

# 单克隆抗体对 LAK 细胞 抗胰腺癌作用的影响<sup>①</sup>

陈其奎<sup>②</sup> 袁世珍

(中山医科大学孙逸仙纪念医院消化内科; 广州, 510120)

**提 要** 本文介绍了淋巴因子活化的杀伤细胞(LAK 细胞), 在 YPC<sub>3</sub> 抗人胰腺癌单克隆抗体(YPC<sub>3</sub> mAb)的介导下, 对体外、体内人胰腺癌细胞生长的影响。体外 4h<sup>51</sup>Cr 释放试验表明, 特异性识别 Capan-2 人胰腺癌细胞的 YPC<sub>3</sub> mAb 能通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)显著增强 LAK 细胞对 Capan-2 细胞的杀伤作用, 这种作用随 mAb 的浓度增加而加强, 50μg/ml 的 YPC<sub>3</sub> mAb 提高 LAK 细胞杀伤率约 60%。对照 mAb 无此作用。裸鼠体内实验发现, YPC<sub>3</sub> mAb 与 LAK 细胞联合应用能完全阻止 Capan-2 胰腺癌移植瘤的生长, 优于 LAK 细胞、新鲜脾淋巴细胞和 YPC<sub>3</sub> mAb 的单独作用(成瘤率分别为 25%、100%和 100%)。YPC<sub>3</sub> mAb 增强 LAK 细胞的抗肿瘤作用可以为胰腺癌的生物学治疗提供一个新方法。

**主题词** 胰腺肿瘤/治疗; 杀伤细胞, 淋巴因子激活; 抗体, 单克隆; 细胞毒性, 免疫

**中图分类号** R735.9

淋巴因子活化的杀伤细胞(LAK 细胞)在肿瘤过继性免疫治疗中已显示了较好的前景, 但也存在不少问题<sup>[1]</sup>。因此, 继续寻找提高 LAK 细胞疗效的方法是当前肿瘤免疫学治疗面临的一大课题。联合应用抗肿瘤单克隆抗体(mAb)和 LAK 细胞, 使其产生抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC), 能显著提高 LAK 细胞的抗肿瘤效应<sup>[2~4]</sup>。本研究观察了 LAK 细胞及其在 YPC<sub>3</sub> 抗人胰腺癌单克隆抗体(YPC<sub>3</sub> mAb)介导下, 在体外、体内杀伤胰腺癌细胞的作用, 试图为胰腺癌的生物学治疗开拓新途径。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂

YPC<sub>3</sub> mAb 由本室研制, 其生物学活性用 ELISA 和 ABC 免疫组化法测定<sup>[5]</sup>。1-F/7 抗登革热病毒单克隆抗体(1-F/7 mAb)为对照抗体, 由中山医科大学微生物教研室惠赠。ABC 试剂盒、RPMI 1640 培养基、重组人白

细胞介素 2(r-IL<sub>2</sub>)分别由美国 Vectastain、GIBCO、Elite 公司提供。Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> 购于中国科学院同位素研究所。

### 1.2 实验动物

Balb/c 小鼠、Balb/c 裸鼠由中山医科大学实验动物中心提供。

### 1.3 效应细胞(E)与靶细胞(T)

无菌采集 Balb/c 小鼠脾细胞, 经淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 在 PHA 和 r-IL<sub>2</sub> (1 000U/ml)作用下, 37℃、5%CO<sub>2</sub>、15%小年血清的 RPMI 1 640 完全培养基中诱导 3d, 收集 LAK 细胞, 并测定其活性。取新鲜分离的脾单个核细胞为对照效应细胞。Capan-2 人胰腺癌细胞株由美国加州大学医学院引进, <sup>51</sup>Cr 标记的 Capan-2 细胞用于体外实验。

### 1.4 体外细胞毒性的检测

采用 4h <sup>51</sup>Cr 释放实验<sup>[2]</sup>, 设置最大释放、自然释放、不同的 E/T 比例、不同的 mAb 组, 每组设 3 个重复管。要求自然释放 cpm 值不超过最大释放 cpm 值的 30%。杀伤

① 本课题由美国中华医学基金会(CMB)和国家自然科学基金资助;

② 第一作者, 1963 年出生, 男, 在读博士, 讲师

率由以下公式计算得出:

$$\text{杀伤率(\%)} = \frac{\text{实验组 cpm} - \text{自然释放 cpm}}{\text{最大释放 cpm} - \text{自然释放 cpm}} \times 100$$

### 1.5 体内杀伤胰腺癌细胞的检查

38只6~8周龄Balb/c裸鼠随机分5组,按下列成份混合接种于鼠右耳后皮下。A组,Capan-2细胞;B组,Capan-2细胞+YPC<sub>3</sub>mAb;C组,Capan-2细胞+对照效应细胞;D组,Capan-2细胞+LAK细胞;E组,Capan-2细胞+LAK细胞+YPC<sub>3</sub>mAb。各组Capan-2细胞为 $5 \times 10^5$ /只,E/T为25:1,YPC<sub>3</sub>mAb浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在无菌条件下饲养4周,观察各组裸鼠的成瘤率。

## 2 结果

### 1.2 YPC<sub>3</sub>mAb的特征

经ELISA测定,YPC<sub>3</sub>mAb(0.5mg/ml)滴度大于1:1000;以Capan-2移植瘤标本进行ABC免疫组化分析,YPC<sub>3</sub>mAb与绝大多数胰腺癌呈阳性反应(图1)。而对照抗体的ELISA试验和ABC免疫组化分析均呈阴性反应。

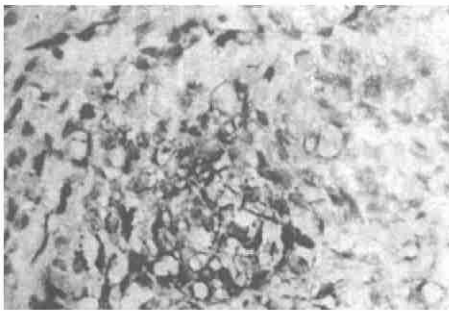


图1 Capan-2人胰腺癌移植瘤YPC<sub>3</sub>mAb的ABC免疫组化染色(×400)

### 2.2 不同E/T比例下,LAK细胞杀伤活力比较

体外细胞毒性实验表明,LAK细胞的杀伤率随E/T比例增大而提高,见图2。

### 2.3 不同浓度YPC<sub>3</sub>mAb的ADCC活性比较

YPC<sub>3</sub>mAb能增强LAK细胞的杀伤率,

这种ADCC作用随抗体浓度的增大而加强。50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的YPC<sub>3</sub>mAb提高LAK细胞对Capan-2肿瘤细胞的杀伤率约60%,见图3。

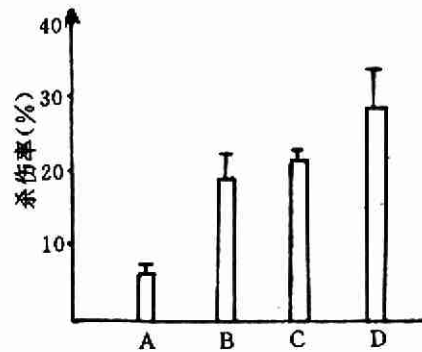


图2 LAK细胞对Capan-2细胞的杀伤活性  
A.对照细胞(E/T=25:1);B.LAK细胞(E/T=10:1);C.LAK细胞(E/T=25:1);D.LAK细胞(E/T=50:1)

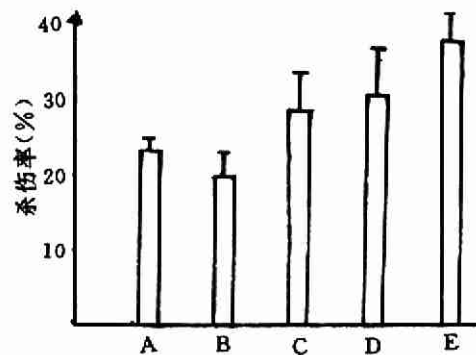


图3 不同浓度YPC<sub>3</sub>mAb的ADCC杀伤活性  
A.LAK细胞(E/T=25:1,下同);B.LAK细胞+1-F/7mAb(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ );C.LAK细胞+YPC<sub>3</sub>mAb(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ );D.LAK细胞+YPC<sub>3</sub>mAb(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ );E.LAK细胞+YPC<sub>3</sub>mAb(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

### 2.4 YPC<sub>3</sub>mAb和LAK细胞体内抗Capan-2肿瘤生长的作用

YPC<sub>3</sub>mAb和LAK细胞联合应用能完全阻止人Capan-2胰腺癌细胞在裸鼠体内的生长,优于对照细胞、YPC<sub>3</sub>mAb或LAK细胞的分别作用。A、B、C、D和E组裸鼠成瘤率分别为100%、100%、100%、25%和0,结果见附表。

附表 不同治疗因子体内抗 Capan-2 肿瘤生长的作用

分组	裸鼠数	成瘤裸鼠数	成瘤率(%)
A 组	8	8	100
B 组	8	8	100
C 组	6	6	100
D 组	8	2	25
E 组	8	0	0

### 3 讨 论

胰腺癌的预后恶劣,临床治疗面临诸多困难<sup>[6]</sup>。在已进行的 mAb 治疗胰腺癌的临床研究中,单用 mAb<sup>[7]</sup>或联合应用自体白细胞<sup>[8]</sup>、干扰素<sup>[9]</sup>等,能增强机体 ADCC 反应及自然杀伤细胞(NK)活性,使部分胰腺癌病人的病情稳定,但这种作用是暂时的、有限的,并未显著延长胰腺癌病人的中位生存期。

LAK 细胞能杀伤肿瘤细胞,这种作用不同于经典的 T 细胞和 NK 细胞。LAK 细胞加大剂量 IL<sub>2</sub> 治疗肾细胞癌、黑色素瘤、淋巴瘤等肿瘤病人已取得一定疗效,但此方法需要大量 LAK 细胞和 IL<sub>2</sub>,且副作用明显<sup>[1]</sup>。因此,如何提高 LAK 细胞疗效是当今免疫学、肿瘤学领域研究和应用 LAK 细胞亟待解决的重要问题。

1987 年 Shiloni 等<sup>[2]</sup>报道了抗肿瘤细胞抗原的特异性抗体可使 LAK 细胞的抗肿瘤活性显著提高,表明 LAK 细胞也象单核、巨噬细胞一样具有 ADCC 效应。这种 LAK 细胞的 ADCC 效应在脾淋巴细胞与 IL<sub>2</sub> 培养 24h 后即很明显,于培养 3~4d 达高峰。抗肿瘤细胞抗体使 LAK 细胞对肿瘤的杀伤率提高一倍。因此,有人将这种加入了 mAb 的 LAK 细胞称为 mAb“武装”或“导向”的 LAK 细胞,对 mAb 特异性识别的肿瘤具有强大的杀伤作用。

近些年来,人们已相继制备出多种抗人

胰腺癌细胞 mAb,应用其中具有 ADCC 效应的 mAb,与 LAK 细胞联合应用,有可能在胰腺癌的过继性免疫治疗中发挥重要作用。本室研制的 YPC<sub>3</sub> mAb,经 ABC 免疫组化检测,与 28/32 例胰腺癌组织反应,与 11 例正常胰腺组织无反应;用核素<sup>99m</sup>Tc 标记 YPC<sub>3</sub> mAb 已在荷瘤裸鼠定位诊断胰腺癌获得成功<sup>[5]</sup>。本实验也发现,YPC<sub>3</sub> mAb 能识别 Capan-2 胰腺癌细胞,在体外能显著提高 LAK 细胞对 Capan-2 细胞的杀伤作用,就杀伤率而言,50ug/ml 浓度时可提高 60%;在体内,YPC<sub>3</sub> mAb 与 LAK 细胞联合应用能更有效地阻止 Capan-2 肿瘤生长。而对照抗体或对照细胞所发挥的杀伤作用相对较弱。从而进一步证实了应用抗肿瘤细胞 mAb 介导的 ADCC 作用能增强 LAK 细胞的抗肿瘤作用,这种 ADCC 作用随抗体浓度的增加而加强。YPC<sub>3</sub> mAb 与 LAK 细胞的联合应用有可能为胰腺癌的生物学治疗提供一个新方法。

(张厚德博士在实验中给予大力帮助,特此致谢)

### 参 考 文 献

- 1 Rosenberg S, Lotze MT, Muul LM, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Eng J Med*, 1987, 316 : 889
- 2 Shiloni E, Eisenthal A, Sachs D, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by murine lymphocytes activated in recombinant interleukin-2. *J Immunol*, 1987, 138 : 1992
- 3 Ragnhammar P, Masucci G, Frodin JE, et al. Cytotoxic functions of blood mononuclear cells in patients with colorectal carcinoma treated with mAb 17-1A and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Cancer Immunol Immunother*, 1992, 35 : 158
- 4 Shiraiwa H, Sekine T, Tobisu KI, et al. A new form of specific targeting cancer immunotherapy

- using anti-tumour monoclonal antibody-conjugated lymphokine-activated killer cells. *Jpn J Cancer Res*, 1991, 82 : 621
- 5 Chen QK, Yuan SZ. Radioimmunolocalization of human pancreatic carcinoma xenograft by  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled YPC<sub>3</sub> monoclonal antibody. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1994, 120 : 668
- 6 Casper ES. Pancreatic Cancer; how can we progress? *Eur J Cancer*, 1993, 29A : 171
- 7 Buchler M, Friess H, Schultheiss KH, et al. A randomized controlled trial of adjuvant immunotherapy (murine monoclonal antibody 494/32) in resectable pancreatic cancer. *Cancer*, 1991, 68 : 1507
- 8 Tempero MA, Pour PM, Uchida E, et al. Monoclonal antibody CO 17-1A and leukopheresis in immunotherapy of pancreatic cancer. *Hybridoma*, 1986, 5 (suppl 1) : S133
- 9 Tempero MA, Sivinski C, Steplewski Z, et al. Phase I trial of interferon gamma and monoclonal antibody 17-1A in pancreatic cancer; biological and clinical effects. *J Clin Oncol*, 1990, 8 : 2019

(1994-03-11 收稿 1995-04-04 修回)

## EFFECT OF MONOCLONAL ANTIBODY ON LAK CELLS ACTIVITY AGAINST PANCREATIC CARCINOMA

Chen Qikui    Yuan Shizhen

(Gastrointestinal Division of Internal Medicine, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

The purpose of this study was to investigate the efficacy of anti-pancreatic carcinoma of lymphokine activated killer cells (LAK cells) mediated by YPC<sub>3</sub> monoclonal antibody (YPC<sub>3</sub> mAb) in vitro and vivo. In 4hr  $^{51}\text{Cr}$  release assays, the cytolysis of Capan-2 human pancreatic carcinoma cells by LAK cells was enhanced by pancreatic carcinoma specific YPC<sub>3</sub> mAb. This antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of the LAK cells was more evident while increasing the concentration of YPC<sub>3</sub> mAb. When 50ug/ml of YPC<sub>3</sub> mAb was used the cytotoxic effects of LAK cells on target cells increased about 60%. No cytotoxic effect of the LAK cells was found in the presence of irrelevant monoclonal antibody. Experimentally, the growth rate of Capan-2 human pancreatic carcinoma cell line in nude mice was 25%, 100% and 100% after the injection of LAK cells, splenocytes and YPC<sub>3</sub> mAb respectively. However, simultaneous injection of YPC<sub>3</sub> mAb and LAK cells completely inhibited the growth of the cell line. These results suggest that LAK cells in combination with YPC<sub>3</sub> mAb might be useful for the treatment of human pancreatic carcinoma.

**Subject headings** pancreatic neoplasms/therapy; killer cells, lymphokine activated; antibody, monoclonal; cytotoxicity, immunologic