

[文章编号] 1007-385X(2003)02-0134-03

淋巴结来源的 CD3AK 细胞的增殖和表型变化分析

马胜林, 冯建国, 许沈华, 唐利荣, 凌雨田 (浙江省肿瘤医院, 杭州 310022)

[摘 要] **目的:** 研究肺癌清扫淋巴结的淋巴细胞, 经 CD3 单克隆抗体激活后的杀伤细胞(CD3AK 细胞)在体外的增殖和表型变化。**方法:** 取肺癌清扫淋巴结, 用机械方法分离成单细胞悬液, 加 CD3 单克隆抗体和小剂量 IL-2 共同培养, 每隔 1 天用流式细胞术进行细胞表型分析及用台盼蓝活细胞计数法观察细胞增殖情况。**结果:** 表型分析显示 CD3, CD8, CD56, CD25 增加。培养第 8 天淋巴细胞增殖达高峰, 数量是培养前的 2.33 倍。**结论:** CD3 单克隆抗体能明显激活各种 T 细胞增殖, 使 CD3AK 细胞维持杀伤功能。

[关键词] CD3 单克隆抗体; 流式细胞术; CD3AK 细胞; 表型变化

[中图分类号] R392.11; Q253 [文献标识码] A

Proliferation and Immunophenotypic Analysis of CD3AK Cells Derived from Lymph Node

MA Sheng-lin, FENG Jian-guo, XU Shen-hua, TANG Li-rong, LIN Yu-tian (Zhejiang Cancer Hospital, 310022 Hangzhou, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the propagation and phenotypes changes of killer cell (CD3AK cell activated by CD3 mAb *in vitro*. **Methods:** Lymph nodes taken from lung cancer patient is dissociated into single cell suspension by mechanical method and cultured in culture medium added CD3 mAb and a little dose IL-2. We analyze cell immunophenotype by flow cytometry and proliferation by trypan blue exclusion test per 2 days. **Results:** Immunophenotypic analysis showed that CD3AK expressing CD3, CD8, CD56, CD25 increased, and reached a peak value which is 2.33 times than before culturing in the 8 th day. **Conclusion:** CD3 mAb added to the culture medium can obviously activate CD3AK cell and stimulate proliferation and keep its killer activity.

[**Key words**] CD3 single clone antibody; flow cytometry; CD3AK cell

* CD3 单克隆抗体激活的杀伤细胞(CD3AK)具有增殖能力和杀瘤作用^[1-3]。目前国内外较详尽地研究了小鼠及人外周血淋巴细胞经 CD3 单克隆抗体协同 IL-2 激活后, 分析了其细胞表型等特征。但体外用淋巴结淋巴细胞经 CD3 单克隆抗体协同 IL-2 共同培养激活淋巴细胞的特征报道不多。本实验采用肺癌病人清扫淋巴结分离的淋巴细胞, 观察经 CD3 单抗体和 IL-2 共同在体外激活后的细胞增殖情况及用 FCM 分析细胞的表型的变化。

1 材料与方

1.1 淋巴细胞来源

在无菌条件下取肺癌手术病人清扫淋巴结 3 个。各半枚用于实验, 半枚用作病理检查。

1.2 试剂

CD3 单抗(鼠源性, 军事医学科学院生物制剂发展中心产品); 重组人白细胞介素 2(IL-2)(上海华新生物高新技术有限公司产品); 淋巴细胞分离液(上海试剂二厂), CD19-FITC, CD25-PE, CD56-PE(美国 BD 公司); CD3-FITC, CD4-TITC, CD8-PE(北京医科大学免疫室产品)。

1.3 细胞培养条件

美国产 RPMI-1640 培养基加 20% 小牛血清(杭州

[基金项目] 本课题受浙江省医药卫生科研基金资助(基金编号 96001)

[作者简介] 马胜林(1965-), 男, 杭州人, 副主任医师, 主要从事肺癌基础与临床方面的研究。

四季青生物工程材料研究所产品),每毫升含青霉素 100 单位、链霉素 100 μg 、胰岛素 0.01 单位、氢化考的松 10 μg 、在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。

1.4 实验方法

用眼科剪将淋巴结剪碎,茶叶滤纸滤成单细胞悬液,加入淋巴分离液 2 000 r/min 离心 15 min,分离出较纯的淋巴细胞,用台盼兰染色法计数细胞。加含 CD3 单抗,终浓度为 0.5 μg 的 RPMI-1640 培养液培养,细胞浓度为 $1.8 \times 10^6/\text{ml}$,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下培养。余下细胞用 FCM 术分析淋巴细胞表型。培养 24 h 后,细胞悬液经离心去上清,用台盼兰计数细胞,重新加入含终浓度为 0.5 μg 的 CD3 单抗和 50 U/ml 的 IL-2 新鲜培养液,另取 5 滴做表型分析。用同样的方法隔天细胞计数及细胞表型分析,共 6 次。

1.5 补充流式细胞分析的简要过程

2 结果

2.1 细胞生长情况

细胞逐渐增殖,到第 8 天达到高峰。最高值为 $4.2 \times 10^6/\text{ml}$,是培养前的 2.33 倍(图 1)。

图 1 CD3AK 细胞生长曲线

Fig. 1 Cell growth curve of CD3AK

2.2 表型分析结果

在培养过程中 CD8 细胞比率不断上升,第 5 天细胞数量就达培养前的 2.1 倍,到第 8 天细胞数量是培养前的 2.33 倍(图 2)。CD3、CD56 细胞比率也不断上升,在第 7 天出现峰值(图 3)。CD25(IL-2 受体),在 CD3 单抗激活后第 1 天 CD25 就开始大量表达,到第 5 天就达培养前的 4 倍,从第 5~9 天增加缓慢,第 9 天达高峰。(图 4)。

3 讨论

T 细胞表面分化抗原 CD3 分子的单克隆抗体具有很强的丝裂原作用,当将淋巴细胞与 CD3 单抗共同培养,淋巴细胞可见明显增殖,据文献报道,几乎所有 T

细胞都有能被抗 CD3 单抗激活,人外周血淋巴细胞中被 CD3 单抗激活的前体细胞频率极高^[4]。我们发现经 CD3 单抗短时间激活出现良好的增殖反应,当培养第 5 天细胞数量就达培养前的 2.1 倍,到第 8 天细胞数量是培养前的 2.33 倍。同时使 T 细胞的功能激活。CD3 是 T 细胞表面的一种重要分化抗原与 T 细胞受体一起构成 TCR-CD3 复合物,在 T 细胞识别抗原及活化过程中起重要作用^[5]。

图 2 细胞培养后 CD4,CD8 表型变化

Fig. 2 CD4, CD8 phenotype changes after cell culturing

图 3 细胞培养后 CD3,CD56 表型变化

Fig. 3 CD3, CD56 phenotype changes after cell culturing

图 4 细胞培养后 CD25 表型变化

Fig. 4 CD25 phenotype changes after cell culturing

CD25 主要分布于活化的 T 细胞表面,是活化 T 细胞的标志。我们实验显示 CD3 单抗激活后第 1 天 CD25 就开始大量表达,到第 5 天就达培养前的 4 倍,从第 5~9 天增加缓慢。第 9 天达高峰。CD3AK 细胞短期内大量增殖,是以获得足量的免疫活性细胞供临床应用,其增殖机制可能与其高表达 IL-2R 和分泌内源性 IL-2 相关。在诱导 CD3AK 细胞研究时抗体和 IL-2 同时存在于培养体系中。由于每个 T 细胞表面平均有 5×10^4 个 CD3AK 结合位点,而不存在 IL-2R,故抗体首先与 CD3-TCR 复合体结合,使其构像发生变化,在细胞表面密度低,激活信号传至胞核,使细胞表达 IL-2R 和内源性 IL-2^[6],从而激活 CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻ 表型前体细胞成为 CD3AK 细胞。在构像发生改变同时,使 CD3AK 细胞进一步激活。有报道 CD3 单抗注入体内,可测出血中 IL-2, IFN- γ 及 TNK 含量升高^[4]。

CD8 阳性表型 T 细胞称为细胞毒细胞,是抗病毒感染和抗肿瘤的主要效应细胞,承担免疫防御和免疫监视作用。培养后 CD3 和 CD8 阳性细胞迅速上升,使 T 细胞更具有杀伤活性,因此回输 CD3AK 细胞能起到杀伤细胞的作用。

CD56 是 NK 细胞的标志。通过培养后第 5~9 天可见 NK 细胞显著增加。NK 细胞能参与抗的非特异免疫作用,它在体内抑制和杀灭肿瘤细胞,且其作用不需要有抗原的刺激,也不需要补体的协助,反应迅速,

作用明显。

我们在体外用 CD3 单抗加少量 IL-2 激活清扫淋巴结的淋巴细胞,从动态观察 CD3AK 细胞在体外的增殖和表型变化显示培养后回输 CD3AK 细胞的最佳时间在第 5~9 天。本实验为临床选择回输 CD3AK 细胞时间提供参考依据,同时从表型变化探讨 CD3AK 细胞杀伤的机理。

[参 考 文 献]

[1] 王言新. 抗 CD3 激活的杀伤细胞研究进展[J]. 上海免疫学杂志, 2001, 14(3): 192-193.
 [2] 许沈华, 钱丽娟, 牟瀚舟, 等. CD3AK 细胞在裸鼠体内抗转移作用研究[J]. 中华病理学杂志, 1998, 27(1): 46-49.
 [3] 钱丽娟, 许沈华, 牟瀚舟, 等. CD3AK 细胞对人肺癌细胞系的体外杀伤作用. 临床与实验病理学杂志, 1999, 15(1): 54-56.
 [4] 虞喜豪, 程永德, 金健行, 等. CD3 单克隆抗体激活细胞用于中、晚期癌肿治疗的初步观察[J]. 上海免疫学杂志, 1995, 15(5): 289-291.
 [5] 李 鸣, 杨 敬, 沈关心, 等. 淋巴细胞经 TCR-CD3 活化增殖作用的分析[J]. 免疫学杂志, 1995, 11(2): 91-93.
 [6] 李殿俊, 张晓伟, 侯 萍, 等. CD3AK 细胞的生物学特性及其抗肿瘤作用[J]. 哈尔滨医科大学学报, 1998, 32(1): 1-4.

[收稿日期] 2003 - 01 - 20

[修回日期] 2003 - 03 - 01

《中国肿瘤》杂志、《肿瘤学杂志》联合征订启事

《中国肿瘤》杂志系卫生部主管,全国肿瘤防治研究办公室主办的综合类科技月刊,大 16 开,64 页,邮发代号: 32-100。该刊以交流肿瘤防治经验、推广肿瘤科技成果,促进肿瘤防治副业的发展为宗旨,是社会各方了解我国肿瘤防治研究工作进展动态的重要途径,也是肿瘤防治研究理论与实践活动的重要论坛。主要刊载国家癌症控制动态和工作研究报告,肿瘤学术研究成果及进展等。好稿一个月内刊出。

《肿瘤学杂志》是面向全国的学术类科技双月刊,大 16 开,64 页,邮发代号:32-37。该刊由浙江省肿瘤医院和中国癌症研究基金会、全国肿瘤防治研究办公室共同办刊,将及时反映我国肿瘤学术研究新领域的新技术、新成果和新进展,以指导科研和临床实践。该刊公平公正,择优录用稿件,力求高质量,好稿快发,1~2 个内见刊。

以上两刊均为国内外公开发行,均已加入“中国期刊网”、“万方数据库”、“中文生物医学期刊文献数据库”,并专递中国肿瘤网站。

读者可在当地邮局订阅,漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

联系地址:浙江省杭州市半山桥广济路 38 号浙江省肿瘤医院内

《中国肿瘤》编辑部 《肿瘤学杂志》编辑部

邮编: 310022

电话: 0571 - 88147297 0571 - 88144401 - 261

传真: 0571 - 88147297

E-mail: zgzl@mail. hz. zj. cn