

单克隆抗体对活化腹腔巨噬细胞 抗胰腺癌作用的影响^①

陈其奎^② 袁世珍

(中山医科大学孙逸仙纪念医院消化内科; 广州, 510120)

摘要 观察重组人白细胞介素 2(γ -IL2)体外诱导的腹腔巨噬细胞,在 YPC3 抗人胰腺癌单克隆抗体 (YPC3 mAb)介导下,通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)机制对胰腺癌细胞的杀伤作用。4 h ⁵¹Cr 释放实验表明,在 YPC3 mAb 作用下,活化腹腔巨噬细胞对 Capan-2 人胰腺癌细胞的杀伤活力明显增强,比单用巨噬细胞杀伤活力约提高 70.0%,而对照 1-F/7 抗登革热病毒单抗无影响。 γ -IL2 作用的腹腔巨噬细胞和脾淋巴细胞具有类似的 ADCC 杀伤效应。结果提示, γ -IL2 和 YPC3 mAb 联合腹腔注射,可能为胰腺癌的局部治疗提供一个新方法。

关键词 胰腺肿瘤 治疗; 抗体,单克隆 治疗应用; 巨噬细胞,淋巴因子活化; 细胞毒性,免疫

中图分类号 R 735.9

活化的腹腔渗出巨噬细胞在局部的抗肿瘤免疫中发挥重要作用^[1],但它对胰腺癌作用的报道甚少。本研究初步观察了抗人胰腺癌单克隆抗体 (YPC3 mAb)对重组人白细胞介素 2(γ -IL2)活化腹腔巨噬细胞杀伤 Capan-2 人胰腺癌细胞作用的影响,旨在为胰腺癌的治疗探索新方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

ABC 试剂盒和 γ -IL2 分别来自美国 Vactastain 和 Ellite 公司,Na₂⁵¹CrO₄ 由中国医学科学院同位素研究所提供。Capan-2 细胞株由美国加州大学医学院引进。

1.2 单克隆抗体检测

YPC3 mAb 由本室研制^[2,3],1-F/7 抗登革热病毒单克隆抗体 (1-F/7 mAb)由中山医科大学微生物教研室提供。抗体的活性分别用酶联免疫吸附试验 (ELISA)和 ABC 免疫组化方法测定。

1.3 效应细胞 (E) 的制备

6周~8周龄的 Balb/c 小鼠,腹腔注射 1 mL 无血清 RPMI 1640 培养基,连续 3 d,第 4 天处死小鼠,无菌冲洗腹腔收集腹腔渗出细胞 (PEC),洗涤、离心 2 次,用含 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基

配成 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个 /mL 的单细胞悬液,平皿孵育 2 h,洗涤 3 次去除非粘附细胞。调整粘附细胞 (巨噬细胞纯度 > 85%) 为 10^6 /mL,加植物血凝素 A 和 γ -IL2 (1 000 U/mL) 在 37°C,5% CO₂ 条件下培养 3 d。使用前去除上清,用完全培养基冲洗,再悬浮。不加 γ -IL2 的粘附细胞为对照细胞。同时以经 γ -IL2 刺激的鼠脾淋巴细胞即淋巴因子活化的杀伤细胞 (LAK 细胞) 为实验对照。

1.4 细胞毒性作用的检测

采用 4 h ⁵¹Cr 释放法^[4]检测活化腹腔巨噬细胞和 LAK 细胞的杀伤活性。以 ⁵¹Cr 标记 Capan-2 细胞为靶细胞 (T),E/T 比例为 25/1,每组设 3 个重复管,特异性杀伤活率的百分比由以下公式算出:

$$\text{杀伤率} = \frac{\text{实验组计数值} - \text{自然释放计数值}}{\text{最大释放计数值} - \text{自然释放计数值}} \times 100$$

最大释放计数值为靶细胞加 0.1 mol/L HCl 孵育后测得,单独孵育的靶细胞所测得的计数值为自然释放计数值,要求自然释放计数值小于最大释放计数值的 30%。为检测 ADCC 效应,25 μ g/mL 的 YPC3 mAb 和 1-F/7 mAb 在加入效应细胞前分别与靶细胞孵育 30 min,ADCC 活性按上述方法测定并计算。

2 结果

① 国家自然科学基金资助课题; ② 第一作者,1963 年出生,男,在读博士,讲师

2.1 YPC3 mAb的特征

以 Capan-2细胞为包被抗原进行 ELISA测定, 0.5 mg/mL YPC3 mAb的滴度大于 1:1 000。以 Capan-2胰腺癌裸鼠移植瘤标本做 ABC免疫组化, YPC3 mAb与绝大多数胰腺癌细胞呈中度以上强阳性反应。而对照抗体 1-F/7mAb均为阴性。表明 YPC3 mAb能选择性识别 Capan-2人胰腺癌细胞。

2.2 不同 mAb对活化巨噬细胞抗胰腺癌作用的影响

经 YPC3mAb和 γ -IL2联合作用的腹腔巨噬细胞对 Capan-2细胞的杀伤活力明显增强,比单用巨噬细胞的杀伤率高 70.0% (从 21.72% \pm 1.52% 到 37.06% \pm 10.78%)。1-F/7mAb对腹腔巨噬细胞杀伤 Capan-2细胞的活力影响较小 (从 21.72% \pm 1.52% 到 27.02% \pm 2.78%),见表 1

表 1 不同条件下腹腔巨噬细胞杀伤 Capan-2 细胞活力的比较

分 组	杀 伤 率 ($\bar{x} \pm s$)
巨噬细胞	21.72 \pm 1.52
巨噬细胞+ γ -IL2	22.47 \pm 4.32
巨噬细胞+ YPC3 mAb	26.67 \pm 1.58
巨噬细胞+ γ -IL2+ 1-F/7 mAb	27.02 \pm 2.78
巨噬细胞+ γ -IL2+ YPC3 mAb	37.06 \pm 10.78

2.3 活化巨噬细胞与 LAK细胞 ADCC活力比较

γ -IL2能增加巨噬细胞和淋巴细胞对 Capan-2细胞的杀伤作用,在 25 μ g/mL YPC3 mAb作用下,经 γ -IL2活化的巨噬细胞和 LAK细胞具有相似的 ADCC作用,见图 1

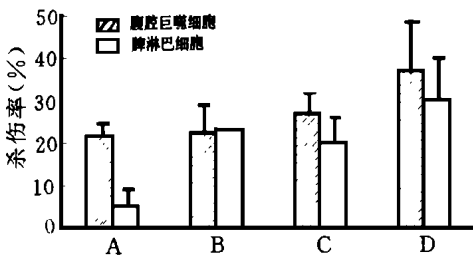


图 1 活化的腹腔巨噬细胞与脾淋巴细胞杀伤 Capan-2活力的比较

A 对照细胞; B 加 γ -IL2; C 加 γ -IL2和 1-F/7mAb; D 加 γ -IL2和 YPC3 mAb

3 讨 论

ADCC的免疫学基础表现为具有 Fc受体的效应细胞能选择性杀伤经特异性抗体致敏的靶细胞。腹腔巨噬细胞也和其他效应细胞一样,细胞表面存

在较多 Fc受体,在特异性抗体介导下发挥较强的 ADCC效应,这种 ADCC作用已成为巨噬细胞溶解肿瘤细胞的主要机制之一。Kawase研究表明, γ -IL2和抗肿瘤抗原抗体 11G mAb联合腹腔注射能通过 ADCC机制抑制 MHI34肝癌细胞在腹腔内的生长,减少小鼠的荷瘤数目,而单独应用 γ -IL2或 11G mAb的作用则不明显。因而,具有 ADCC作用的 mAb能克服单用淋巴因子活化杀伤细胞免疫治疗疗效不佳等某些限制^[5]。

YPC3 mAb由人胰腺癌细胞免疫制备,属 IgG1亚型,与 Capan-2细胞有较好的结合亲和性。用免疫组化 ABC检测, YPC3 mAb与人胰腺癌组织反应(28/32)例,与正常胰腺组织、其他肿瘤无反应或反应较弱^[2]。用核素 ^{99m}Tc标记 YPC3 mAb在荷人胰腺癌裸鼠定位肿瘤已获成功^[3]。YPC3 mAb在体外增强 LAK细胞的抗胰腺癌作用,同时注射 YPC3 mAb和 LAK细胞能阻止 Capan-2在裸鼠体内的生长^[6]。本实验也证实, YPC3 mAb能增强 γ -IL2活化的腹腔巨噬细胞杀伤胰腺癌细胞的作用,表明效应细胞的 ADCC作用主要取决于抗体与细胞膜表面的相互作用,而与效应细胞的类型无关。

胰腺癌预后恶劣,腹腔转移早,晚期病人的治疗面临诸多困难^[7]。本实验应用特异性抗人胰腺癌 YPC3 mAb与 γ -IL2体外联合诱导腹腔渗出巨噬细胞能显著增强其抗胰腺癌效应。如果能将 YPC3 mAb与 γ -IL2联合腹腔注射,可能为胰腺癌的局部治疗提供一条新途径,但在荷宿主体内抗胰腺癌的作用的实验与临床研究有待进一步验证。

参 考 文 献

- 1 Venstovsek S, Maccubbin D, Ehrke MJ, *et al.* Tumor-necrotic activation of murine resident peritoneal macrophages by interleukin-2 and tumor necrosis factor α . *Cancer Res*, 1992, 52(14): 3880
- 2 张厚德,袁世珍. 抗人胰腺癌单克隆抗体的制备和应用. *中山医科大学学报*, 1995, 16(1): 36
- 3 Chen QK and Yuan SZ. Radioimmunolocalization of human pancreatic carcinoma xenograft by ^{99m}Tc-labeled YPC3 monoclonal antibody. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1994, 120(11): 668
- 4 Shiloni E, Eisenthal A, Sach D, *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by murine lymphocytes activated in recombinant interleukin 2. *J Immunol*, 1987, 138(6): 1992

- 5 Kawase I, Komuta K, Hara H, *et al.* Combined therapy of mice bearing a lymphokine-activated killer-resistant tumor with recombinant interleukin-2 and an anti-tumor monoclonal antibody capable of inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res*, 1988, 48(5): 1173
- 6 陈其奎,袁世珍. 抗人胰腺癌单克隆抗体介导 LAK细胞体外体内抗胰腺癌作用的研究. *中华肿瘤杂志*, 1994, 16(5): 353
- 7 Warshaw AL and Castillo CF. Medial progress-pancreatic carcinoma, *N Engl Med J*, 1992, 326(7): 455
- (1996-09-09收稿 1996-12-09修回)

EFFECT OF MONOCLONAL ANTIBODY ON ACTIVATED PERITONEAL MACROPHAGES 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 present study was to investigate the specific ADCC of γ -IL2 activated peritoneal macrophages on Capan-2 human pancreatic carcinoma cells mediated by YPC3 monoclonal antibody (YPC3 mAb). In $4\text{h}^{51}\text{Cr}$ release assays, the cytolysis of γ -IL2 activated macrophages was enhanced significantly by YPC3 mAb. This ADCC of activated macrophages on Capan-2 cells was 70.0%, higher than unactivated macrophages alone. No ADCC was found with irrelevant mAb. The comparison between ADCC of peritoneal macrophages and splenocytes activated by γ -IL2 showed essentially similar cytotoxic levels with 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of YPC3 mAb. The results suggested that peritoneal injection of γ -IL2 and YPC3 mAb might provide a new approach for local treatment of pancreatic carcinoma.

Subject headings pancreatic neoplasms/therapy; antibody, monoclonal/therapeutic use (TU); macrophages, lymphokine activated; cytotoxicity, immunologic