

MLTC 诱导同种异基因细胞毒细胞的研究

区大卫 刘华

(北京市肿瘤研究所免疫室)

1970年 Häyry 等首先报道了体外诱导细胞介导的细胞毒(CMC)的混合淋巴细胞培养(MLC)技术^[1],随后 Golub 等用人的肿瘤细胞,和 Wagner 等用鼠的肿瘤细胞作为刺激细胞,分别建立了异基因,同基因,自身的淋巴细胞,肿瘤细胞混合培养(MLTC)系统诱导 CMC^[2,3]。通过这一技术,学者们研究了细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)的诱导、分化及其调节机制,分析了它们的增殖条件和遗传控制。MLTC 已经成为体外研究细胞免疫和肿瘤免疫的重要方法。近年来以 MLTC 为基础,结合细胞融合,有限稀释和受 T 细胞生长因子(inter-Leukin-2)刺激的长期培养等技术,已经培育出克隆化的细胞毒 T 细胞多株^[4,5],并进行了动物和临床肿瘤治疗试验,初步结果令人鼓舞,为肿瘤特异性 CTL 过继免疫治疗提供了现实的可能性^[6]。

本文初步探索了异基因 MLTC 系统建立的条件,得到一个开展细胞免疫研究的比较稳定的体外模型,为过渡到建立人的同基因诱导 CMC 的 MLTC 系统打下基础。

材料和方法

1. 动物, C57BL/6 小鼠, 6—12 周龄。
2. 肿瘤细胞系。AKR 小鼠胸腺淋巴肉瘤 BW 5147(简称 BW)细胞系;小鼠 S180-V(简称 S180)细胞系。均为体外生长的细胞系。
3. 培养液。1640 培养液,用前加 2-巯基乙醇(2-Me) $5 \times 10^{-5}M$,N-(2-羟乙基)哌嗪 N-2-乙烷磺酸(Hepes)20 mM,L-谷氨酰胺 2mM,青霉素 100 μ/ml ,链霉素 100 $\mu g/ml$,10% 新生小牛血清。pH 7.0—7.2。
4. 反应细胞、靶细胞和刺激细胞。无菌摘取 C57BL/6 小鼠脾,用常规方法制成脾细胞悬液,加入用培养液 2 ml 冲洗腹腔所得的腹腔渗出细胞;细胞悬液置 4℃的 0.85% Tris-NH₄Cl 缓冲液中 5 分钟除去红细胞,然后用培养液洗 3 次作为反应细胞。收集培

养的 BW 瘤细胞,用培养液洗一次,作为靶细胞。BW 瘤细胞经与丝裂霉素(50 $\mu g/ml$)在 37℃温育 45 分钟处理,作为刺激细胞。

5. MLTC 系统的建立^[7-9]。本文所用方法如下:反应细胞和刺激细胞以 5:1 的比例混合培养,使前者的最终浓度为 $3 \times 10^6/ml$,后者浓度为 $6 \times 10^5/ml$ 。将前述悬液 10ml 置 30ml 玻璃小方培养瓶中(重复 3 份),盖消毒棉塞后,以 30 度角斜放,置于含 7% CO₂ 一定湿度的 37℃温箱中温育,每天摇动一次。5 天后收获培养的细胞(效应细胞)作细胞毒试验,用台盼蓝拒染试验测定细胞活率,并计回收率(回收率=收获的活淋巴细胞数/最初加入 MLTC 的淋巴细胞数)。

6. ⁵¹Cr 释放试验测定靶细胞裂解率^[10]

标记靶细胞:取需要量的靶细胞,经培养液洗一次,吸去上清液后,在剩下约 0.1—0.2 ml 培养液中加培养液和 Tris-phosphate 缓冲液各 0.2 ml,摇匀后按 1×10^6 靶细胞数加 100 μci Na₂⁵¹CrO₄ 溶液(原液 13-16 mci/ml,科学院原子能所供应),置 37℃温箱温育 1 小时,每 15 分钟摇动一次。标记后的细胞洗四次,然后用培养液调整细胞数至 $2 \times 10^5/ml$ 。

试验方法:按所要求的效应细胞和靶细胞比例(E/T),吸取所需浓度的效应细胞和标记靶细胞各 0.1 ml 于 40 孔 U 型培养板孔中为实验组;加入培养液和标记的靶细胞各 0.1 ml 为自发释放组;加入 6% OP(聚乙二醇辛基苯基醚)和标记的靶细胞各 0.1 ml 为最大释放组;每组重复孔 3 个。经 $30 \times g$ 离心 5 分钟后置含 5% CO₂ 一定湿度的 37℃温箱温育 4 小时。然后经 $60 \times g$ 离心 10 分钟后,每孔吸上清 0.1 ml 用 FH-1901 或 FH-408 井型 γ 计数器测定释放到上清液中的 ⁵¹Cr cpm 值。每孔 ⁵¹Cr 释放的实际值为 [(测定值 \bar{x}_{cpm} - 本底 \bar{x}_{cpm}) \times 2]。标记靶细胞 0.1 ml 的 cpm 为总掺入值。

靶细胞裂解率计算公式:

裂解率(%) =

$$\frac{\text{cpm}_{\text{实验组}} - \text{cpm}_{\text{自发}}}{\text{cpm}_{\text{最大}} - \text{cpm}_{\text{自发}}} \times 100\%$$

7. 细胞毒抑制试验^[11]。此法用于分析 CMC 的特异性。以上述 ⁵¹Cr 释放试验为基础,除每孔加入效应细胞和标记的靶细胞外,还加入不同比例的未标记

靶细胞或 S180 瘤细胞, 观察这些细胞对靶细胞裂解率的影响。如符合以下条件则可认为该 CMC 对标记靶细胞是特异的。(1) 加入非标记靶细胞后, 裂解率显著降低且与未标记靶细胞的比例有明显的线性反应关系。(2) 加入与靶细胞无关的细胞无此作用。

8. 带 θ 表面抗原细胞的检测。将抗 θ 血清(北京医学院微生物教研组提供)加到浓度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 的效应细胞悬液中, 使最终稀释度为 10:1, 于 4°C 静置 30 分钟, 洗一次, 加新鲜豚鼠血清使最终稀释度为 10:1, 37°C 温育 30 分钟。洗一次, 按上述方法作 ^{51}Cr 释放试验。与对照比较, 靶细胞明显降低或消失时, 表明效应细胞带 θ 抗原。

结 果

(一) MLTC 系统建立的条件

反应细胞与刺激细胞比例 (R/S)。R/S 为 5:1 时 MLTC 第五天细胞回收率和 CMC 活性较高, R/S 增大, CMC 活性和细胞回收率降低 (图 1)。

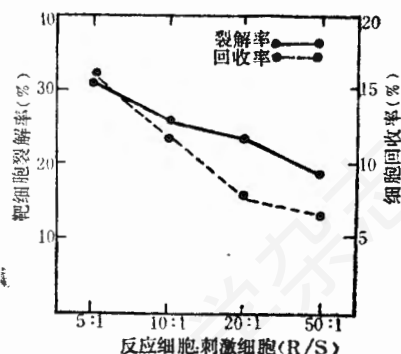


图 1 R/S 对 MLTC 诱导的 CMC 和细胞收获量的影响

^{51}Cr 释放试验的 E/T = 50/1, 除 R/S 外均采用标准 MLTC 系统条件。

细胞密度。反应细胞密度 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 组所诱导的 CMC 活性, 比其余各组稍高 (图 2)。

培养时间。培养 5 天组 CMC 活性比 3 天组高, 与 7 天组接近, 但细胞回收率比 7 天组高 (图 3)。

培养容器。培养容器形状、位置均有影响。小方培养瓶斜置组诱导的 CMC 活性较强 (表 1)。

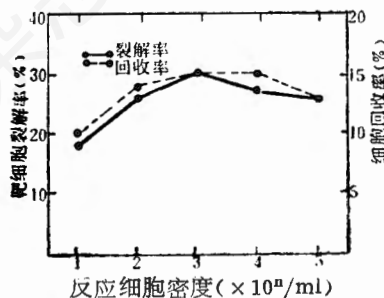


图 2 反应细胞密度对 MLTC 诱导的 CMC 和细胞收获量的影响

^{51}Cr 释放试验的 E/T = 50/1, 除反应细胞浓度均采用标准 MLTC 条件。

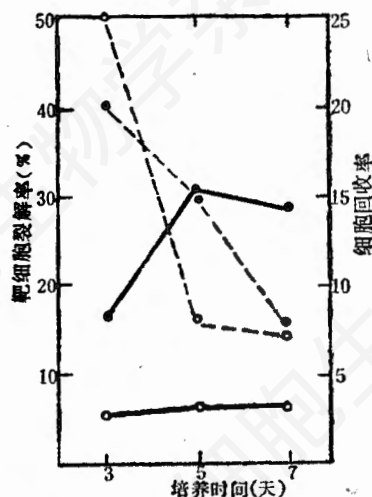


图 3 培养时间对 MLTC 诱导的 CMC 和细胞收获量的影响

分别收集 3、5、7 天的 MLTC 和 AMLC (自身淋巴细胞混合培养) 组细胞作为效应细胞, 以同一批标记 BW 瘤细胞为靶细胞作 ^{51}Cr 释放试验, E/T = 50/1。

●—● MLTC 裂解率 ○—○ AMLC 裂解率
●……● MLTC 回收率 ○……○ AMLC 回收率

培养体积。影响不大, 似以 10ml 组较适宜 (图 4)。

(二) 影响 CMC 的测定—— ^{51}Cr 释放试验的因素

试验用容器。试用过 $4 \times 10 \text{ mm}$ 塑料管, 40 孔平底板, 40 孔 U 型底板 (96 孔板改装), 以后者所测定的靶细胞裂解率较高而且稳定。

温育时间。本试验要求自发释放不超过总

表 1 培养容器对 MLTC 诱导的 CMC 的影响

	第五天细胞回收率(%)	靶细胞裂解率(%) (t 检验)
12 孔板	17	5(p<0.01)
24 孔板	18	7(p<0.01)
青霉素小瓶	16	8(p<0.01)
小方培养瓶(斜置)	15	29 —
小方培养瓶(不斜置)	18	8(p<0.01)

标准的 MLTC 细胞悬液各组 40ml。12 孔板组分 8 孔, 24 孔板组分 20 孔、青霉素瓶、小方瓶组各分 4 瓶培养 5 天, 收获细胞作常规 ^{51}Cr 释放试验。E/T = 50/1。

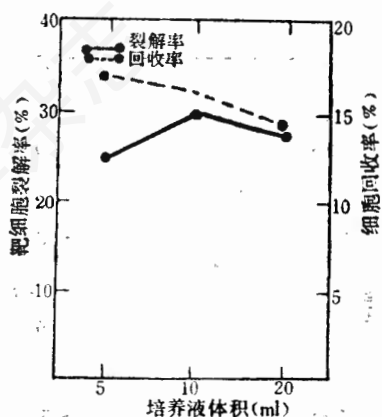
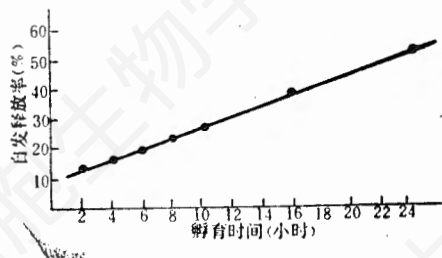


图 4 培养液体积对 MLTC 诱导的 CMC 和细胞收获量的影响

标准的 MLTC 细胞悬液各 20 ml, 5ml、10 ml、20ml 组分别分 4、2、1 瓶培养 5 天, 收获细胞作 ^{51}Cr 释放试验, E/T = 50/1。

图 5 标记 BW 肿瘤细胞 ^{51}Cr 自发释放和温育时间关系

标记 ^{51}Cr 强度 100 μCi /100 万细胞, 每试验孔细胞量 2 万。自发释放率 = 自发释放 cpm/总掺入 cpm。

掺入的 20%。根据标记的 BW 靶细胞的自发释放一时间曲线(图 5), 选用温育时间 4 小时, 与国外同类试验所用时间相同。

温育温度。比较了 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 小时和 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 小时后再 45 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 小时两种方法, 后者裂解率数值增加不多, 但自发释放超过 20%。故选用前法。

标记靶细胞的 ^{51}Cr 强度和试验用靶细胞量。本试验要求总掺入达到 0.1—1cpm/细胞。标记的总强度为 100 μCi /100 万细胞时可达此要求。标记强度增至 2—5 倍, 标记靶细胞的自发释放未见增加(表 2)。试验的效应细胞保持稳定的裂解活性。说明此标记浓度对靶细胞和效应细胞均未见影响试验的毒性作用。为保证总掺入比本底高 5 到 10 倍以上, 靶细胞数量选用 2 万。

表 2 标记同位素 ^{51}Cr 的强度对 BW 靶细胞标记和自发释放的影响

	标记 ^{51}Cr 的强度/100 万细胞				
	25 μCi	50 μCi	100 μCi	200 μCi	500 μCi
掺入(cpm)/细胞	0.07	0.1	0.19	0.25	0.54
自发释放率(%)	16.9	13.3	14.9	13.9	10.8

每试验孔靶细胞数 2 万

效应细胞和靶细胞的比例(E/T)。根据裂解率—E/T 剂量反应曲线, E/T 选用 50:1(图 6)。

增加效靶细胞接触的处理。温育前使效靶细胞充分混和, 离心 30 \times g 5 分钟 沉降可增加接触, 所得裂解率比未处理者高且稳定。

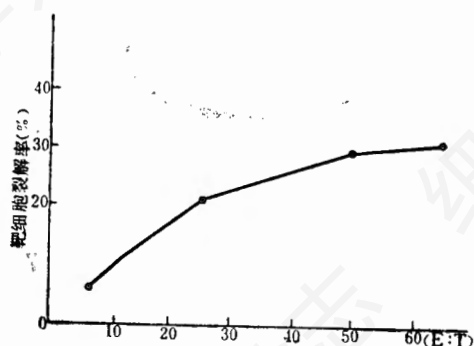


图 6 靶细胞裂解率和 E/T 的关系。

每实验孔靶细胞量 2 万

表 3 MLTC 诱导的 CMC 效应细胞表面 θ 抗原的检测

	预 温 育			
	L	L+抗 θ +C	L+抗 θ	L+C
靶细胞裂解率(%)	27.6	0.8	29.2	30
t 检验	—	($P < 0.01$)	(NS)	(NS)

L: 效应淋巴细胞。抗 θ : 抗 θ 血清。C: 新鲜豚鼠血清。NS: 无意义。

(三) MLTC 诱导的 CMC 效应细胞类型

经检测证实 MLTC 诱导的 CMC 效应细胞为带 θ 抗原细胞(表 3)。

(四) MLTC 诱导的 CMC 的特异性

细胞毒抑制试验表明, 加入成倍未标记的 BW 细胞于实验孔时, 裂解率比对照组明显降低。这种抑制作用随着加入细胞比例的升高而增强, 有线性反应关系, 而加入与 BW 细胞无关的 S180 细胞则无此作用。说明本系统诱导的 CMC 是针对刺激细胞——BW 细胞——所具有的某些抗原(图 7)。

(五) C57BL/6 小鼠脾淋巴细胞对 BW 细胞的自然杀伤(NK)活性

用新鲜的或培养 5 天的 C57BL/6 小鼠脾淋巴细胞作为效应细胞进行试验, 对 BW 靶细胞的裂解率分别为 1% 和 6% 左右(图 3)。

(六) BW 瘤细胞腹腔免疫诱导的 CMC

BW 瘤细胞 1×10^7 腹腔免疫 C57BL/6 小鼠, 10 天后取脾淋巴细胞作为效应细胞, 用

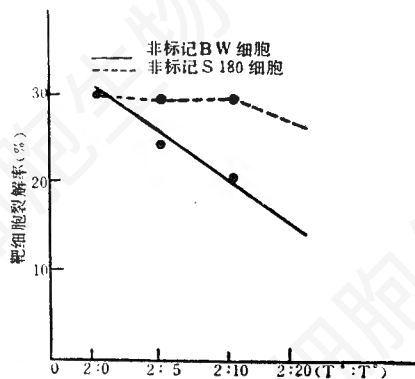


图 7 MLTC 诱导的 CMC 的特异性
细胞毒抑制试验: T* 标记靶细胞, T° 非标记瘤细胞。E/T = 50/1。

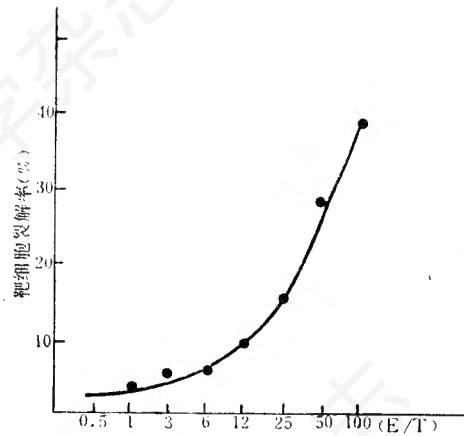


图 8 BW 瘤细胞腹腔免疫小鼠诱导的 CMC: 靶细胞裂解率和 E/T 的关系
每试验孔靶细胞 2 万。

^{51}Cr 释放试验测定对 BW 瘤细胞的裂解率。与本系统诱导的 CMC 作比较, 在 E/T = 50/1 时均为 30% 左右(图 8)。

讨 论

体外的 MLTC 系统是由反应细胞、刺激细胞、辅助细胞和培养液以一定条件组成, 其诱导的主要对象是为各种 T 淋巴细胞, 如 CTL 和相应的辅助细胞, 抑制细胞等。影响回收细胞功能和数量的因素很多, 刺激细胞抗原性的强弱和代谢特性, 反应细胞的来源和组成是决定性的因素。本系统的刺激细胞是 AKR 小鼠的胸腺淋巴肉瘤细胞, H-2 类型为 H-2^k, 反应细胞来自 C57BL/6 小鼠脾, H-2 类型为 H-2^b, 属异基因 MLTC 系统。诱导 CTL 的抗原主要有强免疫原性的 MHC 异型抗原, 也可能有肿瘤相关抗原。反应细胞中加入腹腔渗出细胞为满足本系统诱导 CMC 对巨噬细胞的要求^[12]。在此基础上我们所试验的 5 个培养条件。都不同程度地影响 CMC 细胞的收获量和活性。例如 R/S 降低和小方瓶斜置效果较好, 提示反应细胞和刺激细胞的接触机率和程度是一个重要的影响因素。如果这些细胞密度过大, 以致影响营养和代谢时, 也会导致不良结果, 例如反应细胞浓度升高, 培养体积增加时所见。为解决这一