

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810016899.0

[43] 公开日 2008年12月3日

[11] 公开号 CN 101314764A

[22] 申请日 2008.6.24

[21] 申请号 200810016899.0

[71] 申请人 蚌埠医学院

地址 233030 安徽省蚌埠市东海大道2600号

[72] 发明人 吕合作 李柏青

[74] 专利代理机构 安徽省蚌埠博源专利商标事务所

代理人 杨杰民

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

[54] 发明名称

一种体外扩增自然杀伤细胞的方法

[57] 摘要

本发明属于细胞免疫学技术领域，具体地说是一种体外大量优势扩增外周血自然杀伤细胞的方法。本发明包括以下步骤：(1) 从人、动物外周血分离单个核细胞；(2) 单个核细胞悬浮在含5%~15%自体血清的RPMI 1640培养液中，经有效浓度为1~4mmol/L的甲基-β-环糊精预处理36~60小时；(3) 加入重组白细胞介素2，在含5%新生牛血清与5%自体血清的RPMI 1640培养液中扩增培养10天以上。本发明的优点在于：使用血样少、成本低；操作方便；扩增倍数高，能够在短期内将自然杀伤细胞扩增392-1752倍。

- 1.一种体外扩增自然杀伤细胞的方法，包括以下步骤：
  - (1) 从人、动物外周血分离单个核细胞；
  - (2) 单个核细胞悬浮在含 5%~15% 自体血清的 RPMI 1640 培养液中，经有效浓度为 1~4 mmol/L 的甲基-β-环糊精预处理 36~60 小时；
  - (3) 加入重组白细胞介素 2，在含 5%新生牛血清与 5%自体血清的 RPMI 1640 培养液中扩增培养 10 天以上。
2. 根据权利要求 1 所述体外扩增自然杀伤细胞的方法：单个核细胞采用聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心方法分离获得。
3. 根据权利要求 1 所述体外扩增自然杀伤细胞的方法：甲基-β-环糊精最佳浓度为 2~3mmol/L。
4. 根据权利要求 1 所述体外扩增自然杀伤细胞的方法：重组白细胞介素 2 有效浓度为 20~50 U/ml。
5. 根据权利要求 1 所述体外扩增自然杀伤细胞的方法：在 RPMI 1640 中添加 25 mmol/L HEPES、2 mmol/L L-谷氨酰胺、50 μg/ml 链霉素、50 U/ml 青霉素。
6. 根据权利要求 1 所述体外扩增自然杀伤细胞的方法：单个核细胞在含有 10% 自体血清的 RPMI 1640 培养液中，经甲基-β-环糊精预处理 48 小时；再加重组白细胞介素 2 继续培养。
7. 根据权利要求 1 所述体外扩增自然杀伤细胞的方法：自然杀伤细胞在体外扩增 10~13 天。
8. 根据权利要求 1 所述体外扩增自然杀伤细胞的方法：自然杀伤细胞的比例检测采用流式细胞术，CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>的为自然杀伤细胞，自然杀伤细胞扩增的绝对值通过计数细胞总数结合流式细胞术检测自然杀伤细胞比例计算获得。

## 一种体外扩增自然杀伤细胞的方法

### 技术领域

本发明属于细胞免疫学技术领域，具体地说是一种体外大量优势扩增人或动物外周血自然杀伤细胞的方法。

### 背景技术

自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK 细胞) 是一类不依赖于抗原刺激，能够自发地溶解多种肿瘤细胞和被病毒感染细胞的一类淋巴细胞，其细胞表面的标志分子是 CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>。NK 细胞存在于外周血和脾脏中，在外周血中占淋巴细胞的 15%-20%。NK 细胞具有抗肿瘤、抗感染和免疫调节等作用，是机体免疫监视的第一道防线，对机体抵抗肿瘤和感染具有重要作用。研究 NK 细胞迅速扩增的方法，是临床免疫学实践应用十分重要的课题。由于外周血中 NK 细胞含量不高，要获得大量高纯度的 NK 细胞是困难的。虽然已有的技术通过免疫磁珠或流式细胞术分选能够获得高纯度的 NK 细胞，但要获得一定的数量则需要大量的血液和抗体，这无疑会增加获得 NK 细胞的成本；现有的方法通过使用 IL-2 等淋巴因子能够在体外诱导 NK 细胞增殖，产生淋巴因子激活的杀伤细胞

(lymphokine activated killer cells, LAK 细胞)，但这种方法也会同时扩增其他的淋巴细胞，LAK 细胞中自然杀伤细胞的比例仍处于较低的水平。经广泛查阅国内外专利文献和各种出版物，迄今为止，均未见有实用、高效的体外大量优势扩增 NK 细胞方法的发明和报道。因此发明一种实用、高效、快速体外大量优势扩增人外周血 NK 细胞的方法，用于对自然杀伤细胞的免疫功能机制的实验研究，以及用于临床提高人、动物免疫调节力，抵抗肿瘤、抗感染是非常重要的；对于攻克人类长期渴望解决的恶性肿瘤疾病的难题是十分有价值的。

### 发明内容

本发明目的在于提供一种实用有效的体外大量扩增自然杀伤细胞 (NK 细胞) 的方法。

本发明体外扩增 NK 细胞的方法，包括以下步骤：

(1) 从人、动物外周血分离单个核细胞；

(2) 单个核细胞悬浮在含 5%~15% 自体血清的 RPMI 1640 培养液中，经有效浓度为 1~4 mmol/L 的甲基-β-环糊精(MβCD)预处理 36~60 小时；

(3) 加入重组人白细胞介素 2，在含 5%新生牛血清与 5%自体血清的 RPMI 1640 培养液中扩增培养 10 天以上。

单个核细胞采用聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心方法分离获得。

MβCD 的最佳有效浓度为 2~3 mmol/L。

重组人白细胞介素 2 有效浓度为 20~50 U/ml。

在 RPMI1640 中添加 25 mmol/L HEPES、2 mmol/L L-谷氨酰胺、50 μg/ml 链霉素、50 U/ml 青霉素。

单个核细胞在含有 10% 自体血清的 RPMI 1640 培养液中，经甲基-β-环糊精预处理 48 小时；再加重组人白细胞介素 2。

将上述处理的细胞在体外扩增 10~13 天。

NK 细胞的比例检测采用流式细胞术，CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>的细胞即为 NK 细胞，NK 细胞扩增的绝对值通过计数扩增细胞总数结合流式细胞术检测 NK 细胞比例计算获得。

本发明体外优势扩增 NK 细胞的方法，要点在于：采用最佳的 MβCD 浓度预处理单个核细胞。

脂筏 (Lipid rafts) 是指细胞膜上富含胆固醇和鞘酯的微区，浓集有 GPI-连接的蛋白以及参与信号转导的信号分子，如 LCK、LAT、Ras 和 G 蛋白等。淋巴细胞激活过程的早期，细胞膜上出现脂筏聚集或形成功能性脂筏，也是抗原递呈细胞与 T 细胞相互接触时形成免疫突触的平台。在研究脂筏功能的实验中通常用高浓度(10~15 mmol/L)的 MβCD 预处理细胞，可去除细胞膜胆固醇，以干扰脂筏形成。本发明研究证明低浓度和高浓度的 MβCD 对细胞胆固醇的影响明显不同。当细胞培养中有血清存在时，低浓度 MβCD 可作为胆固醇的穿梭载体，加速游离胆固醇在细胞和脂蛋白之间的交换。我们发现用低浓度的 MβCD(1~4 mmol/L)预处理人外周血单个核细胞能够明显地促进 NK (CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>) 细胞的增殖，从而发明了体外大量优势扩增 NK 细胞的有效的方法。

本发明提出一种用低浓度的 MβCD 预处理外周血单个核细胞后加白细胞介素

2 培养优势扩增 NK 细胞的技术方法, 实现了大量体外优势扩增 NK 细胞, 为免疫学研究领域的实验研究人员对 NK 细胞的免疫功能机制的基础研究, 以及及临床应用提供了细胞基础, 在抗肿瘤的生物学治疗领域中具有重要的应用价值。

本发明体外扩增外周血 NK 细胞的方法, 包括以下三个步骤:

第一步: 从人、动物外周血分离单个核细胞; 单个核细胞采用聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心方法分离获得。

第二步: 单个核细胞悬浮在含 5%~15% 自体血清的 RPMI 1640 培养液中, 经有效浓度为 1~4 mmol/L 的 M $\beta$ CD 预处理 36~60 小时。过少使用自体血清或用其他动物血清替代将不能达到理想效果; M $\beta$ CD 最佳有效浓度为 2~3 mmol/L; 经 M $\beta$ CD 预处理最佳时间为 48 小时。

第三步: 加入重组白细胞介素 2, 在含 5%新生牛血清与 5%自体血清的 RPMI 1640 培养液中扩增培养 10 天以上。加入的重组人白细胞介素 2 有效浓度为 20~50 U/ml; 在 RPMI1640 中添加 25 mmol/L HEPES、2 mmol/L L-谷氨酰胺、50  $\mu$ g/ml 链霉素、50 U/ml 青霉素。NK 细胞在体外培养扩增时间一般为 10~13 天, 少于 10 天, 则繁殖倍数低; 至少 10 天以后才可检测到明显的自然杀伤细胞 (NK 细胞) 比例增加。延长培养时间能够获得更多的 NK 细胞数量, 但是最长也不得高于 15 天, 高于 15 天, 部分细胞衰老死亡, 也会造成 NK 细胞增殖倍数低和绝对数量减少。

NK 细胞的比例检测采用流式细胞术, 表面标志分子 CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>的细胞为 NK 细胞。NK 细胞扩增的绝对值通过计数扩增细胞总数结合流式细胞术检测 NK 细胞比例计算获得。

本发明中一般采用 20~35 岁年轻健康志愿者的外周血单个核细胞。

M $\beta$ CD 预处理 48 小时后再加 rhIL-2。在诱导后的扩增阶段, 细胞的分裂视细胞长势而定, 一般于 6~8 天进行第一次分孔, 随后间隔 2~3 天分孔, 因此, 每次分孔均需补充 rhIL-2。后续的培养所用的培养液可添加自体血清, 也可用 5% 新生牛与 5% 自体血清的混合成分。

本发明中, M $\beta$ CD 的浓度选择有一定的个体差异, 一般在 1~4 mmol/L 的范围内。对同一个个体而言, 较低的浓度有利于细胞增殖, 而较高的浓度则利于获得更高的 NK 细胞比例。

现代医学研究证明，NK 细胞对于提高人、动物免疫调节力，抵抗肿瘤、抗感染是非常重要的，但较为经济有效，快速大量体外扩增 NK 细胞，仍然是一个难题。本发明通过低浓度 M $\beta$  CD 预处理外周血单个核细胞后，再加入普通浓度的白细胞介素 2 培养扩增一段时间，使 NK 细胞得以快速大量优势扩增，繁殖倍数高达 392~1752 倍，取得了出人意料的效果。这种方法在国内外医学文献和专利文件中尚未见报道。因此，本发明是在 NK 细胞研究领域解决了如何即经济便利，又能高效优势扩增 NK 细胞的技术难题的发明，为研究 NK 细胞的生物学特性提供了一种获取细胞来源的方法，以及在肿瘤的生物治疗方面有重要的应用前景。

本发明体外扩增自然杀伤细胞（NK细胞）的方法优点在于：1. 使用血样少、试剂成本低；2. 操作比较方便；3. 扩增倍数高，能够在短期内将NK细胞扩增 392-1752倍；4. 本发明方法可用于人和各种动物的NK细胞扩增。

## 附图说明

图 1 不同浓度 M $\beta$  CD 处理外周血单个核细胞对扩增细胞中 NK 细胞比例的影响 (n=8)；NK 细胞 (CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>细胞) 在 M $\beta$  CD 处理组明显升高，并随浓度增加而升高，特别浓度为 3 mmol/L 和 4 mmol/L 处理组可达到 65%。

图 2 流式细胞术检测 M $\beta$  CD (4 mmol/L) 处理单个核细胞培养扩增 10 天后淋巴细胞的表型。外周血单个核细胞用 M $\beta$  CD (4 mmol/L) 处理 48 小时后再加 IL-2 培养扩增 10 天，用流式细胞术检测分析扩增的淋巴细胞亚群的比例。左图显示：CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞分别为 12%和 18.5%；右图显示：CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>细胞占有 68.5%。

图 3 外周血单个核细胞经 M $\beta$  CD (2 mmol/L) 处理后培养不同时间后 NK 细胞扩增的数量。

## 具体实施方式

以下结合具体实施例对本发明作进一步的详细描述。

本实施例包括以下步骤：

1. 外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离：本例选择 8 例健康成年志愿者 (20~35 岁)，抽取外周血于肝素抗凝试管中，加等量培养液稀释，置于 Ficoll-Hypaque

淋巴细胞分离液上, 常规密度梯度离心分离获取 PBMC, 洗涤 2 次后用含 10% 自体血清的 RPMI1640 培养液调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$ /ml。

2. M $\beta$ CD 的预处理及细胞扩增: 把 PBMC 悬液放入 24 孔培养板中, 1ml/孔; 加入 M $\beta$ CD (含 10% 自体血清的 RPMI1640 配置) 至终浓度 0~4 mmol/L。另外设立 LAK 细胞对照组 (加 rhIL-2 1000 U/ml), 48 h 后, 分别加入 rhIL-2 50 U/孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 温箱中培养。6~8 天后分孔扩大培养, 并补充含 5% NBS 和 5% 自体血清的 RPMI 1640 培养液及 rhIL-2 50 U/孔。以后每隔 2-3 天根据细胞增殖情况对细胞分孔培养, 并补充上述培养液及 rhIL-2。定期计数观察细胞增殖情况; 10 天时收集细胞进行细胞亚群。

3. 流式细胞仪分析: 取上述扩增 10 天后的细胞, 置于流式测定管中, 约  $1 \times 10^5$ /管。用染色缓冲液 (PBS-5%NBS-0.1%NaN<sub>3</sub>) 1 ml, 离心 1600 r/min, 5min, 离心后弃上清, 使残留细胞悬液  $\leq 50 \mu$ l/管。加双荧光标记抗体 CD3-FITC/CD4-PE、CD3-FITC/CD8-PE、CD3-FITC/CD16+CD56-PE 染色, 置 4 $^{\circ}$ C 30 min 后, 加染色缓冲液 1 ml/管, 离心洗两次; 加固定剂 (1%PFA-PBS) 400  $\mu$ l, 在流式细胞仪 (FACSCalibur) 上检测, 数据文件用 CellQuest 软件或 WinMDI 软件分析。

#### 4. 结果:

(1) 不同浓度 M $\beta$ CD 处理的 PBMC 与 LAK 细胞增殖能力比较:

PBMC 加不同浓度 M $\beta$ CD (1 mmol/L~5 mmol/L) 培养, 加 rhIL-2 (50 U/ml) 维持生长, 1 mmol/L~3 mmol/L M $\beta$ CD 处理的 PBMC 均有明显增殖, 4 mmol/L 浓度 M $\beta$ CD 处理的 PBMC 也有增殖, 但较前者弱, 而 4 mmol/L 以上浓度 M $\beta$ CD 处理的 PBMC 均全部裂解死亡。于培养的 10 天及 13 天分别计数增殖的各组细胞, 观察增殖情况, 结果 2 mmol/L M $\beta$ CD 浓度组 PBMC 增殖最快, 第 10 天扩增 31.2 倍, 第 13 天达 182.37 倍; 3 mmol/L M $\beta$ CD 浓度组与 2 mmol/L M $\beta$ CD 浓度组相似; 4 mmol/L M $\beta$ CD 浓度组的 PBMC 增殖最慢, 第 10 天扩增仅 15 倍, 第 13 天仅 32 倍; 作为对照的 LAK 细胞扩增也只有 51.2 倍; 其它各组亦有不同倍数的扩增。

(2) M $\beta$ CD 浓度对扩增细胞亚群的影响: PBMC 分别加 rhIL-2(1000 U/ml)、M $\beta$ CD (1 mmol/L~4 mmol/L) 诱导培养扩增 10 天后收集细胞进行分型, 结果发现 CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>细胞在 M $\beta$ CD 处理组明显升高, 在 3~4 mmol/L 组可达 65%左右,

各组均明显高于 IL-2 组和新鲜 PBMC。在各 M $\beta$ CD 处理组中，CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>细胞的百分率随着 M $\beta$ CD 浓度的增加而增加，CD3<sup>+</sup>T 细胞则相反。

(3) 2 mmol/L M $\beta$ CD 处理组中 CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> 细胞的绝对扩增倍数:

在实验的 0、8、10 及 13 天，用流式细胞术检测 CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> 细胞的比例，同时用苔盼蓝染色计数活细胞的总数。结合二者结果计算出各个体 CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> 细胞的绝对扩增倍数。如表 1 所示，在 8 个个体中，CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> 细胞的基数在  $5\sim 25\times 10^4$ 。8 天后，各组细胞开始以指数方式扩增。但在 8 个个体中，扩增的倍数变化很大，10 天时扩增倍数为  $23\sim 97$ ，而至 13 天时则达  $392\sim 1752$  倍。



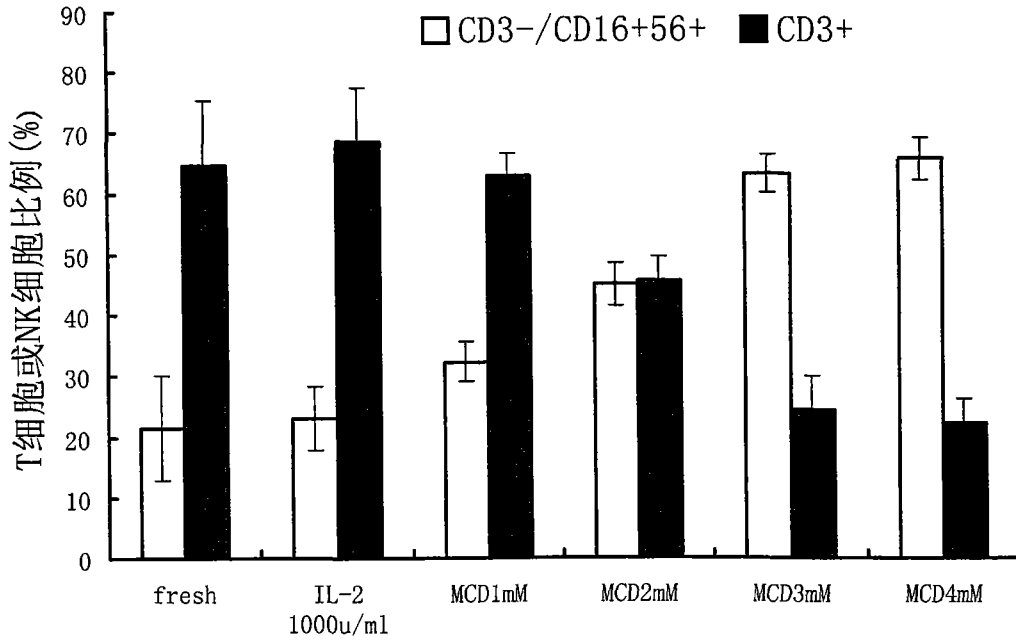


图 1

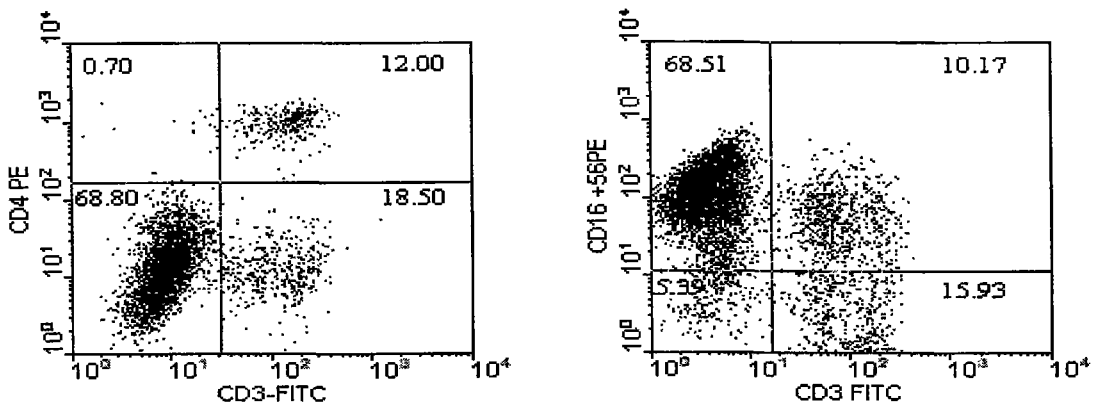


图 2

样本	CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> 细胞×10 <sup>4</sup> (增殖倍数)			
	0 天	8 天	10 天	13 天
S1	5	15.6(3)	486.8(97)	8761(1752)
S2	8	14.4(1.8)	403.2(50)	7096(887)
S2	10	16.8(1.7)	504.8(50)	9173(917)
S4	15	44.7(3)	364.5(24)	5969(398)
S5	20	51.2(2.6)	629.9(32)	11641(582)
S6	25	64.9(2.6)	566.5(23)	9802(392)
S7	11	26.1(2.4)	419.1(38)	7335(667)
S8	14	40.3(2.9)	808.5(58)	14957(1068)
均数	13.5	34.25	522.91	9341.75
标准差	6.52	18.84	144.79	2874.54

图 3