DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.030
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1207-03

论著

胃癌患者外周血DCs细胞表型变化研究

张 坤[1],余佩武[1],高朋芬[2],汪 灏[1],刘 伟[1],饶 云[1] (第三军医大学西南医院:[1]普通外科,[2]全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究胃癌患者外周血树突状细胞(DCs)细胞表型表达水平,与正常人DCs细胞表型表达进行比较并分析其临床意义。方法 分离培养胃癌患者及正常人外周血DCs,流式细胞仪检测细胞表型表达变化。结果 培养第3天,DCs细胞表型表达均较低,两组之间差异不显著;培养第7天,两组培养DCs细胞表型表达均较第3天显著升高,且两组之间差异非常显著;培养第12天,DCs表型表达较培养第3天差异非常显著,较培养第7天差异不显著,两组之间差异显著。结论 外周血培养DCs的细胞表型表达随培养时间推移而升高,至细胞成熟时趋于稳定;胃癌患者DCs细胞表型表达较正常人显著降低,了解胃癌患者体内DCs细胞表型表达水平,对评判患者预后及生物治疗疗效有一定的参考价值。

关键词:胃癌;树突状细胞;细胞表型
中图法分类号:R329.24;R331.14;R735.2 文献标识码:A

Expression of dendritic cell surface phenotypes in peripheral blood from gastric cancer patients and the clinical significance

ZHANG Kun[1], YU Pei-wu[1], GAO Peng-fen[2], WANG Hao[1], LIU Wei[1], RAO Yun[1]([1]Department of General Surgery, [2]Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the expression levels of dendritic cell surface phenotypes in peripheral blood from gastric cancer patients and normal people and the clinical significance. Methods Dendritic cells isolated from the peripheral blood of gastric cancer patients and normal people were cultured. The changes in expression of the phenotypes at different time points were detected by flow cytometry. Results At 3 d after cell culture, the expression levels of dendritic cell phenotypes in the two groups were very low, but no significant difference was found between the two groups. At 7 d after cell culture, the expression levels of the phenotypes of the two groups were significantly higher than those at 3 d, and significant difference was found between the two groups. At 12 d after cell culture, the expression levels of the phenotypes were significantly higher than those at 3 d, but were not significantly different from those at 7 d. Significant difference was also found between the two groups at 12 d. Conclusion The expression levels of the phenotypes of peripheral blood dendritic cells increase in a time-dependent manner. When the cells become mature, the expression levels of the cell phenotypes tend to be stable. The phenotype expression level of dendritic cells from gastric cancer patients is significantly lower than that from normal dendritic cells. Detection of the expression level of phenotypes of dentritic cells can be helpful for the judgment of prognosis and evaluation of the therapeutic efficacy of biotherapy.

Key words: gastric cancer; dendritic cell; phenotype

胃癌是常见消化道恶性肿瘤之一,严重威胁人类的健康,其术后5年生存率仍仅为30%左右。如何提高胃癌患者的长期生存率是目前研究的重要课题。生物治疗成为继手术、放疗、化疗后的第4种肿瘤治疗手段,其目的是诱导机体产生特异性抗肿瘤免疫反应。而树突状细胞(dendritic cells, DCs)是机体最有效的专职抗原递呈细胞,捕获抗原、加工处理后将抗原信息递呈给淋巴细胞,激发后续特异性细胞和体液免疫反应。DCs细胞表型的变化直接影响到患者的免疫功能状态。因此,确定胃癌患者体内DCs细胞表型表达水平及其变化规律,在对胃癌患者的机体免疫状态评价及术后生物治疗方案确定方面有着重要的参考价值。因此,我们对胃癌患者外周血DCs表型变化进行检测,了解其变化规律,为胃癌生物治疗提供理论基础和实验依据。

作者简介:张 坤(1973-),男,山东省沂水县人,博士研究生,医师,主要从事胃肠道肿瘤外科治疗及生物治疗方面的研究。电话:(023)68754000-73172

收稿日期:2003-05-26;修回日期:2003-09-20

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

1 对象和方法

1.1 研究对象

我科室收治胃癌病例共20例，所有病例均经术后病理检查明确诊断。其中男性12例，女性8例，年龄最大69岁，最小27岁。对照组为健康献血员20名。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM培养基(Gibco, USA)；重组人GM-CSF、IL-4、TNF-α(Sigma, USA)；淋巴细胞分离液(TDB)；抗人CD80、CD86、HLA-DR单克隆抗体(Gibco, USA)；流式细胞仪(Beckman, USA)。

1.3 外周血DC培养

无菌取胃癌患者及献血员外周静脉血40 ml，肝素抗凝；50 ml离心管中分别加淋巴细胞分离液20 ml，缓慢沿离心管壁加入抗凝血20 ml，2 500 r/min，离心30 min；离心后管内由上至下分为血清、单个核细胞、淋巴细胞分离液、红细胞4个带；吸取单个核细胞，1 500 r/min，离心10 min，弃上清；分别以1 500、1 000 r/min离心5 min，PBS洗细胞2次；获得PBMC，用DMEM完全培养基悬浮细胞，37 ℃，5%CO_2浓度孵箱培养2～3 h；收集贴壁单个核细胞，DMEM完全培养基培养；培养2 h后加入细胞因子GM-CSF及IL-4 h，培养72 h追加1次；培养6 d后加入TNF-α。

1.4 细胞形态观察及表型检测

分别于培养第3、7、12天观察细胞形态并收获DCs，PBS 1 000 r/min，10 min离心洗涤1次，弃上清；PBS重悬细胞后，分别加入4个试管，每管500 μl，分别加入CD80、CD86、HLA-DR及IgG1直标荧光抗体15 μl，4 ℃ 30 min避光染色，流式细胞仪检测。

1.5 统计学分析

所得数据取平均值，以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 培养DCs的形态学变化

正常人外周血DCs培养第3天观察，细胞表面有少量毛刺样突起形成，细胞形态比较规则，胞膜完整、清晰，部分细胞聚集成团生长；培养第7天观察，细胞悬浮生长，形态规则，细胞表面有大量毛刺样突起形成，细胞散在(图1)；培养第12天观察，培养DCs体积增大，悬浮生长，细胞表面毛刺多、清晰。在培养的各个不同时相点观察，胃癌患者外周血与正常献血员外周血培养DCs比较，细胞体积无明显差异，但细胞数量较少，表面毛刺样突起不如正常人DCs明显。

2.2 培养DCs细胞表型检测

培养第3天，胃癌患者及正常人外周血DCs细胞表型CD80、CD86、HLA-DR表达均低，且两组之间相差不显著；随培养时间的推移，培养DCs细胞表型表达逐渐升高，至培养第7天，胃癌患者及正常人外周血DCs细胞表型表达均较第3天显著增高，且两组之间相差非常显著；培养第12天，DCs细胞表型表达与第3天比较差别非常显著，与培养第7天比较差别不显著，两组之间比较差异显著(表1)。



图1 正常人外周血来源DCs培养第7天，细胞表面毛刺样突起明显 (倒置显微镜×200)

Fig 1 Dendritic prominency on the surface of dendritic cells from normal blood at 7 d after culture (Inverted microscope × 200)

表1 胃癌患者及正常人外周血DCs细胞表型变化比较($\bar{x}\pm s$, %)($n=20$)

Tab 1 Changes in phenotypes of DCs in peripheral blood from gastric cancer patients and normal people ($\bar{x}\pm s$, %)($n=20$)

	Gastric cancer group			Normal group		
	CD80	CD86	HLADR	CD80	CD86	HLADR
3 d	11.2±1.5	13.1±1.3	12.3±1.8	11.8±1.7	13.6±2.3	13.1±1.7
7 d	68.7±7.3**	62.1±9.7**	58.3±13.2**	83.2±8.5	75.3±12.2	77.6±9.5
12 d	69.4±8.1**	63.2±7.6**	59.8±13.4**	85.3±6.2	77.2±3.8	79.8±5.1

$F=19.73$, **: $P<0.01$, *vs* normal group

3 讨论

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤，其术后5年生存率仍然很低，如何努力提高胃癌患者的生存率，已成为近年来学者们研究的热点与重点。其中生物治疗因其疗效的显著，给人们克服恶性肿瘤的威胁带来新的希望[1]。树突状细胞作为机体内专职的抗原提呈细胞，在摄取、提呈抗原及激发后续特异性抗肿瘤免疫反应中发挥着不可替代的重要作用[2]。而在树突状细胞处理提呈抗原过程中，其表面分子CD80、CD86、HLA-DR等的表达水平又起到重要的制约作用，直接关系到DCs免疫激发的功能状态。其中CD80、CD86作为DC激活T淋巴细胞过程中的重要共刺激分子，作用尤为重要，其表达水平如何，标志着DCs免疫激活能力状态的高低[3,4]。因此，测定胃癌患者体内DCs细胞表面分子的表达水平，对正确判断患者的预后及确定相应生物治疗方案，有一定的参考价值。在该实验中，我们对胃癌患者外周血分离培养的DCs细胞表型表达进行了检测，发现随着DCs的逐渐成熟，其表面分子的表达量逐渐升高，至细胞成熟时其表达量趋于稳定。但在其整个培养成熟的过程中，其表面分子的表达水平明

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

1.2 实验材料

PMA、Ionomycin、BFA 及 CD3-TC、CD8-FITC、IFN-γ-PE、IL4-PE、FIX & PERM FIXATION 均购于美国 Caltag 公司。

1.3 实验方法

取空腹静脉血 2 ml 肝素抗凝。取 100 μl 血液，加入 100 μl RPMI1640，5 μl PMA 工作液，4 μl Ionomycin 工作液，4 μl BFA 工作液，混匀；37 ℃ 培养箱培养 4～6 h；加入 10 μl CD3-TC 和 10 μl CD8-FITC，静置 15 min；分成 2 管，每管中加入 100 μl Reagent A 固定剂，静置 15 min 后加入 PBS，1 200 r/min 离心 5 min，去上清；每管中加入 100 μl Reagent B 透膜剂，同时加入相应抗体 10 μl，静置 15 min 后加入 PBS 离心，去上清；0.5 ml PBS 重悬细胞。上机检测：TH1 为 $CD3^+CD8^-$ IFN-γ＋，TH2 为 $CD3^+CD8^-$ $IL\text{-}4^+$。

1.4 质控

PMA＋Ionomycin 刺激后 CD69 在 $CD3^+$ T 细胞中的表达率＞90%（第一步质控）；第一步质控较好时，进行第二步质控，即破膜后观察 CD69 占 $CD3^+$ T 细胞的百分率，其值也应＞90%。然后行正式检测。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 8.0 统计软件分析。两组间比较用 t 检验。

2 结果

与正常妊娠相比，妊高征组患者外周血 TH1 百分比升高，差异显著；TH2 百分比降低，差异显著；TH1/TH2 比值升高，差异显著，见表 1。

表 1 两组外周血 **TH1** 及 **TH2** 百分比及 **TH1/TH2** 比值（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 The percentage of TH1 and TH2 cells and the ratio of TH1/TH2 in PIH patients and normal pregnant control（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	TH1(%)	TH2(%)	TH1/TH2
PIH	20	20.50±4.02	2.31±1.02	11.80±7.72
Control	15	12.57±2.18	3.63±0.70	3.66±1.15
t		6.906	−4.277	4.037
P		0.012	0.033	0.00

3 讨论

1986 年，Mosmann 等[3] 发现 $CD4^+$ 细胞具有两种不同功能的亚群，即 TH1 和 TH2 细胞。TH1 细胞分泌 IL-2，IFN-γ，TNF-α 及 TNF-β，参与细胞免疫及迟发型超敏性炎症的形成。TH2 细胞分泌 IL-4，IL-5，IL-10，IL-13，主要功能为刺激细胞增殖并产生抗体，与体液免疫有关。正常机体内，TH1/TH2 网络维持着动态平衡，当 TH1/TH2 平衡失调时，即某一亚群功能增强，另一亚群功能减弱，称为“TH1/TH2 漂移”。疾病的 TH1/TH2 模式是指疾病所引起的机体优势免疫应答的类型，当 TH1 细胞亚群及其细胞因子占优势，即 TH1/TH2 异常偏向 TH1 漂移，这类疾病属于 TH1 模式，反之，当 TH2 细胞亚群及其细胞因子占优势，即 TH1/TH2 异常偏向 TH2 漂移，这类疾病属于 TH2 模式。

妊娠是一种特殊的半同种异体移植现象。母体对胚胎这种天然移植物的免疫耐受是妊娠得以建立和维持的内在本质。临床上罹患有细胞免疫介导的自身免疫性疾病（如类风湿等）的妇女在妊娠期间，其病情得以缓解；而一些由体液免疫介导的自身免疫性疾病（如系统性红斑狼疮，重症肌无力等）以及一些依赖细胞免疫参与防御的胞内病原体感染（如 HIV、弓形体、疟原虫等）在妊娠时病情加重[1]，所有这些事实均表明正常妊娠时存在着 TH2 型免疫漂移[4]。

本实验采用流式细胞术测定外周血 TH1 及 TH2 百分比，先用 PMA 及 Ionomycin 活化刺激淋巴细胞，并用 BFA 抑制细胞因子分泌，因为在 PMA 刺激下，CD4 抗原的表达迅速下调，而 CDA8 抗原不受影响，且绝大多数 $CD3^+CD8^-$ 细胞都是 $CD3^+CD4^+$ 细胞，故以 $CD3^+CD8^-$ 细胞群来确定 $CD4^+$ T 细胞群，其中 IFN-γ＋为 TH1 细胞，$IL\text{-}4^+$ 为 TH2 细胞。结果显示中、重度妊高征患者体内 TH1 型免疫反应增强，而 TH2 型免疫反应减弱，属于 TH1 模式。

但妊高征时遗传背景对于 TH1/TH2 优势应答有何影响，TH1/TH2 平衡在自身抗原识别中的作用及怎样维持优势应答，都是需要进一步研究的问题。通过直接注射 TH1 或 TH2 细胞因子；应用细胞因子受体或抗体；阻断共刺激通路；基因治疗等逆转 TH1/TH2 异常漂移[5]，可为妊高征治疗或阻断病情发展提供有力手段。

参考文献：

[1] 王梦玖，林其德. 临床生殖免疫学[M]. 上海：上海科学技术出版社，2000. 253－302.

[2] 乐 杰. 妇产科学[M]. 第 5 版. 北京：人民卫生出版社，2000. 116.

[3] Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, *et al*. Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. J Immunol, 1986, 136(7): 2348－2357.

[4] Wegmann T G, Lin H, Guilbert L, *et al*. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship is successful pregnancy a TH2 phenomenon[J]. Immunol Today, 1993, 14(7): 353－356.

[5] 王 莉，吴玉章. CTL 与 TH1/TH2 极化[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(10): 985－988.

（编辑 陈聪连）

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