

急性髓性白血病细胞体外诱导脐血细胞毒性 T 淋巴细胞增殖及抗白血病作用的研究

王彩霞， 张玉平， 王顺清， 李庆山， 许艳丽， 应 逸， 杜庆华， 毛 平

基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号:81202236)；广州市医药卫生科技项目(编号:201102A213087)

作者单位：510180 广东,广州医学院附属市一人民医院血液科
作者简介：王彩霞(1977 -),女,医学博士,副教授,研究方向:血液系统疾病和造血干细胞体外扩增。E-mai:wangcx225@163.com

[摘要] **目的** 研究体外培养急性髓性白血病树突状细胞(AML-DC),并利用该细胞联合细胞因子诱导脐血产生细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL),观察 CTL 对急性白血病细胞的杀伤效应,探讨从 AML-DC 体外诱导产生 CTL 的可行性。**方法** 从急性髓性白血病细胞诱导 AML-DC,联合细胞因子体外诱导脐血 T 细胞活化及增殖,流式细胞术检测培养前后的 T 淋巴细胞亚群变化,利用 LDH 试剂盒检测诱导后 T 细胞对相应急性白血病细胞的杀伤活性。**结果** 可从人 AML 细胞中诱导出 AML-DC,脐血 T 细胞在体外经过诱导培养后可获得增殖,T 淋巴细胞比例较培养前明显增高,其中在 AML-DC 诱导组中,CD3⁺ T 淋巴细胞亚群比例达到(79.7 ± 3.70)%,该 T 淋巴细胞对相应急性白血病细胞的杀伤效率最高达(48.35 ± 12.75)%,与培养前及培养后无 AML-DC 刺激组相比,经过特异诱导培养的 T 细胞对相应白血病细胞杀伤作用大大加强($P < 0.05$)。**结论** AML-DC 联合细胞因子可以诱导活化脐血白血病细胞特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL),该细胞能对相应白血病细胞产生特异性杀伤效应。

[关键词] 脐血; T 淋巴细胞; 细胞因子; 树突状细胞; 急性髓性白血病
[中图分类号] R 55 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674 - 3806(2013)01 - 0001 - 04
doi:10.3969/j.issn.1674 - 3806.2013.01.01

Studies on the specific anti-leukemia cell effect of cytotoxic T lymphocytes induced by acute myeloid leukemia-derived dendritic cells WANG Cai-xia, ZHANG Yu-ping, WANG Shun-qing, et al. The Department of Hematology, Guangzhou First People's Hospital Affiliated to Guangzhou Medical Cllege, Guangdong 510180, China

[Abstract] **Objective** To investigate the specific anti-leukemia cell effect of cytotoxic T lymphocytes(CTL) induced by acute myeloid leukemia-derived dendritic cells(AML-DC). **Methods** Acute myeloid leukemic cells were induced to differentiate into AML-DC. T cells from umbilical cord blood were activated with the cytokine combined with AML-DC. T cells were identified by flow cytometer(FCM). The anti-tumor activity of T cells was assayed with LDH method. **Results** Highly reactive anti-AML T cells were generated and expanded. The CD3⁺ T cells rate was (79.7 ± 3.7)% in the group after stimulation by AML-DCs. These T cells caused specific lysis of (48.35 ± 12.75)% target AML cells. And the difference was significant compared with T cells without stimulation of AML-DCs($P < 0.05$). **Conclusion** Leukemic cells of patients with acute myeloid leukemia could be differentiated to DC-like cells possessing the ability of stimulating anti-leukemic immune response.

[Key words] Cord blood; T cell; Cytokine; Dendritic cell; Acute myeloid leukemia

化疗和造血干细胞移植是治疗急性白血病的主要手段,但微量残留病(MRD)是导致白血病复发的根源,这主要与血液肿瘤缺乏特异性抗原及肿瘤细胞低表达主要组织相容性抗原复合体(MHC)分子以及缺乏共刺激信号和肿瘤细胞分泌细胞因子阻碍树突状细胞(DC)的分化及抗原呈递,从而导致 T 细胞对肿瘤抗原识别受而获得免疫逃逸有关^[1]。特异

性免疫治疗是根除 MRD 的有效办法。DC 为专职抗原提呈细胞,在共刺激信号存在下能够活化 T 细胞。已有研究指出,髓系白血病细胞能诱导分化为白血病树突状细胞,呈递已知或未知的白血病抗原,从而诱导产生 T 淋巴细胞的抗白血病效应^[2,3]。本实验旨在从白血病细胞诱导出急性髓性白血病树突状细胞(AML-DC),致敏脐血 T 细胞后生成细胞毒

性 T 淋巴细胞 (CTL), 检测 CTL 杀伤相应急性白血病细胞的能力, 从而为化疗或造血干细胞移植后的细胞过继免疫治疗、移植抗白血病效应 (GVL) 及防治恶性肿瘤复发等提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 脐血单个核细胞分离 脐血取自本院足月妊娠的健康产妇 (均征得产妇本人知情同意), 用含 CPAD 28 ml 抗凝保护液的无菌采血袋采集, 充分混匀, 8 h 内进行单个核细胞 (MNC) 分离, 将标本与 6% 羟乙基淀粉以 4:1 混匀后静置 30 ~ 45 min, 取上层澄黄色液体, 用 Ficoll-HyPaque 分离液 (比重为 1.077, Pharmacia, Uppsala, Sweden) 密度梯度离心法分离 MNCs, 用 PBS 洗涤 2 次, 备用。

1.2 白血病细胞制备 急性髓性白血病 (AML) 原代细胞 10 例 (男 5 例, 女 5 例, 年龄 21 ~ 65 岁, 平均年龄 41.5 岁), 均为新诊断病例。所有白血病标本均按 FAB 标准进行诊断及分型, 其中急性单核细胞白血病 (AML-M5) 5 例, 急性髓细胞白血病部分分化型 (AML-M2) 2 例, 急性早幼粒细胞白血病 (AML-M3) 3 例。AML 标本采集均征得患者或家属同意。于患者初诊时无菌留取外周血及骨髓, 羟乙基淀粉沉淀去除红细胞后, Ficoll-HyPaque 分离 MNCs, 洗涤后制成 MNC 悬液备用。以标记 CD3 单抗的免疫磁珠 (Miltenyi, 德国) 阳性分选 MNC, 阴性部分作为白血病细胞 (形态学辨认率 > 95%) 培养, 部分以 10% 二甲基亚砷 (DMSO) 低温冻存储备用。

1.3 AML-DC 培养 取上述分选出的 AML 细胞, 接种于无血清培养基 Stemspan 中 (Stem cell 公司), 接种浓度为 2×10^6 /ml, 分别加入 50 ng/ml IL-4, 100 ng/ml GM-CSF 培养 3 d 后加入 100 ng/ml TNF- α , 于第 7 天收集 DC 细胞用于诱导脐血 CTL。

1.4 脐血 T 淋巴细胞培养及诱导 将上述脐血 MNCs 加入无血清培养液 AIM-V 培养液 (Invitrogen) 中, 脐血 MNC 浓度为 2×10^6 /ml, 分别加入 CD3 单抗和 CD28 单抗各 10 ng/ml, d3 开始加入 IL-2 (Pep-
ro Tech 公司) 20 U/ml 培养。对照组: d3 开始只加 IL-2 培养, 不加丝裂霉素处理的 AML-DC。特异性刺激组 (实验组): d3 开始每隔 5 d 加入丝裂霉素 (MMC 50 μ g/ml, Sigma) 处理的 AML-DC 细胞, 共 3 个刺激周期, 脐血细胞种入 6 孔培养板 (Corning, 美国), 3 ml 培养体系。置 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% 的 CO₂ 全湿培养箱中培养, 根据细胞生长状况每 2 ~ 4 d 半量换液, 细胞培养 4 W 后进行实验分析。

1.5 细胞计数及活力分析 用血球计数板和台盼

蓝染色法确定, 在脐血细胞培养前后进行细胞计数, 用台盼蓝染色法进行细胞活率检测。

1.6 T 淋巴细胞亚群变化检测 用流式细胞术检测培养前后 T 淋巴细胞亚群变化, 所有单克隆抗体均为美国 Pharmingen 公司产品, 包括异硫氰酸 (FITC) 荧光标记的抗 CD3 单克隆抗体, 藻红蛋白 (PE) 标记的抗 CD4 单克隆抗体及藻红蛋白 (PE) 标记的抗 CD8 单克隆抗体。取培养前后的脐血 MNCs, 用 PBS 洗涤 2 次后分别加入以上抗体 10 μ l, 充分混匀后避光孵育 30 min, 再用 PBS 洗涤 2 次后用流式细胞仪 (美国 BD 公司 FACS Vantage 产品) 进行检测, 使用 CellQuest 软件系统上机进行分析, 分析 1×10^4 个细胞的相应标记阳性表达率, 每个样本都用 FITC 和 PE 标记同型 IgG 作为相应的阴性对照。

1.7 杀伤性分析 细胞毒性 (CTL 活性) 试验用 LDH 检测试剂盒 (Roche 公司) 进行, 操作按产品手册进行, 实验分 3 组。A 组: 脐血 MNC 效应细胞 + 急性白血病细胞/SHI 细胞株; B 组: 培养 4 w 后 T 效应细胞 + 急性白血病细胞/SHI 细胞株; C 组: 培养后特异性 T 效应细胞 + 急性白血病细胞/SHI 细胞株。通过预实验, 确定效靶比为 30:1, Elx-800 酶标仪中测定反应值, 测定波长 490 nm, 参考波长 630 nm。CTL 活性计算方法为: CTL 活性 = (效靶细胞释放值 - 靶细胞自发释放值 - 效应细胞自发释放值) / (靶细胞最大释放值 - 靶细胞自发释放值) $\times 100\%$ 。

1.8 统计学方法 应用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组培养前后比较采用重复测量资料两因素两水平的方差分析, 均数间两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置显微镜下细胞生长情况变化观察结果

(1) 树突状细胞形态变化: 急性白血病细胞与细胞因子共培养 48 h 后细胞逐渐变得不规则, 胞体逐渐拉长, 突起逐渐增多, 部分细胞聚集成团, 7 d 后细胞胞体增大, 形态不规则, 有明显的树突状突起, 多数为悬浮细胞 (见图 1)。(2) 淋巴细胞形态变化: 对照组及实验组脐血细胞培养前 3 d 无明显增加, 细胞仍呈单个散在分布; 约 7 d 后, 倒置显微镜下可见细胞数增多, 细胞透亮, 折光性好, 上清中可见葡萄串状细胞群, 14 d 时细胞较前明显增加, 细胞团明显增多, 细胞活性好; 传代培养 28 d 时细胞状态依然很好, 细胞活力 > 95% (见图 2)。

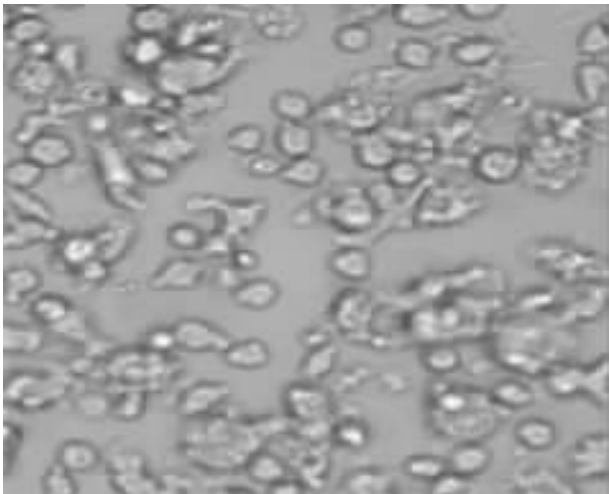


图 1 树突状细胞形态变化(10×10)



图 2 淋巴细胞形态变化(10×10)

2.2 脐血 MNC 诱导培养前及诱导培养后 T 淋巴细胞亚群的变化比较 脐血 MNC 培养前 T 淋巴细胞亚群与培养后相比存在差异。对照组及实验组脐血 MNCCD3⁺ 及 CD8⁺ 细胞比例培养前均低于诱导培养后,其中特异性刺激组(实验组)CD3⁺ 细胞比例培

养后为(79.7±3.70)%,CD8⁺ 细胞比例为(48.74±8.72)%,与培养前相比,差异有统计学意义($P<0.05$);而 CD4⁺ 细胞比例培养后以对照组为高(43.64±12.92)%,高于培养前及实验组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组诱导培养前后的脐血淋巴细胞亚群变化比较[($\bar{x}\pm s$),%]

组 别	状态	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
对照组 ($n=10$)	培养前	45.26±14.91	32.81±9.86	26.74±9.60
	培养后	67.76±9.68 [▲]	43.64±12.92 [*]	33.93±13.51
实验组 ($n=10$)	培养前	45.26±14.91	32.81±9.86	26.74±9.60
	培养后	79.7±3.70 [▲]	29.61±9.22 [#]	48.74±8.72 ^{▲#}
<i>F</i>	—	16.324	8.943	11.654
<i>P</i>	—	0.003	0.031	0.142

注:组内与培养前比较,^{*} $P<0.05$,[▲] $P<0.01$;与对照组培养后比较,[#] $P<0.05$

2.3 脐血 MNC 诱导前及诱导后淋巴细胞杀伤性比较 用 AML-DC 刺激诱导培养后的特异性 T 效应细胞对相应急性白血病细胞的杀伤效率最高,为(48.35±12.75)%,与其他各组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。培养后 T 效应细胞对急性白血病细胞也有一定的杀伤性,但杀伤效率并不高,培养后 T 效应细胞及特异性 T 效应细胞对 SHI 细胞株杀伤效率均比培养前的 T 淋巴细胞高($P<0.05$)。见表 2。

表 2 不同组脐血淋巴细胞的抗白血病细胞效应[($\bar{x}\pm s$),%]

靶细胞	脐血 MNC 效应细胞	培养后 T 效应细胞	特异性 T 效应细胞
急性白血病细胞	3.58±1.53	9.85±4.43 ^a	48.35±12.75 ^{ab}
SHI 细胞株	4.11±2.23	13.43±6.78 ^a	11.54±5.32 ^a

注:组内与脐血 MNC 效应细胞比较,^a $P<0.05$;组内与培养后 T 效应细胞比较,^{ab} $P<0.05$

3 讨论

3.1 脐血来源丰富,容易收集,所以作为干细胞及淋巴细胞来源已越来越受人们重视,但脐血中 T 淋巴细胞免疫原性弱,处于一种未接触、未成熟状态^[4,5]。研究表明,脐血中 CD3⁺ 细胞数与骨髓及外周血比较差异无统计学意义,但脐血中成熟型 T 淋巴细胞亚群的数量显著低于骨髓及外周血^[6]。对 T 细胞的功能研究发现,通过选择诱导 T 细胞成熟和增殖的细胞因子环境可诱导产生功能不同的 T 淋巴细胞。研究指出,从脐血来源的 CTLs 较外周血来源的 CTLs 更具肿瘤特异性细胞毒性,其机制未明,可能与脐血成分中所包含的树突状细胞比外周血的树突状细胞具更好的抗原呈递作用,从而增加 CTL 介导的抗肿瘤细胞毒性相关^[7]。脐血 T 细胞除可对肿瘤抗原产生反应外,与成人来源 T 细胞相

比,其诱导的同种异体效应更低^[8],因此,本实验取脐血细胞进行 T 淋巴细胞诱导培养。

3.2 白血病患者自身往往存在细胞免疫功能障碍,不能有效产生针对白血病细胞相关抗原的白血病细胞特异性 CTL。因此,体外活化并扩增白血病特异性 CTL 的过继性细胞免疫治疗是迄今为止最有希望和最有效的增强 GVL (移植抗白血病)效应的方法。DC 是目前所知机体内功能最强的抗原提呈细胞,能够显著刺激初始型 T 细胞增殖,其受 MHC-I 或 II 类分子限制,能向 CD4⁺ 或 CD8⁺ 淋巴细胞提呈抗原。已有研究指出,髓系白血病细胞能诱导分化为白血病树突状细胞,呈递已知或未知的白血病抗原,从而诱导产生 T 淋巴细胞的抗白血病效应,有望在临床上用于过继性免疫治疗,特别是用于移植后复发的患者。但也有研究认为,白血病树突状细胞与正常人的树突状细胞其基因和功能有不同特征。因此,白血病树突状细胞在产生抗肿瘤免疫反应效能方面可能不足^[9]。本研究利用 AML-DC 联合细胞因子体外诱导脐血 T 细胞活化及增殖,对培养前后的脐血 T 淋巴细胞表面标记分析提示,培养后脐血中 CD3⁺ 细胞比例明显高于培养前 ($P < 0.05$),其中以 AML-DC 特异性刺激组比例最高,达 $(79.7 \pm 3.70)\%$ 。CD8⁺ 是细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的重要表面标志,CD8⁺ 细胞通过细胞裂解或凋亡直接杀伤靶细胞。经过培养后,急性白血病细胞特异性刺激组脐血中 CD8⁺ 细胞比例明显增高,与培养前及用 IL-2 + CD3/CD8 单抗非特异诱导培养组相比差异具有统计学意义 ($P > 0.05$)。通过杀伤试验证实,经过体外诱导扩增后脐血 T 淋巴细胞的杀伤效应要比培养前好 ($P < 0.05$),其中特异性诱导增殖的 T 细胞对相应白血病细胞的杀伤效应要比培养前及非特异性诱导培养的 T 淋巴细胞效应要好 ($P <$

0.05),提示经过体外特异性诱导增殖,可诱导产生针对该白血病细胞的特异性 CTL,有望在临床上用于化疗或造血干细胞移植后的细胞过继免疫治疗以及移植抗白血病效应 (GVL),防止恶性肿瘤复发。

参考文献

- 1 李扬秋,刘启发,黄仁魏. 血液肿瘤免疫治疗学 - 基础研究与临床应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:40-190.
- 2 Liepert A, Grabrucker C, Kremser A, et al. Quality of T-cells after stimulation with leukemia-derived dendritic cells (DC) from patients with acute myeloid leukemia (AML) or myeloid dysplastic syndrome (MDS) is predictive for their leukemia cytotoxic potential[J]. Cell Immunol, 2010,265(1):23-30.
- 3 Kremser A, Dressig j, Grabrucker C, et al. Dendritic cells (DCs) can be successfully generated from leukemic blasts in individual patients with AML or MDS; an evaluation of different methods[J]. J Immunother. 2010,33(2):185-199.
- 4 Lin SJ, Wang LY, Huang YJ, et al. Effect of interleukin (IL)-12 and IL-15 on apoptosis and proliferation of umbilical cord blood mononuclear cells[J]. Bone Marrow Transplant, 2001,28:439-445.
- 5 郭荣,邹萍,邹典斌. 人脐血及骨髓淋巴细胞免疫表型的比较及其意义[J]. 中国实验血液学杂志,2002,10(6):519-522.
- 6 许利民,冯江,王劲,等. 脐血 T 淋巴细胞亚群分布特点及其临床意义探讨[J]. 重庆医学. 2004,33(4):553-554.
- 7 Clark EM, Joshi DS, Grimm AB, et al. Ultrastructural basis of enhanced antitumor cytotoxicity of cord blood-derived CTLs; a comparative analysis with peripheral blood and bone marrow[J]. Int J Oncol, 2010,37(3):645-653.
- 8 Merindol N, Grenier AJ, Caty M, et al. Umbilical cord blood T cells respond against the Melan-A/ MART-1 tumor antigen and exhibit reduced alloreactivity as compared with adult blood-derived T cells[J]. J Immunol,2010,185(2):856-866.
- 9 Gal'tseva IV, Savchenko VG, Sudarikov AB, et al. Leukemic dendritic cells in patients with acute myeloid leukemia[J]. Ter Arkh, 2009,81(7):20-28.

[收稿日期 2012-09-15][本文编辑 黄晓红 韦颖]

《中国临床新医学》杂志投稿须知

凡投本刊的稿件,务请补全以下内容与项目:

1. 中文摘要、关键词(按规范格式书写)。
2. 英文题目,作者(汉拼),英文单位名称,英文摘要和关键词(按规范格式书写)。
3. 论文的统计学处理方法。
4. 单位投稿介绍信。
5. 作者简介(姓名、出生年月、性别、学历、学位、职称、研究方向)。
6. 须寄(送)A4 纸打印稿一份,并发电子邮件到本编辑部。
6. 第一作者联系地址、邮编、电话和 E-mail。

· 本刊编辑部 ·