

· 药理与临床 ·

# 当归多糖促进慢性粒细胞白血病细胞性树突状细胞的诱导生成

陈国安<sup>1</sup>, 肖希斌<sup>1</sup>, 袁利亚<sup>2</sup>, 戎吉平<sup>2\*</sup>

(1 江西医学院第一附属医院 血液科, 江西 南昌 330006 2 江西省医学科学研究所 血液研究室, 江西 南昌 330006)

**摘要:** 目的 探讨当归多糖 (APS) 对慢性粒细胞白血病细胞诱导生成树突状细胞 (DCs) 的影响。方法 取慢性粒细胞白血病 (CML) 患者骨髓单个核细胞, 分别予粒-巨噬集落刺激因子 (GM-CSF) 白介素-4 (IL-4) 培养或 GM-CSF/IL-4 联合各浓度 APS (50、100、200 mg/L) 培养, 普通光镜和电镜观察细胞形态, 台盼蓝拒染法检测细胞成活率, 流式细胞仪检测 DCs 的免疫表型 (CD80、CD86、CD83), 自体或异体混合淋巴细胞反应检测 DCs 刺激 T 淋巴细胞的增殖能力。结果 GM-CSF/IL-4 或 GM-CSF/IL-4/APS 诱导培养的慢性粒细胞白血病骨髓单个核细胞均表现出典型的树突状形态而且表达高水平的免疫表型。GM-CSF/IL-4/APS 培养的 DCs 的细胞成活率和增殖能力显著提高, CD83、CD80、CD86 表达显著升高, APS 组慢性粒细胞白血病细胞诱导的树突状细胞 (CML-DCs) 刺激 T 淋巴细胞的增殖能力更强。结论 GM-CSF/IL-4/APS 培养的 DCs 的 CD83、CD80、CD86 表达率明显高于 GM-CSF/IL-4 组。GM-CSF/IL-4/APS 诱生的 CML-DCs 刺激 T 淋巴细胞增殖能力强于 GM-CSF/IL-4 组。APS 能促进 IL-4 和 GM-CSF 对 CML-DCs 的诱导与成熟。

**关键词:** 当归多糖; 慢性粒细胞白血病; 树突状细胞; T 淋巴细胞

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)05-0531-05

## Promotion of *Angelica* polysaccharide on inducing chronic myelocytic leukemia cells into dendritic cells

CHEN Guo-an<sup>1</sup>, XIAO Xi-bin<sup>1</sup>, YUAN Li-ya<sup>2</sup>, RONG Ji-ping<sup>2</sup>

(1 Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Jiangxi Medical University, Nanchang 330006 China)

(2 Department of Experimental Hematology, Jiangxi Institute of Medical Science, Nanchang 330006 China)

**Abstract** **Object** To investigate the effect of *Angelica* polysaccharide (APS) on the induction of chronic myelocytic leukemia cells into chronic myelocytic leukemia dendritic cells (CML-DCs). **Methods** Bone marrow monocytes from CML patients were cultured in GM-CSF/IL-4 or in GM-CSF/IL-4 combined with APS in each concentration (50, 100, 200 mg/L), respectively. The morphotype of CML-DCs was identified by optical microscope or electron microscope, CML-DCs viability was calculated by Trypan Blue exclusion. The phenotype of CML-DCs (CD80, CD86, and CD83) was identified by flow cytometry. The capability of stimulating auto-lymphocyte or allo-lymphocyte proliferation was tested with mixed leukocyte reaction (MLR). **Results** Bone marrow monocytes from CML patients, which were cultured in GM-CSF/IL-4 or in GM-CSF/IL-4/APS showed typical morphotype and expressed the high level phenotype of CML-DCs. The capability of proliferation and the survival rate of CML-DCs were enhanced markedly and the expression of CD83, CD80, and CD86 on CML-DCs were significantly increased when CML-DCs were cultured in GM-CSF/IL-4/APS. The capability of stimulating lymphocyte proliferation was more competent in 100 mg/L APS group. **Conclusion** The expression of CD83, CD80, and CD86 on CML-DCs cultured in GM-CSF/IL-4/APS is significantly higher than those in GM-CSF/IL-4. The capability of CML-DCs of stimulating lymphocyte proliferation is more potential in GM-CSF/IL-4/APS than in GM-CSF/IL-4. APS can promote the induction and mature of CML-DCs cultured in IL-4 and GM-CSF.

**Key words** *Angelica* polysaccharide (APS); chronic myelocytic leukemia (CML); dendritic cells (DCs); T-lymphocyte

树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 是启动 T 细胞初始免疫反应最重要的抗原呈递细胞, 近年来

\* 收稿日期: 2003-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39960028)

作者简介: 陈国安 (1955-), 男, 江西省人, 江西医学院第一附属医院主任医师、研究员, 主要从事血液细胞生物学研究

已成为肿瘤免疫治疗研究的新热点。DCs 的诱生大多数来源于造血祖细胞和外周血单核细胞,但近年来也有从白血病细胞诱导分化生成 DCs 的研究<sup>[1]</sup>。笔者用慢性粒细胞白血病 (CML) 患者的骨髓,经多种细胞因子联合诱导,成功地诱导培养出 DCs<sup>[2]</sup>。这些 CML 性树突状细胞已经证明来自于白血病细胞克隆,并具有激活 T 淋巴细胞的功能<sup>[3,4]</sup>。但 CML 细胞诱导的 DCs (CML-DCs) 与来自正常骨髓细胞诱导的 DCs 相比,其抗原共刺激分子表达较低,提示其激活 T 细胞的作用受限<sup>[4]</sup>。因此,有必要进一步探索提高诱生 CML-DCs 效果的方法。

当归多糖 (Angelica polysaccharide APS) 是从中药当归中提取出来的。APS 能促进血细胞生成,提高机体的免疫力,APS 在体外不仅能够抑制 K 562 细胞的增殖,而且能够诱导 K 562 细胞向红系和粒系分化<sup>[5]</sup>。另外,APS 可诱导细胞因子如白介素-2 (IL-2)、 $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 的生成。因此,本实验在以往采用粒-巨噬集落刺激因子 (GM-CSF) 白介素-4 (IL-4) 诱导 CML-DCs 方案的基础上,同时加入 APS,观察其对 CML-DCs 诱生的影响。

## 1 材料

1.1 药品: APS (含量 > 99%), 由上海中医药大学中药标准化研究中心提供。真空干燥的 APS 用 MDM 细胞培养基配成所需浓度的工作液 (1 g/L), 滤过除菌。

1.2 主要试剂: 淋巴细胞分离液 (Ficoll-Paque) 购于中国医学科学院血液学研究所, GM-CSF、IL-4 和丝裂霉素 C 均购于 Sigma 公司, MDM 细胞培养基和胎牛血清购于 Gibco 公司, 抗 CD80-FITC、抗 CD83-FITC 和 CD86-FITC 单克隆抗体购于 BD 公司, 噻唑蓝 (MTT) 购于 Amresco 公司。

1.3 主要仪器: 洁净工作台和恒温 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (Thermo Forma 公司), 低温低速离心机 (Backman 公司), 倒置光学显微镜 (Olympus 公司), 流式细胞仪 (FACS Calibur 美国 BD 公司), MBH 型酶标仪 (北京 Binta 公司)。

1.4 CML 细胞: 取自江西医学院第一附属医院血液科住院的 16 例 CML 初治期患者, 其中男性 9 例, 女性 7 例, 平均年龄 46.5 岁, 所有患者 Ph 染色体和 bcr/abl 融合基因检测均为阳性。

## 2 方法

2.1 CML-DCs 的生成: 取 CML 初期患者肝素抗凝骨髓细胞, 用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离 CML 患者骨髓单个核细胞 (白血病幼稚细胞占

大多数, 平均百分比为 92.4%, 范围为 76%~98%), 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 悬浮于 MDM 培养液中, 调整细胞浓度为  $\times 10^7$  /L, 置入 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 完全培养液包括青霉素 (100 IU/mL), 链霉素 (100  $\mu$ g/mL), 10% 胎牛血清和 GM-CSF ( $\times 10^6$  U/L) /IL-4 ( $\times 10^6$  U/L) 或 GM-CSF/IL-4 联合不同浓度的 APS (50 100 200 mg/L)。置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱体外孵育, 每周半量换液 2 次, 补充新鲜培养基及相应的细胞因子。7~10 d 后, 收集细胞进行以下实验。

2.2 细胞计数和细胞存活率检测: 骨髓单个核细胞培养体系中加入 GM-CSF/IL-4 为 GM-CSF/IL-4 组; 加入 GM-CSF/IL-4/APS (50 100 200 mg/L) 为 GM-CSF/IL-4/APS 各组; 未加任何细胞因子和 APS 为对照组。倒置光学显微镜下动态观察细胞的生长情况, 分别在培养第 0 1 3 5 7 10 天取样, 在血细胞计数器上计细胞数, 并用台盼蓝拒染法计算细胞存活率。

2.3 电镜检测: DCs 在上述条件下生成, 并于第 10 天收集。PBS 洗涤, 塑料培养板上用 2.5% 戊二醛直接固定 30 min, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 漂洗 18 h, 1% OsO<sub>4</sub> 在 4℃ 下固定 1 h, 用系列浓度的乙醇脱水, 环氧丙烷浸透, 环氧树脂-812 包埋, 切片, 醋酸双氧铀和枸橼酸铅双染色, JEM-100CX 透射电镜 (Nihon Densi 日本) 观察形态。

2.4 CML-DCs 的免疫表型分析: 细胞悬液中加入抗 CD80-FITC、抗 CD83-FITC 和抗 CD86-FITC 单克隆抗体, 分别标记培养前及培养不同时间后的细胞, 流式细胞仪分析细胞免疫表型, Cellquest 软件 (Becton Dickinson) 分析数据。

2.5 自体 and 异体混合淋巴细胞反应: 取健康人和治疗后达完全缓解的 CML 患者的外周血, 用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离单个核细胞, 置入 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 37℃ 孵育 2 h, 收集非吸附细胞即 T 淋巴细胞。收集培养生成的 CML-DCs 细胞, MDM 培养液洗涤 3 次, 加入含终浓度 25  $\mu$ g/mL 丝裂霉素 C 的 MDM 培养基, 37℃ 孵育 45 min。培养生成的 CML-DCs 细胞 (刺激细胞) 和自体或异体 T 淋巴细胞 (反应细胞), 以不同比例 (1: 200 3: 200 1: 20) 共同接种在 96 孔板中 (每孔中含  $\times 10^5$  自体或异体 T 淋巴细胞), 在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 96 h, 在培养终止前 4 h, 每孔加入 0.5 mg/mL MTT 20  $\mu$ L, 培养结束后每孔加入二甲亚砜 (DMSO) 100  $\mu$ L, 用酶标仪于 560 nm 波长

检测吸光度 (A) 值

2.6 统计学分析: 实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 单变量两组资料均数间比较用 *t* 检验, 多个样本均数间两两比较用 *q* 检验

3 结果

3.1 CM L-DC s 的生成: 刚分离的骨髓单个核细胞分散不集中, 细胞呈球形, 且表面光滑。经 GM -CSF /IL-4 联合诱导培养 10 d 后的骨髓单个核细胞, 部分出现了细胞体积增大, 并伸出突起。随培养时间延长, 树突样的 CM L-DC s 比例增多, 但总细胞数量减少, 大部分细胞死亡。而加入 APS 培养的细胞, 培养次日即出现了呈树枝状突起的细胞, 到培养

3~ 5 d 时出现 CM L-DC s 形态细胞比例明显增加, 且细胞生长状态比未加 APS 好, 细胞总数亦增多。培养 10 d 时细胞总数也未减少。透射电镜下见 CM L-DC s 胞膜伸出大量树枝状突起, 胞浆内含大量空泡, 细胞核染色较深且偏于一侧, 形态不规则。

3.2 细胞计数和细胞存活率: 取不同培养时间的细胞, 细胞计数和成活率检测结果见表 1 和 2。当 APS 浓度为 100 mg/L 时, 细胞的增殖和成活率为最好, 最佳时间是培养 3~ 5 d。在培养后第 10 天, GM -CSF /IL-4/APS (100 mg/L) 组细胞数是 GM -CSF /IL-4 组的 10 倍 ( $1.83 \times 10^9/L$  vs  $1.8 \times 10^8/L$ ,  $P < 0.01$ ), 前者细胞存活率是后者的 2 倍 ( $P < 0.05$ ),

表 1 APS 对培养细胞数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=16$ )

Table 1 Effect of APS on number of cultured cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=16$ )

| 组 别             | APS<br>/(mg·L <sup>-1</sup> ) | 细胞数/( $\times 10^9$ ·L <sup>-1</sup> ) |                      |                             |                             |                             |                             |
|-----------------|-------------------------------|----------------------------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                 |                               | 0 d                                    | 1 d                  | 3 d                         | 5 d                         | 7 d                         | 10 d                        |
| 对照              | 0                             | 1.00 ± 0.79                            | 0.13                 | 0.73 ± 0.16                 | 0.66 ± 0.08                 | 0.38 ± 0.06                 | 0.10 ± 0.02                 |
| GM-CSF/IL-4     | 0                             | 1.00 ± 1.10                            | 0.12                 | 0.93 ± 0.10                 | 0.82 ± 0.09                 | 0.43 ± 0.08                 | 0.18 ± 0.03                 |
| GM-CSF/IL-4/APS | 50                            | 1.00 ± 1.01                            | 0.13 <sup>△</sup>    | 1.08 ± 0.12 <sup>△</sup>    | 0.80 ± 0.09 <sup>△</sup>    | 1.02 ± 0.11 <sup>△</sup>    | 0.83 ± 0.14 <sup>△</sup>    |
|                 | 100                           | 1.00 ± 1.02                            | 0.15 <sup>*△△▲</sup> | 1.53 ± 0.16 <sup>*△△▲</sup> | 2.02 ± 0.18 <sup>*△△▲</sup> | 1.91 ± 0.19 <sup>*△△▲</sup> | 1.83 ± 0.13 <sup>*△△▲</sup> |
|                 | 200                           | 1.00 ± 0.89                            | 0.11 <sup>△</sup>    | 1.02 ± 0.12 <sup>△</sup>    | 1.12 ± 0.17 <sup>△</sup>    | 1.23 ± 0.15 <sup>△</sup>    | 1.45 ± 0.11 <sup>△</sup>    |

与对照组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  与 GM-CSF/IL-4 组比较: <sup>△</sup>  $P < 0.05$  <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  与 GM-CSF/IL-4/APS (50 200 mg/L) 组比较: <sup>▲</sup>  $P < 0.05$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs control group <sup>△</sup>  $P < 0.05$  <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  vs GM-CSF/IL-4 group <sup>▲</sup>  $P < 0.05$  vs GM-CSF/IL-4/APS (50 200 mg/L) groups

表 2 APS 对培养细胞成活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=16$ )

Table 2 Effect of APS on viability of cultured cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=16$ )

| 组 别             | APS<br>/(mg·L <sup>-1</sup> ) | 细胞成活率/% |                        |                        |                        |                         |                         |
|-----------------|-------------------------------|---------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                 |                               | 0 d     | 1 d                    | 3 d                    | 5 d                    | 7 d                     | 10 d                    |
| 对照              | 0                             | 100     | 86 ± 11                | 50 ± 7                 | 30 ± 7                 | 16 ± 4                  | 9 ± 3                   |
| GM-CSF/IL-4     | 0                             | 100     | 95 ± 5                 | 82 ± 10                | 62 ± 11 <sup>*</sup>   | 45 ± 8                  | 35 ± 8                  |
| GM-CSF/IL-4/APS | 50                            | 100     | 90 ± 8 <sup>△</sup>    | 90 ± 10 <sup>△</sup>   | 83 ± 10 <sup>△</sup>   | 70 ± 11 <sup>△</sup>    | 60 ± 11 <sup>△</sup>    |
|                 | 100                           | 100     | 96 ± 4 <sup>*△△▲</sup> | 94 ± 6 <sup>*△△▲</sup> | 90 ± 8 <sup>*△△▲</sup> | 89 ± 10 <sup>*△△▲</sup> | 87 ± 12 <sup>*△△▲</sup> |
|                 | 200                           | 100     | 94 ± 5 <sup>△</sup>    | 76 ± 13 <sup>△</sup>   | 86 ± 11 <sup>△</sup>   | 78 ± 12 <sup>△</sup>    | 63 ± 13 <sup>△</sup>    |

表注同表 1

Notes are same to Table 1

3.3 CM L-DC s 的免疫表型: 动态观察中发现加入 100 mg/L APS 时, 细胞增殖和成活率达到最佳, 因此, 选择加入 100 mg/L APS 组的 CM L-DC s 作免疫表型分析, 并与不加 APS 的 GM-CSF/IL-4 组比较, 结果见表 3 可见, 加入 APS 组, CM L-DC s 相关表面分子表达率明显升高, 且在培养后的第 1 天就开始上升, 在第 3~ 5 天时升高最为明显。CD<sub>83</sub>、CD<sub>80</sub>、CD<sub>86</sub> 表达率分别为 40%, 44%, 50%; 而未加 APS 组, CM L-DC s 相关表面分子表达率升高不明显, 到第 10 天时 CD<sub>83</sub> 才为 18%, CD<sub>80</sub> 为 14%, CD<sub>86</sub> 为 15%。GM-CSF/IL-4/APS 诱生的 CM L-DC s 的 CD<sub>83</sub>、CD<sub>80</sub> 和 CD<sub>86</sub> 的表达显著高于

GM-CSF/IL-4 诱生的 CM L-DC s ( $P < 0.05$ )

3.4 刺激自体或异体淋巴细胞增殖的能力: 由于 CM L-DC s 的免疫表型 (CD<sub>83</sub>、CD<sub>80</sub>、CD<sub>86</sub>) 在 100 mg/L APS 组的第 5 天表达为最高, 故收集 GM-CSF/IL-4/APS (100 mg/L) 培养第 5 天的 CM L-DC s 和培养第 10 天的 GM-CSF/IL-4 组 CM L-DC s 用于混合淋巴细胞反应。未加细胞因子与 APS 培养的 CM L 患者骨髓单个核细胞作为对照组。结果见表 4 和 5。GM-CSF/IL-4 组的 CM L-DC s 和 GM-CSF/IL-4/APS 组的 CM L-DC s 具有刺激 T 淋巴细胞增殖的能力, 而对照组 CM L-DC s 没有或仅有弱的刺激能力。同时可见 GM-CSF/IL-4/APS 诱导的

表 3 APS对培养的 CML-DCs的细胞免疫表型表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=16$ )

Table 3 Effect of APS on phenotype expressions of cell immunocompetence for CML-DCs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=16$ )

| 细胞表型 | APS                   | 表达率 %   |          |          |           |           |           |
|------|-----------------------|---------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
|      | $I/(mg \cdot L^{-1})$ | 0 d     | 1 d      | 3 d      | 5 d       | 7 d       | 10 d      |
| CD83 | 0                     | 1.2±0.4 | 1.8±0.8  | 4.6±2.3  | 6.8±2.1   | 9.1±1.9   | 18.6±2.4  |
|      | 100                   | 1.2±0.4 | 19.3±1.9 | 36.4±5.2 | 40.6±7.0  | 39.8±6.6  | 35.5±10.1 |
| CD80 | 0                     | 3.4±1.1 | 2.9±1.1  | 41.1±1.3 | 8.3±2.9   | 10.1±2.3  | 14.1±3.4  |
|      | 100                   | 3.4±1.1 | 16.2±2.2 | 42.3±6.4 | 44.6±5.9  | 42.1±7.0  | 39.7±12.1 |
| CD86 | 0                     | 2.8±0.9 | 3.4±1.2  | 5.3±1.8  | 9.1±2.2   | 11.8±2.3  | 15.1±3.7  |
|      | 100                   | 2.8±0.9 | 17.3±3.4 | 39.4±4.2 | 50.6±11.6 | 48.1±10.6 | 45.1±7.6  |

与相应不加 APS组比较: \*  $P<0.05$

\*  $P<0.05$  vs corresponding group without APS

表 4 APS对 CML-DCs刺激自体 T淋巴细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 4 Effect of APS on T auto-lymphocyte proliferation stimulated by CML-DCs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

| 组别              | APS<br>$I/(mg \cdot L^{-1})$ | CML-DCs细胞数<br>$I/( \times 10^3 \text{ 孔}^{-1})$ | A           |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------------------------|-------------|
| 对照              | 0                            | 1                                               | 0.08±0.02   |
|                 | 0                            | 3                                               | 0.09±0.03   |
|                 | 0                            | 10                                              | 0.11±0.03   |
| GM-CSF/IL-4     | 0                            | 1                                               | 0.28±0.10   |
|                 | 0                            | 3                                               | 0.51±0.11   |
|                 | 0                            | 10                                              | 0.81±0.17*  |
| GM-CSF/IL-4/APS | 100                          | 1                                               | 0.54±0.12*△ |
|                 | 100                          | 3                                               | 0.83±0.11*△ |
|                 | 100                          | 10                                              | 1.22±0.16*△ |

表注同表 1

Notes are same to Table 1

表 5 APS对 CML-DCs刺激异体 T淋巴细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 5 Effect of APS on T allo-lymphocyte proliferation stimulated by CML-DCs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

| 组别              | APS<br>$I/(mg \cdot L^{-1})$ | CML-DC 细胞数<br>$I/( \times 10^3 \text{ 孔}^{-1})$ | A           |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------------------------|-------------|
| 对照              | 0                            | 1                                               | 0.08±0.02   |
|                 | 0                            | 3                                               | 0.09±0.03   |
|                 | 0                            | 10                                              | 0.11±0.03   |
| GM-CSF/IL-4     | 0                            | 1                                               | 0.33±0.14   |
|                 | 0                            | 3                                               | 0.67±0.18   |
|                 | 0                            | 10                                              | 0.89±0.16*  |
| GM-CSF/IL-4/APS | 100                          | 1                                               | 0.68±0.20*△ |
|                 | 100                          | 3                                               | 1.22±0.14*△ |
|                 | 100                          | 10                                              | 1.46±0.17*△ |

表注同表 1

Notes are same to Table 1

CML-DCs激活 T 淋巴细胞增殖的能力强于 GM-CSF/IL-4组诱导的 CML-DCs ( $P<0.05$ ).

4 讨论

DCs是最有效的专职抗原呈递细胞。大量的动物实验表明,在体外用编码肿瘤抗原的 DNA 或 mRNA 脉冲 DCs 可以产生保护性的抗肿瘤的免疫

反应<sup>[6-7]</sup>。随着许多人类特异性肿瘤相关抗原的确定,如此类似的治疗人类肿瘤的途径引起了关注<sup>[8]</sup>。然而,在白血病中,确定具有潜在的诱导肿瘤特异性免疫反应的肿瘤抗原还存在很多的问题。如果可以诱导恶性细胞自身向 DCs 的分化,这些问题将会得以解决。研究表明,在体外,成熟的 DCs 能够通过利用 GM-CSF, IL-4和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 诱导 CML 患者外周血单个核细胞生成 DCs<sup>[9-11]</sup>。这种白血病 DCs 能有效地刺激异体淋巴细胞增殖,且无需加入外源性抗原便可在自体 T 淋巴细胞中诱导抗白血病效应。然而,利用以往的培养方法诱生的 CML-DCs 不仅表达低水平的共刺激分子<sup>[12]</sup>,而且成熟的时间比较长,DCs 刺激 T 淋巴细胞反应的能力受限,而培养时间延长,细胞成活率明显降低。为了克服这些不足,许多研究人员寻求更有效的能提高 DC 共刺激分子的表达,缩短 DCs 的成熟时间的诱生 DCs 的方法。

基于以往利用 GM-CSF/IL-4 诱生 CML-DCs 的方法,本实验加入 APS 诱导培养 DCs APS 浓度的选择参照文献<sup>[13]</sup>报道的方法适当改进。本实验结果与文献<sup>[14]</sup>相符,即联合 GM-CSF 和 IL-4 培养 CML 细胞可以诱导生成具有树突状形态的 Ph 染色体阳性细胞。然而本实验不同于后者在于联合 APS 能更有效地诱导 DCs 的生成和成熟。本实验表明,GM-CSF/IL-4/APS 诱生出与 DCs 形态、免疫表型和功能上相一致的细胞。在细胞表型方面,GM-CSF/IL-4/APS 诱生的 DCs 的共刺激分子 (CD86, CD80) 和人成熟 DC 标志物 (CD83) 的表达显著高于 GM-CSF/IL-4 诱生的 DCs。抗原呈递细胞上共刺激分子 B7 (CD86, CD80) 的表达对于激活抗原特异性 T 淋巴细胞是必不可少的。这提示如果临床应用 IL-4 GM-CSF 和 APS 在体内可能会提高 DCs 的抗原呈递能力。这种免疫表型的不同表明有 APS 存在的条件下诱生的 DCs 更为成熟。在

APS 存在的条件下诱生的 DCs 刺激自体 and 异体 T 淋巴细胞的能力显著高于无 APS 存在条件下诱生的 DCs, 再次表明前者诱生的 DCs 具有更为成熟的免疫表型

APS 是当归中的重要成分, 已有实验表明 APS 能从 mRNA 水平与蛋白质水平调控 GM-CSF 的表达, APS 可能通过直接或间接途径促进淋巴细胞、造血微环境中的基质细胞、巨噬细胞合成和分泌 GM-CSF 或其他造血生长因子。研究表明, APS 能在体外促进小鼠脾淋巴细胞 IFN- $\gamma$  的分泌和提高 IFN- $\gamma$  的生物活性<sup>[15]</sup>。而 IFN- $\gamma$  能促进 DCs 的成熟<sup>[16]</sup>。在本实验中, 推测 APS 对 DCs 的刺激作用机制可能为: (1) 增强骨髓细胞 GM-CSF 自分泌作用。(2) 诱导骨髓细胞 IFN- $\gamma$  分泌增加

目前, DCs 用于肿瘤免疫治疗存在两个方面难题, 一方面, 尚未找到能大量扩增 DCs 的因子。另一方面, 扩增到一定时间和一定数量规模的 DCs 是否仍能保留其良好的抗原呈递功能。本研究结果表明 APS 能提高 DCs 的表面共刺激分子的表达, 促进其成熟并提高存活率, 延长 DCs 的生存时间。这预示 APS 与其他细胞因子联合诱导 CML-DCs 对慢性粒细胞白血病的治疗可能有良好的前景。

## References

- [1] Oehler L, Berer A, Keil F, *et al*. Generation of dendritic cells from human chronic myelomonocytic leukemic cells in fetal calf-free medium [J]. *Leuk Lymphoma*, 2000, 38(5-6): 577-586
- [2] Yuan L Y, Chen G A, Xiao X B, *et al*. Study on the inducing chronic myelogenous leukemia cells into chronic myelogenous leukemic dendritic cell [J]. *J Clin Hematol* (临床血液学杂志), 2001, 14(Suppl): 27-29
- [3] Westernann J, Kopp J. Bcr/abl autologous dendritic cells for vaccination in chronic myeloid leukemia [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 25(Suppl 2): 46-49
- [4] Orsini E, Foa R. Dendritic cell generation for leukemia immunotherapy [J]. *Leuk Res*, 2002, 26(4): 409-410
- [5] Zheng M, Wang Y P. Experimental study on effect of *Angelica polysaccharide* in inhibitory proliferation and inducing differentiation of K562 cells [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2002, 22(1): 54-57
- [6] Knight S C, Hunt R, Dore C, *et al*. Influence of dendritic cells on tumor growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(3): 4495-4497
- [7] Mayordomo J I, Zorin T L, Stokus W J, *et al*. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumor peptides elicit protective and therapeutic antitumor immunity [J]. *Nat Med*, 1995, 1(12): 1297-1302
- [8] Grabbe S, Beissert S, Schwarz T, *et al*. Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? [J]. *Immunol Today*, 1995, 16(3): 117-121
- [9] Choudhury A, Gajowski J L, Liang J C, *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
- [10] Eibl B, Ebner S, Duba C, *et al*. Dendritic cells generated from blood precursors of chronic myelogenous leukemia patients carry the Philadelphia translocation and can induce a CML-specific primary cytotoxic T-cell response [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997, 20(3): 215-223
- [11] Pawelec G, Rehbein A, Schlotz E, *et al*. Cellular immune responses to autologous chronic myelogenous leukemia cells in vitro [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1996, 42(3): 193-199
- [12] Wang L M, Chen S S, Liu Y R, *et al*. The function of dendritic cells derived from chronic myeloid leukemia [J]. *Chin J Exp Hematol* (中国实验血液学杂志), 2000, 8(4): 161-165
- [13] Feng J Q, Liu Z X, Zuo Z Y, *et al*. The effect of Danggui polysaccharides and Danggui lactone on cellular immunity in mice [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1998, 14(6): 279-282
- [14] Chen X, Regn S, Raffegerst S, *et al*. Interferon alpha in combination with GM-CSF induces the differentiation of leukemic antigen-presenting cells that has the capacity to stimulate a specific anti-leukemia cytotoxic T-cell response from patients with chronic myeloid leukemia [J]. *Br J Haematol*, 2000, 111(2): 596-607
- [15] Shan J J, Wang Y, Wang S C, *et al*. Effect of *Angelica sinensis* polysaccharides on lymphocyte proliferation and induction of IFN- $\gamma$  [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(7): 497-500
- [16] Wesa A, Galy A. Increased production of pro-inflammatory cytokines and enhanced T cell responses after activation of human dendritic cells with IL-1 and CD40 ligand [J]. *Bimol Central Immunol*, 2002, 3(1): 14

## Effect of polydatin on endothelial function in aorta vascular strips of healthy rabbits treated with ADMA

Q N Jian<sup>1</sup>, CHEN Yun-zhen<sup>1</sup>, ZHOU Q i-x in<sup>2</sup>, SHI Ruo-fei<sup>3</sup>, JIANG Q i-ng-song<sup>2</sup>, LOU Q i-n<sup>4\*</sup>

(1. Department of Cardiology, College of Clinical Medicine; 2. Department of Pharmacology, College of Basic Medicine; Chongqing Medical University, Chongqing 400016 China; 3. Chongqing Emergency Care Center, Chongqing 400020 China; 4. Library, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016 China)

**Abstract Object** To study the effect of polydatin (PD) and asymmetric dimethylarginine (ADMA)

\* 收稿日期: 2003-09-19  
作者简介: 秦 俭

女 四川隆昌人 副教授 博士 主要从事动脉粥样硬化的防治 作