

抗 CML 特异性 T 细胞的诱导和细胞毒作用分析

杨力建,李扬秋,陈少华,张学利,张 涛

关键词:慢性粒细胞白血病;T 细胞培养;细胞毒作用

中图分类号:R733.74;R371.22

文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2004)10-0644-02

0 引言

诱导特异性抗白血病免疫应答,而应用于开展白血病患者的特异性过继性免疫治疗,清除微小残留病变一直是众多研究人员的研究目标。本研究应用混合淋巴细胞肿瘤细胞培养(MLTC)和 LDH 方法分析 CML 细胞诱导自体 and 异体 T 细胞的特异性细胞毒活性作用,为特异性免疫治疗提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 标本

收集经细胞形态学、组织化学和细胞遗传学确诊初发未治慢性粒细胞白血病患者 1 例和 1 例正常人外周血,分别分离单个核细胞(MNC),利用 MACS 磁珠分选仪和 CD3 单抗阳性分选 CD3⁺ 细胞(总 T 细胞),并收集 CML 患者 CD3⁻ 细胞(主要为 CML 细胞)。

1.2 T 细胞液体培养

1.2.1 刺激细胞 经磁珠分选 CML 患者外周血的 CD3⁻ 细胞(CML 细胞),经丝裂霉素 C(mitomycinC,MMC,50 μg/mL)处理后,用做诱导 T 细胞特异性扩增的刺激细胞。

1.2.2 T 细胞培养 T 细胞培养分 CML 自体 T 细胞和异基因 T 细胞两类,每类分 3 组,分别为外周血 T 细胞+CML 细胞组,外周血单个核细胞+CML 细胞组和外周血 T 细胞单独培养组,单个核细胞和 CD3⁺ 细胞(终浓度 1 × 10⁶/mL)按实验要求加入或无刺激细胞,以效应细胞与刺激细胞之比 10:1 的比例,置于诱导体系培养,诱导体系包括:15%胎牛血清、抗 CD3 单抗(1μg/mL)、抗 CD28 单抗(0.6 μg/mL)、rhIL-2(500U/mL)、2-巯基乙醇(50μmol/L)、及青、链霉素各 100U/mL。3~5 天后视细胞生长情况半量换扩增体系[15%胎牛血清、rhIL-2(250U/mL)、青、链霉素各 100U/mL]并补加刺激细胞,如此循环。收集培养 2 周 T 细胞进行细

胞毒活性试验。

1.3 靶细胞培养 将磁珠分离出来的 CD3⁻ 细胞(CML 细胞)配成 1 × 10⁶/mL 的细胞悬液,在含 10%FBS、100U/mL 青、链霉素的 RPMI1640 培养液中作维持培养。

1.4 CTL 活性试验 以 LDH 检测试剂盒进行细胞毒性试验,操作按产品手册进行。分别以培养后 T 细胞为效应细胞,以维持培养的 CML 细胞为靶细胞。效靶比为 20:1,置 U 型 96 孔培养板内,于 37 ℃,5%CO₂ 饱和湿度培养箱中孵育 4h。用 1000r/min 离心 5min,吸取上清 100μl 加入平底酶标板中,加入 100μl LDH 底物反应液,室温下避光作用 30min,每孔加 50μl 1N 盐酸终止酶促反应。Elx-800 酶标仪测定 OD 值,测定波长 490nm,参考波长 670nm。同时,检测诱导后各组 T 细胞对 CML 细胞的细胞毒活性,以及混合淋巴细胞反应(MLR)情况。细胞毒性计算公式如下:

CTL 活性(%) =

$$\frac{\text{实验组 OD 值} - \text{效应细胞自然释放组 OD 值} - \text{靶细胞自然释放组 OD 值}}{\text{最大释放组 OD 值} - \text{靶细胞自然释放组 OD 值}} \times 100\%$$

2 结果

各组培养 T 细胞均生长良好,在培养 2 周时收集培养 T 细胞进行细胞毒性分析结果,见表 1。CML 患者自体 and 正常人外周血单个核细胞或分选 T 细胞经 CML 细胞诱导扩增后,对 CML 细胞均具有很高的细胞毒活性,而未经 CML 细胞诱导的 T 细胞体外扩增后,对 CML 细胞也有一定的细胞毒活性。正常人 T 细胞对患者的正常 T 细胞,或患者 T 细胞对正常人 T 细胞均存在低水平的细胞毒性作用。

3 讨论

特异性抗白血病细胞免疫治疗是目前认为比较理想地清除残留白血病细胞的方法,异基因造血干细胞移植后复发的 CML 患者,经输注供者淋巴细胞(DLI)后,可以再次获得缓解,证实了输入的 T 细胞获得了抗 CML 作用,多个研究报道也证实了供

基金项目:国家教育部《高等学校骨干教师资助计划》资助项目(教技司[2000]65号)、广东省科技计划资助项目(2KM05403S)和广东省教育厅“千百十工程”(校级)优秀人才培养基金资助项目(粤教科[2000]21号)

作者单位:510632 广州,暨南大学医学院血液病研究所

表 1 培养后几种效应细胞对靶细胞的细胞毒作用比较

靶细胞	效应细胞					
	CML 患者			正常人		
	MNC+ CML 细胞	CD3 ⁺ 细胞 +CML 细胞	CD3 ⁺ 细胞	MNC+ CML 细胞	CD3 ⁺ 细胞 +CML 细胞	CD3 ⁺ 细胞
CML 细胞	89.04%	100 %	63.34%	100 %	100 %	75.8%
CMLCD3 ⁺ 细胞				16.53%	16.66%	19.68%
正常人 CD3 ⁺ 细胞	14.12%	16.66%	16.66%			

者 T 细胞在患者体内进行特异性克隆性增殖,发挥了移植物抗宿主效应(GVL)。本研究分析 CML 患者自体 T 细胞和正常人 T 细胞经 CML 细胞诱导后体外扩增和细胞毒活性情况。初步的分析结果显示来自 CML 患者的单个核细胞或分选的 T 细胞经自体 CML 细胞诱导后,对自体 CML 均具有很高的细胞毒作用,可达到 100% 杀伤效应,显示了特异性诱导的效应,而未经 CML 诱导的单纯 T 细胞体外扩增后,对 CML 细胞的杀伤作用则比较低,由于没有特异性抗原存在的情况下,T 细胞的扩增为非特异性扩增,所以并非所有增殖的 T 细胞都具有对 CML 细胞的特异性杀伤效应,提示肿瘤抗原诱导增殖的重要性。我们的前期研究也曾发现经白血病抗原诱导的 T 细胞体外扩增后,显示了 TCRV β 亚家族克隆性增殖情况,而未经抗原诱导的 T 细胞体外扩增均以多克隆性形式存在。理论上,自体 T 细胞对自

体 CML 细胞的杀伤活性应较异基因 T 细胞强,但由于异基因 T 细胞同时还存在 GVHD 效应,所以研究结果显示异基因 T 细胞的细胞毒活性略强于自体 T 细胞,可能与此作用有关,这一点也可以从 MLR 的结果中看到,无论是患者 T 细胞还是正常人 T 细胞对异基因 T 细胞均存在 15% ~ 20% 左右的细胞毒性作用。但由于本研究报道的例数上,有待进一步扩大病例数,提供统计学分析结果。

体外研究结果显示 CML 诱导自体 and 异基因 T 细胞均具有良好的特异性杀伤效应,由于自体 T 细胞来源上,远远不能满足细胞免疫治疗的需要,发展特异性异基因 CTL 可能是更为可行的方法,可通过体外诱导扩增 T 细胞后,分析其克隆性,再分选出克隆性增殖的特异性 CTL,从而减少 GVHD 效应。

[编辑校对:张麟]

(上接第 643 页)

Charles 等^[4]发现在人类中枢神经肿瘤中神经元型 NOS 与内皮型 NOS 随肿瘤恶性程度的增高表达也相应增强。Norri 等^[5]的研究表明血管内皮生长因子介导的细胞迁移和促进新血管形成过程中,eNOS 和 nNOS 起一定的作用。肿瘤血管生成是一个多因素参与的复杂过程,NOS 在其中有重要的作用,血管形成机制还有待于进一步探讨。

(本文图见封 2)

参考文献:

[1] Jenkins DC, Charles IG, Thomse LL. Role of nitric oxide in tumor growth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92 (3): 4392-4396.
 [2] Guo FH, Deraeve HR, Rice TW, et al. Continuous nitric oxide

synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92 (4): 7809-7813.
 [3] Iwata S, Nakagawa K, Harada H, et al. Endothelial nitric oxide synthase expression in tumor vasculature is correlated with malignancy in human squamous cell carcinoma of the lung[J]. Neurosurgery, 1999, 45 (1): 24-29.
 [4] Charles S, Cobbs JA, et al. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors[J]. Cancer Res, 1995, 15 (55): 727-730.
 [5] Norri E, Lee E, Testa J, et al. Podokinase in endothelial cell migration: role of nitric oxide[J]. Am J Physiol, 1998, 274: C 236-244.

[编辑:贺文;校对:杨卉]