DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.019
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
142 2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0142-04

人树突状细胞体外提呈凋亡胆管癌细胞抗原的研究

吴 刚[1],韩本立[1],裴雪涛[2] ([1]第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心,重庆 400038;[2]军事医学科学院放射医学研究所实验血液研究室,北京 100850)

提 要 目的:建立从人外周血诱导扩增树突状细胞(DC)及其从凋亡癌细胞提呈抗原的方法。方法:从正常人外周血分离获得单核细胞,加入50 ng/ml hGM-CSF,1 000 ng/ml hIL-4,隔天1次,共4次,培养第3天,加入γ射线照射过的胆管癌细胞,再继续体外培养1周后,用树突状细胞富集柱收集DC。结果:DC高表达共刺激分子B7和CD1a,表面具有典型不规则突起,DC捕捉凋亡小体、吞噬凋亡小体,负载抗原的DC其激发同种异体T淋巴细胞增殖的能力进一步增强。结论:用GM-CSF加IL-4能从人外周血诱导、扩增出DC,并可以有效提呈凋亡胆管癌细胞的抗原,可望成为有效的肿瘤抗原装载DC的新途径。

关键词 树突状细胞;单核细胞;粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;白细胞介素4;细胞凋亡;凋亡小体
中图法分类号 R329.24;R329.25;R735.8 文献标识码 A

Acquirement of antigen from apoptotic cells by human dendritic cells from peripheral blood

WU Gang, HAN Ben-li, PEI Xue-tao (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To seek an efficient way of antigen acquirement from apoptotic cells by human dendritic cells (DC) from peripheral blood. Methods: We obtained DC from peripheral blood monocytes maintaining the antigen capturing and processing capacity by using granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin 4 (IL-4). Then the immature DC and apoptotic hepatocholangioma cells were cocultured for 7 d. Results: These cells have typical dendritic morphology and express high levels of CD1a and B7. Furthermore, they acquire antigen from apoptotic cells and induce and increased T cell stimulatory capacity in MLR. Conclusion: We established DC from blood monocytes using GM-CSF and IL-4. DC can efficiently acquire antigen derived from apoptotic cells and induce increase of T cells.

Key words dendritic cell; monocyte; granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; interleukin 4; apoptosis; apoptotic body

树突状细胞(Dendritic cells, DC)在抗原提呈方面起着重要的作用。树突状细胞的分化发育过程存在二个不同的阶段,作为未成熟的DC,具有摄取、处理抗原的能力,一旦发育为成熟DC,抗原捕获能力丧失,变成刺激静息淋巴细胞激活初次免疫反应的免疫抗原递呈细胞。早在90年代初,就有报道[1,2]DC具有胞饮能力和表达FcγR Ⅱ,因而具有捕获抗原的能力。最新研究发现[3],包裹在凋亡小体外面的膜性物质是一种与原生存细胞膜相一致的免疫原性物质,凋亡小体膜携带的抗原能被DC的MHC-I分子所提呈。许多证据表明抗肿瘤免疫机制失能不是由于缺乏肿瘤抗原而是由于这些抗原不能有效提呈给T细胞产生特异性的免疫反应之故。本研究进行了人外周血树突状细胞体外诱导

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(3982511)
作者简介:吴 刚(1962-11),男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事树突细胞临床应用方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)65335972
收稿日期:1999-07-19,修回日期:1999-12-22

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

扩增及鉴定, DC 提呈凋亡肿瘤细胞抗原的实验研究。目的是通过 DC 吞噬凋亡小体获取肿瘤细胞抗原来阻止肿瘤细胞免疫逃避, 从而激发机体的自身免疫力, 为探索 DC 在肿瘤主动特异性免疫治疗中的重要作用打下基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　主要试剂　　γ-射线照射源: 军事医学科学院放射医学研究所 ^{60}Co 源, 剂量率 2.07 ~ 2.23 Gy/ min; 淋巴细胞分离液 M 450: 英国进口分装, 上海化学试剂厂; CD2、CD19 Magnetic Beads 磁性分离试剂盒: Coulter 公司; 鼠抗人单克隆荧光抗体 CD1a(PE)、B7(FITC): Pharmingen 公司; 培养基 (IMDM): Gibcol Brl 公司。

1.1.2　细胞株　　QBC939 胆管癌细胞株由第三军医大学西南医院王曙光博士惠赠。

1.2　方法

1.2.1　人外周血定向诱导分化和培养树突状细胞　　人外周血肝素抗凝, 4∶1 比例与 0.5%甲基纤维素混匀静置约 30 min, 将红细胞自然沉降至界限分明。收集吸出上层(上清)有核细胞部分, Ficoll-Paque 分离获取单个核细胞, CD2、CD19 免疫磁珠去除 T、B 淋巴细胞, 制成 1×10^6/ml 细胞悬液备用。24 孔培养板每孔加 1 ml IMDM 培养基, 37℃、5%CO_2 及饱和湿度的条件下, 每孔单核细胞的初始浓度 2×10^6/ml, 细胞因子 GM-CSF 50 ng/ml 、IL-4 1 000 ng/ml 每 48 h 加入培养体系 1 次, 连续 4 次, 1 周半量换液。

1.2.2　凋亡胆管癌细胞制备　　取 5×10^6 胆管癌细胞 4 Gy 照射 6 h 使细胞凋亡。

1.2.3　树突状细胞吞噬凋亡小体提呈抗原　　IMDM 培养基, 37℃、5%CO_2 及饱和湿度的条件下, 从人外周血定向诱导分化和培养树突状细胞并在培养的第 3 天 DC 和凋亡胆管癌细胞共培养, 为了证明凋亡是抗原交叉提呈中的重要环节, 设计了 DC 和坏死胆管癌细胞共培养组 (胆管癌细胞加入低渗盐水在 37℃、5%CO_2 及饱和湿度的条件下培养 30 min) 以及正常培养的胆管癌细胞, 共培养 7 d 后, 收集 DC 备用。

1.2.4　电镜观察　　于培养第 11 天收集共培养的 DC 用 PBS 洗涤 2 次, 4%戊二醛固定后, PBS 洗 1 次, 制成悬液滴片, 1%锇酸固定, 梯度酒精脱水, 扫描电镜观察摄片。另取分化成熟的 DC 悬液离心, 细胞沉淀用 4%戊二醛固定及 1%锇酸固定, 梯度酒精脱水, 经超薄切片铅铀染色后透射电镜观察摄片。

1.2.5　DC 的免疫刺激活性及负载抗原后的免疫刺激活性

从外周血单核细胞诱导、分化获得的 DC 分别以 1×10^3/ 孔, 5×10^3/孔, 1×10^4/孔加入 96 孔圆底培养板, 用单核细胞作对照组, 每组各 3 个复孔, 每孔再加入同种 T 细胞 1×10^5, 终体积为 200 μl, 37℃、5%CO_2 及饱和湿度的条件下。培养 96 h, 于检测前 18 h 加 H^3-TdR 0.5 μCi/孔。收集细胞, 液闪计数检测 cpm 值, 结果用 3 孔平均值表示。我们也检测了负载抗原后 DC 的免疫刺激活性, 3 组 DC(受凋亡胆管癌细胞刺激、坏死胆管癌细胞刺激、正常培养的胆管癌细胞刺激)也作了比较。

2　结果

2.1　具有抗原递呈能力的 DC 体外培养

去除 T、B 细胞后的外周血单核细胞, 加入在 IMDM 培养基中, GM-CSF 50 ng/ml, IL-4 1 000 ng/ml 48 h 1 次, 培养 7 d 后, 大部分细胞悬浮不贴壁, 形态不规则, 相差显微镜可见伸展的大量毛刺, 为典型 DC 形态, 见图 1。表面标志分析, 大量细胞是均质的并高表达 CD1a 和 B7, 见图 2。透射电镜见 DC 伸展的突起, 胞浆富含线粒体, 见图 3。

2.2　未成熟 DC 吞噬凋亡小体从凋亡胆管癌细胞提呈抗原

与凋亡胆管癌细胞共培养的 DC 胞浆内可见吞噬的凋亡小体, 而与坏死胆管癌细胞共培养的 DC 胞浆内未见吞噬的凋亡小体, 见图 4。

2.3　DC 的免疫刺激活性

我们检测从外周血单核细胞分化、诱导的 DC 对 T 淋巴细胞的刺激活性, 也检测了提呈抗原后 DC 的免疫刺激活性, 并对分别受凋亡胆管癌细胞刺激、坏死胆管癌细胞刺激和培养胆管癌细胞刺激的 DC 其免疫刺激活性作了比较, 见表 1。结果表明, 同种异体混合淋巴细胞反应时, 少量 DC 即可强烈激发 T 淋巴细胞的增殖, 在抗原负载 DC 后, 其激发能力进一步增强 ($P<0.05$), 见表 1。而对照组由于是单核细胞而非 DC, 故并不能有效激发 T 淋巴细胞的增殖。

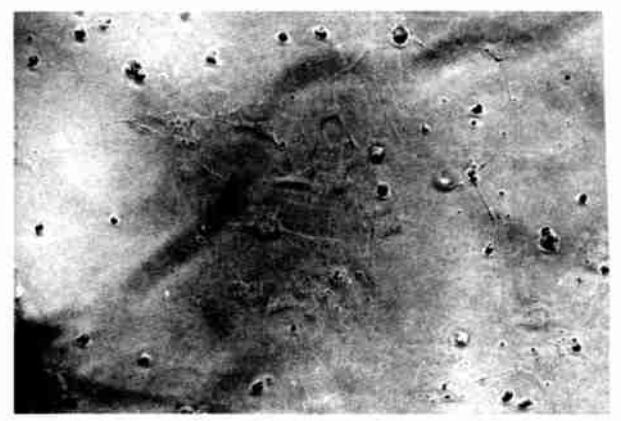


图 1　DC 体外培养第 7 天的形态　(× 500)

Fig 1　Typical appearance of DC cultured on 7th day　(× 500)

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

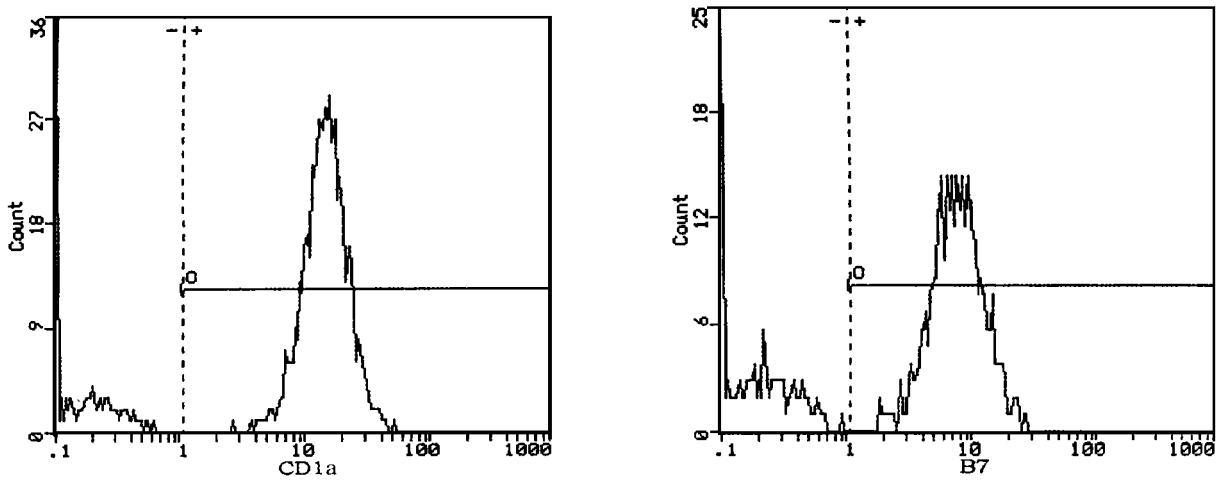


图 2 培养第 7 天 DC 表型检测

Fig 2 Surface phenotype of DC on 7th day of culture

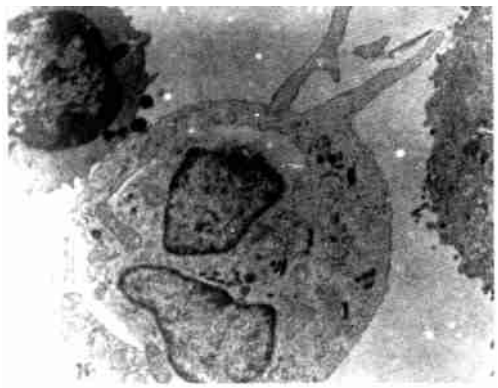


图 3 透射电镜下的树突状细胞 (×7 600)

Fig 3 DC under transmission electron microscopy (× 7 600)

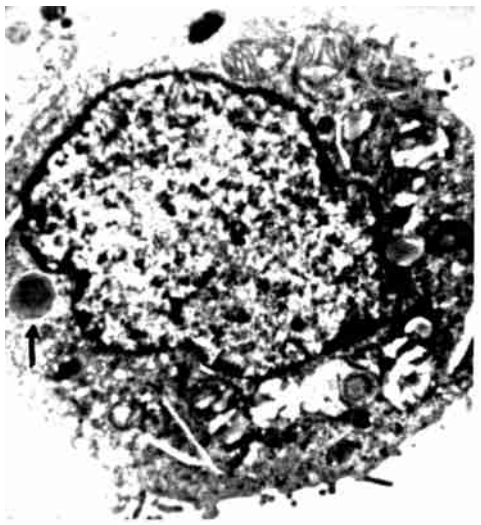


图 4 透射电镜显示 DC 吞噬凋亡小体 (×7 600)

Fig 4 Transmission electron microscopy revealed apoptotic body in the cytoplasm of DC (×7 600)

表 1 DC 的免疫刺激活性及其提呈抗原后的免疫刺激活性(min^{-1})

Tab 1 Immuno-stimulating activity of DC before and after antigen acquirement(min^{-1})

Dose of DC	Allo MLR
Control (Monocyte) 10^4	951 ± 31
DC (Without any coculture with cancer cell)	
10^3	1 721 ± 224*
5×10^3	2 414 ± 120*
10^4	2 688 ± 190*
DC(Cocultured with apoptotic cancer cell)	
10^3	4 597 ± 189**
5×10^3	5 695 ± 240**
10^4	6 805 ± 127**
DC(Cocultured with necrosis cancer cell)	
10^3	1 775 ± 172*
5×10^3	2 436 ± 223*
10^4	2 681 ± 245*
DC(Cocultured with cancer cell)	
10^3	1 749 ± 230*
5×10^3	2 413 ± 231*
10^4	2 715 ± 267*

*: $P < 0.05$ *vs* control; **: $P < 0.05$ DC (Cocultured with apoptotic cancer cell) *vs* other groups

3 讨论

一般地讲,抗原提呈细胞被分为二类:专职的抗原

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

提呈细胞和非专职的抗原提呈细胞。非专职抗原提呈细胞不属于淋巴系统内的细胞，而专职抗原提呈细胞，如树突状细胞、巨噬细胞（Macrophages，Mφ）和 B 细胞，则是免疫系统中不可缺少的重要组成部分。尽管他们都有消化、处理和提呈抗原的共同特点，但是 DC 却在免疫系统中扮演了一个重要的角色，它是最有效的专职抗原提呈细胞，能在体内激活静息 T 细胞，从而激发初次免疫反应。如果肿瘤抗原未被 DC 提呈就不能激发有效的抗肿瘤免疫[4, 5]。已有的研究证明[6]，在肿瘤患者体内存在肿瘤细胞逃避 DC 抗原提呈的机制。

DC 可以从人不同组织的 DC 前体（如骨髓、脐带血和外周血）加上不同的造血细胞因子组合的刺激而诱导、分化成熟。目前，在体外检测 DC 的重要标准有：CD1a，CD40，CD80，CD86 和 MHC-Ⅱ，以及刺激同种异体 T 细胞增殖的混合淋巴细胞反应的能力[7]。

传统的 MHC 抗原的加工和提呈途径是：大多数 MHC-Ⅰ提呈的多肽来自细胞内抗原酶解（主要由蛋白酶体在胞质溶胶中酶解）成短肽（8～12 aa），再由抗原肽转送者转送到粗面内质网与新生 MHC-Ⅰ类分子重链和 β_2- 微球蛋白形成三聚体复合物，然后在细胞表面被 $CD8^+$T 细胞识别。而 MHC-Ⅱ对细胞外抗原的加工和提呈是通过细胞外抗原被 APC 内噬后在内室（Endocytic compartments）酸变性，内体（Endosomal）及溶酶体酶解成 1 条 12～25 aa 的短肽并与内质网中合成后运来的 MHC-Ⅱ类分子结合，再转运到 APC 表面为 $CD4^+$TH 细胞识别[8, 9]。最新研究[3]发现，包裹在凋亡小体外面的膜性物质是一种与原生存细胞膜相一致的免疫原性物质，当凋亡小体被 DC 吞噬后，包裹在凋亡小体外面的免疫原性物质就将抗原递呈给 DC，通过 MHC-I 提呈凋亡肿瘤细胞抗原，刺激 MHC-I 限制的 CTL。

本研究发现并证实了 DC 而非单核细胞可以有效提呈凋亡胆管癌细胞的抗原（坏死胆管癌细胞和培养的胆管癌细胞却不能有效地传递抗原给 DC），刺激 MHC-I 限制的 CTLs[10]。

众所周知，通过肿瘤的常规疗法（手术、放疗、化疗）往往难以获得根治，难于解决转移和复发的问题，且常有明显的损伤和毒副作用，如能激发、增强机体对肿瘤的主动免疫排斥反应，则有可能达到根治肿瘤的目的，而且这在本质上属于一种生理性治疗措施。那么，在体内应该能建立类似于体外定向诱导分化 DC 和诱导肿瘤细胞凋亡的可控条件，获得大量高纯度的 DC 及体内诱导的能传递抗原给 DC 的肿瘤细胞凋亡小体，通过 DC 提呈抗原诱导特异性 CTLs 进行主动特异性免疫抗肿瘤治疗，将在肿瘤的免疫治疗上创造出较好的效果，这是值得我们进行深入研究、开发和应用的领域。

参考文献

[1] Levine T P, Chain B M. Endocytosis by antigen presenting cells: Dendritic cells are as endocytically active as other antigen presenting cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(17): 8 342－8 346.

[2] Girolomoni G, Simon J C, Bergstresser P R, *et al*. Freshly isolated spleen dendritic cells and epidermal Langerhans cells undergo similar phenotypic and functional changes during short-term culture[J]. J Immunlo, 1990, 145(7): 2820－2825.

[3] Matthew L, Albert B S, Nina B. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs[J]. Nature, 1998, 392(5): 86－90.

[4] Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin mataration and antigen presenting function of dendritic cells[J]. Curr Opin Immunol, 1997, 9(1): 10－16.

[5] Schuler G, Thumer B, Romani N. Dendritic cell: from ignored cell to major players in T-cell-mediate dimmunity[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1997, 112(4): 317－322.

[6] Thomas T, Walter J, Storkus M, *et al*. Gene-based strategies for the immunotherapy of cancer[J]. J Mol Med, 1997, 75(3): 478－481.

[7] Peters J H, Gieseler R, Thiele B, *et al*. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants[J]. Immunology Today, 1996, 17(6): 273－278.

[8] Rammensee H G. Chemistry of peptides associated with MHC class I and II molecules[J]. Curr Opin Immunol, 1995, 7(1): 85－96.

[9] Falk K, Rotzschke O. Consensus motifs and peptide ligands of MHC class I molecules[J]. Semin Immunol, 1993, 5(2): 81－94.

[10] Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules[J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15(7): 821－825.

（编辑　王　红）

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