

# 抗T细胞单克隆抗体 (211-1) 清除骨髓中T细胞的实验研究

卜凤荣 劳妙芬 毛秉智 董波 吴祖泽

(军事医学科学院 放射医学研究所)

本文报告应用抗T淋巴细胞单克隆抗体 (211-1) 和幼兔补体, 体外处理骨髓细胞对 GM-CFUc 生成率无不良影响, 并能清除骨髓中 98% 以上的T细胞。淋巴细胞转化试验也证明, 211-1单克隆抗体可以清除骨髓中T细胞。

**关键词** 单克隆抗体, T淋巴细胞

移植物抗宿主病 (GVHD) 是同种骨髓移植后主要死亡原因, 目前尚无根本的解决办法。用抗T细胞单克隆抗体 (McAb) 清除骨髓中引起 GVHD 的功能性T细胞, 是减轻或清除GVHD的一条新途径。

本文报告了应用抗T细胞 McAb 加幼兔补体外处理骨髓有核细胞对 GM-CFUc 生成的影响及清除骨髓中T细胞的效果, 为临床骨髓移植应用McAb 体外处理供体骨髓细胞提供实验依据。

## 材料与方 法

### (一) 211-1 McAb的制备

另文报道<sup>[1]</sup>。

### (二) 211-1 McAb处理骨髓细胞

每毫升骨髓细胞悬液<sup>[2]</sup> ( $1 \times 10^7$  细胞) 加 0.01ml 杂交瘤腹水。置 4°C 孵育 60 min, 加入等体积幼兔补体, 置室温 60 min 或 37°C 30 min, 然后用 RPMI 1640 培养液离心洗涤两次。重新用 RPMI 1640 培养液悬浮细胞, 再加等体积兔补体, 室温放置 60 min 后, 用 RPMI 1640 培养液离心洗涤

三次, 调节细胞浓度后待用。

### (三) 幼兔补体制备

选用一月龄幼兔, 在无菌条件下, 取心脏血, 凝固后分离血清。用微量细胞毒试验检测有无细胞毒抗体, 将多只无细胞毒兔血清混合, -20°C 贮存, 一般只能贮存 3—6 个月, 防止反复冻融, 以免失去补体活性。

### (四) 骨髓中T细胞的检测

采用间接免疫荧光法。将 0.1ml 处理前后的骨髓细胞 ( $1-2 \times 10^7$ /ml) 和 0.1ml 约 1:10000 稀释的杂交瘤腹水加入小试管, 于 4°C 孵育 30 min 以后, 再用 37°C 温热的含 5% 小牛血清的 GKN 溶液, 离心洗涤两次, 再加入 0.1ml 工作浓度的 FITC 标记的兔抗鼠免疫球蛋白, 4°C 孵育 30 min 后, 用上述含小牛血清的 GKN 溶液离心洗涤三次, 加入一滴封固剂 (70ml 甘油加 30ml pH 8.6 甘氨酸缓冲液), 室温放置 15 min, 滴在载玻片上, 盖上盖玻片, 置荧光显微镜下, 观察荧光着色的细胞数

本文于 1985 年 4 月 29 日收到。

及荧光强度。

### (五) 骨髓细胞的GM-CFUc测定

30mm 直径的玻璃培养皿中先加入 0.2ml 肌肉条件培养液作为刺激因子。

RPMI 1640 培养液组成的培养体系中含 15% 马血清, 15% 经 56°C 灭活的 AB 型健人血清, 加入  $1 \times 10^5$ /ml 骨髓有核细胞。37°C 温育后, 加入适量 3% 琼脂, (最终浓度为 0.3%)。经充分吹打, 取 1 ml 细胞悬液加到事先加好刺激因子的培养皿中。培养皿置于含 5% CO<sub>2</sub> 和饱和湿度的二氧化碳培养箱中, 培养八天后, 记录集落生成率。

### (六) 淋巴细胞转化试验

取 0.1ml 骨髓细胞悬液 ( $1 \times 10^6$  细胞/ml), 加到 40 孔培养板的孔内, 加入 1.6ml (约 4μg) PHA 溶液, 置含 5% CO<sub>2</sub> 与饱和湿度的培养箱内, 培养 3 天后, 加入 0.2μCi <sup>3</sup>H-TdR, 继续培养 4h 后取出作成膜片, 烤干后放入闪烁液内, 测 cpm 值。

## 实 验 结 果

### (一) 211-1McAb 加补体处理骨髓细胞对 GM-CFUc 生成的影响

为观察 211-1 McAb 加补体处理骨髓后对粒系祖细胞生长的影响, 选择对杀伤 T 细胞有效的杂交瘤腹水浓度去处理骨髓细胞, 分别记录处理前后的 GM-CFUc 产率 (见表 1)。

表 1 结果表明, 211-1 McAb 加补体处理骨髓细胞对粒系祖细胞生成无不良影响。

### (二) 211-1 McAb 清除骨髓中 T 细胞的效果

用间接免疫荧光法检测经 McAb 和补体处理前后, 骨髓中荧光着色的 T 细胞数, 结果见表 2。

表 1 正常与经 McAb 处理后骨髓中 GM-CFUc 含量测定 (GM-CFUc/10<sup>6</sup>)

Table 1 The yield of granuloid colonies from human bone marrow treated or untreated with 211-1 McAb

| 实验次数<br>No | 处 理 前<br>Untreated | 处 理 后<br>Treated |
|------------|--------------------|------------------|
| 1          | 37.2 ± 4.9         | 34.3 ± 5.8       |
| 2          | 67.0 ± 17.7        | 286.0 ± 17.5     |
| 3          | 51.0 ± 6.2         | 66.0 ± 11.7      |
| 4          | 78.2 ± 12.2        | 88.2 ± 13.8      |
| 5          | 25.6 ± 6.6         | 41.6 ± 6.9       |
| 6          | 48.0 ± 11.5        | 53.0 ± 6.0       |
| 7          | 102.0 ± 15.5       | 117.0 ± 14.0     |
| 8          | 234.0 ± 11.4       | 259.6 ± 16.3     |
| 9          | 22.4 ± 7.3         | 58.2 ± 8.5       |
| 10         | 191.8 ± 25.2       | 244.0 ± 31.0     |
| 11         | 35.6 ± 5.3         | 88.2 ± 16.0      |
| 平均         | 99.7 ± 89.0        | 121.4 ± 94.4     |

注: 表内数字是 5 个培养皿集落计数的均值 ± SD  
Note: Each number represents the mean value of five figures ± SD

表 2 经 211-1McAb 处理与未经处理的骨髓细胞中 T 细胞数的比较 (%)

Table 2 The number of T cells in human bone marrow treated or untreated with 211-1 McAb

| 实验次数<br>No | 骨髓细胞来源<br>The source of bone marrow            | 荧光着色的细胞数 (%)<br>The number of fluorescinated cells |                | T 细胞清除率 (%)<br>T-cells depleted from marrow |                |
|------------|--|--|----------------|---|----------------|
|            |  | 处理前<br>Untreated                                   | 处理后<br>Treated | C <sub>1</sub>                              | C <sub>2</sub> |
| 1          | 手术切除的肋骨 A piece of Rib from surgical operation | 15   | 1              | 93  |                |
| 2          |  | 15   | 0.5            | 97  |                |
| 3          |  | 8  | 0              | 100   |                |
| 4          | 正常人骨髓<br>Normal bone marrow                    | 24   | 1              | 0.5   | 96 98          |
| 5          |  | 15   | 0.5            | 0.25  | 97 98          |
| 6          |  | 23   | —              | 0.25  | — 99           |

注: (1) 表内数字是 400 个细胞中所占荧光着色细胞的平均百分数

The mean number of fluorescinated cells/400 cells

(2) C<sub>1</sub> 表示一次 McAb 加补体处理骨髓细胞  
Bone marrow after the first times treatment with McAb and complement

C<sub>2</sub> 表示第二次补体处理骨髓细胞  
Bone marrow after the second times treatment with complement

由表2可见,正常骨髓中荧光着色的T细胞数较高,平均为16.7%,因混入了外周血T细胞所致。经McAb加补体处理后,荧光着色细胞数下降到0.6%,清除率为96.4%,经第二次补体处理,荧光着色细胞数是0.30%,清除率达98%以上。

### (三) 211-1McAb处理骨髓细胞前后淋巴细胞转化比较

植物血凝集(PHA)有刺激T淋巴细胞增殖作用,用McAb清除骨髓中T细胞后,淋巴细胞转化试验的刺激指数明显降低。结果见表3。

表3 McAb处理人骨髓细胞前后淋转指数的比较  
Table 3 Index of lymphocyte transformation of human bone marrow treated or untreated with 211-1McAb

| 实验次数<br>No | 处理前<br>Untreated  |                |      | 处理后<br>Treated    |                |      |
|------------|-------------------|----------------|------|-------------------|----------------|------|
|            | 实验组<br>Experiment | 对照组<br>Control | SI   | 实验组<br>Experiment | 对照组<br>Control | SI   |
| 1          | 7985              | 5060           | 1.58 | 5846              | 6808           | 0.86 |
| 2          | 14114             | 1937           | 7.29 | 4829              | 3879           | 1.24 |

注: 1. 表内数字为三个实验, 复管平均cpm值  
Each number represents the mean value of 3 tests cpm  
2. SI: 刺激指数 Index of Stimulation

表3的结果指出,骨髓细胞经McAb处理后,淋转试验的刺激指数在1.0左右,与不经McAb处理的骨髓细胞淋转刺激指数比较,两者之间有明显差别。

## 讨 论

我们对211-1McAb的特异性作了研究<sup>[1]</sup>,证明此抗体是抗全部T细胞的

McAb,并具有能结合补体杀伤T细胞的功能。因此,211-1McAb加补体能杀伤骨髓中98%以上的T细胞。Janossy曾报道<sup>[2]</sup>用OKT<sub>3</sub>和OKT<sub>1,1A</sub> McAb加补体能清除骨髓中99%以上的T细胞减少了GVHD的发生率。

淋巴细胞转化试验结果表明,骨髓细胞经McAb处理后,PHA刺激骨髓细胞摄取<sup>3</sup>H-TdR明显降低,在一定程度上说明了T细胞有所减少,但不能绝对反映T细胞数量上的变化。因幼稚的骨髓细胞在培养过程中,由于DNA合成与细胞增殖的缘故,也摄取<sup>3</sup>H-TdR,与外周血淋巴细胞培养比较,<sup>3</sup>H掺入量明显增高。此外,骨髓细胞经McAb处理后对照组cpm值高于未经处理的对照组,可能由于骨髓细胞浓缩所致。

1982年Prentice<sup>[4]</sup>报道,17例白血病人骨髓移植前,用OKT<sub>3</sub> McAb和补体处理HLA相配的供体骨髓,移植给受体,GVHD发生率从79%降低到18%。

1984年Filipovich报道<sup>[6]</sup>,用三个抗T细胞的McAb联接免疫毒素处理供体骨髓细胞后输给2例白血病人,未发生GVHD。

Prentice<sup>[6]</sup>用二个McAb(M<sub>2</sub>G<sub>2</sub>和RF<sub>2</sub>)和兔补体处理供体骨髓细胞后,再输给HLA相配的13例白血病人,其中仅2例发生GVHD。

上述实验结果提示,11-1McAb加补体有可能体外清除骨髓细胞中的T细胞,从而有效地降低同种异基因骨髓移植的GVHD发生率。

## 参 考 文 献

- [1] 卜凤荣等: 中华微生物和免疫学杂志, 第6期, 1985年(待发表)。  
[2] 卜凤荣等: 中华血液学杂志, 第6卷, 第4期, 207—210, 1985年。  
[3] Janossy, G.: *British Medical Bulletin*, 40 (3):247, 1984.  
[4] Prentice, H.G. et al.: *J. Clinical Immunology*, 2 (3):1485, 1982.  
[5] Filipovich, A. H. et al.: *The Lancet*, 8375:469, 1984.  
[6] Prentice, H. G. et al.: *The Lancet*, 8375:472, 1984.

## EXPERIMENTAL STUDIES ON THE REMOVAL OF T-CELLS FROM BONE MARROW WITH ANTI-T CELL MONOCLONAL ANTIBODY (211-1)

Bu Fongrong Lao Miaofen Mao Bingzhi Dong Bo Wu Zuze  
(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences*)

The yield of granuloid colony formation of human bone marrow cells after treatment with 211-1 McAb and complement of immature rabbit serum is comparable with that of normal bone marrow cells, which shows that 211-1 McAb is non-cytotoxic towards hemopoietic progenitors.

Under the same experimental condition 211-1 McAb could remove about 98% of T-cell in bone marrow. Therefore, it may provide an effective measure to reduce the possible occurrence of GVHD in allogeneic bone marrow transplantation by removing essential amount of T-cell.

### Key words

Monoclonal antibody; T Lymphocyte