

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)18-1663-03

双功能抗体抗 CD3/抗 CyclinD1 的制备及对子宫内膜癌细胞的杀伤作用

曲 群, 彭慧霞, 宗 璐, 赵 玲, 段 钊, 杜稳侠 (西安交通大学第二医院妇产科, 陕西 西安 710004)

The preparation of anti-CD3/antiCyclinD1, bispecific monoclonal antibody And killing effect on the endometrial carcinoma cells

QU Qun, PENG Hui-Xia, ZONG Lu, ZHAO Ling, DUAN Zhao, DU Wen-Xia

Department of Gynecology & Obstetrics, Second Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

【Abstract】 AIM: To investigate and prepare anti-CD3 and anti-CyclinD1 BsAb and to discuss the feasibility of treating the cervical cancer with active immunity. **METHODS:** The mAb of anti-CD3 and anti-CyclinD1 were cross-linked to be the bispecific monoclonal antibodies (BsAb), which induced the killing effects on the cells of endometrial carcinoma. **RESULTS:** The killing rate of the bispecific monoclonal antibody induced effect cells to target cells was 61.23%, which was higher than that of the anti-CD3 (42.15%) ($P < 0.01$). This killing rate enhanced along with the elevation of effect-target ratio (78.96%). **CONCLUSION:** The bispecific monoclonal antibody, cross-linked by BsAb of anti-CD3 and anti-CyclinD1 has the clinical feasibility of treating the endometrial carcinoma with active immunity.

【Keywords】 endometrial neoplasms; anti gens, CD3; antibodies, monoclonal; anti CyclinD1; antibodies, bispecific

【摘要】目的: 制备抗 CD3/抗 CyclinD1 双功能抗体, 探讨子宫内膜癌主动免疫治疗的可行性。方法: 以化学交联方法将抗 CD3 单克隆抗体与抗 CyclinD1 单克隆抗体交联为双功能抗体, 进行介导对子宫内膜癌细胞的杀伤作用。结果: 该双功能抗体介导效应细胞对靶细胞的杀伤率为 61.23%, 高于单抗 CD3 (42.15%) 的介导作用 ($P < 0.01$), 并随着效靶比的提高杀伤率也升高 (78.96%)。结论: 采用化学交联法制备的抗 CD3/抗 CyclinD1 双功能抗体具有主动免疫治疗宫颈癌的临床可行性。

【关键词】 子宫内膜肿瘤; 抗原, CD3; 抗体, 单克隆; 抗 Cy-

收稿日期 2004-04-22; 修回日期 2004-07-08

基金项目 陕西省科技攻关项目(2001K10-G5)

通讯作者: 曲 群 (1956-), 女(汉族), 河南省偃师市人, 副教授。Tel.

(029) 87679479 Email: qu-qun21956@Sina.com

clinD1 抗体, 双特异性

【中图分类号】R733.7 【文献标识码】A

0 引言

肿瘤生物治疗是目前研究的热点, 研制特异性高效免疫制剂是生物治疗的关键。双功能抗体具有导向抑制肿瘤细胞生长的活性, 可以同时结合靶细胞(肿瘤细胞)和效应细胞(淋巴细胞), 在两者之间架起桥梁, 增加对肿瘤细胞的杀伤活性。T 细胞是人体内最重要的一类免疫细胞, 基于激活 T 细胞来选择性杀伤肿瘤细胞的抗 CD3/抗肿瘤的双功能抗体的研制在目前最为常见, 在临床上具有较好的应用前景^[1]。我们以化学方法制备抗 CD3/抗 CyclinD1 双功能抗体, 探讨其在子宫内膜癌免疫治疗中的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI1640 为 Gibco/BRL 公司产品, 二巯基苏糖醇(DTT)、N-琥珀亚胺-3-(2-吡啶二硫基)丙酸盐(SPDP)、小牛血清均为美国 Sigma 公司产品, MTT 为 Promega 公司产品, DMSO 为西安化学试剂厂产品。鼠抗 CyclinD1 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品, 抗 CD3 单克隆抗体购于北京中山生物工程公司。子宫内膜癌细胞株 HEC-1A 本室冻存。靶细胞 HEC-1A 细胞, 在 37℃ 50 mL/L CO₂ 条件下, 培养于含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 约 2~3 d 传代 1 次, 保持细胞在对数生长期。人外周血淋巴细胞(PBLS)来自健康献血者。

1.2 方法

1.2.1 双特异性抗体(BsAb)制备 按文献[2]方法进行, 略加改进。将纯化的抗 CyclinD1 单抗和抗 CD3 单抗各 1 g/L, 在 4℃ 下, pH 7.5 PBS 透析过夜, 用无水乙醇将 SPDP 完全溶解, 取 SPDP 按 8 倍的体积比, 分别加入浓度均为 0.5 g/L 的 CyclinD1 单抗和抗 CD3 单抗的透析袋中, 轻轻混匀, 置室温下反应 30 min, 4℃ 下分别以 0.1 mol/L pH 4.5 醋酸盐缓冲和 0.1 mol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液透析, 每 3 h 换透析液 1 次, 共 3 次, 将抗 CyclinD1 单抗和抗 CD3 单抗混合, 加入终浓度为 50 mmol/L 的 DTT, 摇匀 25℃ 反应 30

min 再于 4℃ 下对 PBS 透析过夜, 间隔 4 h 换透析液 1 次, 共 4 次, 转入离心管内离心 10 min (8000 r/min), 收集上清, 紫外分光光度计下测量蛋白浓度, 用 0.23 μm 的滤膜过滤除菌备用。

1.2.2 BsAb 对淋巴细胞增殖活性的影响 分离外周血淋巴细胞, 调整至细胞数 $2 \times 10^8/L$, 于 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 分别加入各种相应抗体, 总体积 200 μL, 各做 3 个平行样, 将加好样的 96 孔板于 50 mL/L CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 72 h, 每个样孔加入 5 μL [³H]TdR (1.85×10^4 Bq) 37℃ 继续培养 16 h. 用多头细胞收集器收集各孔细胞悬液至玻璃纤维滤纸上, 42℃ 烘干, 每孔收集物浸入 2 mL 闪烁液, 液闪计数。

1.2.3 细胞毒试验 采用 MTT 法^[3]。活细胞, 特别是增殖期的细胞可通过线粒体代谢过程中的琥珀酸脱氢酶的作用, 使淡黄色的四甲基偶氮唑盐 (MTT) 还原为蓝紫色结晶。结晶的形成量与活细胞数呈正相关。MTT 法可间接测定 CTL 细胞对靶细胞的杀伤能力。以 HEC-1A 细胞作为靶细胞, CTL 细胞作为效应细胞。效应细胞与靶细胞的比例为 40:1, 80:1。将两者混合后放于 37℃ 50 mL/L CO₂ 孵箱中 16 h, 加入 MTT 作用 4 h, 以 DMSO 显色, 振荡 10 min, 酶联检测仪测 A_{570 nm} 值。对靶细胞的杀伤百分率 = (靶细胞对照孔 A 值 - 实验孔 A 值) / 靶细胞对照孔 A 值 × 100%

统计学处理: 采用单因素方差分析, 所有数据均经 SPSS10.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 不同抗体对淋巴细胞增殖活性的影响 BsAb 组和抗 CD3 组对淋巴细胞增殖均有促进作用, 但抗 CD3 单抗对淋巴细胞增殖作用更明显。两组与抗 CyclinD1 单抗及对照组相比均有显著差异 ($P < 0.01$, Tab 1)。

表 1 3 种抗体对淋巴细胞增殖活性的影响

Tab 1 Influence of three antibodies to lymph cell proliferating capability ($n = 3, \bar{x} \pm s, Bq/hole$)

t/d	CD3McAb	CyclinD1 McAb	BsAb	Control
0	3924 ± 412	1962 ± 342	3102 ± 324	3486 ± 467
0.5	60823 ± 362 ^b	2943 ± 524	46283 ± 281 ^b	3642 ± 543
1	66981 ± 214 ^b	3021 ± 493	49412 ± 423 ^b	3753 ± 392

^b $P < 0.01$ vs CyclinD1 McAb and control.

2.2 BsAb 介导免疫活性细胞对子宫内膜癌细胞的杀伤效应 当效靶比为 80:1 时, 淋巴细胞在不同抗

体作用下对癌细胞毒性作用较 40:1 时明显增强; BsAb 与抗 CyclinD1 和 CD3 单抗相比均有显著差异 ($P < 0.01, P < 0.05$, Tab 2)。

表 2 BsAb 介导免疫活性细胞对子宫内膜癌细胞的杀伤效应
Tab 2 Killing effect of BsAb induced immuneactive cell on the endometrial carcinoma ($n = 3, \bar{x} \pm s, \%$)

Antibodise	Effect-target ratio	
	40:1	80:1
CyclinD1 McAb	4.02 ± 3.4	8.75 ± 2.1
CD3 McAb	42.15 ± 2.2	59.42 ± 3.6
BsAb	61.23 ± 4.6 ^{ab}	78.96 ± 3.4 ^{ab}

^a $P < 0.05$ vs CD3 McAb; ^b $P < 0.01$ vs CyclinD1 McAb.

3 讨论

子宫内膜癌发病率在我国妇科恶性肿瘤中居第 2 位^[4], 手术后复发患者是子宫内膜癌治疗中的棘手问题。若采取手术, 放疗并辅助以生物治疗, 可能会有更好的治疗效果。细胞周期调节失控, 是肿瘤发生的重要机制。近年研究认为, 细胞周期素 D1 (CyclinD1) 基因参与肿瘤的发生、发展, CyclinD1 基因扩增和高表达能导致细胞调控机制平衡紊乱和细胞增生失控^[5]。人类 CyclinD1 基因定位于 11 号染色体上, 有 292 个氨基酸组成, 在哺乳动物正常细胞 G1/S 期转变的起始阶段起着重要作用, 已成为比较肯定的原癌基因^[6]。众多实验表明 CyclinD1 在子宫内膜癌中高表达^[7,8]。推测 CyclinD1 是子宫内膜癌的肿瘤基因蛋白, 并且具有抗原的理化特性。由于大多数肿瘤的抗原呈机制缺陷, 以及肿瘤抗原的个体差异和弱免疫原性, 加之肿瘤的抗原调变, 很难做到用特异性抗原肽刺激 T 细胞活化, 以治疗肿瘤。T 细胞是人体主要免疫活性细胞, 抗 CD3 单抗能激活 T 淋巴细胞, 使杀伤性 T 细胞 IL-2 受体表达增多, 刺激 CTL 对肿瘤细胞发挥细胞毒作用, 而对正常细胞安全无毒, 从而使 T 细胞分裂增殖及细胞毒性增强。应用针对特异肿瘤抗原的单克隆抗体对肿瘤进行治疗是肿瘤免疫疗法的重要组成部分, 尽管单抗的针对性强, 半衰期也长且能介导 CDC 及 ADCC 作用, 但很难穿透肿瘤发挥杀伤作用。双功能抗体其作用机制在于以双特异性抗体作为连接桥, 将肿瘤细胞和免疫效应细胞连接在一起, 使免疫效应细胞能导向性地、更有效地杀伤肿瘤细胞。双功能抗体将单克隆抗体的高度特异性和细胞毒细胞杀伤效应结合起来, 提高了细胞毒细胞的特异性杀伤作用^[9]。我们采用化学方法成功得到抗 CD3/抗 CyclinD1 双功能抗体, 此抗体对淋

巴细胞有较强的增殖活性,并能显著提高对癌细胞的杀伤作用,其介导效应细胞对靶细胞的杀伤率高于抗 CD3 单抗的介导作用,并随着效靶比的提高而升高。提示所制备的抗 CD3/抗 CyclinD1 双功能抗体同时具有效应性和特异性导向肿瘤细胞的的双重功能,既可与子宫内膜癌细胞(靶细胞)结合,又可与激活效应细胞(淋巴细胞)结合,激活效应细胞,最终表现为肿瘤坏死和生长抑制。

我们应用化学方法,制备抗 CD3/抗 CyclinD1 双功能抗体,具有制备周期短、易于分离等特点,并具有使效应细胞靶向杀伤肿瘤细胞的可能性。本实验为进一步的研究打下了基础。

【参考文献】

- [1] 熊冬生,刘汉芝,杨纯正,等. 抗 CD3/抗 CD20 微型双功能抗体裸鼠体内分布研究[J]. 中国肿瘤临床, 2001, 28(5): 375-379.
Xiong DS, Liu HZ, Yang CZ, et al. Distribution of anti-CD3/CD20 diabody in human lymphoma node mouse xenograft model[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2001, 28(5): 375-379.
- [2] Chen Y, Yang SC, Luo H. A chermira antibody erythroimmunoassay for detecting HBsAg in human sera[J]. *Res Virol*, 1990, 141(3): 337-339.
- [3] Mario F, Mario CF, Anna MI. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro* [J]. *Immunol Meth*, 1990;

- 131(2): 165-172.
- [4] 连丽娟. 林巧稚妇科肿瘤学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 1996: 449.
- [5] 谭立军,沈忠英,汤雪明. 细胞周期调控与肿瘤[J]. 肿瘤, 1997; 17(5): 295-297.
Tan LJ, Shen ZY, Tang XM. Cell cycle regulation and tumour[J]. *Cancer*, 1997, 17(5): 295-297.
- [6] Kurzrock R, Ku SMS, Tatpz MMd. Abnormalities in the PRAD (CyclinD1/BCL-1). Oncogene are frequent in cervical and vulvar squamous cell carcinoma celllines [J]. *Cancer*, 1995; 75(2): 584-590.
- [7] 贺书云,辛晓燕,王健. 基因 p16 及 Cyclin D1 在子宫内膜癌中的表达及意义[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(3): 347-349.
He SY, Xin XY, Wang J. Expression of p16 and Cyclin D1 in uterine endometrial carcinomas and its significance [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2000, 21(3): 347-349.
- [8] 韦淑琴,邹丽红,孙云桥. p16 蛋白与细胞周期蛋白 D1 在子宫内膜癌中的表达及临床意义[J]. 中国癌症杂志, 2000, 10(6): 502-506.
Wei SQ, Zou LH, Sun YQ. Expression of p16 and cyclin D₁ in endometrial carcinomas and their clinical significance [J]. *Chin Oncol*, 2000, 10(6): 502-506.
- [9] Renner C, Bauers V. Cure of disseminated xenografted human T-cell subset in a preclinical model [J]. *Blood*, 1996, 87(7): 191-194.

编辑 甄志强

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)18-1665-01

产科并发症子宫切除 18 例

徐苑苑,王双程,洁,庄玉梅

(解放军 451 医院妇产科,陕西西安 710054)

【关键词】产科,并发症,子宫切除

【中图分类号】R713.42 【文献标识码】B

1 临床资料 1983-01/2003-12 分娩总数 21 863 例,剖宫产 5183 例,子宫切除 18 例,占 0.082%。其中围产期子宫切除 16 例,产后 3 wk 子宫切除 2 例。年龄 23~35(平均 28)岁,初产妇 13 例,经产妇 5 例,孕 37~40 wk 12 例,孕 40~42 wk 6 例。子宫切除指征:子宫收缩乏力 11 例,前置胎盘 3 例,胎盘植入 2 例,剖宫产子宫切口感染 2 例。子宫切除术式及出血量:17 例子宫次全切除,1 例子宫全切除,出血量 1600~3100(平均 1900) mL。剖宫产子宫切除 13 例,占 0.059%,阴道分娩子宫切除 5 例,占 0.022%。发生失血性休克 10 例,经输血、补液,及时行子宫切除,无一例发生死亡。围产儿总数 20 例,2 例为双胞胎,巨大儿 3 例,轻度窒息 2 例,重度窒息 3

例。经抢救全部存活。伤口感染者 6(33.3%),可能与手术时间过长,再次进腹切除子宫有关。

2 讨论 产科子宫切除术是抢救产妇生命的有效措施^[1]。产后出血宫缩乏力较为常见,占 70%~80%^[2](本文占 55.56%)。本文剖宫产子宫切除发生率高于阴道分娩子宫切除发生率,为 2.6 倍,与国外报道的 2~3 倍基本一致^[3]。由于剖宫产较阴道分娩出血量多 1 倍,容易发生产后出血,本文晚期产后出血切除子宫 2 例均为子宫切口感染造成,所以应严格掌握剖宫产指征。子宫切除术式首选子宫次全切除术,此术式不仅简单、快速、出血少,且由于保留了一部分子宫组织有月经功能,有利于康复后妇女的内分泌及身心健康。产科子宫切除术是抢救产科出血、防止产科 DIC 安全有效的措施,因发病年龄的妇女均在生育期,术后可使患者丧失生育功能。所以应严格掌握时机及指征,降低孕产妇死亡率的发生。

【参考文献】

- [1] 刘志蓉. 产科子宫切除 28 例临床分析[J]. 实用妇产科杂志, 2002, 18(1): 53-54.
- [2] 耿正惠,曹斌融. 全国妇产科出血学术研讨会会议纪要[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2001; 17(9): 152-153.
- [3] Radeka G, Milasinovic L, Vejnovic T, et al. Cesarean hysterectomy in modern obstetrical practice from 1968 to 1993 [J]. *Med Pregl*, 1997, 50(9-10): 375-376.

收稿日期 2004-07-09; 修回日期 2004-07-13

作者简介 徐苑苑(1957-),女(汉族),山东省掖县人。本科,副主任医师。Tel. (029)82257072 Email. xuyuan2004@yahoo.com.cn

编辑 潘伯荣