

自体树突状细胞联合抗病毒治疗对HBV慢性感染者的临床效应

佟立新, 刘树贤, 郭力红, 段卫, 陈白丽, 王海舫, 柳立平, 申伟, 王淑云

■背景资料

近年来随着生物疗法的进展, 人们对树突状细胞(DC)体外扩增和抗原致敏的研究已成为热点, 将其制备成特异DC疫苗用于慢乙肝的治疗已引起了广泛关注。

佟立新, 刘树贤, 郭力红, 段卫, 陈白丽, 王海舫, 柳立平, 申伟, 王淑云, 河北医科大学第一医院肝病中心 河北省石家庄市 050031

佟立新, 医学学士, 主任医师, 主要从事肝病临床治疗研究。

河北省科技厅资助项目, No. 04276101D-40

通讯作者: 刘树贤, 050031, 河北省石家庄市东岗路89号, 河北医科大学第一医院肝病中心. lzhao-002@163.com

电话: 0311-85917156

收稿日期: 2006-12-06 接受日期: 2007-01-10

Clinical effects of autologous dendritic cells combined with anti-virus therapy on chronic hepatitis B virus infection

Li-Xin Tong, Shu-Xian Liu, Li-Hong Guo, Wei Duan, Bai-Li Chen, Hai-Fang Wang, Li-Ping Liu, Wei Shen, Shu-Yun Wang

Li-Xin Tong, Shu-Xian Liu, Li-Hong Guo, Wei Duan, Bai-Li Chen, Hai-Fang Wang, Li-Ping Liu, Wei Shen, Shu-Yun Wang, Center of Liver Diseases, the First Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China

Supported by the Grants from Hebei Science and Technology Bureau, No. 04276101D-40

Correspondence to: Dr. Shu-Xian Liu, Center of Liver Diseases, the First Affiliated Hospital of Hebei Medical University, 89 Donggang Road, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China. lzhao-002@163.com

Received: 2006-12-06 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To evaluate the clinical effects of autologous HBsAg-loaded dendritic cells (DCs) combined with anti-viral treatment on patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: A total of 41 chronic HBV infected subjects were treated with single interferon- α -2b for 6 months before the trial, and the treatment was stopped for the irresponsive cases. Six months later, the irresponsive cases received the combined therapy of interferon- α -2b and autologous HBsAg-loaded DCs for another 6 months (one course containing twice of re-transfusion). The changes of virology, serology and biochemistry indexes were observed one month after the end of treatment.

RESULTS: DCs were cultured *in vitro*. After proliferation for 6 days, DCs were incubated with HBsAg for 1 day to prepare the specific DCs vaccine. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were significant decreased after the combined therapy as compared with those before ($t = 2.976, P < 0.01; t = 2.049, P < 0.05$). The response rate of HBV DNA was 53.7%, and the decrease of HBV DNA copies was greater than or equal to 2log10. Neither the injection times of DCs nor the HBV-carrying time had a correlation with the virological responses ($r = 0.048, P > 0.05; r = 0.137, P > 0.05$).

CONCLUSION: Combined treatment of autologous DCs vaccine and interferon- α -2b has a favorable effect on patients with chronic HBV infection.

Key Words: Dendritic cell; Hepatitis B virus; Combined treatment; Anti-virus

Tong LX, Liu SX, Guo LH, Duan W, Chen BL, Wang HF, Liu LP, Shen W, Wang SY. Clinical effects of autologous dendritic cells combined with anti-virus therapy on chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1232-1236

摘要

目的: 观察乙肝病毒(HBV)慢性感染者自体树突状细胞(DC)联合抗病毒治疗的临床效应。

方法: 采用自身前后对照试验, 对41例HBV慢性感染者在试验前均应用IFN- α -2b治疗6 mo, 无应答者停药6 mo后继续IFN- α -2b治疗6 mo, 同时联合自体DC回输治疗, 回输两次为一疗程。疗程结束后1 mo检测受试者病毒学、血清学、生化学指标, 在回输前后起始的检测指标均一致的基础上观察自身前后的变化。

结果: 体外培养扩增DC至第6天, HBsAg致敏形成特异性DC疫苗。DC回输后ALT和AST水平较回输前明显降低($t = 2.976, P < 0.01; t$

= 2.049, $P < 0.05$). HBV DNA应答率为53.7%, DNA拷贝数下降 $\geq 2\log_{10}$. DC回输次数与病毒学应答反应没有相关性($r = 0.048$, $P > 0.05$), HBV携带时间与病毒学应答反应亦没有相关性($r = 0.137$, $P > 0.05$).

结论: 自体DC回输联合IFN- α -2b治疗HBV慢性感染者, 生化学和病毒学单项应答反应均优于单纯IFN- α -2b治疗.

关键词: 树突状细胞; 乙型肝炎病毒; 联合治疗; 抗病毒

佟立新, 刘树贤, 郭力红, 段卫, 陈白丽, 王海航, 柳立平, 申伟, 王淑云. 自体树突状细胞联合抗病毒治疗对HBV慢性感染者的临床效应. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1232-1236
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1232.asp

0 引言

自1990年代初至今, 随着对树突状细胞(DC)的体外分离、扩增和培养技术方面的基础研究, 带动了临床研究的逐渐深入. 目前已发现了许多疾病的发生与转归都与DC有关. 因此通过对DC成熟过程中的改变来调节机体的免疫功能, 渴望达到治疗疾病的目的已成了研究的热点. 该研究采用特异性自体DC疫苗与抗病毒药物治疗相结合, 对HBV慢性感染者的临床效应进行了观察.

1 材料和方法

1.1 材料 选自我院肝病中心2004-05/2005-12门诊与住院的HBV慢性感染者41例, 其中慢性携带者22例, 慢性乙型肝炎(CHB)19例, 诊断标准符合2000年修订的《病毒性肝炎防治方案》^[1]. 受试者均不合并其他肝炎病毒感染, 亦不合并其他严重并发症(表1), 同时全部获得了知情同意. 主要仪器: CO₂培养箱(Thermo Forma, 美国), 倒置显微镜(Olympus, 日本), 流式细胞仪(Coulter, 美国), 全自动酶标仪(Thermo, 芬兰). 主要试剂: rhGM-CSF、rhIL-4、RPMI1640培养液、鼠抗人CD40、CD83, 均购自河北博海生物工程有限公司. HBsAg购自中国预防医学科学院病毒所.

1.2 方法 在无菌条件下抽取受试者外周静脉血20 mL, 肝素抗凝, 在百级试验室进行下面操作, 生理盐水1:1稀释抗凝血, 层加到淋巴细胞分离液2000 r/min离心30 min, 分离出外周血单核细胞并计数, 用1640液洗2次, 再加入含有体积分数150 mL/L人AB血清的1640完全培养基重

表1 41例受试者一般特征

诊断	n	性别		年龄(岁)						自觉症状	
		男	女	<20	20-	30-	40-	50-		有	无
慢性携带	22	15	7	2	11	5	4	0	5	17	
慢性肝炎	19	16	3	1	8	5	4	1	9	10	
合计	41	31	10	3	19	10	8	1	14	27	

悬细胞. 以 2×10^9 /L的细胞浓度加入一次性6孔培养板中, 于37℃ 50 mL/L CO₂饱和湿度下培养4 h, 吸弃上清液, 再用1640培养液轻洗2次, 除去非贴壁细胞, 加入含8335 μ kat/L rhGM-CSF和8335 μ kat/L rhIL-4的完全培养基, 隔日换液, 培养至第6天再加入终浓度为2.5 mg/L的HBsAg, 4 h后加入终浓度为10 μ g/L的TNF, 继续在37℃ 50 mL/L CO₂饱和湿度下培养1 d, 收获DC用生理盐水洗涤2次并计数, 即刻在受试者腋下部位常规消毒后经皮下注入体内^[2-6]. 同时取细胞洗液做无菌实验. 采用自身前后对照, 对41例HBV慢性感染者, 在试验前均应用IFN- α -2b 500万单位/次肌注隔日一次, 治疗6 mo无应答者停药6 mo后继续IFN- α -2b治疗6 mo, 同时联合自体DC回输治疗, 回输2次为一疗程(间隔2 wk). 治疗结束后1 mo, 观察受试者HBV DNA、乙肝五项及ALT、AST指标的变化. 在回输前后起始的检测指标均一致的基础上, 对DC回输前后做自身比较.

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示, 进行t检验. 计数资料用 χ^2 检验和Fisher精确概率检验以及等级相关分析(Spearman法). 全部资料均用SPSS10.0软件包处理.

2 结果

2.1 DC体外培养扩增 外周血单核细胞贴壁4 h后获得黏附细胞, 加入细胞因子24 h后贴壁细胞减少, 悬浮细胞渐增多, 随培养时间延长至第6天呈积聚现象, 并可见到悬浮细胞具有树突样突起(图1), 台盼蓝染色细胞存活率达95%以上.

2.2 外周血DC特征标志 DC培养第6天后, 经流式细胞仪检测DC表面CD83的表达(图2). 经组化免疫检测DC表面CD40的表达(图3).

2.3 HBsAg致敏DC 细胞培养至第6天, 加入终浓度为2.5 mg/L的HBsAg, 4 h后再加入终浓度为10 μ g/L的TNF继续培养1 d, 收获DC(图4).

2.4 41例HBV慢性感染者DC回输前后生化学指标的变化 结果显示, ALT, AST在DC回输前与回输后的生化学单项应答比较有明显差异($P < 0.01$, 表2).

■研发前沿

特异DC性疫苗对HBV慢性感染者的治疗已引起广泛关注, 为临床治疗开辟了新的途径. 但经体外扩增乃至用HBsAg致敏的DC, 其性质有可能有别于体内自然存在的微环境状态下的性质. 因此, 更应深入研究体内、外诸多因素与疗效的关联.

■应用要点

目前研究表明,机体的B细胞和T细胞介导的免疫反应是由DC所调控,从而激发免疫反应,使侵入机体的病毒得以清除.因此应用自体DC疫苗回输治疗HBV慢性感染的研究开辟了治疗学的新方向,应用前景广泛.

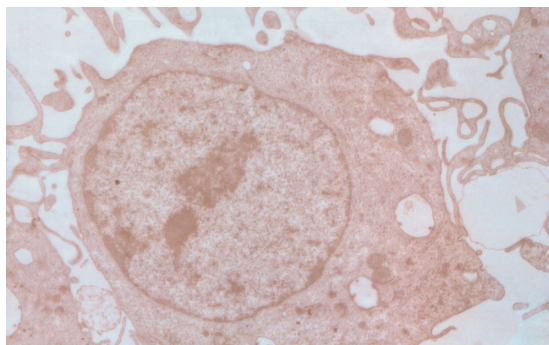


图1 培养第6天透射电镜下DC形态(×4000).

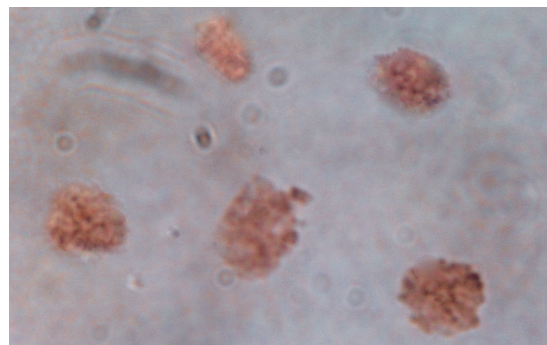


图3 免疫组化检测DC表面CD40的表达(×400).

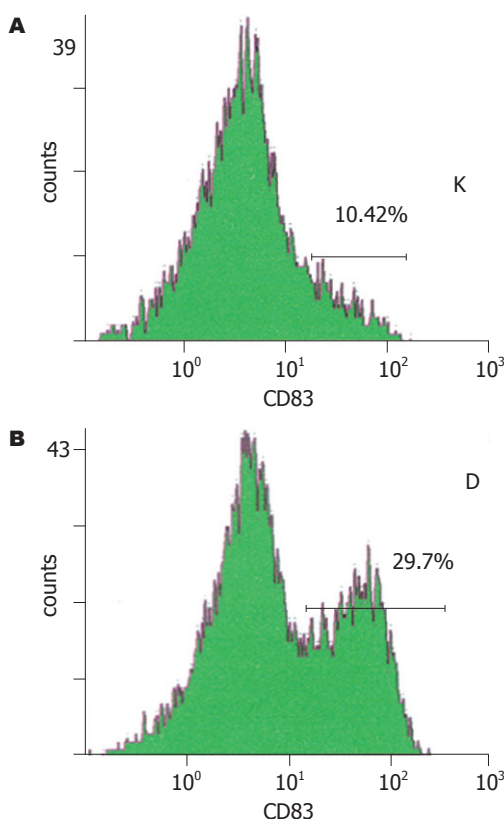


图2 流式细胞仪检测DC表面抗原分析. A: DC促成成熟前CD83表达; B: DC促成成熟后CD83表达.

2.5 41例HBV慢性感染者DC回输前、后血清学指标单项应答的变化 回输前HBsAg阳性数41例, HBsAb阳性数0例, HBeAg阳性数27例, HBeAb阳性数4例, HBcAb阳性数39例. 回输后, HBsAg阳性数41例, HBsAb阳性数0例, HBeAg阳性数27例, HBeAb阳性数3例, HBcAb阳性数41例. 以上数据显示了回输前后无显著性差异.

2.6 DC回输前后病毒学单项应答反应变化 结果显示, 回输前41例受试者均无应答反应, 但回输后完全应答4例、应答18例、无应答减至19例, 有统计意义, 病毒学单项总应答率达53.7%(表3).

2.7 自体DC回输次数与病毒学应答反应类型的

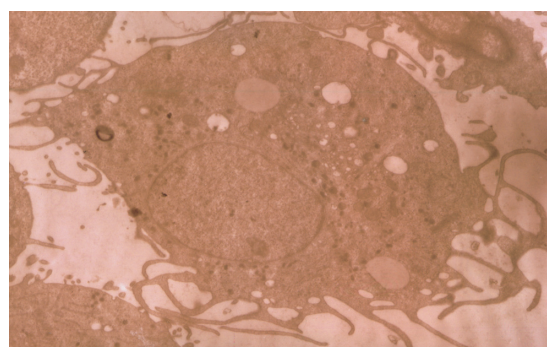


图4 培养结束收获DC透射电镜下形态(×3500).

表2 HBV慢性感染者DC回输前后生化指标单项应答比较(mean ± SD, IU/L)

分组	n	ALT	AST
IFN-α-2b	41	60.40 ± 31.43	54.29 ± 31.07
IFN-α-2b+DC	41	41.76 ± 24.92	41.80 ± 23.64
T值		2.976	2.049
P值		<0.01	<0.05

关系 结果显示, 自体DC回输次数与病毒学应答反应类型无直线相关关系, 作等级相关分析($r = 0.048$, $P > 0.05$, 表4).

2.8 HBV携带的时间与病毒学应答反应的关系 结果显示, 携带病毒时间与病毒学应答反应的类型无量效应关系, 等级相关分析($r = 0.137$, $P > 0.05$, 表5).

3 讨论

乙型肝炎病毒感染的慢性化是一个较大的群体, 在我国约占全世界的1/3. 每年由于慢性乙肝死亡的约30万例^[7-11]. 着眼于这方面的防治研究一直是国家的重点也是热点课题. 目前尚无理想方法根除体内HBV的情况下, 减缓或阻断慢性化进程是当前重要的治疗策略.

表 3 受试者DC回输前后病毒学单项应答反应比较($n = 41$)

分组	DC回输前后病毒学单项应答反应类型			总应答率(%)
	完全应答	应答	无应答	
IFN- α -2b	0	0	41	0/41(0.0)
IFN- α -2b+DC	4	18	19	22/41(53.7)
显著性检验	确切概率 $P = 0.058$	$\chi^2 = 21.45$ $P < 0.005$	$\chi^2 = 26.45$ $P < 0.005$	$\chi^2 = 26.45$ $P < 0.005$

表 4 自体DC回输次数与病毒学应答反应的关系(n)

回输次数	病毒学单项应答反应类型			合计
	完全应答	应答	无应答	
1-3	0	7	7	14
4-6	1	11	3	15
>7	3	0	9	12
合计	4	18	19	41

表 5 HBV携带时间与病毒学反应的关系(n)

持续时间(年)	病毒学单项应答反应类型			合计
	完全应答	应答	无应答	
<10	2	13	9	24
10-19	1	4	8	13
>20	1	1	2	4
合计	4	18	19	41

HBV感染后慢性化的形成与发展是非常复杂的过程, 其中宿主的免疫应答缺陷, 特别是细胞免疫功能低下, 不能产生有效的细胞毒性T细胞(CTL)反应, 导致了HBV的持续感染. 树突状细胞作为功能最强的抗原提呈细胞和免疫反应的启动者^[8-15], 在HBV感染后可能成为决定急性自限性感染或是慢性感染的标志. 随着对DC体外分离、扩增和培养技术方面基础研究的进展, 带动了临床治疗学研究的发展. 该研究在建立了DC体外分离、扩增以及HBsAg致敏的实验研究基础上, 对41例HBV慢性感染者进行自体回输特异性DC疫苗同时联合抗病毒药物治疗, 以自身前后对照设计模式, 作了临床观察. 依据慢性乙型肝炎防治指南的标准^[16], 采用单向应答标准, 对其效应分析如下: 受试者41例均为HBV慢性感染者, 经过IFN- α -2b治疗6 mo后, 在此基础上停药6 mo后再继续IFN- α -2b治疗, 同时联合自体特异性DC疫苗回输治疗. 实验结果显示, IFN- α -2b联合DC回输的干预措施, 单项生化学应答反应及单项病毒学应答反应均优于单纯IFN- α -2b的干预措施. 其ALT, AST复常或下降, DC回输前后比较有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$). 病毒学应答反应表现在HBV DNA载量下降或转阴, DC回输前后比较有统计学意义($P < 0.05$), 病毒学总应答率53.7%. 以上结果表明了自体特异性DC疫苗的治疗, 能够抑制病毒复制, 降低感染者的血清病毒载量. 有可能在于DC体外试验可促使其成熟和功能的完善, 回输体内后有利于促进

干扰素的抗病毒疗效, 而干扰素治疗又有诱导HBV慢性感染者血源性DC产生的作用, 或增加血源性DC的前体细胞, 使之易于向DC分化. 此种联合治疗的临床研究较为鲜见. 特别针对慢性携带状态的青年人群, 应采取积极的治疗措施, 尽早消除升学、就业、婚姻等问题的困惑.

研究还观察到自体DC回输次数与病毒学应答反应无直线相关关系. 表明了随着DC回输次数增加, 并不能改善病毒学应答反应. 当然这与体外获得的DC状态是否典型(如树突明显, 且发亮, 胞体折光性好, 有成簇的DC出现, 大量悬浮等)和DC的数量应越多越好有直接关系^[17-18], 并考虑到回输后的DC在体内维持其活性的时间长短等因素. 为此, DC疫苗的临床治疗效果与回输次数之间无明显的直接关系. 该研究还观察到了病毒学应答类型与HBV持续携带时间无量效应关系, 经等级相关分析. 在此基础上拟进一步扩大DC研究的范围, 从多学科、多因素、多中心的角度探讨与治疗效应有关的因素, 及因素与因素之间的交互作用的研究, 从而推进临床治疗学的进展.

总之, 针对HBV的免疫应答低下是病毒持续存在, 感染慢性化的主要原因^[19-26]. 因此, 重建宿主细胞免疫功能将是治疗措施之一^[27]. 但值得注意的是目前的研究结果大多是以体外培养扩增DC为研究重点, 而经体外培养扩增乃至用HBsAg冲激的DC, 其性质有可能有别于体内自然存在的微环境状态下的性质^[28-32]. 因此, 要客

■名词解释

1 树突状细胞(DC): 是起源于骨髓的最强的专职抗原提呈细胞(APC), 具有启动T细胞介导的免疫应答功能, 因其形态上具有许多突起而得名. DC在免疫应答中起了举足轻重的作用.

2 自身前后对照设计: 是指研究对象不分组, 将实验分为前后两个阶段, 第一阶段的治疗结束后, 经过洗脱期待药物残留效果在体内完全消失, 再开始第二个阶段的治疗, 在治疗结束后比较两种措施的效果. 此种设计可比性好, 消除了不同个体间的差异, 减少了偏倚.

■同行评价

DC自体回输,是近几年抗病毒研究的一个热点,利用HBV特异蛋白在体外预先制备的DC而制成自体疫苗可望成为未来的治疗办法。文章有一定的新颖性,方法可靠,结果可信,有实际意义。

观的对待体外DC研究的结果。更应注意DC双重性作用。人体的免疫调节,实为一个非常复杂的,多位点的调控系统,对今后DC的制备和应用的研究,要进一步作出一套相适应的质控标准和在临床应用方面的规范条件。

致谢: 本文得到王锡育主任的大力帮助, 张明辉副主任、马文波、解从君、张丽霞、刘静医师的参加, 一并致谢。

4 参考文献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 2 Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 1999; 223: 1-15
- 3 李用国, 罗云萍, 梁增伟, 任红. 人外周血树突状细胞的体外培养扩增. 重庆医科大学学报 2001; 26: 1-3
- 4 周雨迁, 詹俊, 邓庆丽, 黄志清, 邵静, 智慧, 黄志明. 慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定. 胃肠病学和肝病学杂志 2001; 10: 256-260
- 5 Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93
- 6 朱学军, 曹雪涛, 于益芝, 雷虹, 万涛, 陈国友, 马施华. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定. 中国肿瘤生物治疗杂志 1997; 4: 191
- 7 贾继东, 庄辉. 中国慢性乙型肝炎治疗进展研讨会会议纪要. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 698-699
- 8 曹雪涛. 树突状细胞的研究热点及其与疾病的防治. 中华医学杂志 1999; 79: 163-165
- 9 张锦堃, 陈海滨, 孙劲旅, 周燕琼. 树突状细胞对不同诱导时间LPAK抗肝癌作用的影响. 世界华人消化杂志 1999; 7: 673-675
- 10 韩进超, 臧国庆, 余永胜. 树突细胞的成熟状态和慢性病毒性肝炎. 国外医学·流行病学传染病学分册 2005; 32: 54-57
- 11 刘源, 李军. 树突细胞与慢性乙型肝炎相关性研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2004; 31: 79-81
- 12 高泽立, 许洁, 陈同辛. 树突细胞功能与乙型肝炎病毒感染慢性化的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2005; 32: 299-301
- 13 邱双健. 树突状细胞与肝癌的免疫逃逸. 世界华人消化杂志 2005; 13: 429-431
- 14 罗治彬, 徐采朴, 王东, 王阁, 肖世全, 朱高友, 房殿春. 致敏树突细胞及其亚细胞成分对荷胃癌小鼠的免疫治疗作用研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 9-12
- 15 罗治彬, 徐采朴, 朱高友, 张朋斌, 郭朝华, 罗元辉, 房殿春, 罗成基. mRNA致敏树突细胞对胃癌的免疫治疗作用研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 13-15
- 16 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
- 17 Ninomiya T, Akbar SM, Masumoto T, Horiike N, Onji M. Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1999; 31: 323-331

- 18 Egea E, Iglesias A, Salazar M, Morimoto C, Kruskall MS, Awdeh Z, Schlossman SF, Alper CA, Yunis EJ. The cellular basis for lack of antibody response to hepatitis B vaccine in humans. *J Exp Med* 1991; 173: 531-538
- 19 李用国, 陈敏, 张大志, 王志毅, 曾维群, 石小枫, 郭渊, 郭树华, 任红. 自体树突状细胞疫苗治疗慢性乙型肝炎的临床研究. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 206-208
- 20 张书广, 赵歧刚, 李友忠. 树突状细胞疫苗的制备及治疗慢性乙型肝炎的疗效观察. 山东医药 2005; 45: 7-9
- 21 Tavakoli S, Schwerin W, Rohwer A, Hoffmann S, Weyer S, Weth R, Meisel H, Diepolder H, Geissler M, Galle PR, Lohr HF, Bocher WO. Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2004; 85: 2829-2836
- 22 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response *in vitro*: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495
- 23 Akbar SK, Onji M. Hepatitis B virus (HBV)-transgenic mice as an investigative tool to study immunopathology during HBV infection. *Int J Exp Pathol* 1998; 79: 279-291
- 24 Shimizu Y, Guidotti LG, Fowler P, Chisari FV. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 1998; 161: 4520-4529
- 25 李用国, 梁增伟, 蔡大川, 兰英华, 周卫平, 任红. 树突状细胞体外激活的CTL杀伤效应. 重庆医科大学学报 2003; 28: 138-139, 165
- 26 Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* 1998; 161: 1947-1953
- 27 Whitmire JK, Ahmed R. Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 448-455
- 28 汤多壮. 树突细胞体外扩增及其修饰在肿瘤免疫治疗中的应用. 国外医学·输血及血液学分册 2006; 29: 246-248
- 29 Zhou ZH, Wang JF, Wang YD, Qiu YH, Pan JZ, Xie W, Jiang LY, Klein B, Zhang XG. An agonist anti-human CD40 monoclonal antibody that induces dendritic cell formation and maturation and inhibits proliferation of a myeloma cell line. *Hybridoma* 1999; 18: 471-478
- 30 Tarte K, Fioll G, Rossi JF, Klein B. Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen uptake, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation *in vitro*. *Leukemia* 2000; 14: 2182-2192
- 31 Loudovaris M, Hansen M, Suen Y, Lee SM, Casing P, Bender JG. Differential effects of autologous serum on CD34(+) or monocyte-derived dendritic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 569-578
- 32 Bai L, Feuerer M, Beckhove P, Umansky V, Schirmacher V. Generation of dendritic cells from human bone marrow mononuclear cells: advantages for clinical application in comparison to peripheral blood monocyte derived cells. *Int J Oncol* 2002; 20: 247-253