

论著 · 临床研究

卡介苗体外对急性淋巴细胞性白血病患者 细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤 HL-60 细胞效应的影响

潘华¹ 孙立荣²

(1. 青岛市妇女儿童医疗保健中心内二科, 山东 青岛 266011;
2. 青岛大学医学院附属医院小儿血液科, 山东 青岛 266003)

[摘要] **目的** 探讨卡介苗(BCG)体外对急性淋巴细胞性白血病(ALL)患儿外周血细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)杀伤 HL-60 细胞效应的影响。**方法** 应用 Ficoll-Hypaque 法分离 ALL 患儿(白血组)和健康儿童(对照组)的外周血单个核细胞,在白介素-2(IL-2)、植物血凝素(PHA)和 BCG 作用下诱导成 CTL 细胞;应用流式细胞仪测定 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 比例变化;应用 MTT 法检测 CTL 对 HL-60 细胞的杀伤力。**结果** 培养前 2 d,对照组和白血组 CTL 细胞数量及体积均无明显变化,第 3 天开始两组细胞均开始增殖,体积变大,6~10 d 达高峰;培养至第 10 天时,加入 BCG 的白血组和对对照组细胞数量分别较无 BCG 的白血组和对对照组增多;白血组 CD3⁺CD8⁺ 比例明显高于对照组,经 BCG 作用后两组 CD3⁺CD8⁺ 比例均明显升高;白血组 CTL 对 HL-60 细胞的杀伤力明显低于对照组。**结论** BCG 可协同 IL-2、PHA 体外促进 CTL 细胞增殖并提高其对 HL-60 细胞的杀伤力。

[中国当代儿科杂志,2012,14(3):184-187]

[关键词] 卡介苗; CTL 细胞; 白血病; 儿童
[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)03-0184-04

Effect of bacillus Callmette-Guérin on cytotoxicity of cytotoxic T lymphocyte from children with acute lymphoblastic leukemia for killing HL-60 cells *in vitro*

PAN Hua, SUN Li-Rong. Women and Children's Medical and Health Care Center of Qingdao, Qingdao, Shandong 266011, China (Sun L-R, Email: Sunlr@vip.sina.com)

Abstract: **Objective** To study the effect of bacillus Callmette-Guérin (BCG) on cytotoxicity of cytotoxic T lymphocyte (CTL) from human peripheral blood of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) for killing HL-60 cells *in vitro*. **Methods** The mononuclear cells were isolated from peripheral blood of ALL children and healthy children, and were cultured with RPMI1640, interleukin-2 (IL-2), phytohemagglutinin (PHA) and BCG. The growth of CTLs was observed by light microscopy. The proportions of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ were determined by flow cytometry 10 days after culture. MTT method was performed to detect the cytotoxicity of CTLs for killing HL-60 cells. **Results** Neither the cell number nor the volume of CTLs changed significantly within 2 days of culture, but both began increasing on the 3rd day of culture and reached a peak on the 6-10th days. On the 10th day of culture, the cell number of CTLs in the BCG treatment group was much higher than in the group without BCG treatment. The CD3⁺CD8⁺ proportion in the leukemia group was much higher than in the control group. With the effect of BCG, the CD3⁺CD8⁺ proportion of the two groups became much higher. The cytotoxicity of CTLs for killing HL-60 cells in the leukemia group was weaker than in the control group. **Conclusions** BCG along with IL-2 and PHA promotes the proliferation of CTLs and enhances the ability of CTLs in killing HL-60 cells. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14 (3):184-187]

Key words: Bacillus Callmette-Guérin; Cytotoxic T lymphocyte; Leukemia; Child

卡介苗(BCG)是一种多功能免疫增强剂,可被巨噬细胞吞噬,提呈抗原肽给 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞,并分泌大量的细胞因子,促进 T 细胞增殖,诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的生成。资料证明,卡介苗能与肿瘤细胞表面抗原交叉反应,可激活机体的免疫反应^[1]。目前卡介苗或卡介苗的提取物已广泛应用于临床抗肿瘤与抗感染,尤其是对膀胱癌的免疫治疗。但卡介苗能否提高 CTL 杀伤白血病的免疫治疗。

[收稿日期]2011-08-07;[修回日期]2011-10-07
[作者简介]潘华,女,硕士,医师。
[通信作者]孙立荣,主任医师。

细胞的作用以及与健康儿童比较,白血病患者 CTL 杀伤力如何目前少见报道。本研究拟观察 BCG 体外对急性淋巴细胞性白血病(ALL)患儿及健康儿童外周血 CTL 细胞增殖的影响,探讨 BCG 对 ALL 患儿 CTL 的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

选取 2007 年 1 月至 2008 年 6 月青岛大学医学院附属医院小儿血液科完全缓解 1 年以上标危 ALL 患儿 20 例(白血病区),平均年龄 3.2 岁,男 11 例,女 9 例。另选取门诊体检的健康儿童 20 例(对照组),平均年龄 3.5 岁,男 9 例,女 11 例。两组根据有无加 BCG 分别分为无 BCG 白血病区、BCG 白血病区、无 BCG 对照组和 BCG 对照组。白血病区与对照组儿童在年龄、性别构成的比较中差异均无统计学意义。本研究获得我院医学伦理委员会批准及家长书面知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 血标本采集 无菌采集两组儿童外周血 10 mL,肝素(20 U/mL)抗凝,加入等体积的 PBS 液稀释,以 2:1 比例加入淋巴细胞分离液,1120 g 离心 20 min,吸取中间白细胞层,置 13 mL 离心管中,PBS 液洗涤,840 g 离心 10 min,取管底部白色沉淀物,即为单个核细胞(PBMC)。

1.2.2 CTL 培养及免疫表型测定 取两组儿童的 PBMC 置于 RPMI-1640 培养液中调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,加入 RPMI-1640 培养液、IL-2 (500 u/mL)、PHA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 BCG (浓度为 $3.75 \times 10^4 \text{ cfu}/\text{mL}$)。置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 10 d,第 3 天半量换液并全量补充细胞因子(IL-2、PHA)及 BCG,离心后取沉淀细胞。

收集沉淀细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,加入离心管,每管 100 μL ,分别加入荧光标记的单克隆抗体 CD3、CD4、CD8,终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置暗处,4℃ 标记 45 min,用 PBS 液洗涤 2 次,然后用流式细胞仪检测细胞表型(CD3、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺)。

1.2.3 细胞毒性实验 将 CTL($2 \times 10^6/\text{mL}$)和靶细胞白血病细胞株(HL-60)($1 \times 10^5/\text{mL}$)各 100 μL ,置于 96 孔板中,效应细胞:靶细胞 = 20:1,另设单独效应细胞和靶细胞对照,每组设 3 个平行板,分别加入 CTL 200 μL 和靶细胞 200 μL ,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,用 MTT 法测定效应细胞对靶细胞

的杀伤活性。杀伤活性的计算公式为:

$$(1 - \frac{A_{\text{效应-靶细胞混合}} - A_{\text{效应细胞}}}{A_{\text{靶细胞}}}) \times 100\%$$

注:A 为平均吸光度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行分析,测得数据用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CTL 细胞的形态变化

采用倒置显微镜观察 CTL 细胞形态变化。培养前 2 d,对照组和白血病区 CTL 细胞数量及体积均无明显变化,第 3 天开始对照组和白血病区 CTL 细胞均开始增殖,体积变大,6 ~ 10 d 达高峰。CTL 细胞以大淋巴细胞为主,圆形,细胞质透明,呈集落生长。见图 1。

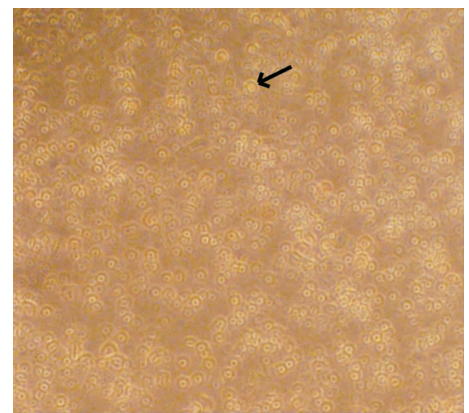


图 1 BCG 白血病区培养第 10 天光镜观察(×100) 箭头所示为典型 CTL 细胞。

2.2 细胞数量变化

培养至第 10 天时,BCG 对照组和白血病区分别较无 BCG 对照组和白血病区 CTL 细胞数量增多($P < 0.01$);BCG 白血病区和无 BCG 白血病区分别较 BCG 对照组和无 BCG 对照组 CTL 细胞数量增多($P < 0.01$)。见表 1。

2.3 细胞表型变化

BCG 白血病区 and 对照组中 CD3、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 比例分别明显高于无 BCG 白血病区 and 对照组($P < 0.01$);无 BCG 白血病区 CD3、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 比例较无 BCG 对照组明显升高

($P < 0.01$);BCG 白血病组 CD3 比例及 $CD3^+CD8^+$ 比例较 BCG 对照组明显升高($P < 0.01$),但 BCG 白血病组 $CD3^+CD4^+$ 比例较 BCG 对照组明显降低($P < 0.01$)。见表 2。

2.4 MTT 法测 CTL 细胞的杀伤力

加入 BCG 的对照组和白血病组 CTL 细胞杀伤力分别明显高于无 BCG 的对照组和白血病组($P < 0.01$);BCG 对照组和无 BCG 对照组分别较 BCG 白血病组与无 BCG 白血病组 CTL 细胞杀伤力提高($P < 0.01$)。见表 3。

表 1 各组培养 10 d CTL 细胞的数量比较 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	细胞计数($\times 10^6$ /mL)
无 BCG 对照组	10	3.51 $\pm$ 0.21
BCG 对照组	10	4.70 $\pm$ 0.43 ^a
无 BCG 白血病组	10	4.17 $\pm$ 0.25 ^a
BCG 白血病组	10	5.83 $\pm$ 0.19 ^{b,c}
F 值		5.25
P 值		<0.01

a:与无 BCG 对照组比较, $P < 0.01$; b:与 BCG 对照组比较, $P < 0.01$; c:与无 BCG 白血病组比较, $P < 0.01$

表 2 各组 CD3、CD3 ⁺ CD4 ⁺ 、CD3 ⁺ CD8 ⁺ 比例的比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	CD3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺
无 BCG 对照组	10	0.72 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.04
BCG 对照组	10	0.80 $\pm$ 0.04 ^a	0.18 $\pm$ 0.08 ^a	0.74 $\pm$ 0.09 ^a
无 BCG 白血病组	10	0.82 $\pm$ 0.05 ^a	0.10 $\pm$ 0.09 ^a	0.69 $\pm$ 0.09 ^a
BCG 白血病组	10	0.89 $\pm$ 0.07 ^{b,c}	0.14 $\pm$ 0.04 ^{b,c}	0.88 $\pm$ 0.09 ^{b,c}
F 值		6.27	5.19	8.05
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

a:与无 BCG 对照组比较, $P < 0.01$; b:与 BCG 对照组比较, $P < 0.01$; c:与无 BCG 白血病组比较, $P < 0.01$

表 3 CTL 细胞的杀伤力的比较 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	杀伤力(%)
无 BCG 对照组	10	26.2 $\pm$ 1.1
BCG 对照组	10	49.9 $\pm$ 1.1 ^a
无 BCG 白血病组	10	20.7 $\pm$ 1.2 ^a
BCG 白血病组	10	36.8 $\pm$ 1.1 ^{b,c}
F 值		5.67
P 值		<0.01

a:与无 BCG 对照组比较, $P < 0.01$; b:与 BCG 对照组比较, $P < 0.01$; c:与无 BCG 白血病组比较, $P < 0.01$

3 讨论

BCG 为结核分支杆菌,是多功能免疫调节剂,侵入机体被巨噬细胞吞噬,并由巨噬细胞和树突状细胞提呈给 TH1 细胞,促使 $CD3^+CD4^+$ T 细胞、

$CD3^+CD8^+$ T 细胞增殖,尤其 CTL 明显增多,并分泌大量的细胞因子,如 IL-2、 γ -干扰素(IFN- γ) 和 β -肿瘤坏死因子(TNF- β),其中 IL-2 可促进 T 细胞的增殖^[2]。本研究结果显示,ALL 患儿和健康儿童体外 PBMC 接种 BCG 后 $CD3$ 、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 均上升,证实 BCG 体外可促进 $CD3^+CD4^+$ T 细胞、 $CD3^+CD8^+$ T 细胞增殖,并以后者为主。

CTL 有 $CD3^+CD8^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 两个亚群,其中 $CD3^+CD8^+$ CTL 是体内数量最多的 CTL 亚群, $CD3^+CD4^+$ 的量极少。故本研究以 $CD3^+CD8^+$ 细胞近似于 CTL。CTL 在机体对肿瘤的免疫反应起非常重要的作用,尤其 CTL 可直接杀伤肿瘤细胞^[3]。

然而,白血病患儿的免疫功能状态低下,尤其细胞免疫功能,存在 CTL 功能受损^[4],削减了对白血病细胞的免疫监视功能。因免疫清除能力下降,而导致白血病细胞恶性克隆性无节制增殖。而机体的抗白血病特异性免疫主要以 T 细胞免疫为主。

本研究显示 ALL 患儿化疗间期 $CD3^+CD8^+$ 比例上升,但 BCG 白血病组和无 BCG 白血病组 CTL 杀伤力分别较 BCG 对照组和无 BCG 对照组低,推测 ALL 患儿化疗间期虽有 $CD3^+CD8^+$ 数量升高,但细胞免疫功能较健康儿童降低。Yu 等^[5] 亦发现白血病患者经化疗后或间断联合免疫抑制剂治疗后 CTL 细胞毒性下降,只有坚持应用一段时间的 BCG 免疫治疗后,CTL 细胞毒性才能提高。

本研究显示 BCG 诱导的 ALL 和健康儿童外周血 CTL 细胞均具有杀伤 HL-60 的作用,并且 Giri 等^[6] 发现在应用 BCG 免疫治疗有效的患儿中 HLA-B17 和 HLA-AW33 阳性率最高。这说明主要组织相容性复合物 I (MHC I) 分子是 CTL 细胞毒性免疫功能的基础。卡介苗的免疫治疗可被看作是在 MHC I 的帮助下对机体进行免疫筛查,可清除机体残存的非常少的肿瘤细胞^[7],从而起治疗微小残留病的作用。

总之,卡介苗作为一种免疫增强剂,激活机体细胞免疫反应,提高机体抗肿瘤能力,可成为临床肿瘤免疫治疗的一种新途径。

[参 考 文 献]

[1] Bequm NA, Ishii K, Kurita-Taniquuchi M, Tanabe M, Kobayashi M, Moriaki Y. Mycobacterium bovis BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages [J]. Infect Immun, 2004, 72(2):937-948.

[2] Fan XL, Yu TH, Gao Q, Yao W. Immunological properties of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin strain ex-

pressing fusion protein IL-2-ESAT-6 [J]. Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai), 2006, 38(10): 683-690.

[3] Shin DM, Jeon BY, Lee HM, Jin HS, Yuk JM, Song CH, et al. Mycobacterium tuberculosis eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling [J]. PloS Pathog, 2010, 6(12): e1001230.

[4] Yuk JM, Shin DM, Yang CS, Kim KH, An SJ, Rho J, et al. Role of apoptosis-regulating signal kinase 1 in innate immune responses by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin [J]. Immunol Cell Biol, 2009, 87(1): 100-107.

[5] Yu DS, Lee CF, Hsieh DS, Chang SY. Antitumor effects of recombinant BCG and uinterleukin-12 DNA vaccines on xenografted

murine bladder cancer[J]. Urology, 2004, 63(3): 596-601.

[6] Giri PK, Schorey JS. Exosomes Derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in vitro and in vivo [J]. PLoS One, 2008, 3(16): e2461.

[7] Mathé G, Amiel JL. The roles of adoptive and active forms of immunotherapy in the cure of children suffering from acute lymphoid leukemia: a) underestimation of active immunotherapy benefit, b) its immunogenetic indications to select sensitive patients, hence prevent chemotherapy's late effects [J]. Biomed Pharmacother, 2001, 55(9-10): 531-542.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

缅怀恩师唐泽媛教授

恩师病榻已久,年初到北京开会曾去探望。10月得知恩师病重,只因学生不能脱身于工作,遂请红静副书记代表医院和学生本人看望恩师。数日后,闻恩师千古于北京中日友好医院(2011年11月7日,享年90岁),其心荡荡,其思翩翩。合目追思恩师音容笑貌,历历在目;把心缅怀恩师教诲,余音绕耳!回首往事只觉眼睛酸涩,黯然泪下。

恩师是四川营山县人,生于1921年4月,1947年毕业于华西协成大学医学院,获美国纽约州立大学医学博士学位。历任《中华儿科杂志》第二、三届编委,第四届副总编辑、第五届顾问。历任四川省医学会儿科专委会副主任委员、主任委员,曾担任华西医科大学儿科教研室副主任、主任。主编《围产医学基础与临床》等专著4部,发表论文80余篇,培养研究生20余名。

唐泽媛教授是我国新生儿医学的奠基人之一,一生治学严谨、一丝不苟,在新生儿感染性疾病领域成绩卓著,尤其在巨细胞病毒感染方面进行了深入的开拓性研究。在全国率先成立了巨细胞病毒研究室,进行了巨细胞病毒感染的分子生物学研究,在国内首次报道了育龄期妇女巨细胞病毒感染的感染率、先天性巨细胞病毒感染的母婴传播途径、巨细胞病毒的分子流行病学特征,建立了巨细胞病毒感染的早期诊断标准,其研究成果先后获四川省科技进步奖2项。

早在新中国成立前,面对缺医少药的社会状况,她就立志于为解除病患疾苦的医疗卫生事业,选择到华西协成大学医学院潜心攻读,以期治病救人、医学救国。新中国一穷二白,妇幼卫生事业尤其如此,极度简陋的医疗条件使孕产妇和新生儿死亡率居高不下。孩子是国家的希望、民族的未来。唐老师等老一辈医学家力图改变这种局面。和同道一起,不辞辛劳,深入农村、工厂、街道,普及医疗卫生常识,宣传新法接生,提倡儿童保健,重视新生儿护理,为基层的儿童健康事业做出了积极贡献。

唐泽媛教授是华西新生儿专业的创始人,早在70年代中期,在她带领下,华西儿科正式成立三级学科。从此,四川医学院儿科开始了儿科学领域内各亚专业跨越式发展。

恩师不仅是一名医术精湛、医德高尚的儿科临床专家和学者,更是一位学风严谨、受人尊敬的良师,一位谦虚谨慎、平易近人的益友。她的一言一行影响着年轻一代的医务工作者,尤其是她看待问题的远见卓识,对待病患谦和的态度以及在临床医疗上的一丝不苟的精神是留给我们的宝贵遗产。她重视培养年轻学者,总是及时地把临床、科研上所发现的新思想、新课题解读给年轻人,作为她的学生,我受益匪浅。今天我们华西儿科学所取得的成绩都与老师的言传身教息息相关。华西医学的精神和文化在她的一生中,得到了充分诠释!今天我们可以告慰恩师的是,华西儿科学已成为国家重点学科和国家精品课程,今年华西儿科新生儿专业又获准国家临床重点专科建设项目。这些成就的取得源自唐老师等一代代华西人的艰苦奋斗和开拓进取。我们将继承和发扬老一辈华西人的优良传统,把儿童医学事业发扬光大。

恩师虽去,风范长存。恩师的为人之道、为师之道、为医之道、为学之道影响久远。“合抱之木,始于毫末;九层之台,始于垒土”,恩师那博古通今的文化底蕴与学贯中西的学术胸襟,为医学界所感佩!恩师为儿科医学奉献终身的情操,为我等后生之楷模!

(四川大学华西第二医院儿科 母得志)