1次制备然后冻存，分次注射的方法可以节约财力和人力。但冻存疫苗是否与新鲜疫苗具有相同的活性？本实验对冻存2周及2个月的DCs疫苗的存活率，表型及T淋巴增殖实验进行了检测。结果显示冻存2周及2个月的DCs疫苗的存活率分别高达92%和87%。冻存疫苗细胞表型及刺激T淋巴细胞增殖的能未受明显影响。

3.4 安全性

本疫苗在培养及冻存过程中经细菌学及内毒素检测，未发现细菌，霉菌生长。培养上清内毒素检测均为阴性。

本实验利用外周血单核细胞诱导DCs，自体胃癌细胞裂解抗原负载DCs，制备树突细胞疫苗。经检测，DCs细胞无论从数量及质量均达到了临床应用的要求。并且证实疫苗冻存2个月以内对疫苗质量无明显影响。我们认为本方法简单，经济，安全性高。为DCs疫苗在胃癌中下一步的临床应用提供了坚实的基础。

关键词：树突状细胞；胃癌；疫苗

中图法分类号：R392.7 文献标识码：B

参考文献：

[1] Fields R C, Shimizu K, Mule J J, *et al*. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent anti-tumor immune responses *in vitro* and *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(21): 9482—9487.

[2] Saha A, Chatterjee S K, Foon K A, *et al*. Murine dendritic cells pulsed with an anti-idiotype antibody induce antigen-specific protective antitumor immunity[J]. Cancer Res, 2003, 63(11): 2844—2854.

[3] Engleman E G. Dendritic cell-based cancer immunotherapy[J]. Semin Oncol, 2003, 30(3 Suppl 8): 23—29.

[4] Bernadette F, Thomas G B. A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use[J]. J Immunol Methods, 2000, 245(1-2): 15—29.

[5] 吴 淼，余佩武，蔡志民，等. 负载胃癌酸洗抗原树突状细胞诱导高效特异的抗胃癌细胞效应[J]. 第三军医大学学报，2002，24(10)：1236—1238.

[6] 雷 晓，余佩武，石 彦，等. 树突状细胞肿瘤疫苗诱导抗胃癌作用的试验研究[J]. 中华胃肠外科杂志，2002，5(1)：45—48.

[7] Wu L, Vandenabeele S, Georgopoulos K, *et al*. Derivation of dendritic cells from myeloid and lymphoid precursors[J]. Int Rev Immunol, 2001, 20(1): 117—135.

[8] Curti A, Fogli M, Ratta M, *et al*. Dendritic cell differentiation from hematopoietic CD34+ progenitor cells[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2001, 15(1): 49—52.

[9] Banchereau J, Palucka A K, Dhodapkar M, *et al*. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine[J]. Cancer Res, 2001, 61(17): 6451—6458.

[10] Syme R, Gluck S. Effects of cytokines on the culture and differentiation of dendritic cells *in vitro*[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2001, 10(1): 43—51.

（编辑 汪勤俭）

## 参考文献类型及标识

根据GB 3469规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

| 参考文献类型 | 专著 | 论文集 | 报纸文章 | 期刊文章 | 学位论文 | 报告 | 标准 | 专利 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 文献类型标识 | M | C | N | J | D | R | S | P |

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母“A”；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母“Z”。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

| 电子参考文献类型 | 数据库 | 计算机程序 | 电子公告 |
|---|---|---|---|
| 电子文献类型标识 | DB | CP | EB |

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net