

M ϕ 1和M ϕ 2对 $\gamma\delta$ T细胞体外抗胃癌细胞SGC-7901作用的影响

武 侠, 费素娟, 刘军权, 陈复兴, 吴 萍

背景资料
在肿瘤免疫均衡期和免疫逃逸期, 必须联合固有免疫和适应性免疫中的抗肿瘤效应细胞一起应用, 才能达到清除肿瘤的目的。巨噬细胞具有极化现象(M ϕ 1、M ϕ 2), 在免疫细胞和非免疫细胞构成的细胞网络及各种细胞因子构成的分子网络中, 巨噬细胞处于中心地位。不同极化状态的细胞表达不同的表面分子, 分泌不同细胞因子, 功能也不同。 $\gamma\delta$ T细胞在固有性肿瘤免疫监视和适应性肿瘤特异性应答中均具有重要作用。巨噬细胞如能和 $\gamma\delta$ T细胞进行综合性细胞免疫治疗, 将会明显提高肿瘤患者的细胞免疫治疗效果。

武侠, 吴萍, 徐州市中心医院消化科 江苏省徐州市 221009
费素娟, 徐州医学院附属医院消化科 江苏省徐州市 221002
刘军权, 陈复兴, 中国人民解放军第九七医院中心实验室 江苏省徐州市 221004

武侠, 医学硕士, 主要从事消化系统肿瘤的基础和临床研究。

作者贡献分布: 此课题由武侠、费素娟、刘军权、陈复兴及吴萍共同设计; 研究过程由武侠、刘军权与陈复兴操作完成; 研究所用新试剂由费素娟提供; 研究所用分析工具由刘军权与陈复兴提供; 数据分析由武侠完成; 本论文写作由武侠完成。

通讯作者: 武侠, 主治医师, 221009, 江苏省徐州市, 徐州市中心医院消化内科。wuxiafang1974@163.com

电话: 0516-83956340

收稿日期: 2009-11-05 修回日期: 2009-11-20

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2010-01-08

Effects of the culture supernatants of M ϕ 1 and M ϕ 2 on the killing activity of human $\gamma\delta$ T cells against gastric cancer SGC-7901 cells *in vitro*

Xia Wu, Su-Juan Fei, Jun-Quan Liu, Fu-Xing Chen, Ping Wu

Xia Wu, Ping-Wu, Department of Gastroenterology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou 221009, Jiangsu Province, China

Su-Juan Fei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Jun-Quan Liu, Fu-Xing Chen, Central Laboratory, the 97th Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xia Wu, Department of Gastroenterology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou 221009, Jiangsu Province, China. wuxiafang1974@163.com

Received: 2009-11-05 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2010-01-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of the culture supernatants of classically activated macrophages (M ϕ 1) and alternatively activated macrophages (M ϕ 2) on the proliferation, cytotoxicity, and surface marker expression of gamma delta T ($\gamma\delta$ T) cells and explore potential mechanisms involved.

METHODS: M ϕ 1 were induced *in vitro* with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interferon- γ (IFN- γ), while

M ϕ 2 were induced with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). The isopentenyl pyrophosphate method was used to amplify human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells. The surface markers on macrophages and $\gamma\delta$ T cells were determined by flow cytometry (FCM). Interleukin-10 (IL-10) and IL-12 levels in the culture supernatants of M ϕ 1 and M ϕ 2 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits. The proliferation of $\gamma\delta$ T cells induced with the culture supernatants of M ϕ 1 and M ϕ 2 was investigated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The lactate dehydrogenase (LDH) method was used to detect the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells against gastric cancer SGC-7901 cells.

RESULTS: After 10 days of induction culture, approximately 73.2% and 61.8% of M ϕ 1 and M ϕ 2 highly expressed CD68, respectively. The level of IL-12 secreted by M ϕ 1 was significantly higher than that secreted by M ϕ 2 (35 mg/L *vs* 9 mg/L, $P < 0.001$). The level of IL-10 secreted by M ϕ 1 was significantly lower than that secreted by M ϕ 2 (15 mg/L *vs* 87 mg/L, $P < 0.001$). The culture supernatant of M ϕ 1 could increase the proliferation of $\gamma\delta$ T cell when compared with those of M ϕ 2 and control cells (338% *vs* 11% and 0%, respectively; both $P < 0.01$). The positive rate of surface marker $\gamma\delta$ T cell receptor ($\gamma\delta$ TCR) on $\gamma\delta$ T cells induced with the culture supernatant of M ϕ 1 was higher than those on $\gamma\delta$ T cells induced with the culture supernatants of M ϕ 2 and control cells (97.3% *vs* 89.1% and 91.3%, respectively; both $P < 0.05$). The culture supernatant of M ϕ 1 could increase the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells when compared with those of M ϕ 2 and control cells (70.18% *vs* 51.38% and 47.25%, respectively; both $P < 0.01$).

CONCLUSION: The culture supernatant of M ϕ 1 can increase the proliferation and cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells, whereas the culture supernatant of M ϕ 2 has no significant effects.

Key Words: Classically activated macrophage; Alternatively activated macrophage; Gamma delta T cell; Interleukin-10; Interleukin-12

同行评议者
李瑗, 教授, 广西
肿瘤研究所

Wu X, Fei SJ, Liu JQ, Chen FX, Wu P. Effects of the culture supernatants of M ϕ 1 and M ϕ 2 on the killing activity of human γ δ T cells against gastric cancer SGC-7901 cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(1): 20-27

摘要

目的: 探讨经典激活的巨噬细胞(M ϕ 1)和选择性激活的巨噬细胞(M ϕ 2)培养上清液对人 γ δ T细胞增殖、表面标志、杀瘤活性的影响及其作用机制。

方法: 在体外用GM-CSF和IFN- γ 诱导培养M ϕ 1, 用M-CSF培养M ϕ 2, 已戊烯焦磷酸法扩增外周血 γ δ T细胞。用流式细胞术(FCM)检测巨噬细胞、 γ δ T细胞表面标志, 用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测IL-10、IL-12含量, 用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测巨噬细胞培养上清对 γ δ T细胞增殖的影响。用乳酸脱氢酶(LDH)释放法检测巨噬细胞培养上清对 γ δ T细胞的杀瘤活性的影响。

结果: 体外诱导培养10 d的M ϕ 1和M ϕ 2均高表达CD68(73.2% *vs* 61.8%), M ϕ 1分泌IL-12的浓度显著高于M ϕ 2(35 mg/L *vs* 9 mg/L, $P<0.01$), M ϕ 1分泌IL-10的浓度明显低于M ϕ 2(15 mg/L *vs* 87 mg/L, $P<0.01$)。不同浓度M ϕ 1上清组对 γ δ T细胞的增值率均高于对照组或M ϕ 2组(338% *vs* 11%, 0, $P<0.01$)。M ϕ 1培养上清作用后的 γ δ T细胞表面标志 γ δ TCR表达率高于M ϕ 2组和对照组, 有统计学意义(97.3% *vs* 89.1%, 91.3%, $P<0.05$)。不同浓度M ϕ 1上清组对 γ δ T细胞的杀瘤活性均高于对照组或M ϕ 2组(70.18% *vs* 51.38%, 47.25%, $P<0.01$)。

结论: M ϕ 1能够促进 γ δ T细胞生长, 而且能够提高 γ δ T细胞对胃癌SGC-7901细胞的杀伤活性, M ϕ 2对 γ δ T细胞作用不明显。

关键词: 经典激活的巨噬细胞; 选择性激活的巨噬细胞; γ δ T细胞; 白介素-10; 白介素-12

武侠, 费素娟, 刘军权, 陈复兴, 吴萍. M ϕ 1和M ϕ 2对 γ δ T细胞体外抗胃癌细胞SGC-7901作用的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(1): 20-27

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/20.asp>

0 引言

胃癌是人类常见的恶性肿瘤, 我国是胃癌高发国家, 其发病率和死亡率居各种恶性肿瘤首位^[1], 严重威胁着人类的健康, 因此对其防治的研究具有重要的临床意义。免疫治疗是一种采用多种免疫细胞治疗恶性肿瘤的新技术, 能提高患

者免疫系统对肿瘤抗原的识别和提呈能力, 达到减少肿瘤复发和转移的目的。在肿瘤免疫均衡期和免疫逃逸期, 必须联合固有免疫和适应性免疫中的抗肿瘤效应细胞一起应用, 才能达到清除肿瘤的目的^[2]。巨噬细胞在特异性免疫反应的诱发和免疫调节中起关键作用。近年来人们逐渐发现成熟巨噬细胞能在各种因素诱导下出现表型和功能分化, 即极化现象^[3-5]。人单个核细胞在粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage-CSF, GM-CSF)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage-CSF, M-CSF)诱导下分别分化为经典激活的巨噬细胞(classic activated macrophage, CAM/M ϕ 1)和选择性激活的巨噬细胞(alternative activation of macrophage, AAM/M ϕ 2)^[6,7]。 γ δ T细胞是体内T细胞固有免疫的一个重要细胞群^[8,9], 在肿瘤免疫监视中具有重要作用^[10-13]。巨噬细胞如能和 γ δ T细胞进行综合性细胞免疫治疗, 将会明显提高肿瘤患者的细胞免疫治疗效果。目前国内外有关巨噬细胞和 γ δ T细胞相互作用的研究主要局限在炎症组织^[14,15], 尚未见有关巨噬细胞对 γ δ T细胞抗肿瘤作用的影响方面的报道, 特别是比较不同极化状态的巨噬细胞对 γ δ T细胞抗肿瘤作用的研究。本实验旨在体外成功培养M ϕ 1和M ϕ 2, 并给予鉴定。观察M ϕ 1和M ϕ 2培养上清对 γ δ T细胞的增殖、表面受体的表达以及杀伤活性的影响, 并探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株SGC-7901(中国科学院上海细胞生物学研究所); rhGM-CSF、rhM-CSF(Promega公司); rhIL-2、rhIFN- γ (厦门特宝生物工程股份有限公司); RPMI 1640培养基、小牛血清、胰蛋白酶(Gibco公司); 四甲基偶氮蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)(Sigma公司); PE标记的鼠抗人单克隆抗体CD3、FICT标记的鼠抗人单克隆CD68、CD44、 γ δ TCR(联科生物有限公司); IL-10、IL-12试剂盒(Abender公司); 乳酸脱氢酶试剂盒(购于日本世诺临床诊断制品株式会社); 恒温CO₂培养箱(Heraeus公司)、倒置显微镜(德国Wilovet公司)、超净工作台、流式细胞仪(FCM, 美国BD公司)、低速离心机。

1.2 方法

1.2.1 γ δ T细胞的培养和鉴定: 取健康献血者末梢抗凝血10 mL, 加入淋巴细胞分离液, 以2000 r/min离心15 min, 吸取外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 用生理盐水洗

研发前沿
开发有效治疗肿瘤的方法已成为当今医学研究的重要课题, 细胞免疫治疗是一种采用多种免疫细胞治疗恶性肿瘤的新技术, 能提高患者免疫系统对肿瘤抗原的识别、提呈和杀伤能力, 达到减少肿瘤复发和转移的目的。

相关报道

Baron-Bodo等在体外用GM-CSF、IFN- γ 培养M ϕ 1,并证实M ϕ 1可通过杀伤肿瘤细胞和限制肿瘤细胞的扩增,发挥抗肿瘤作用;Corvaisier等研究证实, γ δ T细胞能识别肿瘤细胞和自身细胞,对自体肿瘤细胞和异体肿瘤细胞均有杀伤作用,对正常细胞无杀伤作用。

涂3遍(1500 r/min离心,每次10 min),加入RPMI 1640培养液(含10%小牛血清、5%人AB血清、IL-2 150 kU/L和IPP 2 μ g/L)中后按陈复兴等^[16]提出方法进行 γ δ T细胞培养。收集培养10 d的贴壁生长 γ δ T细胞进行细胞表面标志 γ δ TCR和CD44检测和随后的 γ δ T细胞生长及杀伤活性试验。

1.2.2 巨噬细胞的培养:健康志愿者6例,每例抽血200 mL,以淋巴细胞分离液分离PBMC,用RPMI 1640完全培养基将PBMC配成 2×10^9 /L,加入6孔板细胞培养板中,每孔5 mL,于37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂培养箱中培养2 h后,用PBS将未贴壁细胞洗掉,贴壁细胞热盐水洗1次,应用含700 kU/L GM-CSF和10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,于50 mL/L CO₂, 37 $^{\circ}$ C培养,每2 d半量换培养基1次,第6天加入166 kU/L的IFN- γ ,孵育24 h后即得M ϕ 1。同法用50 μ g/L的M-CSF代替GM-CSF诱导M ϕ 2^[7],但第6天不加IFN- γ 。

1.2.3 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测巨噬细胞表面标志CD68的表达:分别将6份标本用胰蛋白酶消化收获的培养7、10、13 d的M ϕ 1, M ϕ 2,用PBS调细胞浓度为 5×10^9 /L, PBS离心洗涤后重悬,分别取100 μ L加入离心管,加入荧光标记的单克隆抗体CD68(FITC标记),终浓度为5 mg/L, 4 $^{\circ}$ C暗处孵育标记20 min, PBS液洗涤,然后用FCM检测细胞表型。

1.2.4 M ϕ 1、M ϕ 2培养上清液中IL-10和IL-12的检测:分别吸取培养第4、6、8、10、12和14天M ϕ 1和M ϕ 2上清液0.5 mL,置-20 $^{\circ}$ C保存。收集完标本后检测其中IL-10、IL-12含量。操作过程严格按照说明书进行。

1.2.5 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)测定M ϕ 1、M ϕ 2培养上清液对 γ δ T细胞增殖的影响:将上述方法培养10 d的 γ δ T细胞配成 1×10^9 /L,加入96孔板,每孔0.2 mL,每组设5个复孔,置于50 mL/L CO₂、37 $^{\circ}$ C培养箱中培养24 h后分别加入培养10 d的M ϕ 1、M ϕ 2培养上清混合液,设不加巨噬细胞上清为对照组,最终培养液量为每孔0.2 mL,继续置37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂培养箱中继续孵育4 h,弃去上清,加二甲基亚砷(DMSO)每孔100 μ L,震荡10 min后,待其沉淀产物完全溶解,置酶标仪上570 nm波长测定各孔的吸光度(A)。细胞增殖率=(试验组A值/对照组A值-1) \times 100%。

1.2.6 FCM检测M ϕ 1、M ϕ 2培养上清液对 γ δ T细胞表型的影响:收集经培养10 d的M ϕ 1、M ϕ 2培

养上清液作用72 h后的 γ δ T细胞(实验组, M ϕ 1或M ϕ 2上清:1640培养基体积比为1:8)和没有上清作用的 γ δ T细胞(对照组),用PBS液调细胞浓度为 2×10^9 /L,分别取100 μ L加入离心管,加入FITC荧光标记的 γ δ TCR单克隆抗体、抗人CD44-FITC抗体,终浓度为5 mg/L, 4 $^{\circ}$ C暗处孵育,标记20 min, PBS液洗涤,然后用FCM检测。

1.2.7 经M ϕ 1、M ϕ 2培养上清液作用后 γ δ T细胞杀伤活性的测定:以乳酸脱氢酶释放法测定细胞杀伤活性^[17],将SGC-7901胃癌细胞用高糖DMEM培养基培养至对数生长期,收集细胞用Hank液洗2次,配成 2×10^8 /L为靶细胞。经不同浓度(M ϕ 1或M ϕ 2上清:1640培养基体积比为1:4、1:8、1:32、1:64)M ϕ 1、M ϕ 2培养上清液诱导72 h后的 γ δ T细胞配成 2×10^9 /L为效应细胞,将效应靶细胞数按10:1比例混合。以500 r/min离心5 min,置37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂培养箱中孵育6 h后,轻轻混匀细胞,再以1500 r/min离心10 min。每次测试分别加入未经巨噬细胞上清诱导的 γ δ T细胞悬液做对照组,每组设5个复管。收集培养上清液,用Encore全自动生化分析仪,测定LDH的活性单位(U/L)。 γ δ T细胞杀伤活性=(测定管LDH单位-效应细胞自然释放LDH单位)/(最大释放管LDH单位-靶细胞自然释放管LDH单位) \times 100%。

统计学处理 采用SPSS统计软件,数值以mean \pm SD表示,两组比较采用T检验,多组之间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 γ δ T细胞培养、形态学观察及纯度鉴定 PBMC在 γ δ T细胞培养诱导体系中培养24 h即可见贴壁生长,48 h后集落开始变大,培养10 d可见大的集落和单个贴壁生长细胞,单个细胞可见细胞呈条梭状,也有少量呈悬浮生长细胞。收集培养前后细胞进行mAb荧光标记后经FCM检测并分析结果,培养前 γ δ T细胞数的比例为4.21%,其细胞表面黏附分子CD44的表达率仅为5.13%;培养10 d时 γ δ T细胞数的比例达91.27%,其CD44表达为94.00%(图1, 2),符合 γ δ T细胞的特征。

2.2 M ϕ 1、M ϕ 2细胞培养、形态学观察及纯度鉴定 PBMC分别在M ϕ 1、M ϕ 2培养诱导体系中培养24 h即可见贴壁生长,48 h后集落开始变大,每个集落约3-6个细胞,培养7 d可见大的集落和极少量单个贴壁生长细胞,单个细胞可见细胞呈

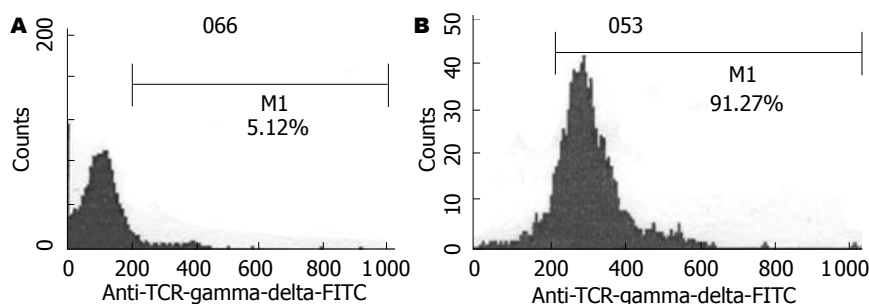


图 1 培养10 d $\gamma\delta$ T细胞百分率(%). A: 培养前; B: 培养10 d.

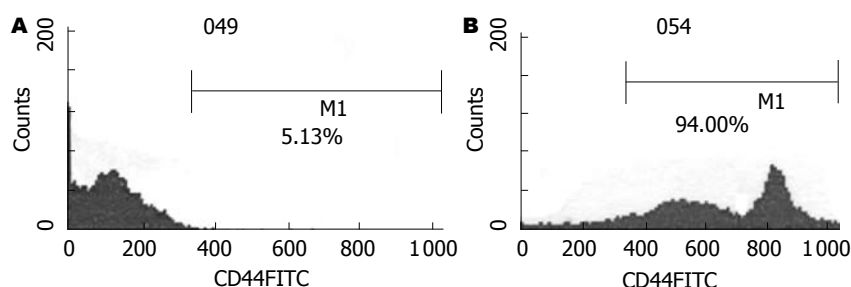


图 2 $\gamma\delta$ T细胞表面CD44的表达. A: 培养前; B: 培养10 d.

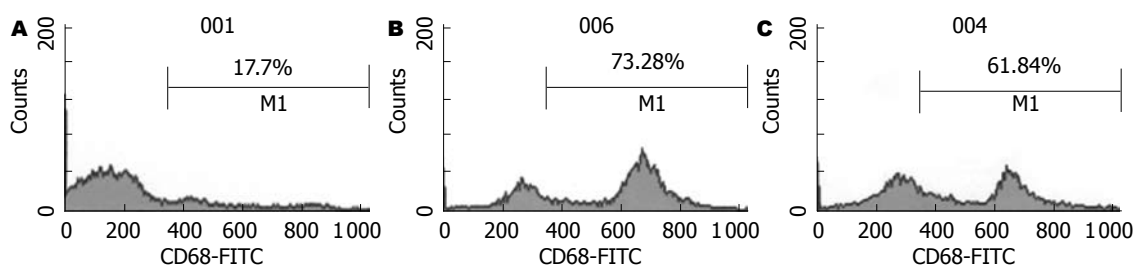


图 3 M ϕ 1、M ϕ 2培养前后表面标志CD68的表达. A: 培养前CD68; B: 培养10 d M ϕ 1表面; C: 培养10 d M ϕ 2表面.

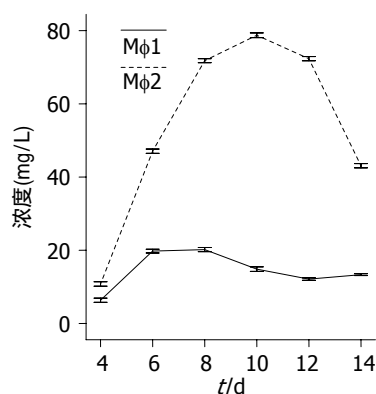


图 4 M ϕ 1和M ϕ 2培养上清中IL-10的浓度.

不规则形, 培养7 d的巨噬细胞涂片行瑞姬氏染色发现大多数细胞体积大, 呈椭圆或不规则形, 细胞核大多为椭圆或不规则形, 核染质疏松, 核膜不规则, 有凸起; 胞质丰富, 染成灰蓝色, 形态不规则, 有的像伪足, 近核处有淡染现象, 也有呈不规则形. 培养前后细胞表面CD68的表达率有明显改变, 培养前CD68表达率为17.7%, 培养后M ϕ 1的CD68表达率为73.2%, M ϕ 2的CD68表达率为61.8%(图3).

2.3 M ϕ 1、M ϕ 2培养上清中IL-10检测结果 M ϕ 1、

M ϕ 2可通过分泌不同的细胞因子, 发挥免疫调节作用, 其中IL-10介导负向调节功能, 为此我们检测巨噬细胞不同培养时间IL-10的分泌水平, 结果表明, 培养第6天时M ϕ 2分泌IL-10的水平开始升高, 8-12 d达到峰值(8、10、12 d IL-10浓度比较无统计学意义, $P>0.05$), 14 d时分泌量下降, 而M ϕ 1各培养时间段分泌的IL-10水平无明显差异($P>0.05$). 但在相同培养时间点, M ϕ 1与M ϕ 2 IL-10分泌水平比较有显著差异($P<0.01$), 尤其在培养10 d M ϕ 1、M ϕ 2分泌IL-10的浓度分别为15 μ g/L和87 μ g/L, 经统计学比较有显著性差异($P<0.001$, 图4).

2.4 M ϕ 1、M ϕ 2培养上清中IL-12检测结果 IL-12介导正向调节功能, 培养第6天时M ϕ 1分泌的IL-12的水平开始升高, 8-12 d达到峰值, 8、10、12 d IL-12浓度比较无统计学意义($P>0.05$), 14 d时分泌量下降, 而M ϕ 2各培养时间段分泌的IL-12水平无明显差异. 但在相同培养时间点, M ϕ 1与M ϕ 2 IL-12分泌水平有显著差异($P<0.01$), 尤其是培养12 d M ϕ 1、M ϕ 2分泌IL-12浓度分别为35 μ g/L和9 μ g/L, 经统计学比较有非常显著性

创新盘点

目前国内外有关巨噬细胞和 $\gamma\delta$ T细胞相互作用的研究主要局限在炎症组织, 尚未见有关巨噬细胞对 $\gamma\delta$ T细胞抗肿瘤作用的影响方面的报道. 特别是比较不同极化状态的巨噬细胞对 $\gamma\delta$ T细胞抗肿瘤作用的研究. 实验发现M ϕ 1能够促进 $\gamma\delta$ T细胞生长, 而且能够提高 $\gamma\delta$ T细胞对胃癌SGC-7901细胞的杀伤活性, M ϕ 2对 $\gamma\delta$ T细胞作用不明显.

应用要点

M ϕ 1能够促进 $\gamma\delta$ T细胞生长,为 $\gamma\delta$ T细胞提供了一种增效途径;而且能够提高 $\gamma\delta$ T细胞对胃癌细胞SGC-7901的杀伤活性,为M ϕ 1和 $\gamma\delta$ T细胞用于胃癌的免疫治疗提供了一定理论依据;M ϕ 2对 $\gamma\delta$ T细胞作用不明显.

表 1 M ϕ 1、M ϕ 2培养上清液对 $\gamma\delta$ T细胞增殖的影响 ($n = 6$, mean \pm SD)

M : 1640 (体积比)	$\gamma\delta$ T细胞增殖(4值)		$\gamma\delta$ T细胞增殖率(%)	
	M ϕ 1培养组	M ϕ 2培养组	M ϕ 1培养组	M ϕ 2培养组
对照组	0.430 \pm 0.026	0.433 \pm 0.031	0.00	0.00
1 1	1.647 \pm 0.097 ^b	0.377 \pm 0.066	283.32 ^b	-5.12
1 2	1.829 \pm 0.036 ^b	0.408 \pm 0.028	325.68 ^b	-12.28
1 4	1.871 \pm 0.021 ^b	0.384 \pm 0.003	335.53 ^b	-10.63
1 8	1.882 \pm 0.029 ^b	0.381 \pm 0.054	338.09 ^b	-11.40
1 16	1.554 \pm 0.044 ^b	0.357 \pm 0.006	261.60 ^b	-16.83
1 32	1.569 \pm 0.011 ^b	0.280 \pm 0.031	265.09 ^b	-34.83
1 64	1.040 \pm 0.069 ^b	0.357 \pm 0.026	142.12 ^b	-16.99
1 128	0.914 \pm 0.050 ^b	0.333 \pm 0.019	112.08 ^b	-22.43

^b $P < 0.01$ vs 对照组或M ϕ 2组. M: 不同巨噬细胞上清.

表 2 M ϕ 1、M ϕ 2培养上清液对 $\gamma\delta$ TCR和黏附分子表达的影响 ($n = 6$, mean \pm SD)

分组	$\gamma\delta$ CR	CD44
对照组	91.27 \pm 1.09	94.01 \pm 1.72
M ϕ 1	97.32 \pm 1.56 ^a	95.08 \pm 0.74
M ϕ 2	89.12 \pm 1.01	93.01 \pm 1.71

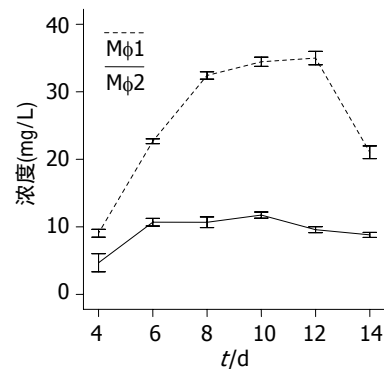
^a $P < 0.05$ vs 对照组或M ϕ 2; M ϕ 1或M ϕ 2上清 $\gamma\delta$ T细胞比为1 : 8.

差异($P < 0.001$, 图5).

2.5 M ϕ 1、M ϕ 2培养上清液对 $\gamma\delta$ T细胞增殖的影响 $\gamma\delta$ T细胞分别经培养10 d的M ϕ 1和M ϕ 2培养上清混合液作用后发现,不同浓度M ϕ 1上清组对 $\gamma\delta$ T细胞的增殖率均显著高于对照组或M ϕ 2组($P < 0.01$).在M ϕ 1上清:1640培养基体积比从1 : 1至1 : 8比例组,随M ϕ 1培养上清液浓度的减少, $\gamma\delta$ T细胞的增殖率逐渐升高,体积比在1 : 8时 $\gamma\delta$ T细胞增殖率达峰值(338%),当M ϕ 1上清:1640培养基体积比至1 : 16以下时, $\gamma\delta$ T细胞增殖率逐渐下降.与M ϕ 1相反,在M ϕ 2每一浓度组 $\gamma\delta$ T细胞增殖率均为负值,与M ϕ 1组比较,均有显著性差异($P < 0.01$),但与对照组比较无统计学意义($P > 0.05$,表1).

2.6 M ϕ 1、M ϕ 2培养上清液对 $\gamma\delta$ T细胞表面标志 $\gamma\delta$ TCR表达的影响 $\gamma\delta$ T细胞分别经培养10 d的M ϕ 1和M ϕ 2培养上清混合液作用(M ϕ 1或M ϕ 2上清:1640培养基体积比为1 : 8)后发现,M ϕ 1培养上清作用后的 $\gamma\delta$ T细胞表面标志 $\gamma\delta$ TCR表达率为97.3%,明显高于M ϕ 2组(89.1%)和对照组(91.27%),有统计学意义($P < 0.05$).提示M ϕ 1能上调 $\gamma\delta$ T细胞的表面标志 $\gamma\delta$ TCR的表达(表2).

2.7 M ϕ 1、M ϕ 2培养上清液对 $\gamma\delta$ T细胞杀瘤活性的影响 $\gamma\delta$ T细胞分别经培养10 d的M ϕ 1和M ϕ 2培养

图 5 M ϕ 1和M ϕ 2培养上清中IL-12的浓度.

上清混合液作用后发现,不同浓度M ϕ 1上清组 $\gamma\delta$ T细胞的杀瘤活性均高于对照组或M ϕ 2组($P < 0.01$).在M ϕ 1上清:1640培养基体积比从1 : 4至1 : 16比例组,随M ϕ 1培养上清液浓度的减少, $\gamma\delta$ T细胞的杀瘤活性逐渐升高,体积比在1 : 16时 $\gamma\delta$ T细胞杀瘤活性达峰值(70.18%),当M ϕ 1上清:1640培养基体积比至1 : 32时, $\gamma\delta$ T细胞增殖率下降.M ϕ 2每一浓度组 $\gamma\delta$ T细胞杀瘤活性无明显变化,与M ϕ 1组比较,有统计学意义($P < 0.05$),但与对照组比较无统计学意义($P > 0.05$,图6).

3 讨论

巨噬细胞具有吞噬、递呈抗原、分泌细胞因子等多种功能,在免疫细胞和非免疫细胞构成的细胞网络及各种细胞因子构成的分子网络中,巨噬细胞处于中心地位,在特异性免疫反应的诱发和免疫调节中起关键作用^[18].免疫效应细胞在免疫反应中并非是表型单一的活化细胞,在局部微环境因素的影响下,活化的细胞分化成具有不同表型的亚细胞型,这些亚型细胞适应局部环境同时又是局部环境不可或缺的组分.他们分布不同,表型特征有别:表达不同的表面

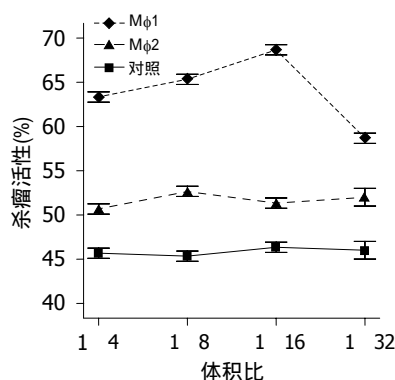


图 6 M ϕ 1和M ϕ 2培养上清液对 $\gamma\delta$ T细胞杀瘤活性的影响.

分子,分泌不同细胞因子,功能也不同.近年来人们逐渐发现成熟巨噬细胞能在各种因素诱导下出现表型和功能分化,即极化现象.

Baron-Bodo等^[19]采用GM-CSF、IFN- γ 培养M ϕ 1,证实用IFN- γ 活化培养好的巨噬细胞可以增加巨噬细胞的抗肿瘤能力. Verreck等^[7]用M-CSF诱导M ϕ 2. GM-CSF和M-CSF能明显增加培养巨噬细胞的数量,在体外培养增加杀肿瘤细胞的能力,而且可生成更多的炎性细胞因子^[20,21]. IL-12高表达和IL-10低表达是M ϕ 1的特征,而IL-10高表达和IL-12产生减少被认为是广义的M ϕ 2共同的表型标志. CD68是分布于细胞表面的跨膜糖蛋白,相对分子质量为110 kDa. 单核细胞表面的CD68较少,一旦向巨噬细胞转化,CD68表达即明显增加,即CD68是人巨噬细胞公认的检测标记^[22].

$\gamma\delta$ T细胞是体内T细胞固有免疫的一个重要细胞群,约占外周血中T细胞的5%-15%,他以MHC非限制方式识别各类抗原,广泛分布于消化系统和呼吸系统上皮组织内;末梢血中也有一定数量的 $\gamma\delta$ T细胞^[23]. 近几年来,大量的研究证明, $\gamma\delta$ T细胞在肿瘤免疫监视和免疫治疗中具有重要作用^[24-28].

本实验发现培养前后M ϕ 1、M ϕ 2表面CD68表达均明显增加,分别由培养前17.7%增加到73.2%和61.8%. 培养第6天M ϕ 2分泌的IL-10的量开始增多, M ϕ 1分泌的IL-12的量开始增多, 8-12 d达到顶峰, 14 d时分泌量下降. M ϕ 1高分泌IL-12、低分泌IL-10; M ϕ 2高分泌IL-10、低分泌IL-12,符合M ϕ 1和M ϕ 2的特征,提示我们已成功完成了由人外周血单核细胞培养为巨噬细胞的实验.

$\gamma\delta$ TCR是 $\gamma\delta$ T细胞表面表达的主要与炎症、肿瘤等免疫相关的受体, Dalton等^[29,30]证实巨

噬细胞和 $\gamma\delta$ T细胞相互作用是V δ 1亚型的特性. V γ 1+细胞结合巨噬细胞是TCR介导的. $\gamma\delta$ TCR可以结合巨噬细胞,影响巨噬细胞抗原提呈功能和分泌细胞因子,介导炎症反应和肿瘤免疫. 另外, $\gamma\delta$ TCR的杀伤活性与肿瘤细胞表达相应的配体如MICA/MICB, ULBP1-4有关. $\gamma\delta$ T细胞分别经培养10 d的M ϕ 1和M ϕ 2培养上清混合液作用后发现, M ϕ 1培养上清作用后的 $\gamma\delta$ T细胞表面标志 $\gamma\delta$ TCR表达率明显高于M ϕ 2组和对照组. 提示M ϕ 1能上调 $\gamma\delta$ T细胞的表面标志 $\gamma\delta$ TCR的表达.

本组资料MTT实验发现, $\gamma\delta$ T细胞分别经培养10 d的M ϕ 1和M ϕ 2培养上清混合液作用后发现,不同浓度M ϕ 1上清组对 $\gamma\delta$ T细胞的增殖率均显著高于对照组或M ϕ 2组. 浓度在1:8时 $\gamma\delta$ T细胞增殖率达峰(338%),当M ϕ 1上清 $\gamma\delta$ T细胞体积比至1:16以下时, $\gamma\delta$ T细胞增殖率逐渐下降. 与M ϕ 1相反,在M ϕ 2每一浓度组 $\gamma\delta$ T细胞增殖率均为负值,但与对照组比较无统计学意义. 这说明M ϕ 1培养上清能够促进 $\gamma\delta$ T细胞生长,为 $\gamma\delta$ T细胞提供了一种增效途径.

如果仅仅是抗原刺激,并不能引起 $\gamma\delta$ T细胞的增殖和扩增,需要补充细胞因子如IL-2或与辅助性T细胞共培养. IL-2是较早确定的可以激活或共刺激 $\gamma\delta$ T细胞的体外因素. 除此之外,其他细胞因子同样可以影响 $\gamma\delta$ T细胞激活,如IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21等,但作用各有侧重. IL-2和IL-15侧重于引导增殖,IL-12和IL-18则侧重于介导 $\gamma\delta$ T细胞分泌功能性IFN- γ . IL-12联合IL-2可以使 $\gamma\delta$ T细胞数量增加到一个很大的程度,同时 $\gamma\delta$ T细胞抗瘤活性明显提高; IL-12还可以上调 $\gamma\delta$ T细胞TNF- α 受体数量,增加对TNF- α 的易感性. Dieli等^[31]在体外用卡介苗感染的Dc与T细胞共培养,发现两种细胞无论是接触共培养还是隔离共培养,均可以激活 $\gamma\delta$ T细胞,产生大量的IFN- γ ,说明卡介苗感染的DC分泌的某种可溶性因子起着一定作用. 分别加入IL-12抗体、IL-18抗体和 $\gamma\delta$ T细胞受体(T cell receptor, TCR)抗体后,只有IL-12抗体强烈抑制了IFN- γ 分泌,确定了IL-12对 $\gamma\delta$ T细胞的作用. 本实验M ϕ 1上清组中IL-12分泌较多,且能明显促进 $\gamma\delta$ T细胞的增殖,也证实了IL-12对 $\gamma\delta$ T细胞的作用.

我们的实验发现,与M ϕ 2组及对照组相比, M ϕ 1培养上清液能加强 $\gamma\delta$ T细胞对人胃腺癌SGC-7901细胞的杀伤作用,其机制可能是由于M ϕ 1高分泌促Th1的细胞因子IL-12,而且促进 $\gamma\delta$ TCR的表达. IL-12最初被发现时被认为是细

同行评价
本研究内容丰富,
研究结果数据详
实,有一定的学术
价值.

胞毒T细胞的成熟因子,并可单独激活NK细胞,后逐渐发现其可以介导外周血淋巴细胞产生IFN- γ ,增加NK细胞的细胞毒作用,促进T细胞增殖,释放细胞因子IFN- γ 和TNF- α 等,起到杀伤肿瘤的作用。 $\gamma\delta$ T在 $\gamma\delta$ TCR活化后上调FasL表达,引发胃癌细胞的凋亡。

巨噬细胞上清联合 $\gamma\delta$ T细胞治疗胃癌的机制可能为:(1)利用巨噬细胞和 $\gamma\delta$ T细胞直接杀伤癌细胞,弥补MHC限制性杀伤的不足;(2)通过补充各种免疫细胞之间的相互作用和细胞因子的作用,增加和健全体内抗肿瘤免疫网络的功能。

总之,巨噬细胞对 $\gamma\delta$ T细胞体外抗胃癌细胞SGC-7901作用有影响,不同极化状态的巨噬细胞作用不同,本实验利用巨噬细胞上清和 $\gamma\delta$ T细胞作用,排除了直接的细胞细胞接触作用。但作用机制、细胞通路等问题需进一步的研究。

4 参考文献

- 1 孙秀娣,牧人,周有尚,戴旭东,张思维,皇甫小梅,孙杰,李连弟,鲁凤珠,乔友林.中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测.中华肿瘤杂志 2004; 26: 4-9
- 2 Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Ann Rev Immunol* 2004; 22: 329-360
- 3 Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett* 2009; 123: 97-102
- 4 Chen JJ, Lin YC, Yao PL, Yuan A, Chen HY, Shun CT, Tsai ME, Chen CH, Yang PC. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol* 2005; 23: 953-964
- 5 Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 958-969
- 6 Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796: 11-18
- 7 Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4560-4565
- 8 Kabelitz D, Wesch D, He W. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. *Cancer Res* 2007; 67: 5-8
- 9 Casetti R, Martino A. The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 2008; 5: 161-170
- 10 Born WK, Reardon CL, O'Brien RL. The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 31-38
- 11 Moser B, Brandes M. Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC. *Trends Immunol* 2006; 27: 112-118
- 12 Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Osaka Y, Nakazawa H, Uchiyama T, Minato N, Toma H. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 469-476
- 13 Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, Rolland F, Philip I, Gal  a C, Salot S, Saiagh S, Audrain M, Rimbert M, Lafaye-de Micheaux S, Tiollier J, N  grier S. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1599-609
- 14 赵莹,魏晓晴,崔颖,高颖. DEC205在幽门螺杆菌感染的巨噬细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2037-2041
- 15 党胜春,张建新. 巨噬细胞与急性胰腺炎关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2493-2496
- 16 陈复兴,刘军权,冯霞,张娟,张颂. 一种体外扩增人 $\gamma\delta$ T细胞的新方法. 细胞与分子免疫学杂志 2007; 23: 662-664
- 17 刘军权,韩慧敏,陈复兴. 用乳酸脱氢酶试剂盒检测LAK细胞活性. 临床医学检验 1995; 13: 83
- 18 丁世凯,任珂,丁雄,龚建平. Kupffer细胞在肝癌发生发展中的双向作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2761-2764
- 19 Baron-Bodo V, Doceur P, Lefebvre ML, Labroqu  re K, Defaye C, Cambouris C, Prigent D, Salcedo M, Boyer A, Nardin A. Anti-tumor properties of human-activated macrophages produced in large scale for clinical application. *Immunobiology* 2005; 210: 267-277
- 20 Wallace PK, Romet-Lemonne JL, Chokri M, Kasper LH, Fanger MW, Fadul CE. Production of macrophage-activated killer cells for targeting of glioblastoma cells with bispecific antibody to FcgammaRI and the epidermal growth factor receptor. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49: 493-503
- 21 Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 1065-1073
- 22 Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 23-35
- 23 陈复兴,刘军权,冯霞,王涛,张娟,张颂,陈桂林. 人末梢血 $\gamma\delta$ T细胞对消化系统肿瘤细胞的杀伤作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1591-1595
- 24 Beck BH, Kim HG, Kim H, Samuel S, Liu Z, Shrestha R, Haines H, Zinn K, Lopez RD. Adoptively transferred ex vivo expanded gammadelta-T cells mediate in vivo antitumor activity in preclinical mouse models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009 Sep 18. [Epub ahead of print]
- 25 Kondo M, Sakuta K, Noguchi A, Ariyoshi N, Sato K, Sato S, Sato K, Hosoi A, Nakajima J, Yoshida Y, Shiraishi K, Nakagawa K, Kakimi K. Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional gammadelta T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 2008; 10: 842-856
- 26 Yuasa T, Sato K, Ashihara E, Takeuchi M, Maita S, Tsuchiya N, Habuchi T, Maekawa T, Kimura S. Intravesical administration of gammadelta T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 493-502
- 27 Viey E, Fromont G, Escudier B, Morel Y, Da Rocha S, Chouaib S, Caignard A. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* 2005; 174: 1338-1347
- 28 韩露艳,费素娟,陈复兴,刘军权,陈桂林. 唑来膦酸对人末梢血 $\gamma\delta$ T细胞杀伤胃癌细胞株SGC-7901作用的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 181-185
- 29 Dalton JE, Pearson J, Scott P, Carding SR. The interaction of gamma delta T cells with activated macrophages is a property of the V gamma 1

- subset. *J Immunol* 2003; 171: 6488-6494
- 30 Dalton JE, Howell G, Pearson J, Scott P, Carding SR. Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells. *J Immunol* 2004; 173: 3660-3667
- 31 Dieli F, Caccamo N, Meraviglia S, Ivanyi J, Sireci G, Bonanno CT, Ferlazzo V, La Mendola C, Salerno A. Reciprocal stimulation of gammadelta T cells and dendritic cells during the anti-mycobacterial immune response. *Eur J Immunol* 2004; 34: 3227-3235

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	7	41	-0.99	0.043	41	-0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	-0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	-0.44	0.294	34	-0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	-0.43	0.379	28	-0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	-0.50	0.441	22	-0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	-0.32
G257	临床内科杂志	875	16	-0.24	0.412	24	-0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	-0.73	0.294	34	-0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	-0.28	0.371	29	-0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	-0.65	0.329	33	-0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	-0.86	0.158	40	-0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	-0.73	0.279	36	-0.46
G523	内科理论与实践	34	40	-0.97	0.171	39	-0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	-0.73	0.562	14	0.08
G190	世界华人消化杂志	2480	6	1.15	0.547	17	0.05
G800	胃肠病学	619	23	-0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病杂志	580	28	-0.50	0.415	23	-0.20
G083	心肺血管病杂志	246	37	-0.79	0.361	31	-0.31
G419	心血管病学进展	585	26	-0.49	0.410	25	-0.21
G260	心脏杂志	553	29	-0.52	0.406	26	-0.22
G610	胰腺病学	268	35	-0.77	0.366	30	-0.30
G234	中国动脉硬化杂志	934	15	-0.19	0.557	16	0.07
G267	中国实用内科杂志	2309	7	1.00	0.487	20	-0.06
G211	中国糖尿病杂志	1567	11	0.36	0.570	13	0.10
G380	中国心血管杂志	256	36	-0.78	0.225	37	-0.57
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	657	21	-0.43	0.562	14	0.08
G633	中国血液净化	680	19	-0.41	0.546	18	0.05
G119	中国循环杂志	694	18	-0.40	0.406	26	-0.22
G231	中华肝脏病杂志	3283	4	1.84	1.119	2	1.15
G235	中华高血压杂志	1168	14	0.01	0.730	8	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	166	38	-0.86	0.207	38	-0.60
G876	中华老年心脑血管病杂志	588	24	-0.49	0.442	21	-0.15
G155	中华内分泌代谢杂志	1612	10	0.40	0.897	5	0.73
G156	中华内科杂志	3484	3	2.02	0.788	7	0.52
G161	中华肾脏病杂志	1643	9	0.42	1.068	3	1.05
G285	中华消化内镜杂志	1314	13	0.14	0.578	12	0.11
G168	中华消化杂志	2571	5	1.23	1.025	4	0.97
G892	中华心率失常学杂志	494	30	-0.57	0.657	9	0.26
G170	中华心血管病杂志	4186	2	2.63	1.375	1	1.64
G172	中华血液学杂志	1501	12	0.30	0.489	19	-0.06
	平均值	1154			0.520		

以上数据摘自2009年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 177-178.