

脐血 CD34⁺ 造血干细胞来源的树突状细胞疫苗体外抗乳腺癌效果评价及优化

王 森¹, 解辉平², 严珂庆¹, 崔洪飞¹, 李 伟¹, 张志斐^{1*}, 金媛媛^{3*}

(1 华北理工大学药学院, 唐山 063000; 2 华北理工大学基础医学院, 唐山 063000;

3 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

[摘要] **目的:** 优化脐血 CD34⁺ 造血干细胞来源的树突状细胞(dendritic cell, DC)体外诱导培养方法, 制备负载肿瘤细胞裂解物的 DC 疫苗并探索 DC 疫苗的抗乳腺癌活性。**方法:** 免疫磁珠分选脐血单个核细胞后获得 CD34⁺ 造血干细胞, 流式细胞术鉴定 CD34⁺ 造血干细胞纯度, 经扩增培养和诱导分化培养获得 DC, 比较各因子在不同组合和不同时机加入对所获得 DC 表型的影响; 通过流式细胞术检测 DC 对异硫氰酸荧光素-卵白蛋白(FITC conjugated ovalbumin, FITC-OVA)的抗原吞噬活性, CCK-8 方法检测 DC 疫苗对异源脐血单个核细胞的刺激增殖能力, 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)方法检测负载肿瘤细胞裂解物抗原的 DC 疫苗激活后的 T 细胞对乳腺癌细胞的体外杀伤活性。**结果:** 扩增培养阶段, IMDM 培养基 + 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF, 100 ng·mL⁻¹) + 干细胞因子(stem cell factor, SCF, 50 ng·mL⁻¹) + FMS 样酪氨酸激酶 3(FMS like tyrosine kinase 3 ligand, Flt-3L, 100 ng·mL⁻¹) + 血小板生成素(thrombopoietin, TPO, 100 ng·mL⁻¹) + 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) + 1% P/S 条件培养组与 IMDM 培养基 + GM-CSF(100 ng·mL⁻¹) + SCF(50 ng·mL⁻¹) + 10% FBS + 1% P/S 条件培养组相比, 收获的 DC 表型没有显著性差异, 但前者能收获更多数量的 DC; 诱导分化阶段, 肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)在和白介素-4(interleukin 4, IL-4)加入 48 h 后加入 GM-CSF, 比在其他时间加入收获 DC 的 CD80 和 CD83 的表达更高; 流式细胞术结果显示未成熟 DC 具有较强的抗原吞噬活性; DC 疫苗对异源脐血单个核细胞具有较强的刺激增殖能力; 负载肿瘤细胞裂解物抗原的 DC 疫苗激活后的 T 细胞在体外对不同的乳腺癌细胞系具有显著的杀伤活性。**结论:** 脐带血造血干细胞能够分化为数量可观的功能性 DC, 负载肿瘤细胞裂解物抗原的 DC 疫苗能激活 T 细胞并对乳腺癌细胞系具有显著的杀伤活性。

[关键词] 脐血; CD34⁺ 造血干细胞; 树突状细胞疫苗; 乳腺癌

[中图分类号] R967 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2025)04-0377-09

Evaluation and optimization of anti-breast cancer effect of dendritic cell vaccine derived from cord blood CD34⁺ hematopoietic stem cells *in vitro*

WANG Miao¹, XIE Hui-ping², YAN Ke-qing¹, CUI Hong-fei¹, LI Wei¹, ZHANG Zhi-fei^{1*}, JIN Yuan-yuan^{3*}

(1 College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China;

2 School of Basic Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China;

3 Institute of Medical Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the induction and culture method of umbilical cord blood CD34⁺

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目(2021-I2M-I-070)

[作者简介] 王森, 女, 硕士, 主要从事细胞生物学研究。E-mail: wangmiao20000720@163.com。

[通讯作者] *金媛媛, 女, 医学博士, 副研究员, 主要从事酶类、蛋白多肽类生物大分子的设计、活性和成药性的研究和细胞治疗产品及技术的研究与开发工作。E-mail: jinyuanyuan@imb.pumc.edu.cn。*张志斐, 女, 教授, 主要从事药物有效性分析、药物晶体结构及药物组合生物合成研究。E-mail: zhangzhifeifei7208@163.com。

[DOI] 10.20251/j.cnki.1003-3734.2025.04.008

hematopoietic stem cell derived dendritic cell (DC) *in vitro*, prepare DC vaccine loaded with tumor cell lysate, and explore the anti-breast cancer activity of DC vaccine. **Methods:** CD34⁺ hematopoietic stem cells were obtained after umbilical blood mononuclear cells were sorted by immunomagnetic beads. The purity of CD34⁺ hematopoietic stem cells was determined by flow cytometry, and DC was obtained by amplification culture and induced differentiation culture. The influence of different factors added in different combinations and different times on the phenotype of the obtained DC was compared. Flow cytometry was used to detect the antiphagocytotic activity of DC on FITC-OVA, CCK-8 method was used to detect the ability of DC vaccine to stimulate the proliferation of heterologous umbilical blood mononuclear cells, and LDH method was used to detect the *in vitro* killing activity of T cells activated by DC vaccine loaded with tumor cell lysate antigen on breast cancer cells. **Results:** During amplification and culture, IMDM medium + GM-CSF (100 ng·mL⁻¹) + SCF (50 ng·mL⁻¹) + Flt-3L (100 ng·mL⁻¹) + TPO (100 ng·mL⁻¹) + 10% FBS + 1% P/S condition culture group and IMDM medium + GM-CSF (100 ng·mL⁻¹) + SCF (50 ng·mL⁻¹) + 10% FBS + 1% P/S, there was no significant difference in the phenotype of harvested DCs, but the former group could harvest more DCs. In the induction differentiation stage, the expression of CD80 and CD83 of the harvested DC was higher when TNF- α was added 48 hours after the addition of GM-CSF and IL-4 than at other time. Flow cytometry showed that immature DC had strong antigen-phagocytosis activity. DC vaccine showed a strong ability to stimulate the proliferation of heterologous cord blood mononuclear cells. T cells activated by DC vaccine loaded with tumor cell lysate antigen showed significant killing activity against different breast cancer cell lines *in vitro*. **Conclusion:** Cord blood hematopoietic stem cells can differentiate into a considerable number of functional DC, and DC vaccine loaded with tumor cell lysate antigen can activate T cells and have significant killing activity against breast cancer cell line.

[Key words] umbilical cord blood; CD34⁺ hematopoietic stem cells; dendritic cell vaccine; breast cancer

2020年,世界卫生组织报告了全球超过226万例乳腺癌新增病例和近68.5万例死亡病例,因此,迫切需要开发新的乳腺癌治疗方法^[1]。与其他癌症相比,乳腺癌在免疫学上被归类为“冷肿瘤”。美国国家癌症研究所定义的“冷肿瘤”是一种不太可能引发强烈免疫反应的肿瘤。浸润性免疫抑制细胞如髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)、调节性T细胞(Tregs)和M2极化巨噬细胞促进对抗肿瘤免疫细胞如树突状细胞(dendritic cell, DC)、T细胞、B细胞、M1巨噬细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)和自然杀伤T细胞(natural killer T cell, NKT)的抑制^[2-3]。此外,这种免疫抑制性肿瘤微环境抑制了对曲妥珠单抗和拉帕替尼辅助化疗的预期有益反应^[4]。总之,在上述免疫性“冷肿瘤”观察到的免疫抑制性肿瘤微环境对乳腺癌患者的治疗构成了巨大挑战^[2]。

DC在免疫系统调节中发挥关键作用,并作为激活适应性免疫反应的连接桥梁^[5]。与其他抗原呈递细胞相比,DC通常被称为专业抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APC),表现出更高的向CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞呈递肿瘤抗原的潜力。

DC细胞可分为3种主要亚型,包括传统I型DC(cDC1)、传统II型DC(cDC2)和浆细胞样DC(plasmacytoid dendritic cells, pDC)^[6-7]。另一种亚型是单核细胞衍生的树状细胞(monocyte-derived dendritic cells, Mo-DCs),是在炎症和感染中发挥重要作用的独特的DC亚群,这些Mo-DCs来源于对单核细胞的刺激和激活信号的反应^[8-9]。各种DC细胞特异性标记物如CD80, CD83, CD86, CD40, MHC I类和II类的表达状态可以决定这些DC亚群的功能,而了解DC功能和亚群将有助于进一步选择适当类型的DC用于设计DC疫苗。使用DC疫苗时要考虑的2个最重要的参数是选择合适的DC亚群和选择合适的成熟状态,因为其决定了疫苗的肿瘤微环境和疗效。本研究主要探讨了将脐血造血干细胞诱导成DC细胞的方法和对DC表型的影响因素,进一步考察了DC细胞的抗原吞噬功能和负载肿瘤细胞裂解物抗原的DC疫苗的抗乳腺癌活性。

材 料

1 脐血

脐血样本来自健康、足月正常分娩产妇。

2 试药和试剂

CD34⁺ 细胞磁珠阳性分选试剂盒 (Miltenyi Biotec 公司); 人重组粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF, 华北制药股份有限公司, 批号: M202206X1303); 人重组白细胞介素-4 (interleukin 4, IL-4, 批号: C17dC1-G001-233EW1-DE)、人重组干细胞因子 (stem cell factor, SCF, 批号: C1326c1-G001-2362w1-1HT)、人重组肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α , 批号: C25cP1-22A5w1-1138) 均来自 Pepro Tech 公司; 人重组血小板生成素 (thrombopoietin, TPO, 批号: B334287)、人重组 FMS 样酪氨酸激酶 3 配体 (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, Flt-3L, 批号: B322454)、抗人 CD83-PE 抗体 (批号: B359336)、抗人 CD80-PE 抗体 (批号: B378574)、抗人 CD86-PE 抗体 (批号: B390950)、抗人 CD8-PE 抗体 (批号: B385188)、抗人 CD11c-FITC 抗体 (批号: B401287)、抗人 CD14-FITC 抗体 (批号: B390672)、抗人 CD3-FITC 抗体 (批号: B378281)、抗人 CD34-FITC 抗体 (批号: B369517)、抗人 CD4-APC 抗体 (批号: B333715)、抗人 HLA-DR-PerCP 抗体 (批号: B389998) 及其同型对照抗体 APC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (批号: B404487), PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (批号: B379941), PerCP Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl (批号: B352926) 均来自 Biolegend 公司; 人淋巴细胞分离液 (Ficoll, 批号: 20240425-9083)、RPMI 1640 培养基购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司, 批号: 20220906; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号: A1285601)、IMDM 培养基均来自 Gibco 公司; X-VIVO 15 培养基 (Lonza 公司); 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS, Biosharp 公司); 异硫氰酸荧光素-卵白蛋白 (FITC conjugated ovalbumin, FITC-OVA, 40 kDa)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 均购自北京索莱宝科技有限公司; CCK8 试剂盒、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH, 批号: WQ784) 检测试剂盒均购自同仁化学科技 (北京) 有限公司; 青霉素-链霉素 (penicillin/streptomycin, P/S)、BCA 检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

3 脐血 CD34⁺ 造血干细胞的磁珠分选

将肝素抗凝的脐带血 $2\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血浆, 用与血浆体积比为 1:1 的 PBS 重悬下层血细胞沉淀, 按照稀释后脐血: Ficoll = 2:1 的体积比

加入 Ficoll, 密度梯度 $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 20 min, 吸取白膜层离心洗涤得到脐血单个核细胞。单个核细胞使用含有 0.5% BSA 和 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 的 PBS 缓冲液重悬洗涤, 用 $40\ \mu\text{m}$ 细胞筛网过滤细胞, 使用 CD34 单克隆抗体阳性磁珠分选试剂盒, 分离得到纯化的 CD34⁺ 细胞。得到的阳性细胞以及阴性滤液中的细胞各取出 5×10^4 个细胞用 $50\ \mu\text{L}$ 重悬, 加入 $2\ \mu\text{L}$ 的 CD34 单克隆抗体, 避光孵育 15 min, 离心洗涤后流式细胞仪检测分选效率。

4 脐血 CD34⁺ 造血干细胞的体外扩增培养与 DC 的诱导分化

分离纯化得到的 CD34⁺ 细胞平均分为两组, 将每组细胞浓度调整为 2×10^5 个细胞 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 转移至经过 TC 处理的培养瓶中进行培养, 在 A: IMDM + 10% FBS + GM-CSF ($100\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) + SCF ($50\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) + Flt-3L ($100\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) + TPO ($100\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 1% P/S 和 B: IMDM + 10% FBS + GM-CSF ($100\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) + SCF ($50\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 1% P/S 这 2 种培养条件下进行为期 30 d 的 CD34⁺ 细胞的扩增培养, 扩增培养 5 d 后进行首次换液, 以后每隔 3 d 进行全量换液, 每次换液时, 记录两组培养条件下细胞数量, 并使细胞浓度维持在 $2\times 10^5\sim 5\times 10^5$ 个细胞 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。自 d 8 培养瓶内开始有贴壁细胞富集, 转移悬浮细胞至新的培养瓶中, 贴壁细胞进行 DC 诱导培养, 诱导培养条件分 9 组: 1~4 组为 X-VIVO15 + GM-CSF ($50\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) + IL-4 ($25\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0 h 加入) + TNF- α ($50\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 分别在 0, 24, 48, 72 h 加入); 5~8 组为 X-VIVO15 + GM-CSF ($50\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) + IL-4 ($25\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 48 h 加入) + TNF- α ($50\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 分别在 0, 24, 48, 72 h 加入); 9 组为 X-VIVO15 + GM-CSF ($50\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) + IL-4 ($25\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0 h), 不加 TNF- α , DC 进行诱导培养 5 d。记录 A, B 两组条件下在一个培养周期内 CD34⁺ 细胞扩增的倍数和最终收获的 DC 的数量, 选择最佳 CD34⁺ 细胞扩增条件以及 DC 诱导条件。

5 流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 对细胞表型和抗原吞噬活性的检测

5.1 DC 流式细胞术细胞表型检测 在一个培养周期内, 可收获 7~9 批 DC, 每批收获的 DC 以及不同 DC 诱导培养方案得到的 DC 在 d 5 取样使用 FCM 检测, 每个样本使用 PBS 洗涤 2 次, $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 5 min, 用适量 PBS 重悬, 每管加入 $50\ \mu\text{L}$ 待测样本, 加入 PE 标记的鼠抗人 CD80, CD86, CD83, FITC 标记的鼠抗人 CD14, CD11c 和 Percp 标记的鼠抗人

HLA-DR 及其相应的同型对照流式抗体各 2.5 μL , 室温避光孵育 15 min, 孵育结束后用 1 mL PBS 洗涤, $1\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 5 min, 用 150 μL 的 PBS 重悬后使用流式细胞仪检测各表面特异性标记物表达情况。

5.2 DC 抗原吞噬活性检测 分别在 DC 诱导培养 d1, d3, d5, d7 加入一支工作浓度为 $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 FITC-OVA (40 kDa) 抗原, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育 30 min, 加入 PBS, $1\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心洗涤 5 min, 重复洗涤 2 次, 用适量 PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪检测 FITC-OVA 阳性的表达情况。

6 DC 疫苗制备

6.1 肿瘤细胞裂解物抗原制备 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 乳腺癌细胞培养条件均为 RPMI-1640 + 10% FBS。取状态良好的 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 乳腺癌细胞各 1×10^7 个, 离心后用 1 mL PBS 重悬细胞转移至 1.8 mL 冻存管中, 将冻存管置于液氮中 10 min, 取出在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅解冻, 反复操作 3~4 次, 得到的裂解液 $3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸出上清过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤菌膜, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测肿瘤细胞裂解物蛋白浓度。

6.2 DC 疫苗制备 在抗原吞噬能力最高的培养时间, 即 DC 诱导培养 d3 加入 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 肿瘤细胞裂解物抗原 ($30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 并加入 TNF- α ($50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 共孵育 48 h, 刺激 DC 进一步成熟, 即为肿瘤特异性 DC 疫苗。

7 DC 疫苗刺激淋巴细胞增殖能力的检测

7.1 CCK-8 检测淋巴细胞增殖 在 96 孔细胞培养板中, 共培养孔加入淋巴细胞 1×10^5 个 $\cdot$ 孔 $^{-1}$, 淋巴细胞来源于同种异体新鲜脐带血单个核细胞 (cord blood mononuclear cells, CB-MNC), 按照 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 的效靶比, 分别加入 DC 疫苗 2×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 , 2.5×10^3 个 $\cdot$ 孔 $^{-1}$, 同时设置空白 DC 孔、空白淋巴细胞孔、空白培养基孔, 每组设 3 个复孔, 每孔终体积为 $100\text{ }\mu\text{L}$, 共孵育 7 d, 加入 CCK-8 检测试剂 $10\text{ }\mu\text{L}\cdot$ 孔 $^{-1}$, 孵育 2 h, 使用 BioTek 酶标仪进行检测。用刺激指数 (stimulation index, SI) 表达刺激淋巴细胞增殖能力, 刺激指数计算公式如下:

$$\text{SI} = \frac{\text{实验孔 A 值} - \text{空白 DC 组 A 值}}{\text{空白淋巴细胞组 A 值} - \text{背景组 A 值}}$$

7.2 淋巴细胞共培养后表型检测 共培养前后淋巴细胞的表型检测: 共培养前和培养 7 d 后取淋巴

细胞适量, 将细胞稀释至合适浓度, 加入 CD3, CD4, CD8 单克隆抗体避光孵育 15 min, 加入 1 mL PBS 洗去未结合抗体, $1\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 流式细胞仪上机检测。

8 DC 疫苗激活的 T 细胞对乳腺癌细胞的杀伤活性

8.1 体外 T 细胞的分离与培养 脐血单个核细胞贴壁培养 2 h 后, 分离未贴壁细胞, 用含 5% 自体血浆、单克隆抗体 CD3 (GMP Monoclonal Anti-Human CD3 Antibody, OKT3, $100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 IL-2 ($2\,000\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 X-VIVO15 培养基重悬细胞后, 以 1×10^6 个细胞 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种到培养瓶中, 每隔 2 d 补充含有 IL-2 的新鲜培养基。得到的 DC 疫苗与 T 淋巴细胞共培养, 设置 DC 疫苗:T 细胞 = 1:10 的效靶比, 培养条件为 X-VIVO15 + 5% 自体血浆 + $200\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ IL-2 + 1% P/S, 置入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱共培养 7 d, 即得到细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL)。负载 MDA-MB-231, MDA-MB-453 肿瘤裂解物抗原 DC 与 T 细胞共培养得到的细胞分别记为 231DC-CTL 和 453DC-CTL, 未负载抗原的 DC 与 T 细胞共培养得到的细胞记为 mDC-CTL, 同时设置空白 T 细胞培养组。

8.2 LDH 法检测杀伤活性 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 乳腺癌细胞铺板, 每孔铺肿瘤细胞 1×10^4 个, 设置效靶比为 5:1, 10:1, 20:1, 40:1, 终体积为 $100\text{ }\mu\text{L}$, 按照不同效靶比加入 CTL, 同时设置空白肿瘤细胞组、空白效应细胞组和空白培养基组, 每组 3 个复孔, 共孵育 24 h, 孵育结束后用 LDH 检测试剂盒检测效应细胞杀伤能力, 使用 BioTek 酶标仪检测 OD 值。计算杀伤活性:

$$\text{CTL 杀伤活性}/\% = \frac{(A_{\text{效靶比组}} - A_{\text{肿瘤细胞自然释放组}} - A_{\text{效应细胞自然释放组}} + A_{\text{背景孔}}) / (A_{\text{肿瘤细胞最大裂解组}} - A_{\text{肿瘤细胞自然释放组}}) \times 100\%}{1}$$

9 统计学分析

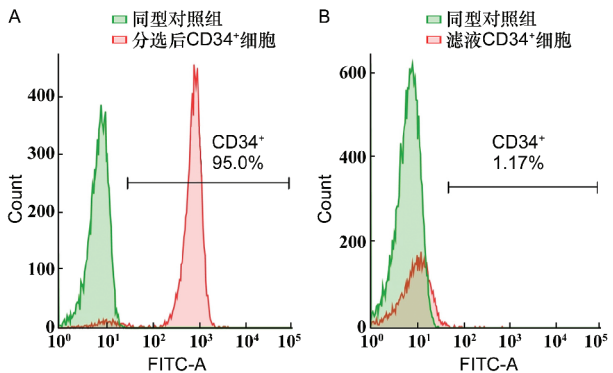
使用 GraphPad Prism 9.5 软件对实验数据进行统计分析。以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料, 两组间比较采用非配对 t 检验进行统计分析, 多组间比较采用 one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1 脐血 CD34⁺ 造血干细胞的磁珠分选纯化效率

采用 Ficoll 密度梯度离心法分离得到 5×10^7 个脐血单个核细胞, 经过磁性细胞分选 (magnetic activated cell sorting, MACS) 纯化后得到 6×10^5 个 CD34⁺ 造血干细胞。流式细胞术检测分析显示分选后

CD34⁺细胞纯度在 90% 以上,阴性滤液中 CD34⁺细胞比例为 1.17%,结果见图 1。



A:脐血单个核细胞经 MACS 分选后 CD34⁺ 细胞纯度;B:脐血单个核细胞经 MACS 分选后阴性滤液中 CD34⁺ 细胞含量
图 1 MASC 分选后人脐血造血干细胞的 FCM 结果

2 DC 前体细胞体外扩增培养方案优化

在大约为期 30 d 的培养周期内,伴随造血干细

胞的扩增,可收获 7~9 批 DC。A 组:IMDM 培养基 + GM-CSF (100 ng·mL⁻¹) + SCF (50 ng·mL⁻¹) + Flt-3L(100 ng·mL⁻¹) + TPO(100 ng·mL⁻¹) + 10% FBS + 1% P/S 条件培养组与 B 组:IMDM 培养基 + GM-CSF (100 ng·mL⁻¹) + SCF (50 ng·mL⁻¹) + 10% FBS + 1% P/S 条件培养组相比,前者得到的 DC 前体细胞数量更多,相较于 d 0 总细胞数平均扩增了 13 050 倍,并且相应获得的 DC 细胞数量更多,A 组至 d 30 收获 DC 细胞数量 1.49 × 10⁹ 个;B 组相较于 d 0 总细胞数平均扩增了 3 775 倍,至 d 30 收获 DC 细胞数量 5.2 × 10⁸ 个。收集每批培养了 5 d 的未成熟 DC (immature DC, imDC) 进行流式细胞术检测,表型检测结果显示两组培养条件下,获得的 imDC 表面表达 CD80,CD83,CD86,HLA-DR,CD14,CD11c 的水平没有显著差异 (P>0.05),见表 1。并且两组 DC 前体细胞经诱导培养后均可得到纯度高、质量表型均一的成熟 DC,流式表型图见图 2。

表 1 DC 前体细胞和两组扩增培养基得到的 imDC 表型 % , $\bar{x} \pm s, n = 7$

分组	CD80	CD86	CD83	HLA-DR	CD14	CD11c
A 组	51.70 ± 9.12	58.83 ± 10.63	22.06 ± 8.08	87.36 ± 1.69	7.53 ± 3.83	85.77 ± 5.33
B 组	46.13 ± 5.24	51.59 ± 8.57	18.34 ± 10.79	79.99 ± 4.4	6.70 ± 3.55	87.84 ± 4.99
DC 前体细胞	13.64 ± 1.83	22.88 ± 2.16	4.63 ± 1.65	51.96 ± 1.80	67.88 ± 2.37	40.98 ± 2.36

A 组和 B 组相比,DC 培养 5 d 后得到的表面标记物表达情况无显著差异 (P>0.05)

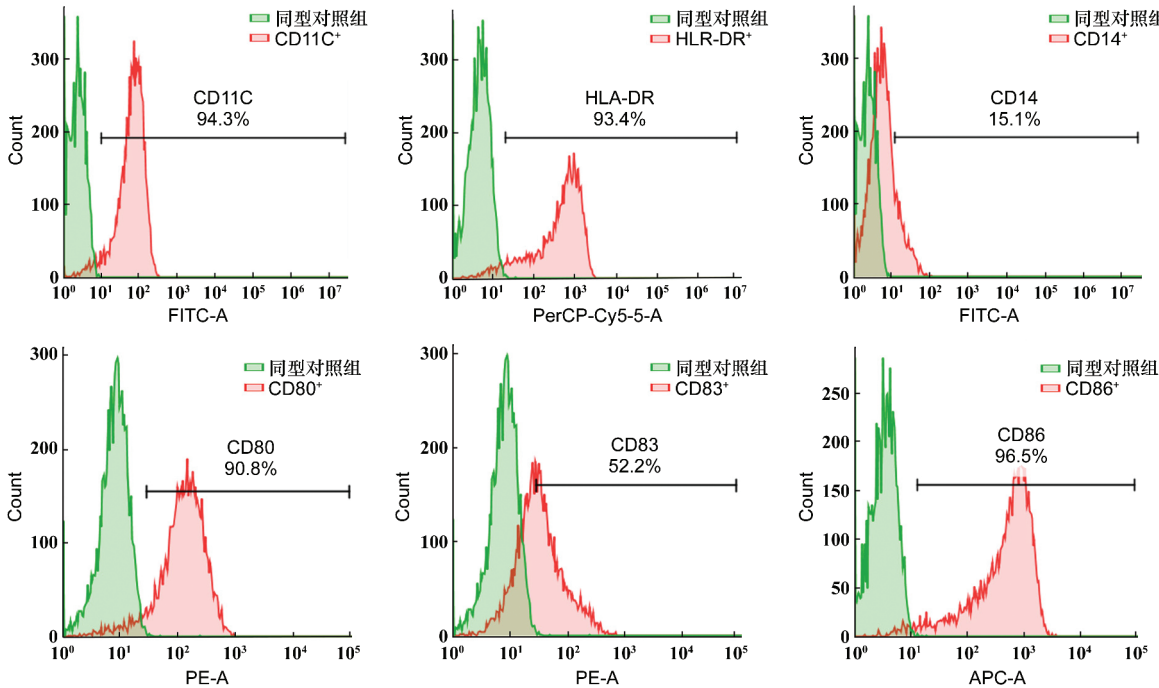


图 2 CD34⁺ 细胞来源 mDC 的特异性表面标记物表达



3 不同 DC 诱导培养方案表型 FCM 检测

在 DC 诱导培养阶段,在不同时间加入细胞因子,各组细胞数量无差异,但对于 DC 细胞表型有一定影响。比较各组细胞表型,由表 2 可知,相较于 DC 前体细胞,各组 CD14 均低表达,HLA-DR 和 CD11c 均高表达,说明 DC 前体细胞已成功分化为成熟 DC。接下来,本研究比较不同时间点加入 IL-4 和 TNF-α 对诱导成熟的 DC 细胞表型影响,从结果可知,相较于其他组,48 h 加入 TNF-α 所获得的 DC 细胞表型优于其他组,即第 3 组:培养条件X-VIVO15 + GM-CSF (100 ng·mL⁻¹) + IL-4 (50 ng·mL⁻¹,0 h) + TNF-α (50 ng·mL⁻¹,48 h) 和第 7 组:培养条件

X-VIVO15 + GM-CSF (100 ng·mL⁻¹) + IL-4 (50 ng·mL⁻¹,48 h) + TNF-α (50 ng·mL⁻¹,48 h) 细胞表型较好。其中,第 3 组 CD80 的表达较第 4 组、第 5 组和第 9 组的表达具有显著性差异($P<0.05$);第 7 组 CD80 的表达较第 4 组、第 5 组和第 9 组的表达具有非常显著性差异($P<0.01$);第 3 组 CD86 表达较第 5 组具有显著性差异($P<0.05$);第 3 组 CD83 的表达较第 4 组和第 9 组的表达具有显著性差异($P<0.05$);第 7 组 CD83 的表达较第 5 组和第 9 组的表达具有非常显著性差异($P<0.01$)。而何时(0 或 48 h)加入 IL-4 对第 48 h 加入 TNF-α 所获得的 DC 细胞表型无影响。

表 2 不同时间加入 TNF-α 和 IL-4 诱导培养 5 d 的 DCs 的表型 % , $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

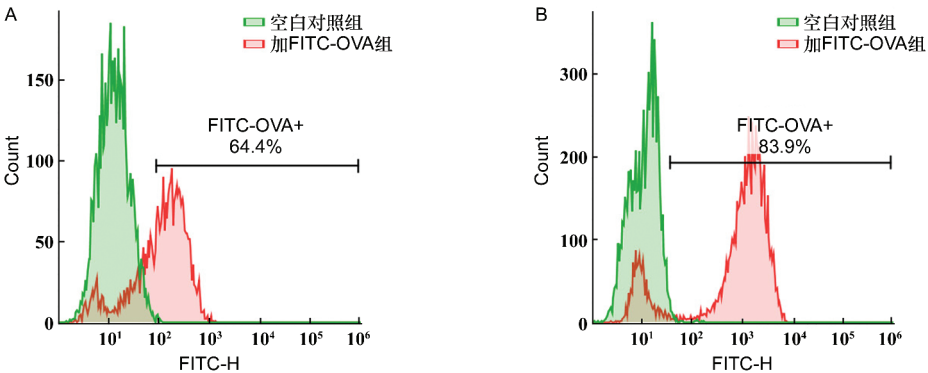
诱导方案	DC 诱导因子	CD80 PE	CD86 APC	CD83 PE	HLA-DR PerCP	CD14 FITC	CD11c FITC
1	0 h 加入 IL-4 0 h 加入 TNF-α	55.63 ± 5.01	94.62 ± 2.45	32.53 ± 1.98	96.06 ± 0.53	0.43 ± 0.19	88.13 ± 9.85
2	0 h 加入 IL-4 24 h 加入 TNF-α	51.39 ± 7.51	93.75 ± 4.68	38.70 ± 3.05	93.06 ± 6.78	0.37 ± 0.09	94.85 ± 2.25
3	0 h 加入 IL-4 48 h 加入 TNF-α	58.74 ± 6.73	93.73 ± 5.41	40.38 ± 7.91	90.93 ± 6.58	0.71 ± 0.18	85.81 ± 5.49
4	0 h 加入 IL-4 72 h 加入 TNF-α	37.87 ± 0.88 ^{ab}	93.45 ± 5.41	18.31 ± 3.56 ^a	94.6 ± 4.40	0.41 ± 0.10	90.25 ± 0.14
5	48 h 加入 IL-4 0 h 加入 TNF-α	31.34 ± 5.25 ^{ab}	77.61 ± 4.34 ^a	21.14 ± 6.16 ^b	88.46 ± 4.83	1.34 ± 0.68	87.67 ± 2.04
6	48 h 加入 IL-4 24 h 加入 TNF-α	50.21 ± 4.35	83.04 ± 5.02	32.73 ± 7.83	95.07 ± 0.75	2.87 ± 3.35	91.65 ± 3.25
7	48 h 加入 IL-4 48 h 加入 TNF-α	57.43 ± 1.76	89.53 ± 4.25	53.59 ± 8.82	85.27 ± 0.74	1.51 ± 1.62	90.89 ± 1.71
8	48 h 加入 IL-4 72 h 加入 TNF-α	50.87 ± 1.79	84.13 ± 11.83	42.86 ± 15.82	87.58 ± 4.12	1.00 ± 0.92	84.63 ± 10.59
9	0 h 加入 IL-4 -TNF-α	28.47 ± 5.62 ^{ab}	78.72 ± 10.67	14.32 ± 3.15 ^{ab}	90.37 ± 4.34	3.28 ± 2.46	88.05 ± 5.83

与第 3 组比较,a: $P<0.05$;与第 7 组比较,b: $P<0.01$

4 DC 细胞抗原吞噬活性

抗原吞噬实验结果显示,DC 的抗原吞噬能力在诱导培养 d 3 达到最高峰,而后逐渐下降(见图 3)。

因此,后期 DC 疫苗负载抗原时间确定为 DC 诱导培养 d 3。



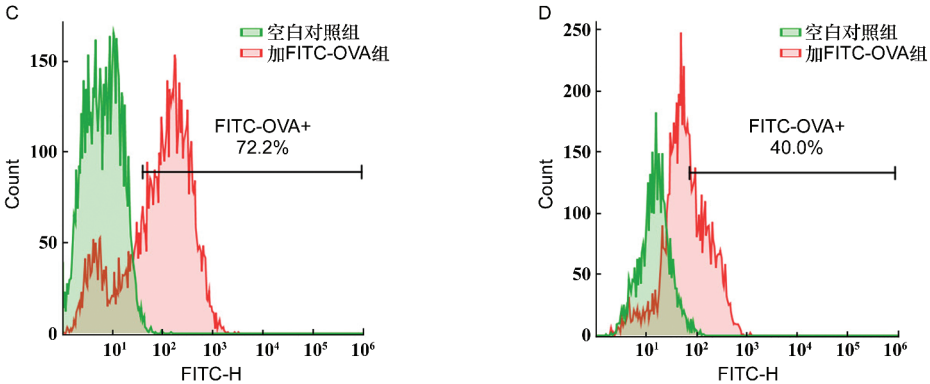


图3 d 1,d 3,d 5,d 7 时 DC 的 FITC-OVA 抗原吞噬指数

5 DC 疫苗刺激淋巴细胞增殖活性

CCK8 法检测刺激淋巴细胞增殖实验结果显示负载 MDA-MB-231 乳腺癌肿瘤细胞裂解物抗原的 DC 疫苗 (231mDC) 促进 CB-MNC 增殖能力明显, DC: CB-MNC = 1: 5 时刺激指数最高, 并且随着 DC 细胞数量减少, 促进增殖能力逐渐减弱, 见图 4。对 DC: CB-MNC = 1: 5 组共培养前后的 CB-MNC 进行流式细胞术检测, 发现共培养后 CD3⁺ 细胞比例显著上升 ($P < 0.05$), 显著增殖的 T 细胞亚群为 CD3⁺, CD4⁺ 亚群 ($P < 0.01$), 见表 3。

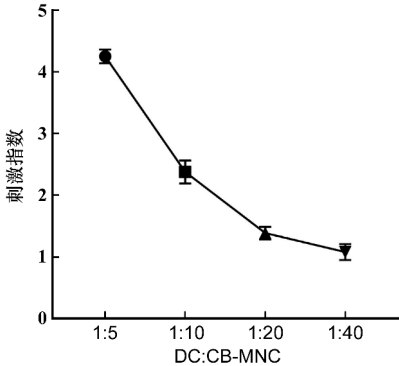


图4 DC 疫苗对 CB-MNC 的促增殖活性

表3 DC 和 CB-MNC 共培养前后淋巴细胞的表型变化 % , $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

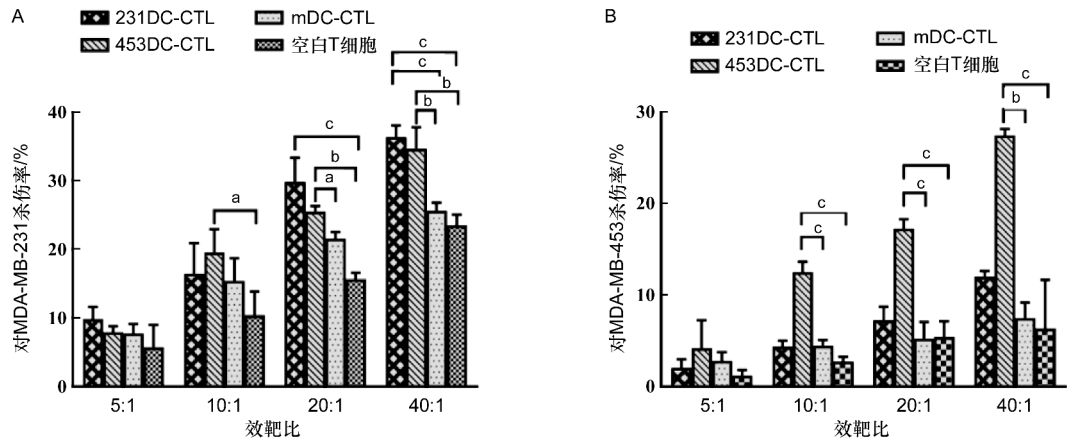
组别	d 0 表型			d 7 表型		
	CD3 ⁺	CD3 ⁺ , CD4 ⁺	CD3 ⁺ , CD8 ⁺	CD3 ⁺	CD3 ⁺ , CD4 ⁺	CD3 ⁺ , CD8 ⁺
共培养组	51.1 ± 4.54	20.61 ± 5.75	22.50 ± 10.08	79.7 ± 4.68 ^a	51.27 ± 7.04 ^b	22.93 ± 5.41
空白 CB-MNC 组	—	—	—	44.53 ± 11.56	18.17 ± 6.97	17.53 ± 4.80

与空白 CB-MNC 组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

6 DC 疫苗抗乳腺癌活性

在 DC 诱导培养 d 3 分别负载 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 乳腺癌肿瘤细胞裂解物抗原, 加入促成熟因子得到的 DC 疫苗与同种异体 T 细胞进行共培养得到抗原特异性 CTL。LDH 杀伤实验结果见图 5, 对于 MDA-MB-231 肿瘤细胞, 在 10: 1 的效靶比下, 与空白 T 细胞组相比, 453DC-CTL 具有显著杀伤活性 ($P < 0.05$); 在 20: 1 效靶比下, 与 mDC-CTL 和空白 T 细胞组相比, 231DC-CTL 和 453DC-CTL 均

具有显著的杀伤活性 ($P < 0.01$); 在 40: 1 效靶比下, 与未负载抗原 mDC-CTL 和空白 T 细胞组相比, 231DC-CTL 显示出极其显著的杀伤活性 ($P < 0.001$), 453DC-CTL 也显示出显著的杀伤活性 ($P < 0.01$); 对于 MDA-MB-453 乳腺癌肿瘤细胞, 只有 453DC-CTL 在效靶比 10: 1, 20: 1 和 40: 1 的条件下, 与未负载抗原 mDC-CTL 以及空白 T 细胞组相比, 具有显著的杀伤活性 ($P < 0.001$)。



A:负载 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 肿瘤细胞裂解物抗原的 DC 疫苗、空白成熟 DC 激活的 CTL 和空白 T 细胞对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的杀伤率; B: 负载 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 肿瘤细胞裂解物抗原的 DC 疫苗、空白成熟 DC 激活的 CTL 和空白 T 细胞对 MDA-MB-453 乳腺癌细胞的杀伤率;不同细胞组相比,a; $P < 0.05$,b; $P < 0.01$,c; $P < 0.001$

图 5 负载乳腺癌肿瘤细胞裂解物抗原的 DC 疫苗激活的 T 细胞对不同乳腺癌细胞系的杀伤活性

讨 论

DC 细胞疫苗实际上早已在动物实验和早期的临床试验中取得了很多重大突破。但 Dendreon 公司开发的前列腺癌疫苗 Provenge 是目前唯一成功上市的肿瘤治疗疫苗^[10-13]。Provenge 虽然有疫苗的称号,却跟一般的疫苗不一样,需要使用患者自身的免疫细胞制造,所以其实是一种自体细胞免疫疗法,然而自体来源的 DC 细胞与非自体来源 DC 细胞相比功能存在一定的差异。DC 细胞的供体往往是肿瘤患者,由于体内复杂环境的影响,DC 细胞的功能数量受到不同程度地抑制,导致 DC 疫苗的抗癌效应下降。DC 细胞可由外周血、骨髓和脐血的造血祖细胞发育而来。脐血中的造血祖细胞数量远高于外周血,和骨髓不相上下,并具有更强的增殖能力,且来源丰富,易于收集,是 DC 细胞的理想来源。将脐血造血干细胞诱导分化的 DC 细胞负载肿瘤相关抗原后,可实现 DC 细胞疫苗的现货供应,患者无须等待,以免延误病情。

由于实验室培养条件以及前体细胞来源不同,所使用细胞因子用量、应用顺序对 DC 细胞发育和表型的影响也不尽相同。因此,本研究希望在优化基础细胞因子添加剂量和顺序的基础上,培育出脐血造血干细胞来源的拥有最佳功能活性的 DC 细胞。GM-CSF 调控 CD34⁺造血干细胞向粒细胞单核细胞集落分化,是维持 DC 细胞分化和功能的最基

本的细胞因子;IL-4 可抑制单核巨噬细胞的产生,下调单核细胞表达 CD14;TNF- α 可促进 DC 细胞成熟,使其具有极强刺激初始型 T 细胞的活性。本研究在确定应用此 3 种因子进行 DC 细胞诱导分化培养的基础上^[14-15],通过控制 IL-4 和 TNF- α 不同的加入时间,比较不同条件下获得的 DC 表型,明确了不同细胞因子加入时间对 DC 表型的影响。研究结果表明,在 48 h 加入 TNF- α 所获得的 DC 细胞表达 CD80,CD86 和 CD83 水平显著高于其他培养条件,所获得的 DC 细胞具有最优的纯度和刺激 T 细胞能力。

在确定了最优的培养方案后,本研究通过将未成熟的 DC 细胞与 FITC-OVA 共孵育确定了最佳的抗原负载时机,负载了乳腺癌肿瘤细胞裂解物抗原的 DC 细胞对脐血源单个核细胞具有显著的刺激增殖活性,并特异性激活 CD3⁺,CD4⁺ T 细胞亚群。最后,本研究还考察了经 DC 细胞活化的 T 细胞对不同乳腺癌细胞系的杀伤活性,在较高靶比下,负载 MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 乳腺癌肿瘤细胞裂解物抗原的 DC 细胞激活的 T 细胞与未激活的 T 细胞和未负载抗原的 DC 细胞激活的 T 细胞相比,对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系均具有显著的杀伤活性。但对于 MDA-MB-453 乳腺癌细胞系,只有负载 MDA-MB-453 乳腺癌肿瘤细胞裂解物抗原的 DC 细胞激活的 T 细胞对其有显著的杀伤活性。综上所述,通过培养条件的摸索和方案的进一步优化,本研

究能够从脐血中获得足量功能性强的 DC 细胞,为乳腺癌 DC 细胞疫苗的研究奠定了坚实的研究基础。

[参 考 文 献]

- [1] LOIBL S, POORTMANS P, MORROW M, *et al.* Breast cancer [J]. *Lancet*, 2021, 397(10286): 1750 – 1769.
- [2] SALEMME V, CENTONZE G, CAVALLO F, *et al.* The crosstalk between tumor cells and the immune microenvironment in breast cancer: implications for immunotherapy[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 610303.
- [3] TRIULZI T, FORTE L, REGONDI V, *et al.* HER2 signaling regulates the tumor immune microenvironment and trastuzumab efficacy[J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(1): e1512942.
- [4] GRIGUOLO G, SERNA G, PASCUAL T, *et al.* Immune microenvironment characterisation and dynamics during anti-HER2-based neoadjuvant treatment in HER2-positive breast cancer[J]. *NPJ Precis Oncol*, 2021, 5(1): 23.
- [5] IWASAKI A, MEDZHITOV R. Control of adaptive immunity by the innate immune system[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(4): 343 – 353.
- [6] DEL PRETE A, SALVI V, SORIANI A, *et al.* Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing[J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20(5): 432 – 447.
- [7] LIU J, ZHANG XM, CHENG YJ, *et al.* Dendritic cell migration in inflammation and immunity[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(11): 2461 – 2471.
- [8] MARZAIOLI V, CANAVAN M, FLOUDAS A, *et al.* Monocyte-derived dendritic cell differentiation in inflammatory arthritis is regulated by the JAK/STAT axis *via* NADPH oxidase regulation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1406.
- [9] TANG-HUAU TL, GUEGUEN P, GOUDOT C, *et al.* Human *in vivo*-generated monocyte-derived dendritic cells and macrophages cross-present antigens through a vacuolar pathway[J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 2570.
- [10] SMALL EJ, FRATESI P, REESE DM, *et al.* Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells[J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(23): 3894 – 3903.
- [11] BURCH PA, CROGHAN GA, GASTINEAU DA, *et al.* Immunotherapy (APC8015, Provenge) targeting prostatic acid phosphatase can induce durable remission of metastatic androgen-independent prostate cancer: a phase 2 trial[J]. *Prostate*, 2004, 60(3): 197 – 204.
- [12] BURCH PA, BREEN JK, BUCKNER JC, *et al.* Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(6): 2175 – 2182.
- [13] SMALL EJ, SCHELLHAMMER PF, HIGANO CS, *et al.* Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(19): 3089 – 3094.
- [14] HART DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response[J]. *Blood*, 1997, 90(9): 3245 – 3287.
- [15] BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity[J]. *Nature*, 1998, 392(6673): 245 – 252.

编辑:刘卓越/接受日期:2024-09-14