

包被抗人 CD3 单克隆抗体对 CIK 细胞生长影响的研究

王 岩¹, 刘蓉芳¹, 晁玉琴² (河南省驻马店肿瘤医院: 1. 医学生物细胞室; 2. 检验科 463000)

【摘要】 目的 通过对比包被和未包被抗人 CD3 单克隆抗体培养瓶中的杀伤细胞(CIK 细胞)生长状态及培养一段时间后收集的细胞数, 研究在临床常用培养 CIK 细胞的方法上, 后续增加对培养瓶进行包被抗人 CD3 单克隆抗体的预处理后, 对 CIK 细胞生长的影响。**方法** 提取健康者的外周血单个核细胞(PBMC), 无血清培养液调整好细胞浓度, 在 75 cm² 密封盖培养瓶中定量加入包被和未包被抗人 CD3 抗体, 以及 IFN- γ 。培养 24 h 后加入 CIK 混合刺激因子, 以后每天观察细胞的生长情况, 根据细胞的生长情况进行传代扩增(扩增至未包被的培养瓶中), 第 12 天收集细胞进行比较。**结果** 包被抗人 CD3 抗体的 75 cm² 密封盖培养瓶培养的 CIK 细胞, 在培养第 3 天即可进行传代扩增, 以后每天都可进行扩增; 用未包被抗人 CD3 抗体 75 cm² 密封盖培养瓶培养的 CIK 细胞在第 5 天才可进行传代扩增, 以后每隔 1 d 可以进行扩增, 第 12 天收集的细胞总数未包被的为 1.2×10^9 , 包被的为 3.3×10^9 。**结论** 包被细胞因子抗人 CD3 单克隆抗体对正常条件培养的 CIK 细胞生长状态和较短时间内收获的 CIK 细胞总量有很好的正影响。

【关键词】 杀伤细胞; 包被细胞因子; 细胞生长状态

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.04.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)04-0413-02

Study on influence of monoclonal antibody coated with anti-human CD3 on CIK cells growth WANG Yan¹, LIU Rongfang¹, CHAO Yu-qin² (1. Medical Biological Cells; 2. Department of Laboratory, Zhumadian Tumor Hospital, Zhumadian, Henan 463000, China)

【Abstract】 Objective To study the effects of monoclonal antibody coated with anti-human CD3 on quality and quantity of CIK cells cultured in culture flask by comparing the pretreatments with not coated anti-human CD3, based on common clinical cultural methods of CIK cell. **Methods** To extract peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from healthy people, and adjust the certain concentrations of serum-free cell culture, add the same amounts of antibody coated with anti-human CD3 and not coated antibody and subsequently add IFN- γ in 75cm sealed cultural flask. After 24 h treatment, CIK mixed stimulating factor was added, the growth status was observed and recorded every day. The cells were collected for comparison on 12 d. **Results** CIK cells with antibody coated by anti-human CD3 began to amplify after 3 d and every day of the amplification latter; CIK cells not coated with anti-human CD3 antibody began to amplify only after 5 d. The total number of collected cells was 1.2×10^9 , for not coated treatment, and 3.3×10^9 for coating treatment. **Conclusion** The cytokine-coated anti-human CD3 monoclonal antibody in normal condition has a good positive influence on the growth of cultured CIK cells within the relatively short time.

【Key words】 CIK; coated cell; cell growth

随着我国工业的快速发展, 环境污染日益加剧, 肿瘤的发病率逐年上升, 人们对肿瘤治疗方法的探究也在不断创新。自 1991 年 Schmidt Wolf 等^[1]报道了体外培养的杀伤细胞(CIK 细胞)具有较强的抗肿瘤作用以来, 细胞因子诱导的杀伤细胞 CIK(cytokine-induced killer)作为新型过继免疫治疗肿瘤的免疫细胞之一, 开始得到广泛关注。近几年来, 我国对 CIK 细胞的研究也在不断深入^[2]。CIK 细胞是将人体外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子(IFN- γ 、IL-1 α 、抗人 CD3 单抗和 IL-2)共同刺激激活培养后获得的一群既表达 T 细胞所特有的膜表面分子 CD3, 又表达 NK 细胞膜表面分子 CD56^[3], 被称为 NK 样 T 淋巴细胞的特异质细胞群。与 LAK、TIL 等相比, CIK 细胞在杀瘤活力等方面具有新型、高效和广谱性^[4]。

目前常见临床 CIK 细胞治疗的方法一般为用 Ficoll 法分离提取外周血单个核细胞或用单采机采集外周血单个核细胞, 经多种细胞因子(IFN- γ 、IL-1 α 、抗人 CD3 单抗和 IL-2)共同刺激后进行扩增培养, 在两周左右进行收集回输。这种培养模式培养虽可获得一定量的 CIK 细胞, 但存在细胞生长状态缓慢、

扩增次数一般等问题, 导致患者需长期进行细胞治疗才有很好的治疗效果。抗人 CD3 单克隆抗体作为 CIK 细胞刺激因子之一, 具有诱导活化 T 细胞并能进行长期培养的作用, 且在培养过程中用量很小。IFN- γ 、IL-1 α 对 CIK 细胞的生长无明显影响, IL-2 虽能刺激活化 T 细胞大量增殖但所需要的量非常大。本研究通过包被细胞因子抗人 CD3 抗体对 CIK 细胞的体外培养增殖的研究, 以寻求在正常培养条件下较短时间内获得质量更好、数量更多的 CIK 细胞, 为肿瘤患者在较短的时间内获得很好的过继免疫治疗效果提供方法。

1 材料与方法

1.1 材料 GT-T551 无血清培养基(北京宝日医生物科技有限公司)基因重组人白细胞介素 1 (IL-1 α) (Biosource); Monoclonal Anti-human CD3 ϵ Antibody (R & D Systems); D-PBS 缓冲液(北京宝日医生物科技有限公司); 基因重组人白细胞介素 2 (IL-2) (北京四环生物科技有限公司); 基因重组干扰素- γ (IFN- γ) (上海克隆生物高科技有限公司); 人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物科技有限公司); 生理盐水, 硫酸庆大霉素(国

产)。

1.2 75 cm² 密封盖培养瓶的预处理 75 cm² 密封盖培养瓶中加入 D-PBS 缓冲液 10 mL, 再加入 5 μg/mL 的 Monoclonal Anti-human CD3ε Antibody, 4℃ 孵育过夜。使用前用倒去包被液, 先用洗液(生理盐水+庆大霉素)洗涤一次, 再用无血清培养基洗涤一次备用。

1.3 外周血单个核细胞的分离提取与初培养 采取肝素抗凝的健康成人外周血 50 mL, 缓慢均匀加入已加人淋巴细胞分离液的离心管中, 低速水平离心机 20℃ 分离。分离后提取单个核细胞层, 用洗液(生理盐水+庆大霉素)洗涤 3 遍。收集外周血单个核细胞于离心管中, 加入无血清培养基吹打至充分悬浮, 等量分别加入至未包被和已包被 抗人 CD3 抗体的 75 cm² 细胞培养瓶中。

1.4 CIK 细胞的诱导及扩增培养 (1)健康对照组: 提取外周血单个核细胞, 加入 1 000 U/mL IFN-γ, 置 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养 24 h 后加入 CIK 混合刺激因子 (10 ng/mL IL-1α、1.5 μg/mL 抗人 CD3 单抗和 500 U/mL IL-2), 每天观察 CIK 细胞的生长状态, 根据细胞的生长情况进行传代扩增。扩增时补加含 1 000 U/mL IL-2 的无血清培养基, 计数调整 75 cm² 细胞培养瓶细胞浓度至 1×10⁶ U/mL 左右。将补加含

1 000 U/mL IL-2 的无血清培养基后增加的细胞悬液移至未包被的培养瓶中培养, 观察细胞生长状态, 视 CIK 细胞生长情况更换培养液, 换液时添加含 1 000 U/mL IL-2 无血清培养基, 计数调整培养瓶细胞浓度至 1×10⁶ U/mL 左右正常培养至第 12 天收集计数。(2) 包被细胞因子组: 提取外周血单个核细胞, 加入 1 000 U/mL IFN-γ, 置 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养 24h 后加入 CIK 混合刺激因子 (10 ng/mL IL-1α、1.5 μg/mL 抗人 CD3 单抗和 500 U/mL IL-2), 每天观察 CIK 细胞的生长状态, 根据细胞的生长情况进行传代扩增。扩增时补加 1 000 U/mL IL-2 的无血清培养基, 计数调整 75 cm² 细胞培养瓶细胞浓度至 1×10⁶ U/mL 左右。将补加 1 000 U/mL IL-2 的无血清培养基后增加的细胞悬液移至未包被的培养瓶中培养, 观察细胞生长状态, 视 CIK 细胞生长情况更换培养液, 换液时添加含 1 000 U/mL IL-2 无血清培养基, 计数调整培养瓶细胞浓度至 1×10⁶ U/mL 左右正常培养至第 12 天收集计数。

1.5 统计学方法 依据数据性质采用 t 检验。

2 结 果

包被与未包被抗人 CD3 单抗的 75 cm² 密封盖培养瓶培养细胞的生长状态与培养至第 12 天收集的细胞数比较(表 1)。

表 1 密封盖培养瓶培养细胞的生长状态与培养至第 12 天收集的细胞数比较

时间	生长状态及相关操作	
	包被	未包被
第 1 天	分离提取 PBMC+IFN-γ	分离提取 PBMC+IFN-γ
第 2 天	加入 CIK 混合刺激因子	加入 CIK 混合刺激因子
第 3 天	CIK 细胞形态一般、密度高、执行传代扩增	CIK 细胞形态一般、密度一般
第 4 天	CIK 细胞形态良好、密度高、执行扩增	CIK 细胞形态一般、密度一般
第 5 天	CIK 细胞形态良好、密度高、执行扩增	CIK 细胞形态一般、密度高、执行传代扩增
第 6 天	CIK 细胞形态良好、密度高、执行扩增	CIK 细胞形态良好、密度一般
第 7 天	CIK 细胞形态良好、密度高	CIK 细胞形态良好、密度高、执行扩增
第 8 天	CIK 细胞形态良好、密度高、执行扩增	CIK 细胞形态良好、密度一般
第 9 天	CIK 细胞形态良好、密度高	CIK 细胞形态良好、密度高、执行扩增
第 10 天	CIK 细胞形态良好、密度高、执行扩增	CIK 细胞形态良好、密度一般
第 11 天	CIK 细胞形态良好、密度高	CIK 细胞形态良好、密度高、执行扩增
第 12 天	收集, 计数, 进行统计学分析	收集, 计数, 进行统计学分析

3 讨 论

实验表明外周血单个核细胞在细胞因子作用下均能增殖, 镜下可见细胞饱满透亮, 聚集成团, 呈集落样生长^[5]。本次试验在培养数百例 CIK 细胞过程中也注意到此类现象, 并用这一现象结合细胞密度作为判断 CIK 细胞生长状态的良好程度和是否可进行扩增的指标。CD3 单抗致 T 细胞扩增的机制已研究得较为透彻, CD3 单抗与 TCR-CD3 复合体结合, 通过信号传导系统将刺激信号转入细胞内部, 触发级联反应, 导致 T 细胞活化及扩增^[6]。

比较了悬浮加入抗 CD3 mAb 和使用孔板包被的方法加入抗 CD3 mAb 刺激生成的 CIK 细胞在扩增能力, 纯度和细胞毒活性方面的不同。使用包被的方法将抗 CD3 mAb 固定在孔板底部的效果要比直接悬浮加入好^[7]。多种研究表明^[1,8-9], CIK 细胞虽可在长期培养的过程中获得大量增殖, 但

普通的培养条件下通常在 3~4 d 进行一次调节细胞密度的操作(临床上称之为换液, 即扩增操作)。说明普通培养条件下 CIK 细胞增长的速度比较慢, 扩增次数较少限制了培养后收集的细胞总数。本科室在总结 CD3 单抗和 CIK 细胞的生物学特性后, 提出用包被 CD3 的方法对培养瓶进行预处理, 在后续的培养过程中按照正常的 CIK 细胞培养方法进行培养, CIK 细胞可能会增殖更快, 呈高密度生长状态, 较短时间内扩增次数更多, 收获细胞数更多的设想。在多组实验中, CIK 细胞的生长状态基本如上(表 1)。上述结果证明本次试验设想是正确的, 从而为临床在较短时间内获得多倍于常用方法培养的 CIK 细胞提供了可靠参考方法。

参考文献

[1] Schmidt-Wolf, Neqrin RS, Kiem HP, et al. (下转第 417 页)

胰腺癌、肝胆系癌、胃癌、结直肠癌的 CA19-9 水平分别是正常均值的 683、535、279、115 倍。故 CA19-9 是胃癌较好的标志物。

CA72-4 是一种肿瘤相关糖蛋白抗原。研究表明,胃癌组 CA72-4 平均值明显高于对照组和胃良性肿瘤组及其他消化道恶性肿瘤,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。胃癌 CA72-4 水平和阳性率明显高于其他消化道恶性肿瘤,提示 CA72-4 在胃癌诊断中具有较大的意义,是胃癌诊断中理想的肿瘤标记物。

肿瘤细胞对 CEA 有强阳性细胞质染色。大肠癌组织可产生一种糖蛋白,作为抗原引起患者的免疫反应,此种抗原称为 CEA,可广泛存在于内胚叶起源的消化系统肿瘤,也存在于正常胚胎的消化管组织中,在健康者血清中也可有微量存在。CEA 是一个广谱性肿瘤标志物,它能向人们反映出多种肿瘤的存在,对大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计是一个较好的肿瘤标志物。

目前胃癌检测标本多为外周血,由于血液稀释作用,加之肿瘤早期其标志物含量甚低,分泌到外周血中就更少,故其阳性率不够高。胃液直接与胃黏膜接触,能较敏感地反映胃的病变,检测胃液的肿瘤标志物诊断胃癌的价值较检测血清为高。经试验证实胃液中 CA72-4、CA19-9、CEA 的测定值要高于血清中 CA72-4、CA19-9、CEA 的测定值,而且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),所以胃液比血液更适合用于检测胃癌肿瘤标志物;癌前疾病组与对照组比较,血清中的 3 种肿瘤标志物检测结果无统计学意义 ($P > 0.05$),而胃液中 3 种肿瘤标志物检测结果差异有统计学意义 ($P < 0.05$),胃液中 CA72-4、CA19-9、CEA 的测定更有利于癌前疾病的诊断和疗效的追踪,对于胃

癌的早期诊断和治疗有重要的意义。

参考文献

[1] 夏同礼. 肿瘤实验诊断学[M]. 北京:北京科学技术出版社,2005:163.
 [2] 王海燕,姚桂芹,高佩增,等. CA72-4、CEA、CA19-9 在胃癌及癌前病变组织中表达的相关研究[J]. 临床消化病杂志,2005,17(6):279-281.
 [3] Tian XZ, Mei AN, Zhang Y. Value and significance of CA 19-9 and CEA in serum of patients with gastrointestinal cancer[J]. Cancer Res Clin, 2000 12(1):17-18.
 [4] 任绍青,牛福河,崔建军,等. CA72-4、CA19-9、CEA 联合检测在胃癌诊断中的应用[J]. 河南外科学杂志,2006,12(6):11.
 [5] Tocchi T, Costa G, Lepre L, et al. The role of serum and gastric juice levels of CEA, CA19-9, CA72-4 in patients with gastric cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1998, 124(8):450-455.
 [6] 王怀志,郭漳生,赵玉亭,等. 胃癌患者血清肿瘤标志物 CA19-9、CA72-4 联合检测[J]. 郑州大学学报:医学版, 2005,40(1):98-99.
 [7] 黄曼,李会灵,李国华. 血清肿瘤标志物在胃癌诊治中的研究进展[J]. 医药产业资讯,2006,3(9):35-36.

(收稿日期:2011-09-06)

(上接第 414 页)

Weissman. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity[J]. J Exp Med, 1991, 174(1):139-149.
 [2] 杨葳,沈志奇,王俊懿,等. 我国新型肿瘤细胞治疗方法 CIK 的研究与应用现状[J]. 科技导报,2008,26(6):73-77.
 [3] Schmidt-Wolf DW, Negrin RS, Schmidt-Wolf IGH. Activated T cells and cytokine-induced CD3+ CD56+ killer cells[J]. Ann Hematol, 1997, 74:51-56.
 [4] 任欢,邢淑贤,徐红薇,等. CIK 的体外增殖及体内外杀瘤活性的实验研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6(1):17-21.

[5] 陈明水,陈强,叶韵斌,等. CIK 细胞的体外扩增及其抗肿瘤特性的研究 [J]. 福建医药杂志,2004,26(6):162-164.
 [6] 罗志刚,谢江波. CD3McAb、CD28McAb、CpGODN 刺激 PBMC 活化的研究[J]. 南华大学学报:医学版,2003,31(4):379-385.
 [7] 秦晓亮,康自珍,蔡海波,等. 不同激活方式影响细胞因子诱导杀伤细胞的扩增与活性[J]. 免疫学杂志,2003,19(6):439-442.
 [8] 黄朝晖,王丰,华东,等. 肿瘤患者自体 CIK 细胞治疗及其对患者免疫功能的影响[J]. 江南大学学报:自然科学版, 2004,3(1):100-102.

(收稿日期:2011-08-24)

总体与样本

根据研究目的确定的同质研究对象的全体(集合)称为总体,包括有限总体和无限总体。从总体中随机抽取的部分观察单位称为样本,样本包含的观察单位数量称为样本含量或样本大小。如为了解某地区 10~15 岁儿童血钙水平,随机选取该地区 3 000 名 10~15 岁儿童并进行血钙检测,则总体为该地区所有 10~15 岁儿童的血钙检测值,样本为所选取 3 000 名儿童的血钙检测值,样本含量为 3 000 例。类似的研究需满足随机抽样原则,即需要采用随机的抽样方法,保证总体中每个个体被选取的机会相同。