

不同组合 CD3、CD28 抗体对 CIK 细胞诱导培养的探索研究

孙志亚,何 静[△],陈民佳,赵宗林

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所细胞生物治疗中心消化内科,重庆 400042)

[摘要] 目的 探索利用 CD3、CD28 抗体对人外周血单个核细胞(PBMC)体外激活转化增强作用,采用不同包被方法及抗体浓度,以期获得一种更有效的包被方法。**方法** 利用人外周血单个核细胞分离技术、体外细胞培养技术及流式细胞术(FMC),以 CD3 抗体固相包被、CD28 抗体不同浓度固相包被或悬浮加入,计算经 12 d 培养获得成熟 CIK 细胞的数量,测定不同包被方法刺激培养后的细胞表型的变化。**结果** 培养后 C 组中 CD4⁺ 细胞百分比明显低于 A 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。C 组中 CD8⁺ 细胞所占比例高于 A、B 组($P < 0.05$)。C 组的 T4/T8 比值与 A、B 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。B 组 NK 细胞含量与 C 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。CD25⁺ 细胞在 C 组中所占比例低于 A 组($P < 0.01$)。**结论** CD3 抗体固相包被及 CD28 抗体悬浮加入组合对人外周血细胞的刺激增强作用强于 CD3 抗体固相包被 CD28⁺ 抗体固相包被组合。

[关键词] 流式细胞术;CIK 细胞;固相包被**[中图分类号]** R-331**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)22-3096-03**The effect of monoclonal antibody coated with anti-human CD3 and CD28 on CIK cells growth**Sun Zhiya, He Jing[△], Chen Minjia, Zhao Zonglin

(Cell Biological Center, Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To explore the enhancing effect of monoclonal antibody coated with anti-human CD3 and CD28 on activation and transformation of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) in vitro. **Methods** Human peripheral blood mononuclear cells were separated. Cells was cultured in vitro, and determined by flow cytometry. The solid phase with CD3 and CD28 antibody was coated and added in. The mature CIK cells were obtained after 12 days culturing. **Results** The CD4⁺ cells was lower in group C than those in group A ($P < 0.05$). The CD8⁺ cells was higher in group C than that in group A and B ($P < 0.05$). There was significant difference of T4/T8 between group C and group A and B ($P < 0.05$). There was significant difference of NK cells between group B and group C ($P < 0.05$). The CD25⁺ cells was lower in group C than that in group A ($P < 0.01$). **Conclusion** CD3 antibody solid coated combined with CD28 antibody added to the suspension has more strong activation than both CD3 antibody and CD28 antibody solid coating on peripheral blood mononuclear cell.

[Key words] flow cytometry; CIK cell; immobilization on solid phase materials

早在 1999 年就有研究利用 CD3、CD28 抗体体外扩增活化 T 淋巴细胞,激活表型为 CD8⁺ CD25⁺ 的具有杀伤活性的细胞,回输到免疫力低下的肿瘤患者体内,从而提高肿瘤患者的生命质量,延长寿命^[1]。CIK 细胞是从外周血中分离出的单个核细胞,在体外经多种细胞因子刺激、培养后获得的一群异质细胞群,将其转入宿主体内建立长期的特异性抗肿瘤免疫效应,具有很好的应用前景^[2]。本研究利用 CD3、CD28 抗体对人外周血单个核细胞(PBMC)体外扩增转化增强作用,采用不同包被方法及抗体浓度,相互比较,探索一种更有效的包被方法。

1 材料与方

1.1 材料 人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司);12 孔板、6 孔板(NUNC 公司,美国);AB 血浆由重庆市血液中心提供;CD3、CD28 抗体(Invitrogen 公司);白细胞介素 2(IL-2)(北京四环制药有限公司);白细胞介素 7(IL-7)等细胞因子(Invitrogen 公司);GT-T551 培养基(宝日医生物技术有限公司);3111 型 CO₂ 培养箱(Thermo 公司,美国);A2 型生物安全柜(Thermo 公司,美国);流式细胞仪(美国贝克曼 HPC-100)。

1.2 方法 (1)抗体包被:取 12 孔板,分 3 组包被:A 组抗体 CD3 浓度 2 mg/L、CD28 浓度 2 mg/L;B 组抗体 CD3 浓度 2 mg/L、CD28 浓度 5 mg/L;C 组抗体 CD3 浓度 5 mg/L。分 A、B、C 组包被,每组 8 孔重复,每孔 250 μL 包被液。室温静置 3 h,4 ℃ 保存备用。(2)取同一肿瘤患者外周血 50 mL,利用淋巴细胞分离液分离单个核细胞^[2],细胞计数,按照 1×10⁶ 个/孔重悬于 1 号培养基(培养基 GT-T551 中加入人干扰素 γ(γ-IFN)100 万 IU/L、IL-2 100 万 IU/L、IL-1β 100 万 IU/L、IL-7 40 μg/L)中,并接种于去除包被有抗体 CD3、CD28 的 16 孔中;同样按照 1×10⁶ 个/孔重悬于 2 号培养基(培养基 GT-T551 中加入 γ-IFN 100 万 IU/L、IL-2 100 万 IU/L、IL-1β 100 万 IU/L、IL-7 40 μg/L、抗体 CD28 50 μg/L)中,并接种于去除单独包被有抗体 CD3 的 8 孔中。均加入 10% AB 血浆,37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养。(3)培养至第 5 天,将各孔细胞重悬,接种于 6 孔板中。每孔分别补加 3 号培养基(培养基 GT-T551 中加入 IL-2 100 万 IU/L、IL-1β 100 万 IU/L、IL-7 40 μg/L)3 mL,并加入 10% AB 血浆,37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱继续培养。(4)培养至第 7 天,

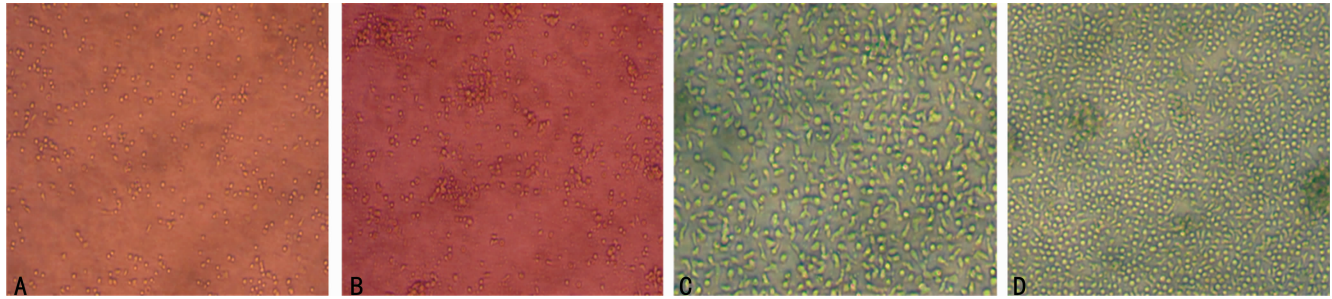
将 6 孔板中各孔细胞转移至 25 cm² 的培养瓶中,每瓶补加 12 mL 4 号培养基(培养基 GT-T551 中加入 IL-2 100 万 IU/L),并加入 10% AB 血浆,37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱培养。(5)每天观察细胞生长状态,培养至 12 d 收集细胞,进行细胞计数,取样检测细胞分型。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism-4.0 软件包处理,进行多组间 One-Way ANOVA Test,以 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结 果

2.1 3 组细胞的生长状态与培养至第 12 天收集的细胞数量比较 显微镜下观察可见红细胞逐渐退化,第 3 天开始细胞由圆形逐渐变为不规则形态,且体积变大,呈聚集态生长。第 7 天细胞铺满平板,细胞逐渐均一化。第 12 天细胞成熟,呈圆形,单个细胞饱满透亮,见图 1。



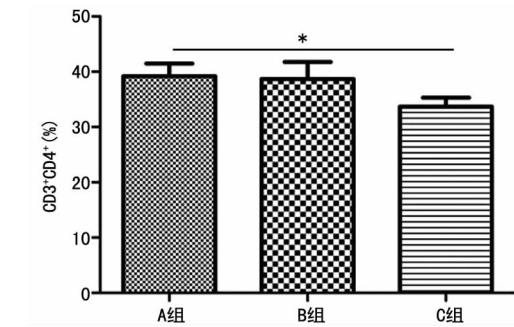
A:第 0 天;B:第 3 天;C:第 7 天;D:第 12 天。

图 1 细胞生长状态(×100)

2.2 12 d 后淋巴细胞数量变化及活率 经过 12 d 诱导培养后,3 组细胞数量迅速扩增,其中 C 组达到 $(0.66 \pm 0.03) \times 10^8$ 个,显著高于 A 组 $[(0.58 \pm 0.04) \times 10^8$ 个, $P < 0.05$],较 B 组 $[(0.61 \pm 0.02) \times 10^8$ 个]差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组细胞经过 12 d 培养后,细胞活率均达到 97% 以上,组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

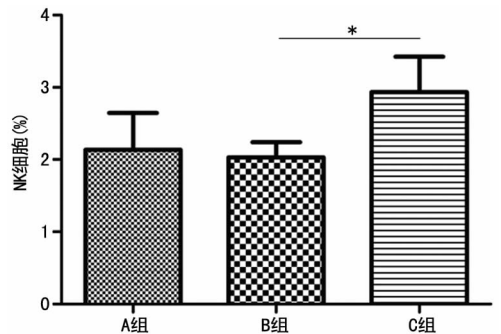
组中 CD8⁺ 细胞所占比例高于前两组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3。T4/T8 比值作为 CIK 细胞的重要指标,C 组明显低于前两组,且与 A 组差异有统计学意义 ($P < 0.01$),与 B 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

经流式检测,CIK 细胞中含有部分 NK 细胞,但所占比例不高,B 组与 C 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4。具有免疫抑制功能的 CD25⁺ 细胞在 C 组中所占比例低于 A 组,且差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 5。



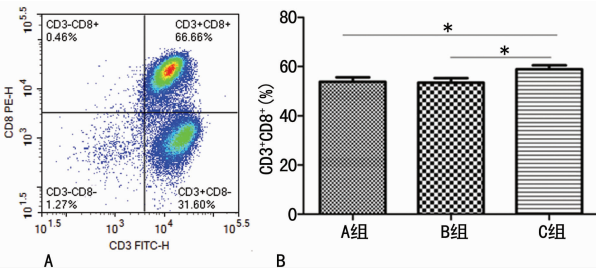
*: $P < 0.05$, C 组与 A 组比较。

图 2 T4 细胞比例



*: $P < 0.05$, B 组与 C 组比较。

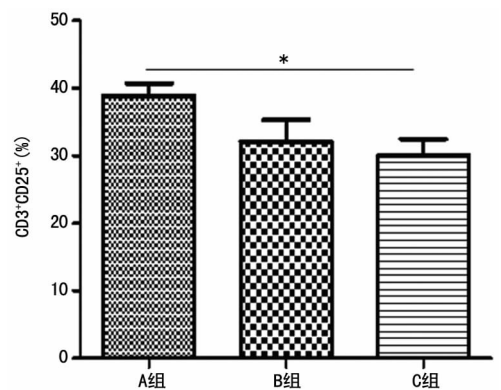
图 4 NK 细胞比例



*: $P < 0.05$,与 C 组比较。A: C 组 T8 细胞流式检测;B: T8 细胞比例。

图 3 T8 细胞

2.3 诱导 PBMC 后流式分析 抗体诱导培养后的细胞经流式细胞仪检测,3 组细胞总成熟的 T 细胞百分比均达到 90% 以上,但 3 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养后 C 组中 CD4⁺ 细胞百分比明显低于 A 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),其他组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 2。而 C



*: $P < 0.01$, A 组与 C 组比较。

图 5 CD3⁺CD25⁺ 细胞比例

3 讨 论

T 细胞在机体内发挥着重要的作用。它不仅有着直接的免疫功能,而且能够产生多种细胞因子及表达黏附分子等,与其他的免疫细胞共同作用发挥强大的免疫共调节作用。目前国内外已将体外诱导活化的 T 淋巴细胞用于过继性免疫治疗^[3-4]。

本试验比较了相同浓度 CD3 固相包被与不同浓度 CD28 固相包被及悬浮加入刺激诱导培养后 CIK 细胞的生长状态、增殖能力、细胞表型。试验结果表明:CD28 抗体悬浮加入培养的 CIK 细胞经流式检测 CD4⁺、CD3⁺ CD25⁺ 均明显低于 CD28 抗体固相包被方式培养的 CIK 细胞,而前者中的 CD8⁺ 细胞比例却高于后者,CD3 固相包被、CD28 悬浮加入的效果比 CD3 固相包被、CD28 固相包被的效果好。镜下观察外周血单个核细胞在细胞因子的刺激诱导下,细胞迅速增殖,形态发生改变,呈聚集生长并逐渐均一化,培养至 12 d 成熟,细胞透亮饱满,与之前报道一致^[5]。

CD3 抗体刺激 T 细胞活化(即包被),原理是固相结合的高密度 CD3 抗体可引起 T 细胞 TCR-CD3 复合体的交联,产生活化信号,刺激 T 细胞活化增殖。研究证实,液相单一加入 CD3 单抗在不同浓度下均不能刺激单个核细胞增殖^[6-7],故本试验中使用 CD3 单抗固相包被。CD3 单抗包被浓度依据细胞生长的需要来选择^[8]。常用包被抗体浓度是 5 mg/L,高浓度可以快速刺激 T 细胞活化增殖,但活化诱导的凋亡作用(AICD)也很明显。结合临床 CIK 细胞的培养方法,本试验中 CD3 单抗包被浓度分别选择了 2 mg/L 及 5 mg/L。细胞 12 d 诱导成熟,未见明显凋亡现象,且 5 mg/L 组效果优于 2 mg/L 组。

近年来,对 T 细胞活化的研究已从单一分子机制发展到多分子的综合研究^[9-10]。CD28 分子已充分被证实是经由 TCR/CD3 激活 T 细胞的重要共刺激分子,在 TCR 被抗 CD3 单抗预激活的细胞中,当 CD28 与其配体结合后,诱导细胞内酪氨酸磷酸化,使 T 细胞充分活化^[1]。研究证实 CD28 单抗呈非剂量依赖型,当采用 10 μg/L 低剂量时即可协同 CD3 引起较强的扩增效果,在 100 μg/L 时达到高峰^[11]。本试验中 CD28 单抗也采用了固相包被与液相加入两种方法。为避免高浓度引起细胞凋亡,故 CD28 单抗液相加入浓度采用 50 μg/L,结果证实 CD28 单抗液相加入效果明显优于固相包被,具体原理有待深入研究。本研究将进一步研究不同时相点细

胞的增殖速度计数变化,从而为临床培养 CIK 细胞提供了一种可参考的方法。

参考文献

- [1] 骆群,吕明,于鸣,等.抗 CD28 抗体协同刺激增强抗 CD3 抗体体外激活 T 淋巴细胞并降低 TGF-β 的表达[J].中国实验血液学杂志,2006,14(3):547-551.
- [2] 李娟,张国俊.CIK 细胞过继免疫治疗的现状及研究新进展[J].中国实用医刊,2012,39(10):92-94.
- [3] 王惠成,冯毅,戴国华.CIK 细胞免疫治疗原发性肝癌的研究进展[J].国际消化病杂志,2011,31(4):223-227.
- [4] 沈丽琴,戴宏,庄志祥.GIK 细胞在肿瘤免疫治疗中的作用[J].苏州大学学报:医学版,2009,29(3):494-496.
- [5] 王岩,刘蓉芳,晁玉琴.包被抗人 CD3 单克隆抗体对 CIK 细胞生长影响的研究[J].检验医学与临床,2012,9(4):413-414,417.
- [6] Shi Y, Wu W, Wan T, et al. Impact of polyclonal anti-CD3/CD28-coated magnetic bead expansion methods on T cell proliferation, differentiation and function[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 15(1):129-137.
- [7] Majowicz A, Van Der Marel S, Te Velde AA, et al. Murine CD4⁺ CD25⁺ cells activated in vitro with PMA/ionomycin and anti-CD3 acquire regulatory function and ameliorate experimental colitis in vivo[J]. BMC Gastroenterol, 2012, 12:172.
- [8] 骆群,黎燕.CD3、CD28 抗体增强淋巴细胞转化功能的研究[J].军医进修学院学报,2005,26(6):479-480.
- [9] Cermák L, Símová S, Pintzas A, et al. Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(10):7955-7961.
- [10] 李静,王菲,刘艳芬,等.不同刺激物对细胞因子诱导的杀伤细胞分泌细胞因子的影响[J].郑州大学学报:医学版,2014,49(2):166-168.
- [11] 罗志刚,谢江波.CD3McAb、CD28McAb、CpG ODN 刺激 PBMC 活化的研究[J].南华大学学报:医学版,2003,31(4):379-382,385.

(收稿日期:2015-02-18 修回日期:2015-07-09)

(上接第 3095)

无狭窄的胸痛病人的临床分析[J].岭南心血管病杂志,2007,13(2):109-111.

[10] 汪永生,李均利,陈爽.约束方程能量最小化提取 3 维血管图像中轴线[J].中国图象图形学报,2011,16(11):2047-2053.

[11] Dougherty G, Varro J. A quantitative index for the measurement of the tortuosity of blood vessels[J]. Med Eng Phys, 2000, 22(8):567-574.

[12] 李洋.冠状动脉扭曲的研究现状[J].国际心血管病杂志,

2011,38(1):24-26.

[13] Turgut O, Yilmaz A, Yalta K, et al. Tortuosity of coronary arteries; an indicator for impaired left ventricular relaxation? [J]. Int J Cardiovasc Imaging, 2007, 23(6):671-677.

[14] 冉希,杨成明,林德胜,等.老年患者冠状动脉扭曲临床特征及相关危险因素[J].中华老年多器官疾病杂志,2013,12(3):209-212.

(收稿日期:2015-02-11 修回日期:2015-07-20)