

[文章编号] 1000-4718(2005)10-1962-04

G-CSF 动员的外周血干细胞悬液冷冻保存后诱导培养树突状细胞的研究*

史敦云¹, 汪明春^{1△}, 李明¹, 张琼丽¹, 聂李平¹, 李玉珠¹, 卓家才², 许 蕴²
(深圳市第二人民医院 ¹血液病研究所, ²血液科, 广东 深圳 518039)

[摘要] 目的:研究粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员的外周血干细胞(PBSC)悬液中单个核细胞(MNC)冷冻保存后经不同诱导途径培养的树突状细胞(DC)的特性,探讨PBSC悬液冷冻保存后诱导培养DC的方法。方法:用两种保护液-80℃冷冻保存PBSC悬液,分析复苏MNC中CD34⁺细胞、CD14⁺细胞、CD14⁺PI⁺细胞,并分两种方法诱导培养复苏MNC:贴壁细胞经粒细胞单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素4(IL-4)培养2周,培养结束前加入肿瘤坏死因子α(TNF-α)、布雷非德菌素(BFA);非贴壁细胞经酪氨酸激酶3配体(FL)、干细胞因子(SCF)、GM-CSF、IL-4培养1周,再按前1种方法继续培养2周。培养结束后,流式细胞仪分析DC特性。结果:两组复苏MNC与新鲜MNC比较:CD34⁺细胞含量均无明显差异(P>0.05);而CD14⁺细胞少,CD14⁺PI⁺细胞百分率高(P<0.01);贴壁细胞少,贴壁细胞诱导培养DC效果不佳;非贴壁细胞扩增诱导均能获得大量成熟的激活的能够分泌IL-12(p40)的髓系DC。结论:PBSC悬液冷冻保存后能用于培养髓系DC,但培养方法应以扩增诱导为主。

[关键词] 干细胞; 树突细胞; 免疫疗法; 粒细胞集落刺激因子

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Dendritic cells induced from culture of cryopreserved G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell harvests

SHI Dun-yun¹, WANG Ming-chun¹, LI Ming¹, ZHANG Qiong-li¹, NIE Li-ping¹, LI Yu-zhu¹, ZHUO Jia-cai², XU Yun²

(¹Institute of Hematology, ²Department of Hematology, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518039, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To find the way of culturing the dendritic cells(DC) from the cryopreserved G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell(PBSC) harvests. **METHODS:** The non-adherent or adherent cells from the fresh or refreshed PBSC harvests were induced to DCs separately. The amount of CD34⁺ cells, CD14⁺PI⁺ cells in the PBSC harvests and the characters of DCs were analyzed by flow cytometry. **RESULTS:** The DCs cultured from the non-adherent cells were similar to those from the fresh groups in the number and the characters. The amount of CD34⁺ cells was also similar between them, but CD14⁺PI⁺ cells were higher in the refreshed groups than that in the fresh groups. The adherent cells from the refreshed group were too few to be induced to DCs. **CONCLUSION:** The refreshed PBSC harvests could be induced to the matured activated myeloid DCs cultured by the routine of CD34⁺ cells rather than by the way of monocytes.

[KEY WORDS] Stem cells; Dendritic cells; Immunotherapy; Granulocyte colony-stimulating factor

临床应用树突状细胞(dendritic cells, DCs)不仅要求其功能活性满意,而且常需有足够量的DCs供反复使用。DCs通常从骨髓CD34⁺细胞和外周血单核细胞培养获得。本实验拟探索将粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)动员的外周血干细胞(peripheral blood stem cell, PBSC)悬液

冷冻保存后诱导培养DCs的方法。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 PBSC来源 10例健康外周血干细胞移植供者,经G-CSF(惠尔血,日本麒麟公司产品)

[收稿日期] 2004-03-08 [修回日期] 2004-05-24

* [基金项目] 深圳市科技局科研基金资助项目(No. 199904003)

Tel: 0755-83211326; E-mail: sdy2727@szonline.net

△通讯作者

5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 皮下注射,第4.5 d和5.5 d用CS-3000血细胞分离机采集PBSC,用RPMI-1640制成细胞悬液备用。

1.2 主要试剂 粒细胞单核细胞集落刺激因子(granulocyte monocyte colony stimulating factor, GM-CSF)、重组人白细胞介素4(recombination human interleukin-4, rhIL-4)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、酪氨酸激酶3配体(flt3-ligand, FL)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)等细胞因子购自Peprotech公司,大鼠IgG1-生物素(biotin)、大鼠抗人IL-12(p40)-biotin、兔IgG1-藻红蛋白(R-phycoerythrin, PE)、链霉亲和素(streptavidin)-藻红蛋白-花青甙5.1(tri-color, TC)、兔抗人IL-10-PE等购自Caltag公司。CD14、CD34、CD11c、CD86、CD83、HLA-DR、CD1a、CD64等单克隆抗体[异硫氰酸(fluorescein, FITC)或PE标记]以及破膜剂等购自Coulter公司,细胞冻害保护液(CP-1)购自日本极东制药工业株式会社。

2 方法

2.1 PBSC保存 2×10^{10} cells/L冷冻液分两组-80℃冷冻保存:①二甲基亚砜(DMSO)冷冻液:10%胎牛血清(FCS)+10% DMSO;②CP-1冷冻液:羟乙基淀粉(hydroxyethyl starch, HES)6%+DMSO 5%+人血清白蛋白(abumin, ABL)4%。7 d后42℃复苏细胞,1%台盼蓝(trypan blue)染色后进行活细胞计数。

2.2 CD14⁺细胞活性检测 取新鲜的或复苏的PBSC悬液(2×10^{10} cells/L)90 μL ,加CD14-FITC单抗10 μL 及碘化乙啶(PI, DNA-Prep Stain, 库尔特公司)5 μL ,室温避光孵育20 min,洗涤,流式细胞仪(Coulter Epics XL)分析5 000个CD14⁺细胞,计算CD14⁺PI⁺细胞百分率。

2.3 DC诱导培养 按文献^[1]方法进行,贴壁细胞加入GM-CSF(100 $\mu\text{g}/\text{L}$) + rhIL-4(5×10^5 U/L), RPMI-1640(20% FCS)条件下,置37℃、5% CO₂、饱和湿度下于24孔板中培养,每周半量换液,培养2周,培养结束前48 h、24 h分别加入TNF- α (100 $\mu\text{g}/\text{L}$)、布雷菲德菌素(Brefeldin A, BFA, 10 mg/L, Sigma公司, DMSO溶解); 2×10^8 非贴壁细胞/L加入FL(100 $\mu\text{g}/\text{L}$) + SCF(100 $\mu\text{g}/\text{L}$) + GM-CSF(100 $\mu\text{g}/\text{L}$) + rhIL-4(5×10^5 U/L)培养1周,再按前一种方法继续培养2周。培养结束后,收获细胞检测。

2.4 细胞表型分析 细胞膜标志采用荧光标记抗体直接法染色,流式细胞仪分析5 000个DC细胞,计算阳性细胞百分率。

2.5 DC细胞内IL-12(P40)、IL-10含量分析 参考文献^[2]方法进行。胞浆(c)IL-10采用直接标记法染色,cIL-12(p40)采用间接标记法染色。步骤如下:取50 μL 培养细胞(2×10^{10} cells/L)加入破膜剂A 100 μL ,室温孵育15 min,洗涤后加入破膜剂B 100 μL 、大鼠抗人IL-12(P40)-biotin(对照管加大鼠IgG1-biotin)20 μL 、兔抗人IL-10-PE(对照管加兔IgG1-PE)20 μL ,孵育15 min,洗涤后实验管与对照管各加入Streptavidin-TC 10 μL ,再室温避光孵育15 min。洗涤,流式细胞仪分析5 000个DC细胞,计算cIL-12(p40)⁺、cIL-10⁺细胞百分率。

3 统计学处理

数据用均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间用方差分析,组间差异用 t 检验判别。

结 果

1 复苏PBSC活细胞回收率

2×10^7 新鲜PBSC悬液细胞/管-80℃冷冻保存7 d后,两组复苏细胞悬液均肉眼观有絮团,细胞涂片瑞氏染色后油镜下见大量破损细胞。复苏细胞①回收活细胞(1.9 ± 0.4) $\times 10^7$,回收率(93.0 ± 2.6)%,复苏细胞②回收活细胞(1.9 ± 0.6) $\times 10^7$,回收率(94.5 ± 3.1)%,复苏组①②活细胞回收率差异不显著($P>0.05$)。

2 PBSC悬液造血干祖细胞含量

新鲜PBSC悬液CD34⁺细胞(0.91 ± 0.44)%,复苏细胞①CD34⁺细胞(1.08 ± 0.52)%,复苏细胞②CD34⁺细胞(1.04 ± 0.52)%,与新鲜组差异不显著($P>0.05$)。

3 PBSC悬液中贴壁细胞数量

2×10^6 cells/well于24孔板中培养3 h,取贴壁细胞计数,新鲜组(2.4 ± 0.6) $\times 10^5$,复苏组①②分别为(5.6 ± 2.2) $\times 10^3$ 、(6.2 ± 2.8) $\times 10^3$,均与新鲜组差异显著($P<0.01$)。

4 PBSC悬液中CD14⁺细胞活性

新鲜组CD14⁺细胞(18.4 ± 8.6)%,CD14⁺PI⁺(1.2 ± 0.2)%(图1A)(注:PI为双链核酸红色荧光染料,不能透过活细胞膜,可鉴别死活细胞),复苏组①CD14⁺细胞(9.2 ± 3.6)%,CD14⁺PI⁺(15.8 ± 6.2)%(图1B),复苏组②CD14⁺细胞(9.6 ± 3.2)%,CD14⁺PI⁺(16.4 ± 5.4)%(图1C),复苏组与新鲜组CD14⁺PI⁺细胞数差异显著($P<0.01$)。

5 PBSC悬液诱导培养DC的数量

以冷冻前 2×10^6 PBSC悬液中的MNC为起始,

新鲜组贴壁细胞和非贴壁细胞诱导 DC 分别为 $(1.6 \pm 0.6) \times 10^5$ 和 $(1.2 \pm 0.4) \times 10^6$, 两者差异显著 ($P < 0.05$); 从贴壁细胞途径诱导 DC, 复苏组①②均由于贴壁细胞数量太少而诱导培养不成功; 从非贴壁细胞(含造血干祖细胞)扩增诱导 DC, 复苏组①获得 DC $(1.3 \pm 0.5) \times 10^6$, 复苏组②获得 DC $(1.4 \pm 0.4) \times 10^6$, 两者与新鲜非贴壁细胞组差异不显著 ($P > 0.05$)。

6 培养 DC 膜表型和细胞内因子分析

如表 1 所示, 复苏 PBSC 悬液培养 DC 的膜表型与新鲜组相似, 均为成熟的激活的髓系 DC 表型, 细胞内因子分析表明上述 3 组方案培养的 DC 分泌 IL-12(p40) 的能力相近, 均不分泌 IL-10。

表 1 PBSC 悬液诱导培养 DC 的特性

Tab 1 The characters of the DCs cultured from PBSC harvests (% $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

McAb	The fresh adherent cells group	The refreshed non-adherent cells group①	The refreshed non-adherent cells group②
CD11c ⁺	97.3 ± 5.2	91.4 ± 6.4*	89.6 ± 7.8*
CD86 ⁺	88.2 ± 6.8	76.8 ± 6.9*	73.8 ± 8.5*
CD83 ⁺	59.6 ± 8.4	47.3 ± 9.3*	41.7 ± 6.3*
HLA-DR ⁺	96.5 ± 7.1	65.3 ± 11.3*	62.4 ± 7.2*
CD1a ⁺	36.6 ± 7.5	48.2 ± 5.9*	49.8 ± 8.6*
CD3 ⁺	3.2 ± 1.4	6.8 ± 2.6*	5.2 ± 1.8*
CD19 ⁺	1.6 ± 0.7	1.8 ± 0.8*	1.3 ± 0.5*
CD64 ⁺	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.5*	2.4 ± 0.7*
cIL-12(p40) ⁺	15.9 ± 5.1	14.8 ± 4.2*	14.6 ± 3.4*
cIL-10 ⁺	1.2 ± 0.4	1.4 ± 0.5*	1.2 ± 0.6*

The DCs cultured from the adherent cells of the refreshed group were too few to be detected. * $P > 0.05$ vs the fresh group.

讨 论

DC 在免疫调节中有重要作用: DC1 能分泌 IL-12(p40), 促进 Th0 向 Th1 分化, 参与免疫增强和细胞

免疫反应^[3]; DC2 能分泌 IL-10, 促进 Th0 向 Th2 分化, 参与免疫耐受和体液免疫反应^[4]。肿瘤抗原致敏 DC1 适合于肿瘤的免疫治疗^[3,5,8]。供者抗原致敏受者 DC2 诱导免疫耐受可能在器官移植方面有潜在用途^[4]。这些显示了 DC 良好的应用前景。采用 Teflon 疏水袋培养^[6], 或改善细胞因子的适当组合提高培养效果, 或改进取材方法提高培养材料中的有效细胞成分, 是提高培养 DC 数量以便临床分次应用的有效途径。G-CSF 体内能提高外周血 DC2 数量, 诱导 T 细胞向 Th2 分化^[2,7], 但 G-CSF 动员可以增加 PBSC 悬液中单核细胞和造血干/祖细胞含量, 即增加了培养 DC 的有效细胞成分。洗去 G-CSF 后, 我们对新鲜 PBSC 悬液中的单核细胞直接诱导和对其中的造血干祖细胞用 FL、SCF、GM-CSF、IL-4 培养扩增 1 周后再诱导, 均培养出了成熟度较高的髓系(CD11c⁺) DC。它们高表达人白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA) II 类分子 HLA-DR 和协同刺激分子(co-stimulator molecule) CD86 以及粘附分子(adhesive molecule) CD1a, TNF- α 刺激后表达激活标志 CD83, 并具有分泌 IL-12(p40) 的能力(图 2A), 不能分泌 IL-10(图 2B), 即这些 DC 具有 DC1 的功能活性, 可发挥免疫增强作用。部分 DC 低表达 CD86(图 2C), 没有被 TNF- α 活化(图 2D), 这部分 DC 为不成熟 DC, 它们对免疫治疗有何影响待进一步研究。培养后收获细胞中 CD3⁺、CD19⁺、CD64⁺ 细胞很少, 表明成熟血细胞成分不会影响 DC 祖细胞分化, 不必从 PBSC 悬液中纯化 CD34⁺ 细胞培养 DC。

两种冷冻液保存的 PBSC 复苏后均有细胞絮团, 而贴壁细胞少见, CD14⁺ PI⁺ 细胞率增高, 依单核细胞途径诱导培养 DC 效果不佳, 表明本文情况下两种常用冷冻保护液均不能使单核细胞活性得到良好保持, PBSC 悬液冷冻后不能循单核细胞途径诱导培养 DC。但同样条件下 CD34⁺ 细胞活性保持良好, 依此途径扩增诱导培养的 DC 在数量、表型以及分泌 IL

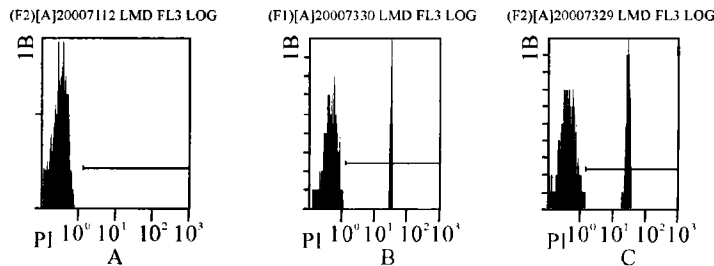


Fig 1 FCM figures of the CD14⁺ PI⁺ cells in PBSC harvests. A: the fresh group; B: the refreshed group①; C: the refreshed group②.

图 1 PBSC 悬液中 CD14⁺ PI⁺ 细胞流式细胞仪分析

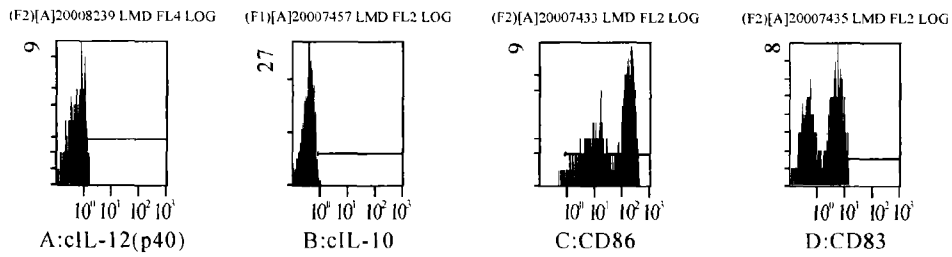


Fig 2 FCM figures of the DCs induced from the adherent cells in the fresh PBSC harvests. A: cIL-12(p40); B: cIL-10; C: CD86; D: CD83.

图2 新鲜PBSC悬液中贴壁细胞诱导DC流式细胞仪分析

-12的能力上与新鲜组培养的DC相近。这表明PBSC冷冻后仍可作为诱导培养DC的材料,但培养方法应以循造血干/祖细胞途径的扩增诱导为主。据报道DC可以冷冻保存^[6],那么,PBSC悬液作为诱导DC材料应预先诱导培养成DC后保存或将标本冷冻保存以后采用循造血干/祖细胞途径扩增诱导的方法培养DC。G-CSF动员的PBSC冷冻保存后仍能诱导DC,使医生可以选择有利时机取材。该取材方法较抽取骨髓或外周血(50 mL以上)的常规方法省去了反复取材、分离细胞的麻烦,能获得更多的有效细胞成分,不导致大量血液成分丢失,并更便于免疫治疗方案的执行。

【参 考 文 献】

[1] 史敦云,张琼丽,李明,等. 人外周血单核细胞体外诱导成熟和激活的树突状细胞[J]. 山西医药杂志, 2002, 31(5): 384 - 386.
 [2] Klanginsirikul P, Russell NH. Peripheral blood stem cell harvests from G-CSF-stimulated donors contain a skewed

Th2 CD4 phenotype and a predominance of type 2 dendritic cells[J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(5): 495 - 501.
 [3] Caron G, Delneste Y, Roelandts E, et al. Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell - promoting effector dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2001, 167(7): 3682 - 3686.
 [4] Kuwana M, Kaburaki J, Wright TM, et al. Induction of antigen-specific human CD4⁺ T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors[J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31(9): 2547 - 2557.
 [5] Takahashi H. Dendritic cells and tumor specific immunity[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1999, 26(14): 2121 - 2126.
 [6] Cao H, Veronique V, Chantal M, et al. Cryopreservation of dendritic cells grown *in vitro* from monocytes for their future clinical use[J]. *J Exp Hematol*, 2000, 8(4): 245 - 250.
 [7] Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation[J]. *Science*, 1999, 283(5405): 1183 - 1186.
 [8] 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.