

[文章编号] 1000-4718(2008)07-1414-04

白细胞介素-18 干预诱导的树突状细胞表型和活性研究*

傅永强¹, 张在云², 李旭升¹, 柳月安³(¹ 金华职业技术学院医学院, 浙江 金华 321017; ² 山东大学第二医院肿瘤科, ³ 山东省肿瘤医院药剂科, 山东 济南 250033)

[摘要] 目的: 研究白细胞介素-18(IL-18)干预诱导的树突状细胞(DC)的表型和活性。方法: 自人外周血单核细胞诱导 DC, 第 5 d 起分为 IL-18 组、TNF- α 组和 IL-18 + TNF- α 组, 分别加 IL-18、TNF- α 及 IL-18 + TNF- α 促成熟, 用 ELISA 法测定上清中 IL-12 含量; 用流式细胞仪测定培养 8 d DC 的 CD1a、HLA-DR、CD83 及 CD86 的表达; 用 MTT 法检测 3 组 DC 诱导 T 细胞增殖的作用。用 ELISA 法测定 3 组 DC 刺激 T 细胞分泌干扰素 γ (IFN- γ) 的量。结果: IL-18 组与 TNF- α 组 CD1a、HLA-DR、CD83 及 CD86 表达无差异, IL-18 + TNF- α 组 CD1a、CD83 及 HLA-DR 阳性率高于 IL-18 组。IL-18 + TNF- α 组 IL-12 量高于 IL-18 组和 TNF- α 组 ($P < 0.05$)。IL-18 组与 TNF- α 组 DC 刺激 T 细胞增殖作用无差异, IL-18 + TNF- α 组 DC 的作用强于 IL-18 组和 TNF- α 组。IL-18 组和 TNF- α 组 IFN- γ 量无显著差异, IL-18 + TNF- α 组 IFN- γ 的量高于 IL-18 组和 TNF- α 组 ($P < 0.05$)。结论: IL-18 干预诱导的 DC 高表达表面分子, 具有明显的免疫刺激活性, IL-18 与 TNF- α 合用作用更强。

[关键词] 白细胞介素 18; 树突细胞; 干预性研究

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Phenotype and immune activity of dendritic cells under interleukin-18 intervention

FU Yong-qiang¹, ZHANG Zai-yun², LI Xu-sheng¹, LIU Yue-an³(¹ Medical College of Jinhua Vocational and Technical University, Jinhua 321017, China; ² Department of Oncology, The Second Hospital of Shandong University, ³ Department of Pharmacy, Shandong Tumour Hospital, Jinan 250033, China. E-mail: fyq666166@126.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the phenotype and immune activity of dendritic cells using interleukin-18 as intervent. **METHODS:** Monocytes were isolated from human peripheral blood and induced into DCs with GM-CSF and IL-4. The cellular morphous was observed under inverted microscope. On the 5th day, 3 groups including IL-18 group, TNF- α group and IL-18 + TNF- α group were set. IL-18, TNF- α or IL-18 + TNF- α was used as intervents respectively to facilitate cell maturity. Supernatants were collected at 24 h, 48 h and 72 h. IL-12 in the supernatant, CD1a, HLA-DR, CD83 and CD86 were analyzed using flow cytometry. DCs of the 3 groups were co-cultured with T cells respectively on the ratio of 1:100, 1:50 and 1:10. T cell proliferation stimulated by DC was determined using MTT method. DCs were co-cultured with T cells on the ratio of 1:10, and the supernatant were collected at 24 h, 48 h and 72 h. IFN- γ in the supernatant was detected with ELISA method. **RESULTS:** Induced by GM-CSF and IL-4, then stimulated by IL-18, TNF- α or IL-18 + TNF- α , monocytes showed typical morphous of DC. No morphological difference was observed among DCs of the 3 groups. No statistical difference showed in expression level of CD1a, HLA-DR, CD83 and CD86 between IL-18 group and TNF- α group ($P > 0.05$). The positive rates of CD1a and CD83 in IL-18 + TNF- α group were higher than those in other 2 groups. The positive rate of HLA-DR in IL-18 + TNF- α group was higher than that in IL-18 group. No difference between IL-18 group and TNF- α group in the potency of stimulating T cell proliferation was found, whereas the stimulating potency in IL-18 + TNF- α group was higher than that in IL-18 group and TNF- α group. IL-12 in IL-18 + TNF- α group at 48 h and 72 h was higher than that in IL-18 group and TNF- α group ($P < 0.05$). However, there was no difference between the latter 2 groups. There was also no difference between IL-18 group and TNF- α group in IFN- γ secretion. IFN- γ in IL-18 + TNF- α group was higher than that in IL-18

[收稿日期] 2007-03-14 [修回日期] 2007-11-19

* [基金项目] 金华市科技创新重点资助项目 (No. 2004-2-302)

Tel: 0579-2265055; E-mail: fyq666166@126.com

group and TNF- α group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Using IL-18 as intervent, DC expresses high level of surface molecules, secretes high level of IL-12, stimulates T cell proliferating effectively and produces IFN- γ potently. The actions are stronger when used in combination with TNF- α . It suggests that IL-18 may serve as a promoting agent of DC maturity, or combination with TNF- α in DC induction will strengthen the immune activity of DC.

[**KEY WORDS**] Interleukin-18; Dendritic cells; Intervention studies

树突状细胞(dendritic cells, DC)是功能强大的专职性抗原呈递细胞,可提呈抗原给MHC-I类限制性CD8⁺和MHC-II类限制性CD4⁺T淋巴细胞,诱导特异性免疫反应,基于DC的肿瘤疫苗显示了明显的抗肿瘤作用,DC的活性和功能是DC疫苗发挥作用的关键^[1,2]。白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)是多效性的免疫调节因子,人外周血单核细胞来源的DC表达IL-18受体^[3],提示IL-18能够对单核细胞来源的DC产生影响。本文旨在研究IL-18对体外扩增DC免疫活性的影响,为IL-18结合DC用于肿瘤治疗提供依据。

材 料 和 方 法

1 材料和仪器

合成培养基DMEM及胎牛血清购自Gibco公司;rhGM-CSF为美国先灵葆雅产品;rhIL-4、TNF- α 、rhIL-18均为R&D公司产品;CD1a、HLA-DR、CD83及CD86抗体均购自Immunotech公司;MTT为Sigma公司产品;干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)及人白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)(p40 & p70)ELISA试剂盒购自晶美公司;人外周血购自浙江省血液中心;流式细胞仪为Beckman-coulter公司产品;酶标仪为Bio-Rad公司产品。

2 DC的诱导培养

自人外周血分离单核细胞,用含10%胎牛血清的DMEM悬浮细胞,调整细胞浓度为 2×10^9 cells/L,用6孔板贴壁培养2h,收集非贴壁细胞,用尼龙毛分离T细胞^[4],备用。将贴壁细胞分为IL-18组、TNF- α 组和IL-18+TNF- α 组,加入GM-CSF及IL-4分别至终浓度 1×10^6 U/L和 5×10^5 U/L,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养,倒置显微镜下观察细胞形态。第5d加干预剂促成熟,IL-18组加IL-18 2×10^5 U/L, TNF- α 组加TNF- α 1×10^5 U/L, IL-18+TNF- α 组同时加上上述浓度的IL-18和TNF- α ,在加入促成成熟因子后24h、48h和72h收集上清液,以备检测IL-12含量。

3 DC表型测定

收集培养8d的各组DC,用PBS洗2次,调整细胞数为 1×10^9 cells/L,分别加入FITC标记的CD1a、HLA-DR、CD83、CD86抗体,置暗处室温下反应15min,上机检测。

4 T细胞增殖反应

取培养8d的3组DC,用丝裂霉素C处理去增殖活性,作为刺激细胞。以T细胞为反应细胞。实验组包括IL-18组、TNF- α 组和IL-18+TNF- α 组,另设T细胞组,用96孔培养板,每组3复孔,实验组为 1×10^5 T细胞和3个浓度(1×10^3 、 2×10^3 、 1×10^4)相应DC, T细胞组为 1×10^5 T细胞,每孔终体积200 μ L, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养96h,加入MTT 100 μ g/well,培养4h,离心,弃上清,加入DMSO振荡10min,用酶标仪测570nm吸光度A值。

5 DC分泌的IL-12的检测

取上述DC上清液,用IL-12(p40 & p70)ELISA试剂盒,按说明书操作,检测IL-12(包括p40及p70)的含量。

6 DC刺激T细胞分泌IFN- γ 的测定

分别将IL-18组、TNF- α 组和IL-18+TNF- α 组 1×10^4 DC与 1×10^5 T细胞混合,用含10%FCS的DMEM培养,分别于24h、48h及72h取上清液,按照ELISA试剂盒操作说明测定IFN- γ 的含量。

7 统计学处理

用SPSS13.0软件进行数据的统计分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析(ANOVA)方法,组间比较用LSD检验。

结 果

1 DC的形态

外周血单核细胞呈圆形,贴壁生长,经GM-CSF和IL-4诱导培养,第2d,细胞聚集成簇,仍贴壁生长,细胞形态无变化;第4d细胞变大,开始悬浮,表面可见毛刺或凸起;第7d大多数细胞悬浮,成簇的细胞分散,毛刺更明显,符合典型DC的形态(图1),3组DC的细胞形态未发现差异。

2 DC的表型分析

3组DC经流式细胞表型分析,CD1a、HLA-DR、CD83、CD86表达阳性率高,表明为典型DC,IL-18+TNF- α 组DC的CD1a和CD83的表达均高于IL-18组和TNF- α 组,IL-18+TNF- α 组HLA-DR的表达高于IL-18组,CD1a、HLA-DR、CD83、CD86的表达在IL-18组和TNF- α 组之间无差异,3组DC的CD86的表达无差异,见表1。

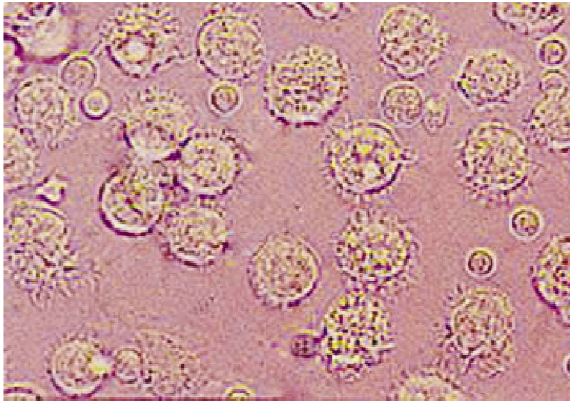


Fig 1 DC 7 d after induction(×400).

图1 诱导培养第7 d的DC

表1 DC的表面分子表达

Tab 1 Surface molecules on DC (positive rate, %)

Group	CD1a	HLA-DR	CD83	CD86
IL-18	50.6±4.5	71.6±6.5	55.1±5.9	74.3±5.5
TNF-α	52.8±3.8	78.3±5.3	56.8±6.2	78.6±4.3
IL-18+TNF-α	62.4±5.7*	86.1±4.9*	68.6±6.0*	82.7±4.8

*P<0.05 vs other groups; #P<0.05 vs group IL-18.

3 T细胞增殖反应

以实验组A值与T细胞组A值的差值为每组的反应值进行方差分析,结果3组DC与T细胞之比为1:100、1:50和1:10时均可促进T细胞增殖,DC与T细胞的比例为1:100时,3组的反应值无差异,DC与T细胞的比例为1:50时,IL-18+TNF-α组反应值大于IL-18组,DC与T细胞的比例为1:10时,IL-18+TNF-α组反应值大于IL-18组和TNF-α组。IL-18组和TNF-α组在DC与T细胞的比例为1:100、1:50和1:10时均无差异(P>0.05),见表2。按以下公式计算DC对T细胞的刺激指数(SI):
 $SI(\%) = [(实验组A - T细胞组A) / T细胞组A] \times 100\%$ 。3组中随着DC比例的增加,刺激T细胞增殖的作用增强,3组的刺激指数,见图2。

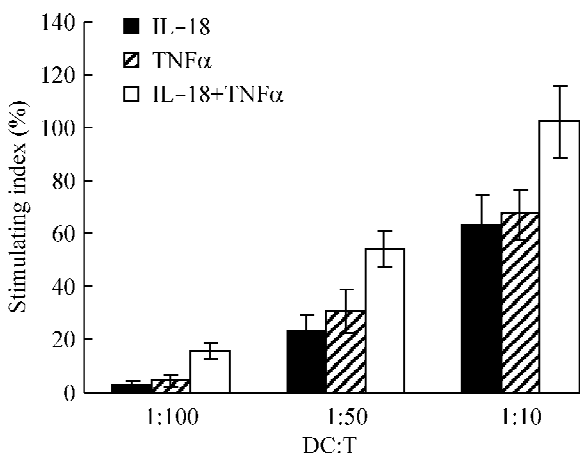


Fig 2 Stimulating index of DC in T cell proliferation. $\bar{x} \pm s$. n=9.

图2 DC对T细胞增殖反应的刺激指数比较

表2 DC刺激T细胞增殖反应

Tab 2 Proliferation of T cells stimulated by DC (n=9)

Group	Response value		
	1:100	1:50	1:10
IL-18	0.78±0.08	0.93±0.05	1.23±0.12
TNF-α	0.79±0.05	0.99±0.08	1.26±0.13
IL-18+TNF-α	0.88±0.07	1.16±0.12*	1.53±0.09*#

*P<0.05 vs IL-18 group; #P<0.05 vs TNF-α group.

4 DC分泌的IL-12的检测

用ELISA法检测3组DC上清中IL-12含量。结果在24h时,IL-18+TNF-α组IL-12的含量高于TNF-α组,在48h和72h时IL-18+TNF-α组IL-12的含量均高于IL-18组和TNF-α组(P<0.05)。在24h、48h和72h时IL-18组和TNF-α组IL-12的含量之间无显著差异(图3)。

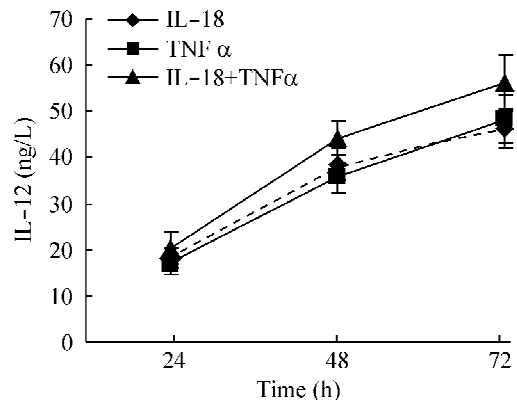


Fig 3 Assay of IL-12 in DC supernatant. $\bar{x} \pm s$. n=9.

图3 3组DC上清中IL-12的含量比较

5 DC刺激T细胞分泌IFN-γ的测定

经ELISA法检测3组细胞上清IFN-γ,结果3组IFN-γ的含量均逐渐增高,经方差分析,在24h、48h和72h时IL-18组和TNF-α组IFN-γ的含量之间无显著差异,IL-18+TNF-α组IFN-γ的含量在24h、48h和72h时均高于IL-18组和TNF-α组(P<0.05),见图4。

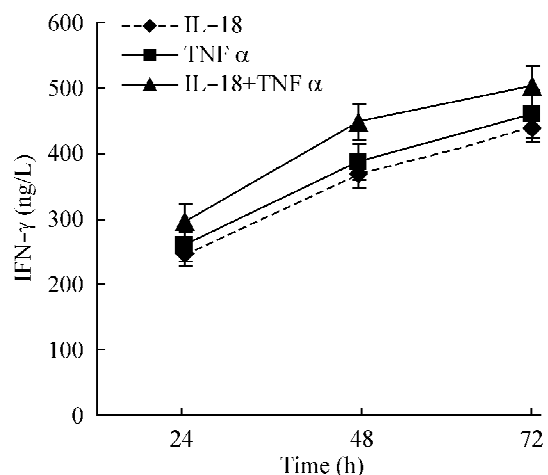


Fig 4 Assay of IFN-γ secreted by T cells. $\bar{x} \pm s$. n=9.

图4 3组T细胞IFN-γ的含量比较

讨 论

DC 高表达 MHC - I 类和 MHC - II 类分子和共刺激分子,通过呈递细胞抗原并分泌 Th1 型细胞因子 IL - 12,能有效激发 T 细胞应答^[5]。通过干预诱导以增强 DC 的功能是增强 DC 疫苗作用的重要途径。IL - 18 具有多种生物学效应,可促进 T 细胞增殖,诱导 T 细胞分泌 IFN - γ ,并能增强 NK 细胞和 Th1 细胞的细胞毒活性,IL - 18 基因转染 DC 可增强其诱导的抗肿瘤作用^[6-9]。实验显示 IL - 18 不能促进单核细胞向 DC 分化,但能促进 DC 成熟^[10]。GM - CSF 和 IL - 4 可将单核细胞诱导为非成熟的 DC, TNF - α 是普遍应用的促 DC 成熟因子。在本实验中,单核细胞经 GM - CSF 和 IL - 4 诱导后,用 IL - 18、TNF - α 或 IL - 18 + TNF - α 促成熟,IL - 18 + TNF - α 组 CD1a、CD83 的表达高于另外 2 组,IL - 18 + TNF - α 组 HLA - DR 的表达高于 IL - 18 组,IL - 18 组与 TNF - α 组 DC 表面分子表达无差异。表明 IL - 18 与 TNF - α 均可用于 DC 的诱导培养,IL - 18 与 TNF - α 合用,则 DC 的 CD1a、CD83 及 HLA - DR 的表达增加。

通过 3 组 DC 刺激 T 细胞增殖的研究发现,在 DC 与 T 细胞的比例为 1:100 时,3 组 DC 刺激 T 细胞增殖的作用均较弱,随着 DC 与 T 细胞比例的增加,其刺激作用增强,IL - 18 + TNF - α 组作用强于 IL - 18 组和 TNF - α 组,IL - 18 组与 TNF - α 组刺激作用无差异,表明 IL - 18 能有效用于 DC 诱导培养,与 TNF - α 合用作用更强。

IL - 12 是 1 种重要的 Th1 型细胞因子,是 DC 的主要效应因子^[11]。3 组 DC 在加入 IL - 18、TNF - α 或 IL - 18 + TNF - α 后 24 h、48 h 及 72 h 时 IL - 12 含量逐渐增加,72 h 时含量最高,在 48 h 和 72 h 时 IL - 18 组和 TNF - α 组 IL - 12 含量之间无显著差异,IL - 18 + TNF - α 组 IL - 12 的含量高于 IL - 18 组和 TNF - α 组,表明 IL - 18 可有效诱导 DC 分泌 IL - 12,IL - 18 通过诱导 IL - 12 的分泌将会对 DC 功能产生重要影响。

IFN - γ 通过激活单核细胞、淋巴细胞和 NK 细胞而调节免疫反应,并发挥抗肿瘤作用。IL - 1 具有强大的刺激 IFN - γ 分泌的能力。在本实验中,3 组 DC 分别与 T 细胞共培养,结果在 24 h、48 h 和 72 h 时 3 组 IFN - γ 的含量均逐渐增高,IL - 18 + TNF - α 组 IFN - γ 的含量最高,IL - 18 组和 TNF - α 组 IFN - γ 的含量之间无显著差异。本实验显示 IL - 18 干预诱导的 DC 具有明显的刺激细胞产生 IFN - γ 的作用。

本研究发现,外周血单核细胞经 GM - CSF 和 IL

- 4 诱导后,用 IL - 18 干预促成熟,表面分子 CD1a、HLA - DR、CD83、CD86 表达高,能有效刺激 T 细胞增殖,表明为成熟 DC,该 DC 可分泌高水平 IL - 12,并明显刺激 T 细胞产生 IFN - γ ,IL - 18 与 TNF - α 联合应用作用更强。提示 IL - 18 可作为 DC 诱导中的促成熟因子,或与 TNF - α 联合用于 DC 诱导以增强 DC 的功能。

[参 考 文 献]

- [1] Sakai Y, Morrison BJ, Burke JD, et al. Vaccination by genetically modified dendritic cells expressing a truncated neu oncogene prevents development of breast cancer in transgenic mice[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(21): 8022 - 8028.
- [2] 朱新梅,乔健,肖保国,等. 不同大鼠胶质瘤抗原致敏的 DC 体外诱导 CTL 活性的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(4): 584 - 589.
- [3] Gutzmer R, Langer K, Mommert S. Human dendritic cells express the IL - 18R and are chemoattracted to IL - 18 [J]. *J Immunol*, 2003, 171(12): 6363 - 6371.
- [4] 张在云,吴金民,潘宏铭,等. Bcap37 完全细胞抗原冲击树突状细胞诱导特异性抗乳腺癌免疫[J]. *实用肿瘤杂志*, 2002, 17(6): 389 - 391.
- [5] O' Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer [J]. *Blood*, 2004, 104(8): 2235 - 2246.
- [6] Vujanovic L, Ranieri E, Gambotto A, et al. IL - 12p70 and IL - 18 gene - modified dendritic cells loaded with tumor antigen - derived peptides or recombinant protein effectively stimulate specific type - 1 CD4⁺ T - cell responses from normal donors and melanoma patients *in vitro* [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(8): 798 - 805.
- [7] Yamanaka R, Honma J, Tsuchiya N, et al. Tumor lysate and IL - 18 loaded dendritic cells elicits Th1 response, tumor - specific CD8⁺ cytotoxic T cells in patients with malignant glioma[J]. *J Neurooncol*, 2005, 72(2): 107 - 113.
- [8] Xia D, Li F, Xiang J. Engineered fusion hybrid vaccine of IL - 18 gene - modified tumor cells and dendritic cells induces enhanced antitumor immunity [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2004, 19(3): 322 - 330.
- [9] 张在云,吴金民. 白细胞介素 18 基因转染的肺癌细胞对树突状细胞免疫特性的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(4): 794 - 798.
- [10] Li J, Mbow ML, Sun L, et al. Induction of dendritic cell maturation by IL - 18 [J]. *Cell Immunol*, 2004, 227(2): 103 - 108.
- [11] Molenda M, Mukkamala L, Blumenberg M. Interleukin - 12 blocks a specific subset of the transcriptional profile responsive to UVB in epidermal keratinocytes [J]. *Mol Immunol*, 2006, 43(12): 1933 - 1940.