

# 慢性髓性白血病来源的树突状细胞诱导的 CTL 体外作用研究

王俊祥,王金铠,孟建波

Thein Vitro Response of Cytotoxic T Lymphocyte Induced by Chronic Myeloid Leukemia Derived Dendritic Cells

WANG Jun-xiang, WANG Jin-kai, MENG Jian-bo

Department of Hematology, The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China

**Abstract: Objective** To investigate the immune function of dendritic cells derived from chronic myeloid leukemia (CML-DC). **Methods** The mononuclear cells were separated from the peripheral blood of CML patients and cultured with GM-CSF and IL-4 to induce DC. The phenotype of CML-DC and the anti-tumor effect of cytotoxic T cells induced by CML-DC were investigated. The level of IL-12 and IFN- $\gamma$  in supernatant were measured by ELISA. CML-DCs were compared with normal DCs. **Results** It was proved that the DCs could be derived from CML. The expression rates of CD1a, CD80 and CD83 of CML-DC were obviously lower than those of normal DC. In mixed lymphocyte reaction, the average level of IL-12 and IFN- $\gamma$  of CML-DC were obviously lower than those of normal DC. CML cells were effectively and specifically destroyed by CTLs induced by CML-DCs. **Conclusion** DCs derived from CML have the immune function of antigen-presenting cells, and have the ability to induce anti-leukemia effect.

**Keywords:** Chronic myeloid leukemia; Differentiation; Dendritic cell; Anti-tumor immune

**摘要:**目的 研究慢性髓性白血病来源的树突状细胞的免疫功能。方法 分离慢性期 CML 患者外周血单个核细胞(PBMC),用细胞因子 GM-CSF 及 IL-4 在体外诱导培养 DC,检测细胞表型,并观察其诱导的 CTL 体外抗肿瘤效应。用酶联免疫(ELISA)方法测定 CML-DC 混合淋巴细胞反应(MLR)上清液中 IL-12 及 IFN- $\gamma$  的量,并与正常 DC 进行比较。结果 联合 GM-CSF 及 IL-4 可诱导 CML 细胞分化为 CML-DC, CML-DC 的 CD1a、CD80、CD83 表达率均低于正常 DC; CML-DC 混合淋巴细胞反应上清 IL-12 及 IFN- $\gamma$  含量均低于正常 DC; CML-DC 能诱导出对自身 CML 细胞有特异性杀伤作用的 CTL。结论 CML-DC 具有抗原提呈细胞的免疫功能,能诱导抗白血病 CTL 反应。

**关键词:**慢性髓性白血病;分化;树突状细胞;抗肿瘤免疫

中图分类号:R733.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2004)12-0739-03

## 0 引言

树突状细胞(DC)是目前已知的能激活未致敏 T 细胞的专职抗原提呈细胞(APC),可由各种来源的造血干细胞(CD34<sup>+</sup>)或外周血单核细胞(CD14<sup>+</sup>)诱导分化成熟。近年来研究发现,体外诱导慢性髓系白血病(CML)细胞可分化为 DC。本研究将 CML 来源 DC 与正常 DC 进行比较,来对 CML-DC 的免疫功能进行评价,从而为白血病细胞来源的 DC 用于白血病免疫治疗进行初步探讨。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

初诊慢性期 CML 5 例,其中男 3 例,女 2 例,

BCR-ABL 融合基因阳性,年龄 23~51 岁,诊断和分期见文献[1]。以 5 例本单位健康志愿者作为对照,男 2 例,女 3 例,年龄 25~34 岁。

### 1.2 主要试剂

重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)由华北制药金坦公司惠赠,白细胞介素(IL-4)为美国 Pepprotech 公司产品,FITC-CD1a、CD80、PE-CD83 单抗购自 B-D 公司,ELISA 试剂盒为上海森雄科技实业有限公司产品。

### 1.3 骨髓单个核细胞的分离和保存

初诊 CML 患者分别采集骨髓 3ml,经淋巴细胞分离液梯度离心(2000 r/min)30min,获界面细胞,用 PBS 洗 2 次,加冷冻保存液 -80℃ 保存备用。

### 1.4 肿瘤抗原的制备

取生长良好的 K-562 细胞  $1 \times 10^7$  个,用生理盐水洗涤 2 遍,加入生理盐水 200 $\mu$ l,分别在室温和 -

收稿日期:2003-09-25;修回日期:2004-03-17

作者单位:050051 石家庄,河北医科大学第三医院血液

科

80 反复冻融 5 次,稀释至 1ml,用微孔滤膜(0.22  $\mu$ m)过滤,4℃ 保存备用。

### 1.5 DC 的诱导培养

采集外周静脉血 10ml,分离单个核细胞(PBMNC),实验组用 RPMI-1640 全培养基(含 10% 胎牛血清、IL-450  $\mu$ g/L 及 GM-CSF100 $\mu$ g/L)调节细胞浓度为  $5 \times 10^5$ /ml,接种于 24 孔培养板中,于 37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;对照组(细胞浓度  $3 \times 10^6$ /ml)则先孵育 2h,洗出悬浮细胞,再培养,共培养 9 天,每 2~3 天半量换液,对照组在 7 天时分为二组,一组加入 K-562 的冻融抗原 50 $\mu$ l(负载组),一组加入 50 $\mu$ l 培养基(未负载组)。在倒置显微镜下观察细胞生长的动态变化,采用直接免疫荧光标记、流式细胞仪(FACSVanta ge,BD 公司)检测细胞表型。

### 1.6 同种混合淋巴细胞反应(allo-MLR)

取上述培养的 DC,以 25mg/L 丝裂霉素去增殖后作为刺激细胞。分离健康人 PBMNC,贴壁 2h 去除贴壁细胞,作为效应细胞。按 1:10 比例加入 24 孔板和 96 孔板(总体积 200 $\mu$ l/孔)培养 72h,收集 24 孔板中的细胞作为 CTL,上清用 ELISA 方法检测其中 IL-12 和 IFN- $\gamma$  的含量。96 孔板中加入四甲基偶氮唑盐(MTT)(5mg/ml,20  $\mu$ l/孔)继续培养 4h,490nm 检测 A 值。

### 1.7 CTL 对肿瘤细胞的杀伤作用

以 K-562 细胞和复苏的 CML 细胞作为靶细胞,采用乳酸脱氢酶(LDH)法测定 CTL 活性,参照文献[2]稍加修改,将上述制备的 CTL 细胞与靶细胞以 20:1 混合,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养 6h,以 Beckman LX20(美国)自动生化分析仪检测上清 LDH 活力(U/L),分析 CTL 对靶细胞的杀伤作用,公式如下:

$$\text{CTL 杀伤活性}(\%) = (E/T - E_s - T_s) / (T_m - T_s) \times 100\%$$

E/T: 试验组 LDH 活力;E<sub>s</sub>: 靶细胞自然释放组 LDH 活力;T<sub>s</sub>: 效应细胞自然释放组 LDH 活力;T<sub>m</sub>: 靶细胞最大释放组 LDH 活力。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态与表型的变化

CML 细胞呈球形,悬浮生长,加入 GM-CSF 及 IL-4 培养后,形状变为不规则形,部分细胞可见有树突状突起,见图 1;对照组细胞开始呈贴壁生长,培养后呈集聚趋势,簇状生长,并有部分细胞脱落,细胞表面有许多毛刺,较实验组异形性更加明显,树状突起多而长,见图 2。流式细胞术检测细胞表型,CML-DC 的 CD1a,CD80,CD83 表达均明显低于正常对照组( $P < 0.01$ ),负载组与未负载组无显著差

异( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 DC 刺激同种异体 T 细胞增殖的能力

在混合淋巴细胞反应(allo-MLR)中,以 MTT 法测定增殖指数,刺激同种异体 T 细胞增殖的能力 CML-DC 低于正常 DC,未负载 DC 低于负载 DC,见图 3。

表 1 DC 的膜表面标志的表达水平(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	CD1a	CD80	CD83
CML-DC	10.53 $\pm$ 2.64	11.64 $\pm$ 1.71	23.91 $\pm$ 3.06
DC(未负载组)	49.64 $\pm$ 8.99	34.35 $\pm$ 5.95	42.64 $\pm$ 7.80
DC(负载组)	52.18 $\pm$ 8.26	36.17 $\pm$ 6.20	44.19 $\pm$ 8.53



图 1 CML-DC(  $\times 200$  未染色)



图 2 正常 DC(  $\times 200$  未染色)

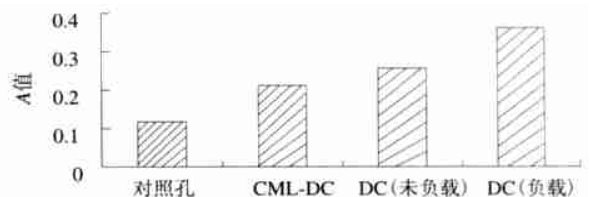


图 3 MTT 法检测 allo-MLR 的结果

### 2.3 MLR 中 IL-12 和 IFN- $\gamma$ 的分泌水平

allo-MLR 上清用 ELISA 法测定 IL-12 和 IFN- $\gamma$  的含量(ng/L),结果发现 CML-DC 组 IL-12,IFN- $\gamma$  含量(47.59  $\pm$  11.24 和 53.14  $\pm$  15.86)低于正常 DC 未负载组(70.67  $\pm$  16.96 和 89.92  $\pm$  20.77)( $P < 0.05$ )及正常 DC 负载组(136.12  $\pm$  24.82 和 138.99

$\pm 29.31$ ) ( $P < 0.01$ ), 未负载组显著低于负载组 ( $P < 0.05$ )。

#### 2.4 CTL 对靶细胞的杀伤活性

结果显示在 20:1 的效靶比时, CML-DC 诱导出的 CTL 对自身 CML 细胞具有特异性杀伤作用 (52.35%), 对异体 CML 细胞及 K-562 细胞杀伤作用很弱 (12.30% 和 7.52%); 负载组正常 DC 诱导出的 CTL 对 K-562 细胞有明显的杀伤作用 (68.57%), 对 CML 细胞杀伤作用较弱 (14.71%); 未负载组正常 DC 诱导出的 CTL 对 CML 细胞及 K-562 细胞均无明显杀伤作用 (10.19% 和 8.26%)。

### 3 讨论

肿瘤的免疫治疗是当今众所关注的热点之一, 特异性抗肿瘤免疫治疗有赖于功能性抗原提呈细胞 (APC) 对肿瘤抗原的有效提呈。DC 是目前已知的功能最强的 APC, 目前围绕 DC 进行实体瘤免疫治疗已进入临床研究阶段<sup>[3]</sup>。白血病细胞由于缺乏特异抗原, 而全细胞抗原有毒细胞污染的危险, 因此给 DC 用于白血病的治疗带来困难, 近年研究发现, 白血病细胞特别是 CML 细胞在体外可以直接诱导分化为 DC, Choudhury 等将 CML 患者 PBMC 体外培养获得 DC, 分子生物学检测 t(9,22) 阳性, 证实为 CML 来源, 并可激发出抗 CML 免疫反应<sup>[4]</sup>。若白血病来源 DC 免疫功能得到肯定, 它就有可能在白血病免疫治疗方面开辟一个崭新的领域。

本研究发现, 联合 GM-CSF 及 IL-4 可诱导 CML 细胞分化为 DC, 阳性表达 CD1a, CD80, CD83 等免疫分子, 能够刺激同种异体 T 细胞增殖, 证实了 CML-DC 具有类似正常 DC 的功能。DC 能分泌多种细胞因子如 IL-12、IL-1、IL-15 等<sup>[5]</sup>, 来激活其他免疫细胞, 诱导高效而特异的免疫应答反应。IL-12 是细胞免疫调节中关键的细胞因子, 具有激活 NK 细胞、T 细胞, 促进 T 细胞分泌 IFN- $\gamma$  和抑制肿瘤血管生成等功能。IFN- $\gamma$  则能抑制肿瘤细胞的生长, 能引发巨噬细胞的杀瘤效应, 增强 CTL 和

NK 细胞杀伤靶细胞的能力, 并可抑制 Th2 细胞增殖。在 allo-MLR 中, DC 为产生 IL-12 的主要细胞, T 细胞为产生 IFN- $\gamma$  的主要细胞, 我们的研究证实 CML-DC 具有分泌 IL-12 和协助与促进 T 细胞分泌 IFN- $\gamma$  的作用。同时也发现, CML-DC 与正常 DC 存在差异, 表面免疫分子表达、分泌 IL-12 和协助与促进 T 细胞分泌 IFN- $\gamma$  均低于正常 DC, 这在一定程度上会影响 CML-DC 的功能。其原因可能为: 一方面体外诱导培养只能使一部分 CML 细胞分化为 DC, 其诱导分化率明显低于正常细胞, 另一方面 CML 细胞自身可能分泌一些细胞因子如血管内皮生长因子 (VEGF) 等, 抑制了 DC 的分化和成熟。

我们的研究发现, CML-DC 及负载抗原 DC 激活的 CTL 对靶细胞具有较强杀伤作用, 与未负载肿瘤抗原的 DC 共同培养的 T 细胞对靶细胞杀伤作用很弱, 说明 CML-DC 能够递呈自身肿瘤抗原, 激发的 CTL 的细胞毒活性是特异性的。因此白血病来源的 DC 有望用于体外肿瘤特异性 CTL 的扩增并用于过继性回输患者, 或灭活后作为疫苗回输, 体内激发肿瘤特异性 CTL, 增强机体特异性的肿瘤免疫能力。

#### 参考文献:

- [1] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 219-228.
- [2] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 第 1 版. 武汉: 湖北科学出版社, 1996. 292-293.
- [3] Small EJ, Fratesi P, Reese DM, et al. Immunotherapy for refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells [J]. J Clin Oncol, 2000, 18 (23): 3894-3903.
- [4] Choudhury A, Gajewski JL, Liang J, et al. Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia [J]. Blood, 1997, 89 (4): 1133-1142.
- [5] Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, et al. The cytokine profile expressed by human dendritic cells depends on cell subtype and mode of activation [J]. J Immunol, 1998, 160 (4): 1666-1676.

[编辑: 刘红武; 校对: 安 凤]