

# 用低分化鼻咽癌细胞株(CNE<sub>2</sub>)为靶细胞 测定鼻咽癌(NPC)患者ADCC作用

刘庆伦 蔡体育 陈爱珍

(肿瘤研究所免疫室)

抗体依赖的细胞介导的细胞毒(Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity, ADCC)是机体细胞免疫与体液免疫两大系统的协调作用,在机体的肿瘤免疫、移植免疫,某些真菌、病毒、寄生虫疾患及某些自身免疫疾患的过程中,均发挥重要作用<sup>[1~3]</sup>。ADCC对那些吞噬细胞无法吞噬的体积较大的实体瘤、寄生虫及血流中转移的单个肿瘤细胞均有杀伤作用,ADCC对那些被抗体封闭使T细胞无法发挥杀伤作用的靶细胞亦能有效地杀伤,这些在防止肿瘤转移及改善预后方面是有重要意义的<sup>[4]</sup>。

目前,一般流行用鸡红细胞做靶细胞来测定ADCC作用。为了较准确地反映NPC患者对本身的肿瘤细胞的ADCC作用,我们选用了低分化鼻咽癌细胞株(CNE<sub>2</sub>)作为靶细胞,参考Maclennan的方法<sup>[5]</sup>,用<sup>51</sup>Cr释放法测定了健康人与鼻咽癌患者的ADCC功能,现报道如下:

## 材料与方 法

**一、实验对象** 健康献血员72例,年龄21~50岁NPC患者41例,年龄27~73岁,均为初诊未经抗癌治疗的患者。

**二、靶细胞** 体外培养的低分化鼻咽癌上皮细胞株(CNE<sub>2</sub>),取自北京市病毒研究所。

**三、RPMI-1640培养液** 含15%小牛血清。

**四、Hank's液** 使用时调成pH7.4。

**五、淋巴细胞分离液** 比重1.077~1.078(上海试剂二厂生产)。

**六、聚乙二醇辛基苯基醚(OP)** 配成5%供使用。

**七、<sup>51</sup>Cr: 铬酸钠—<sup>51</sup>Cr注射液,放射性浓度** 20mCi/ml左右,(中国科学院原子能研究所提供)

**八、40孔塑料培养板** 圆底,(上塑二厂生产)

**九、10×40mm塑料试管** 用于测定样品cpm数。

**十、免抗CNE<sub>2</sub>细胞抗血清** 常规方法:以CNE<sub>2</sub>细胞免疫家兔制备,效价为1:5,000,使用浓度为1:10,000。56℃半小时灭活。

**十一、效应细胞** 新鲜外周血3ml,用Ficoll—Hypaque密度梯度分离法分离淋巴细胞。以Hank's液洗3次,用RPMI—1640重新配成细胞混悬液,置培养管内37℃孵育1小时,除去贴壁细胞。用Trypin blue染色检查,活细胞95%以上,染色涂片检查,淋巴细胞占98%以上。最后,配成1.5×10<sup>6</sup>细胞/ml浓度备用。

## 十二、靶细胞标记及<sup>51</sup>Cr释放试验

(1)取生长旺盛的靶细胞(CNE<sub>2</sub>)足量,用0.5%胰酶(活性1:250,pH7.4)消化,(37℃孵育10分钟,)以使细胞从瓶壁上脱落,以RPMI-1640洗3次,然后,每1×10<sup>6</sup>个靶细胞加100μCi的Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>,及0.5ml RPMI-1640,置37℃温箱1小时,每15分钟摇匀1次,然后用RPMI-1640洗4次,除去未掺入细胞内的<sup>51</sup>Cr,留取少量供测定<sup>51</sup>Cr总掺入用,其余分成两份,使用前30分钟,其中1份以抗CNE<sub>2</sub>抗血清(1:10,000)孵育,另1份

用同浓度的无关抗体（免疫前的正常兔血清）  
 孵育，上述靶细胞均最终配成  $1 \times 10^5$  细胞/ml  
 浓度备用。

(2) 按下述各组（每组三个平行孔）要  
 求，加相应实验材料入培养板各孔中：  
 另取  $0.1 \text{ ml}^{51}\text{Cr}$  标记靶细胞直接加入塑料

表1 ADCC 试验 ( $^{51}\text{Cr}$  释放法)

组别	5%OP ml	RPMI 1640ml	效应细胞 ml	抗血清, $^{51}\text{Cr}$ 标记靶细胞 ml	正常血清, $^{51}\text{Cr}$ 标记靶细胞 ml	$^{51}\text{Cr}$ 标记靶细胞 ml
自发释放	—	0.1	—	—	—	0.1
最大释放	0.1	—	—	—	—	0.1
效应细胞对照	—	—	0.1	—	0.1	—
抗体对照	—	0.1	—	0.1	—	—
实验组	—	—	0.1	0.1	—	—

管中（一式三份）供测定总掺入用。

最后，将上述装好的培养板用  $30\text{g}$  离心5分钟，然后置含  $5\% \text{CO}_2$  的湿空气中孵育14小时，取出以  $90\text{g}$  离心10分钟，吸取各孔上清液  $0.1$  毫升置塑料试管内，测定 cpm 数，各组  $^{51}\text{Cr}$  释放实际值为： $[(\bar{x}_{\text{测定值 cpm}} - \bar{x}_{\text{本底 cpm}}) \times 2]$ ， $\bar{x}$  代表三孔平均测得的 cpm 数值。

细胞毒性 CT，按下式计算：

$$CT = \frac{\text{试验组 } ^{51}\text{Cr 释放} - \text{效应细胞对照组 } ^{51}\text{Cr 释放}}{\text{最大 } ^{51}\text{Cr 释放} - \text{效应细胞对照组 } ^{51}\text{Cr 释放}} \times 100\%$$

### 结果

	例数	细胞毒性(CT.%)	
正常人	72	$36.10 \pm 12.13$	} $P > 0.8$
NPC 患者	41	$35.57 \pm 9.39$	
正常人女性	16	$34.80 \pm 15.32$	} $P > 0.7$
正常人男性	43	$35.84 \pm 11.37$	
NPC 患者女性	9	$31.14 \pm 13.88$	} $P > 0.1$
NPC 患者男性	32	$36.82 \pm 7.54$	

注：(1) 有13例正常人未记录性别，故未列入性别分类统计中。

(2) 因年龄分组分布较集中，无法分析年龄影响。

### 讨论

一、 $^{51}\text{Cr}$  标记强度 使用  $100\mu\text{Ci}/1 \times 10^6$  靶细胞标记强度时，总掺入约为  $0.5\text{cpm}/\text{细胞}$ ，

亦不会因射线过强而致靶细胞被杀伤而出现自发释放率过高的情况。

### 二、自发释放及收获时间

(1) 自发释放： $^{51}\text{Cr}$  标记的靶细胞自发释放在收获期内不超过  $20\%$ ，20小时时约为  $20\%$  左右，可满足实验要求（图1）。

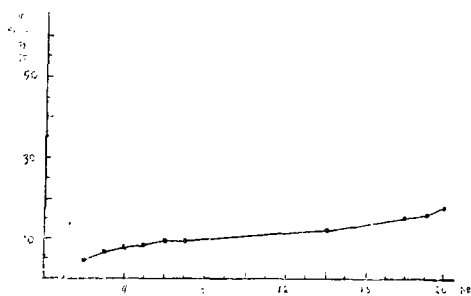


图1 标记靶细胞自发释放—时间曲线

(2) 收获时间：约7小时  $^{51}\text{Cr}$  释放基本达到高峰，为了便于实验操作，我们选第14小时收获（图2）。

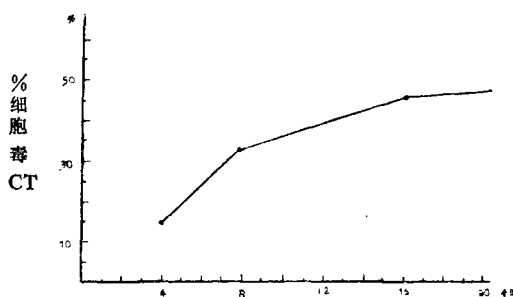


图2 孵育时间—细胞毒曲线

**三、效靶细胞的比例 (E/T)** 在 E/T 比例增高时, 细胞毒也增高。但考虑到效靶细胞比例 E/T 太高时, 反而会抑制细胞毒<sup>[6]</sup> 及以尽量少取患者血液为原则, 我们采取了取血 3 ml, E/T = 15/1 的方案。当 E/T 为 15/1 时细胞毒曲线为上升部分, 可以比较灵敏地反映细胞毒活性的变化 (图 3)。

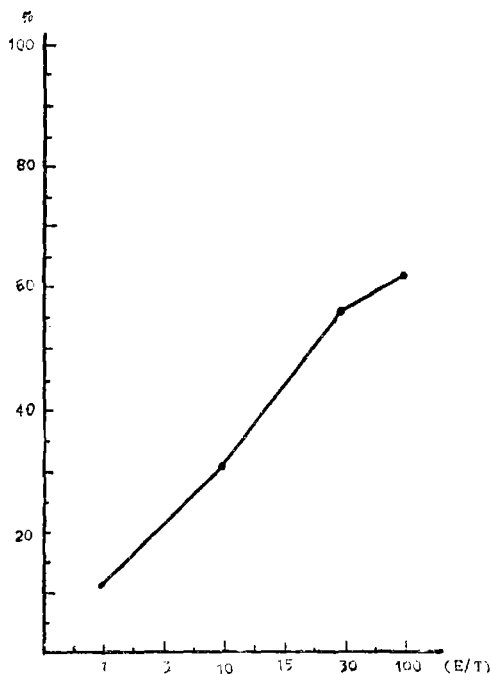


图 3 效靶细胞比率—细胞毒曲线

**四、抗靶细胞抗血清浓度** 抗靶细胞抗血清最终浓度 1:10,000 已满足实验要求, 增加浓度并不增加细胞毒作用 (图 4)。

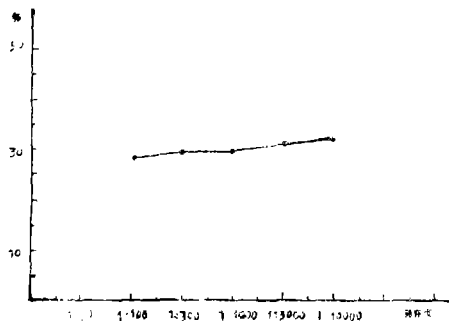


图 4 抗血清浓度—细胞毒曲线

**五、靶细胞的选择** 我们认为选用体外培养的 CNE<sub>2</sub> 细胞株作为靶细胞较之使用异种细胞作靶细胞所测定出的 ADCC 作用能更切实地反映 NPC 患者 K 细胞对本身癌细胞的杀伤能力。因为在不同的靶细胞的实验系统之中, 所要求的实验条件是不同的, 所测出的结果也是不同的<sup>[6]</sup>。我们选 CNE<sub>2</sub> 作靶细胞还因为 98.6% 左右的 NPC 患者癌细胞为低分化型的 (CNE<sub>2</sub> 为低分化鼻咽癌细胞株)<sup>[7]</sup>, 以及因为有报道, 巨噬细胞, 单核细胞, 中性白细胞等对传代细胞无 ADCC 作用<sup>[8]</sup>。我们还发现, 在我们的实验系统中, 效应细胞对照组的细胞毒 CT, 鲜有超过 3~5%, 说明 CNE<sub>2</sub> 对 NK 细胞的杀伤作用不敏感, 另外, CNE<sub>2</sub> 亦易于用 <sup>51</sup>Cr 标记, 易于传代培养, 保证靶细胞的稳定来源。因而本法是稳定和简易的。

**六、结果分析** 我们的结果表明, 正常人与 NPC 患者的 ADCC 功能无显著差别, 不同性别亦无差别, 这与国内外一些报道的某些肿瘤患者, 如肺癌, 恶性黑色素瘤, 结肠癌, 淋巴瘤等患者 ADCC 功能不比正常人低下的结论相符<sup>[9~12]</sup>。

本试验首次应用鼻咽癌 CNE<sub>2</sub> 细胞株为靶细胞, 从理论上应较客观地反映 NPC 病人的 ADCC 功能、在体内 ADCC 易被抑制或封闭因子包括游离抗原, 免疫复合物, 正常免疫球蛋白等所抑制<sup>[13]</sup>。但在体外试验中, 由于淋巴细胞多次孵育与洗涤, 有可能除去了抑制性物质, 这可能是 NPC 患者 ADCC 功能体外试验结果与正常人比较没有明显降低的原因之一。

**参 考 文 献**

[1] O'Tode C, et al. Lymphoid cells mediating tumor specific cytotoxicity to carcinoma of uricary bladder. J Exp Med 1974; 139:457.  
 [2] Greenspan J S, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in recurrent aphthous ulceration. Clin exp Immunol 1981; 44:603.  
 [3] 林飞卿, 章谷生. 细胞免疫学研究进展。

- 北京。人民出版社。1980；177。
- [4] Roitt I M. *Essential Immunology* 3rd. ed. p160, London, Blackwell, Scientific publication, 1978.
- [5] MacLennan L C M, et al. Quantitation K cell, In: Bloom B R, (eds), *In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity*. p511, New York, Academic Press Inc 1976.
- [6] George M S, et al. Human lymphocyte, monocyte and neutrophil antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity towards human erythrocytes. *Cell Immunol* 1978; 41:122.
- [7] 中山医科大学病理教研组, 等。鼻咽癌组织类型及其与放射治疗的预后关系。新医学肿瘤专辑 1975; 9。
- [8] David A and Garrett M A. Distinctive functional properties of human blood L lymphocytes: A comparison with T lymphocytes, B lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1977; 118(5):1712.
- [9] Beboe K P, et al. Natural cytotoxicity and antibodydependent cytotoxicity in solid tumor cancer patients: Regulation by adherent cell. *Clin Immunol Immunopathol* 1982; 23:133.
- [10] Hersh E M. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in human cancer: Characterization of patient leucocyte activity and treatment effects. *Cancer* 1982; 49:251.
- [11] 陈新, 等。慢淋及淋巴瘤患者 ADCC 的测定。上海免疫杂志 1983; 3(2):85.
- [12] Mc Credie J A, et al. Effect of operation and rddiotherapy on antibody-dependent cellular cytotoxicity *Cancer* 1979; 44:99.
- [13] Currie G. *Cancer and the Immune Response*, 2nd ed, London, Edward Arnold Ltd 1980.

## The Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity against NPC Cell Line (CNE<sub>2</sub>) in NPC Patients

Liu Qinglun    Cai Tiyu    Chen Aizhen

(Cancer Research Institute)

### Abstract

The ADCC activities of human lymphocytes against poordifferentiated nasopharyngeal carcinoma cell line (CNE<sub>2</sub>) were studied by using a quantitative <sup>51</sup>Cr release assay. The cytotoxicity (CT) was 36.11 ± 12.13% in healthy donors, while it was 35.57 ± 9.39% in NPC patients. There was no significant difference between healthy donors and NPC patients, nor between man and woman.

The factors affecting the quantitative <sup>51</sup>Cr releas assay were studied. It was shown that this assy is reproducible and practicable.