

造血干细胞诱导树突状细胞的临床应用*

宋现让 魏 玲 李 敏 王兴武 薛兴奎 宋丽华
山东省肿瘤医院基础研究中心 (济南市 250117)

摘要 目的:探讨回输动员人外周造血干细胞(PBSC)体外诱导树突状细胞(DCs)治疗乳腺癌患者的可行性。方法:采用 CS-3000 血细胞分离系统分离 9 例粒细胞集落刺激因子(G-CSF)预动员乳腺癌患者 PBSC,在体外经 rhGM-CSF、rhIL-4 诱导和自体肿瘤细胞提取物刺激后成为成熟 DCs,收集并自体回输。用 MTT 法测定 DCs 在体内外激活细胞毒性 T 细胞(CTL)的体外杀伤活性。结果:9 例患者平均采集 1.02×10^9 PBSC,培养后平均收获 2.3×10^8 DCs, CD83 表达率平均为 68.7%。收获 DCs 的数量是等量未动员全血的 57.5 倍。在体外自体肿瘤抗原致敏的 DCs 激活 CTL 对自体原代培养的肿瘤细胞具有显著的杀伤活性。DC 瘤苗自体回输除轻微发烧外,无任何其它不良反应,回输后患者 PBMC 对自体肿瘤细胞的杀伤活性提高 20 倍。结论:用血细胞分离机分离 G-CSF 动员肿瘤患者 PBSC,在体外诱导制备自体 DC 瘤苗,回输治疗可提高对自体肿瘤细胞的杀伤活性,而且安全可靠,无明显不良反应。

关键词 造血干细胞 树突状细胞 乳腺癌 细胞毒性 T 细胞

中图分类号:R737.9 R730.51 文献标识码:A 文章编号:1000-8179(2004)20-1150-03

Clinical Application of Dendritic Cells Induced from Peripheral Blood Stem Cells

Song Xianrang Wei Ling Li Min et al

Cancer Research Center of Shandong Tumor Hospital, Jinan

Abstract Objective: To explore the possibility of transfusing dendritic cells (DCs) induced from pre-mobilized human peripheral blood stem cells (PBSC) for therapy of breast cancer patients. **Methods:** PBSCs were collected from 9 breast cancer patients who were pre-mobilized with G-CSF by CS-3000plus Blood Cell Separating System. After 7-8 days' culture in medium containing rhGM-CSF and rhIL-4 and exposure to autologous cancer cell extracts, they became mature DCs and transfused back to the patients. The killing activity of CTLs activated by mature DCs in vitro and in vivo was determined by using MTT method. **Results:** The average PBSC number collecting from 9 patients was 1.02×10^9 . After culture, average 2.3×10^8 DCs were harvested averagely. The CD83 positive accounted for 68.7% of DCs. DCs harvested by this method was 57.5 folds of the equal volume nonmobilized whole blood. CTL induced by mature DCs killed the cultured autologous primary cancer cells powerfully. After DCs transfusion, the patients only felt slight fever and no other side effects, the cytotoxicity of PBMC increased 20 fold than before. **Conclusions:** PBSC were collected from cancer patients pre-mobilized with G-CSF using blood cell separating system and then cultured to induce mature DCs. DCs transfusion could increase the specific killing activity to autologous cancer cells. No severe side effects were observed.

Key words Peripheral blood stem cells(PBSC) Dendritic cells(DCs) Breast cancer
Cytotoxic T lymphocytes(CTL)

* 本文课题受山东省卫生厅科研基金资助(编号:1999CAIDABBL)

造血干细胞定向诱导分化及抗原提呈(APC)细胞研究及相关免疫治疗肿瘤的应用研究是一个热点,主要集中在实验室基础研究及动物模型研究阶段^[1,2],最近关于造血干细胞定向诱导分化和肿瘤抗原免疫识别及应答等部分研究成果已开始进入临床应用研究阶段^[3]。树突状细胞(DC)用于肿瘤免疫治疗遇到的难题是其数量扩增有限和功能维持问题。例如尚未找到大量扩增 LAK 细胞的 IL-2 那样能扩增 DC 的因子,扩增至一定时间和一定数量规模的 DC 其 APC 功能是否仍能保持良好也不确定,用来刺激 DC 的瘤细胞成分抗原性弱的问题也未得到解决。本文利用血细胞分离机采集经粒细胞集落刺激因子(G-CSF)预动员乳腺癌患者的骨髓造血干细胞(PBSC)进行体外培养,应用低温冻融法制备肿瘤抗原提取物致敏 DC,通过进行体外及临床实验了解 DC 瘤苗抗肿瘤的机制并解决 DC 瘤苗临床应用中存在的实际问题。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 2002 年 1 月至 2002 年 7 月我院外科住院治疗的女性乳腺癌患者 9 例,年龄 37~67 岁,平均 51 岁。患者术前未进行任何治疗。组织学类型:单纯癌 5 例,浸润癌 4 例。

1.2 细胞株及原代乳腺癌细胞的培养传代

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 Bcap37,人胃癌细胞系 MGC803,本实验室保存,在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,37℃、5%CO₂ 条件下培养。2~3 天传代一次。手术切除肿瘤组织,无菌条件下剪碎、研磨并 200 目滤网过滤制备细胞悬液,在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,37℃、5%CO₂ 条件下培养,3 天传代一次。

1.3 肿瘤细胞抗原提取物的制备及定量

收集肿瘤细胞,PBS 洗涤 2 次后,加水 5ml,采用 4~5 次低渗冻融法(-80℃~37℃)碎裂细胞,15 000rpm 离心 30min,收集上清,过滤除菌,即为无菌可溶性全抗原。采用 Bradford 法测定提取物中的蛋白质含量。

1.4 外周血造血干细胞(PBSC)的动员及采集

术后 2 周的 9 例乳腺癌患者,单用 G-CSF(赛强生物制药公司)10mg/kg·d 皮下注射,连续 5 天,于开始用药后的第 4 或 5 天用血细胞分离机采集 PBSC,平均采集体积 50ml。其中 3 例在动员前采集 10ml 外周血,分离 PBMC,同法诱生 DC,用于比较两者诱生 DC 的差异。

1.5 DC 的诱生及表型鉴定

采集的 PBSC 和 PBMC(单个核细胞)用含 10%

人 AB 血清的 RPMI1640 培养液悬浮后置 37℃、5% CO₂ 条件下培养。2h 后弃去悬浮细胞,贴壁细胞加含 rhGM-CSF(华北制药集团)800ng/ml、rhIL-4(北京医科大学免疫室)400U/ml 及 10%人 AB 血清的 RPMI1640 培养液继续培养。5 天后,更换新培养液并加入肿瘤抗原提取物 20μg/ml 和 TNF-α(第二军医大学江苏常州药业)100ng/ml,再培养 2~3 天。采用流式细胞仪(FACSCalibur 型)分析细胞 CD83 的表达水平。

1.6 DCs 刺激 CTL 的体外杀伤活性检测

自体 PBMC 与 MDA-MB-231 肿瘤抗原提取物致敏的 DCs 按 1:10 比例在含 rhGM-CSF 800ng/ml、rhIL-4 400U/ml 及 IL-2(北京瑞得合通药业)100U/ml 的 RPMI1640 完全培养基中,37℃、5% CO₂ 条件下培养 3~4 天,成为特异性 CTL。细胞毒试验:以 MDA-MB-231、Bcap37、MGC803 为靶细胞,效靶比 20:1,37℃作用 4h 后,用 MTT 法检测效应细胞对靶细胞的杀伤率,并与自体 PBMC 诱生 DCs 做比较。杀伤率(%)=[1-(试验孔 A570 均值-效应细胞对照孔 A570 均值)/靶细胞对照孔 A570 均值]×100%。

1.7 自体肿瘤抗原致敏 DCs 的临床应用

培养 7~8 天的成熟 DC,收获后悬浮于含 10%人血白蛋白和 800ng/ml rhGM-CSF 的 100ml 生理盐水中,静脉滴注,自体回输。回输前和回输 4 天后分别取患者静脉血,常规制备 PBMC,以 PBMC 为效应细胞,以自体体外传代培养的肿瘤细胞为靶细胞,以 20:1 效靶比采用 MTT 法检测杀伤活性。

1.8 统计学分析

采用 SAS 统计软件。所有变量均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 *t* 检验分析两变量间差异性。

2 结果

2.1 PBSC 诱导 DC 的生成和数量

9 例乳腺癌患者平均采集 50ml, PBSC $1.02 \times 10^9 \pm 0.24 \times 10^9$ 个,经 7~8 天培养后,平均收获 DCs $2.3 \times 10^8 \pm 0.52 \times 10^8$ 个,相当于 3 例患者等量未动员全血分离获得 PBMC 诱生 DCs (8.0×10^5 /10ml 全血)的 57.5 倍。平均 68.7%表达 DC 的特征性标记 CD83。

2.2 PBSC 与 PBMC 诱生 DCs 刺激 CTL 能力比较

9 例乳腺癌患者中 3 例患者 PBSC 和 PBMC 诱生 DC 经 MDA-MB-231 细胞抗原提取物致敏后,对 MDA-MB-231、Bcap37 和 MGC803 细胞的杀伤活性分别为 (73.0±6.8)%、(33.0±5.3)%、(5.3±4.8)%和 (72.2±7.4)%、(35.6±4.4)%、(6.3±3.2)%,差异无显著性 (*P*>0.05)。

2.3 DC 体内诱导 CTL 活性

乳腺癌患者回输 DC 前的 PBMC 对自体肿瘤细

胞的杀伤活性微弱,只有 $(1.7\pm 1.4)\%$ 。应用自体肿瘤抗原提取物致敏 DC 回输 4 天后,患者 PBMC 对自体肿瘤细胞的杀伤活性提高至 $(36.2\pm 3.4)\%$,提高 21 倍。对同种异体肿瘤细胞的杀伤活性从 $(1.5\pm 0.7)\%$ 提高到 $(7.5\pm 3.7)\%$,提高 5 倍。差异均有显著性($P<0.01$)。

2.4 DC 瘤苗治疗的效果及不良反应

9 例乳腺癌患者均为 II 期,平均随访 6 个月,均未复发。2 例有轻微的发烧,未发现其它不良反应。

3 讨论

人们对 DC 来源于造血干细胞已有共识,研究表明 DC 可能至少起源于两类细胞。DC 来源于骨髓的 DC 前体或粒细胞/单核细胞前体,即髓样 DC。这一来源的 DC 在血中有典型的淋巴细胞样特征,体外培养时,在 IL-4、GM-CSF、TNF α 等因子的刺激下可转化为 DC。而以前认为具有终末细胞特征的中性粒细胞前体体外经过 IL-4、GM-CSF、TNF α 等因子培养后也可出现成熟 DC 的形态和表型特征,提示可溶性抗原的能力比新鲜分离的单核细胞强 10 000 倍^[4]。最近有报道另一 DC 亚群,表达高水平的 CD123(IL-3 receptor)和 CD4,但缺少 CD11c 等髓样 DC 标记,需要 IL-3 和 CD40L 刺激成熟^[5]。目前,有关体外或体内诱导扩增 DC 进行免疫治疗的研究均采用 GM-CSF+IL-4+TNF α 等诱导培养髓样 DC。DC 前体来源于外周血、脐带血、骨髓、脾脏等。每 50ml 外周血经过 7~8 天培养,获得 DC 数量在 $(5\sim 10)\times 10^6$ 之间,难以满足患者治疗的需要。我们以动员人外周血造血干细胞为 DC 前体的来源,用血细胞分离机分离的 PBSC 在同样条件下经 7~8 天培养平均收获 2.3×10^8 细胞,约是自 50ml 外周血中获得 DC 的 57.5 倍,在形态、表面标记、刺激 CTL 的杀伤活性方面与 PBMC 来源的 DC 基本一致,可以解决 DC 数量不足的矛盾。

国外已进行了较多的 DC 临床应用试验,包括黑色素瘤、多发性骨髓瘤、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、肾癌、非何杰金氏淋巴瘤等众多疾病,疗效差异很大^[6-8]。国内研究大多集中在动物和体外研究,少数临床试验回输的 DC 数量从 5×10^4 至 2×10^6 不等。由于细胞数量不足,疗效难以比较。我们采用动员造血干细胞诱导并致敏 DC 治疗 9 例术后乳腺癌患者,每个患者接受 DC 数量在 $1.5\sim 3.2\times 10^8$ 之间,患者回输后 4 天体内 CTL 活性提高 21 倍,未出现严重的不良反应。

DC 临床应用仍有许多问题有待于进一步解

决,如 DC 的数量、应用的方式、抗原的选择以及抗原负载的方法等。抗原的选择是一个难题,因为许多肿瘤抗原性较弱。目前已试用的肿瘤抗原肿瘤组织提取物、CEA、独特型免疫球蛋白、p53 蛋白、PAP 等。肿瘤抗原基因修饰 DC 是一种较好的探索,它比肿瘤抗原蛋白或多肽体外冲击致敏的 DC 诱导激发体内 T 细胞抗肿瘤免疫应答的效果好^[9]。此外,现已证明,机体 DC 功能下降,尤其是肿瘤局部浸润性 DC(TIDC)的功能缺陷与肿瘤的发生发展和预后密切相关^[10]。肿瘤细胞可通过分泌 IL-10、TGF- β 、VEGF 等抑制 DC 成熟,也可抑制 DC 向肿瘤部位的迁移和聚集,导致肿瘤局部免疫功能低下^[11],因此,设法激活肿瘤局部 DC,纠正其缺陷的 APC 功能是肿瘤免疫治疗的方向之一。

参考文献

- 1 Evans JT, Cravens P, Lipsky PE, et al. Differentiation and expansion of lentivirus vector-marked dendritic cells derived from human CD34(+)cells[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(18): 2483~2492
- 2 Feng B, Inaba M, Lian Z, et al. Development of mouse dendritic cells from lineage-negative c-kit (low) pluripotent hemopoietic stem cells in vitro[J]. Stem Cells, 2000, 18(1): 53~60
- 3 Buchler T, Hajek R, Bourkova L, et al. Generation of antigen-loaded dendritic cells in a serum-free medium using different cytokine combinations[J]. Vaccine, 2003, 21(9-10): 877~882
- 4 Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE. Costimulatory function of umbilical cord blood CD14+ and CD34+ derived dendritic cells[J]. Exp Mol Pathol, 2003, 75(1):18~33
- 5 Coates PT, Barratt-Boyes SM, Zhang L, et al. Dendritic cell subsets in blood and lymphoid tissue of rhesus monkeys and their mobilization with Flt3 ligand[J]. Blood, 2003, 102(7): 2513~2521
- 6 Hersey P, Menzies SW, Halliday GM, et al. Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma[J]. Cancer Immunol Immunother, 2004, 53(2):125~134
- 7 Marten A, Renoth S, Heinicke T, et al. Allogeneic dendritic cells fused with tumor cells: preclinical results and outcome of a clinical phase I/II trial in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. Hum Gene Ther, 2003, 14(5):483~494
- 8 Hernando JJ, Park TW, Kuhn WC. Et al. Dendritic cell-based vaccines in breast and gynaecologic cancer [J].Anticancer Res, 2003, 23(5b):4293~4303
- 9 Morse MA, Clay TM, Colling K, et al. HER2 Dendritic Cell Vaccines[J]. Clin Breast Cancer, 2003, 3(Suppl 4):S164~172
- 10 Ciavarrá RP, Brown RR, Holterman DA, et al. Dendritic Cell Infiltration in Colon Cancer[J]. J Immunother, 2001, 24(2):130~137
- 11 Yang AS, Lattime EC. Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses[J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2150~2157

(2004-02-19 收稿)

(2004-05-07 修回)

(李雅玲校对)