

·论著·

脐血 CD₃A K 细胞和其培养上清诱导 K₅₆₂ 细胞凋亡

何秉燕,张渝侯,文志华,李小明,邹典定,王捷荣

[摘要] 目的 探讨脐血 CD₃A K 细胞和其培养上清(CS)诱导 K₅₆₂ 细胞凋亡。方法 用细胞形态学观察, DNA 琼脂糖电泳,原位末端标记法检测 K₅₆₂, CD₃A K 细胞诱导的 K₅₆₂, CS 诱导的 K₅₆₂ 细胞凋亡率。结果 K₅₆₂ 细胞自然凋亡率 3.50 ± 0.97%; CD₃A K 细胞诱导的 K₅₆₂ 细胞凋亡率 27.38 ± 4.91%, $P < 0.01$, CS 诱导的 K₅₆₂ 细胞凋亡率为 33.09 ± 5.22%, $P < 0.01$ 。结论 脐血 CD₃A K 细胞和其培养上清能诱导 K₅₆₂ 凋亡。

[关键词] 脐血; CD₃A K 细胞; K₅₆₂ 细胞; 凋亡

[中图分类号] R-33; R733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2000)02-0071-03

Cord Blood CD₃A K Cells and CD₃A K Cell Cultural Supernatants Induce K₅₆₂ Cell Apoptosis

HE Bing-Yan, ZHANG Yur-Hou, WEN Zhi-Hua, et al.

Department of Pediatrics, Second Hospital, Hubei Medical University, Wuhan 430071

[Abstract] **Objective** To explore K₅₆₂ cell apoptosis induced by cord blood CD₃A K cells and CD₃A K cell cultural supernatants (CS). **Methods** Apoptosis was detected in K₅₆₂ cells and in K₅₆₂ cells cultured with either cord blood CD₃A K cells or CS using the TdT end labelling technique, cell morphology and DNA agarose gel electrophoresis. **Results** The percentage of apoptotic cells in the control K₅₆₂ culture was 3.50 ± 0.97%. Apoptosis of K₅₆₂ cells cultured with CD₃A K cells rose to 27.38 ± 4.91% ($P < 0.01$). Culturing K₅₆₂ cells in CS also resulted in significantly increased apoptosis (33.09 ± 5.22%) ($P < 0.01$). **Conclusions** Cord blood CD₃A K cells and CS could induce K₅₆₂ cell apoptosis.

[Key words] CD₃A K, fetal; K₅₆₂ cell; Apoptosis

细胞凋亡也称程序性细胞死亡(PCD),生物疗法治疗白血病的重要机制是诱导白血病细胞凋亡。本实验研究活化脐血 CD₃A K 细胞和 CD₃A K 细胞培养上清(CD₃A K cells' cultural supernatants, CS)诱导红白血病 K₅₆₂ 细胞株凋亡的作用,以期为活化脐血治疗白血病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

标本来源:脐血来源于湖北医科大学附属第二医院妇产科正常分娩的胎儿胎盘血。重组白细胞介

素 2(rIL-2) 购自军事医学科学研究所, CD₃ 单抗购自北京邦定生物医学公司, K₅₆₂ 购自武汉大学典型物培中心,原位细胞凋亡试剂盒 POD 购自德国 Boehringer Mannheim。

1.2 方法

1.2.1 脐血的采集 待足月、顺产、健康的胎儿胎盘娩出后,距胎盘 5~7 cm 的脐静脉抽脐血 10 ml, 25 U/ml 肝素抗凝。

1.2.2 CD₃A K 细胞及 CS 的制备 用淋巴细胞分离液分离脐血单个核细胞(CMNC),取 CMNC,加入含 10% 新生小牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基,使 CMNC 终末浓度

[基金项目] 湖北省科学技术发展基金资助(基金号:962p1104)

[作者简介] 何秉燕,女,1963 年出生,硕士,主治医师。

[作者单位] 430071 武汉,湖北医科大学附二院儿科(何秉燕,张渝侯,邹典定,王捷荣); 430071 武汉,湖北医科大学附属第二医院脑外科(文志华); 430071 武汉,湖北医科大学大学生化教研室(李小明)

为 1×10^6 /ml,加 rIL-2, 1 000 U/ml, CD₃ 单抗, 1 μ g/ml,置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂,饱和湿度培养箱 72 h,离心后收获的细胞即 CD₃A K 细胞,取 CD₃A K 细胞加入培养基,使其终末浓度为 1×10^6 /ml,置培养箱 24 h,离心后的上清即 CD₃A K 细胞培养上清。

1.2.3 脐血 CD₃A K 细胞和 CS 诱导 K₅₆₂ 凋亡实验分组 K₅₆₂; CD₃A K (0.5 ml) + K₅₆₂ (0.5 ml); CD₃A K 细胞浓度为 1×10^7 /ml, K₅₆₂ 细胞浓度 1×10^6 /ml; CS (900 μ l) + K₅₆₂ (100 μ l), K₅₆₂ 细胞浓度 5×10^6 /ml。各组细胞置培养箱共育 4 h,离心收获细胞,涂片,待自然晾干,丙酮固定 15 min,置 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.4 原位末端标记法 (TUNEL) POD 检测凋亡细胞 阻断自体过氧化物酶和细胞裂解; 标记; 信号转换和分析,设阴、阳性对照,光镜下观察细胞涂片,棕黄色细胞即为凋亡细胞,蓝色细胞为非凋亡细胞,严格按试剂盒说明操作。

1.2.5 DNA 抽提和电泳 取 10^7 细胞经 0.5 ml 细胞裂解液重悬细胞 50 $^{\circ}$ C 过夜,不时振荡,加等体积酚、氯仿、异戊醇抽提,加入 25 μ l RNA 酶 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,取所制的样品,1.5% 琼脂糖电泳,电压 150 V,电泳 40 min。

1.2.6 统计学处理 采用 *t* 检验

2 结果

2.1 细胞形态

CD₃A K 与 K₅₆₂ 共育 4 h,见 CD₃A K 聚集在 K₅₆₂ 周围, K₅₆₂ 细胞凋亡呈棕黄色,见核固缩甚至核碎裂,胞浆空泡变性, CD₃A K 细胞呈蓝色,形态结构正常。见图 1。

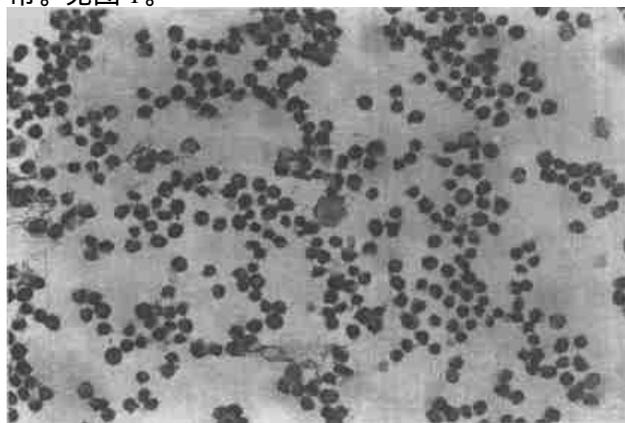


图 1 CD₃A K 诱导 K₅₆₂ 凋亡

Fig. 1 CD₃A K cells induced K₅₆₂ cell apoptosis

CS 与 K₅₆₂ 共育 4 h,见 K₅₆₂ 细胞异型性明显,有的细胞明显增大,呈棕黄色,核固缩或呈新月体形,甚至核碎裂,胞浆明显空泡变性,呈现凋亡细胞特征性改变。见图 2。

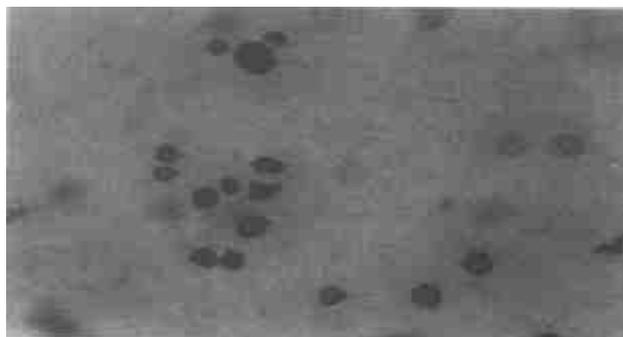


图 2 CS 诱导 K₅₆₂ 凋亡

Fig. 2 CS induced K₅₆₂ cell apoptosis

2.2 TUNEL 检测凋亡细胞

CD₃A K 细胞及其上清与 K₅₆₂ 细胞作用前,其凋亡率均 < 5%,作用后 K₅₆₂ 细胞凋亡率明显增高。见表 1。

表 1 CD₃A K, CS 诱导 K₅₆₂ 细胞凋亡百分率

Table 1. The percentage of K₅₆₂ cell apoptosis

组别	例数	凋亡率 ($\bar{x} \pm s$, %)
K ₅₆₂	20	3.50 \pm 0.97
CD ₃ A K + K ₅₆₂	23	27.38 \pm 4.91 ¹⁾
CS + K ₅₆₂	21	33.09 \pm 5.22 ²⁾

注:1) (CD₃A K + K₅₆₂) 组与 K₅₆₂ 组比较, $t = 15.1$, $P < 0.01$

2) (CS + K₅₆₂) 组与 K₅₆₂ 组比较, $t = 17.6$, $P < 0.01$

2.3 DNA 琼脂糖凝胶电泳检查结果

K₅₆₂ 细胞 DNA 电泳无梯状条带; CD₃A K 细胞诱导的 K₅₆₂ 细胞 DNA 电泳呈现凋亡细胞特征性的梯状条带; CS 诱导的 K₅₆₂ 细胞 DNA 电泳呈现凋亡细胞特征性的梯状条带。见图 3。



图 3 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 DNA agarose gel electrophoresis

3 讨论

脐血干细胞替代骨髓干细胞用于免疫重建,其移植物抗宿主反应(GVHD)比较低,以往因而推测其移植物抗白血病反应(GVL)亦低。但最近研究表明,与骨髓血和外周血相比,脐血淋巴因子激活杀伤细胞(LAK)有较高的GVL,其能诱导白血病细胞凋亡,有利于清除白血病细胞^[1,2]。CD₃A K 细胞体内外抗肿瘤活性明显高于LAK细胞^[3],CD₃A K 细胞是异质性细胞群,其表型以CD₃⁺T 细胞和CD₅₆⁺NK 细胞表型为主,具有活化淋巴母细胞特性,常形成集落^[4],本实验见脐血CD₃A K 细胞聚集在白血病细胞K₅₆₂细胞周围,直接攻击K₅₆₂,诱导K₅₆₂凋亡。

CD₃A K 细胞培养上清抑制肿瘤细胞生长,杀伤肿瘤细胞^[5],脐血CD₃A K 细胞培养上清含多种细胞因子,实验证明CS能诱导K₅₆₂凋亡。以上说明脐血CD₃A K 既有靶细胞直接接触诱导K₅₆₂凋亡,又通过细胞因子诱导K₅₆₂凋亡。

上述研究结果显示,除常规放、化疗治疗白血病,还可用脐血CD₃A K 细胞治疗白血病,但脐血

CD₃A K 细胞治疗白血病患者,必须考虑供受者之间的组织配型,MHC限制性,否则会导致GVHD。故对组织配型不合的患儿,可用CS治疗白血病。由于不含细胞,仅含多种细胞因子,故不会出现GVHD。

[参 考 文 献]

- [1] Gardiner CM, Reen DT. Differential cytokine regulation of natural killer cell-mediated necrotic and apoptotic cytotoxicity [J]. Immunology, 1998; 93(4): 511~516.
- [2] Gardiner CM, Neara AO, Reen DT. Differential cytotoxicity of cord blood and bone marrow derived natural killers [J]. Blood, 1998; 91(1): 207~212.
- [3] 白云飞,张学庸,牟震先,等. CD₃ 单克隆抗体活化的杀伤细胞对胃癌细胞株 MWKS 体外杀伤及裸鼠体内抑制作用的实验研究 [J]. 中国肿瘤临床, 1994; 16(2): 111~113.
- [4] 施广霞,程一耀,郭连英,等. 抗 CD₃A K 单抗原和 rIL-2 共刺激诱导,扩增的 CD₃A K 免疫生物学特征 [J]. 上海免疫学杂志, 1995; 15(6): 324~326.
- [5] 王立新,许靖霞,谭剑平,等. CD₃A K 细胞的诱导及抗肿瘤作用的初步探讨 [J]. 上海免疫学杂志, 1997; 17(6): 350~352.

(收稿日期:1999-11-18 修回日期:2000-02-01)

(本文编辑:黄志强)

欢迎订阅、邮购中国当代儿科杂志

中国当代儿科杂志是经国家科学技术部、卫生部审核批准,由卫生部主管,湖南医科大学和湘雅医院主办的国家级儿科专业学术期刊,为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊,向国内外公开发行。国际标准刊号:ISSN 1008-8830,国内统一刊号:CN43-1301/R,邮发代号:42-188,广告经营许可证号:4301004000016。

本刊内容以儿科与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态,设有论著、儿童保健、小儿外科、病例报告、临床经验交流、药物与临床、临床病例讨论、讲座、综述、医学与电脑等栏目,是广大儿科及相关学科的工作者工作学习交流的良好园地。

本刊为国际标准大16开本,双月刊,逢双月中旬出版。每期定价7.80元,全年订价46.80元。欢迎到各地邮局订阅;本刊编辑部也可办理邮购。如需购1999年度全年杂志者,请汇款30元(含邮费)至本编辑部,款到寄书。

地址:湖南省长沙市湘雅路141号中国当代儿科杂志编辑部

邮政编码:410008 电话:0731-4327402 传真:0731-4327402

Email: xycjcp@163.net; xyped@public.cs.hn.cn

中国当代儿科杂志编辑部