

# 自身 CD3AK 细胞过继免疫治疗乙型肝炎 47 例

刘军权,陈复兴,金义生,陈子鉴,张春平,俞 谨,周忠海

刘军权,陈复兴,周忠海,中国人民解放军第 97 医院实验科  
江苏省徐州市 221004  
金义生,陈子鉴,张春平,俞谨,中国人民解放军第 97 医院传染科  
江苏省徐州市 221004  
项目负责人:刘军权,221004,江苏省徐州市铜山路226号,中国人民解放军97  
医院实验科. lxuming@pub.xz.jsinfo.net  
收稿日期:2002-01-11 接受日期:2002-01-17

## 摘要

目的:CD3AK(Anti-CD3 antibody induced activated killer, CD3AK)细胞具有增生快、杀瘤活性强和杀瘤谱广的特点. 本文旨在评估用CD3AK细胞过继回输治疗乙型肝炎的疗效.

方法:用淋巴细胞分离液分离乙型肝炎患者末梢血单个核细胞,然后将末梢血单个核细胞加入含有 IFN- $\alpha$ 、IL-2 和 CD3 单抗的培养基中进行培养扩增,将经培养后的 CD3AK 细胞回输给患者;患者一个疗程接受 CD3AK 细胞总数在  $(0.8-7) \times 10^{10}$ .

结果:在 47 例接受治疗者中,治疗结束后 HBeAg+HBV-DNA 转阴率为 53.2%. 总有效率(HBeAg 和 / 或 HBV-DNA 转阴)为 74.5%. CD3 和 CD8T 淋巴细胞绝对值在 CD3AK 细胞治疗后均增加在 85% 以上.

结论:用自身 CD3AK 细胞过继回输治疗能明显提高乙型肝炎患者细胞免疫功能,治疗结束后 HBeAg+HBV-DNA 转阴率达 53.2% . 且无毒副作用,对乙型肝炎是一种安全有效的治疗方法.

刘军权,陈复兴,金义生,陈子鉴,张春平,俞谨,周忠海. 自身 CD3AK 细胞过继免疫治疗乙型肝炎 47 例. 世界华人消化杂志 2003;11(1):100-102  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/100.htm>

## 0 引言

随着分子生物学与细胞免疫学的发展和对乙型肝炎的发病机制的研究表明,生物治疗正成为治疗乙型肝炎的一种重要手段. 在生物治疗中,细胞过继免疫治疗是临床应用较多的一种治疗方法,其治疗效果的关键,是输注细胞的数量和质量. 因而探寻在体外培养出大量高质量的抗病毒效应细胞一直是大家所关注的问题. 为此我们采用患者自身外周血单个核细胞(PBMC)经体外用鼠抗人 CD3 单克隆抗体和白介素 2 等细胞因子联合诱导,回输治疗 47 例乙型肝炎病毒(HBV)感染患者. 现将治疗结果报告如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 47 例为本院 1997-01/2000-01 住院与门诊患

者,按 1995 年全国病毒性肝炎诊断标准,其中慢性乙型肝炎 33 例,乙型肝炎病毒携带者 14 例. 男 37 例,女 10 例,年龄 14-50 岁. 47 例中 44 例 HBeAg 及 HBV-DNA 均阳性,3 例仅 HBV-DNA 阳性;1 a 内均未行抗病毒治疗. 试剂:鼠抗人 CD<sub>3</sub> 单克隆抗体(CD3mAb)购自北京邦定生物公司;人重组白介素 2(rhIL-2)由南京军事医学科学研究所提供;人重组  $\alpha$ -干扰素(rhIFN- $\alpha$ ) 购自上海生物制品研究所;RPMI1640 完全培养液(包括 RPMI 1640 和 10% 胎牛血清),购自 Gibico 公司;T 淋巴细胞亚群试剂盒,购自武汉生物制品研究所.

1.2 方法 (1)CD3AK 细胞诱导方法:抽患者外周血 200 mL,先离心分离出血浆备用,再吸出富含白细胞层的细胞约 10 mL,悬浮于等量患者自身血浆中,用淋巴细胞分离液分离,收集单个核细胞. 剩余红细胞用生理盐水补充至原体积后回输给患者. 单个核细胞用无菌生理盐水洗涤 3 次,将细胞按  $2 \times 10^9 \cdot L^{-1}$  数量悬浮于 RPMI-1640 完全培养基中,加入经抗 CD3mAb 包被的 6 孔细胞培养板,每孔 6 mL,加入终含量为  $5 \times 10^4 \cdot L^{-1}$  rhIL-2 和  $1 \times 10^6 \cdot L^{-1}$  rhIFN- $\alpha$  37,  $50 \text{ mL} \cdot L^{-1}$  CO<sub>2</sub> 条件下培养,每 2 d 半量换培养基 1 次,并调整细胞密度至  $2 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ . 培养 7 d 后,经细菌和霉菌培养阴性后再收集细胞,用无菌生理盐水洗 3 次,将细胞悬浮于自身血浆中,加入  $5 \times 10^4$  rhIL-2,用输血器回输给患者,2 h 内输完. (2) CD3AK 细胞表型测定:用流式细胞仪(美国 B. D 公司的 FACSCalibur, 分析软件为 Simul SET)测定和分析,每次获取 15 000 个细胞,用 HP 彩色打印机打印结果. (3) T 细胞亚群和 T 细胞亚群绝对值测定:患者在 CD3AK 细胞治疗前后用法国 Hemacell plus 全自动血细胞分析仪做全血细胞记数. 同时测定患者外周血 T 淋巴细胞亚群,并将各亚群百分数乘以淋巴细胞总数即得 T 细胞亚群绝对值. (4) 疗效判断:显效: HBeAg 与 HBV-DNA 均转阴;有效: HBeAg 与 HBV DNA 有一项转阴;无效: HBeAg 与 HBV DNA 无变化. 有肝功能异常者先给予常规护肝药物治疗,待肝功能正常后,回输 CD3AK 细胞;肝功能正常者仅行回输治疗. 回输前常规应用地塞米松 2.5 mg, 2 次/wk, (8-12) 次为 1 疗程. 回输细胞总数为  $(0.8-7) \times 10^{10}$ . 治疗前后行 T 细胞亚群和绝对值测定. 治疗前后及随访时检查 HBV-DNA、HBeAg 和肝功能.

统计学处理 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示. 用 t 检验比较各组间均数差异的显著性.

## 2 结果

2.1 CD3AK 细胞表型 正常成人 PBMC 在培养前细胞的 CD25 和 CD95 的测定结果为 9.09 % 和 35.35 %。而培养 7 d 时则为 86.65 % 和 66.64 %。

2.2 乙型肝炎患者经 CD3AK 细胞治疗前后 T 细胞亚群及其绝对值测定结果 47 例患者有 41 例检测了 T 细胞亚群和绝对值。经 CD3AK 细胞治疗后, CD3、CD8T 细胞百分率及其绝对值比治疗前显著增高, CD4T 细胞百分率及其绝对值也比治疗前明显增高。结果见表 1。

表 1 经 CD3AK 细胞治疗前后 T 细胞亚群及其绝对值变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	治疗前	治疗后
CD3T 细胞	41	0.57 ± 0.05	0.83 ± 0.11 <sup>b</sup>
CD3T 细胞绝对值	41	1539.7 ± 216.7	2905.7 ± 335.3 <sup>b</sup>
CD4T 细胞	41	0.33 ± 0.03	0.38 ± 0.06 <sup>a</sup>
CD4T 细胞绝对值	41	989.6 ± 151.3	1330.3 ± 176.6 <sup>a</sup>
CD8T 细胞	41	0.27 ± 0.06	0.47 ± 0.13 <sup>b</sup>
CD8T 细胞绝对值	41	729.7 ± 121.4	1645.7 ± 110.3 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05, vs 治疗前; <sup>b</sup>P < 0.01, vs 治疗前。

2.3 治疗后血清中 HBeAg 和 HBV-DNA 转阴情况 治疗前 44 例 HBeAg 阳性者, 治疗后有 29 例 HBeAg (65.9 %) 转阴。47 例 HBV-DNA 阳性者治疗后有 31 例转阴, 转阴率为 66.0 %。按疗效判断标准, 显效 53.2 % (25/47), 有效 21.3 % (10/47), 无效 25.5 % (12/47), 总有效率为 74.5 %。

2.4 随访结果 经 3 mo-2 a 随访, HBeAg 转阴者由治疗结束时的 25 例增至 29 例, 转阴率为 65.9 % (29/44), HBV-DNA 转阴者由 15 例增至 31 例, 转阴率为 66.0 % (31/47)。有 2 例患者治疗结束时 HBeAg 与 HBV-DNA 仍为阳性, 随访期间曾出现低度 ALT 增高, 未作治疗, 经休息自行复常, 且 HBeAg 和 HBV DNA 转阴, 表明本疗法具有治疗后效应。

2.5 副作用 47 例总计回输 489 次。仅有 6 例次于回输结束后 30 min 出现体温 37.8-38.5 的发热。未经处理, 约 2 h 后体温自行恢复正常。全部患者血常规均无明显变化。

## 3 讨论

CD3AK 细胞是一种较新型的肿瘤效应细胞, 已用于治疗各种恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 但用于慢性乙型肝炎临床治疗的报告较少。由于病毒和癌基因产物的抗原提呈大都属内源性抗原提呈途径, 因此人们尝试用 LAK 细胞治疗病毒性疾病。其治疗效果令人鼓舞<sup>[2-7]</sup>。我们的疗效比单用 IL-2 和 LAK 细胞治疗的效果好。

CD3AK 细胞治疗乙型肝炎病毒感染的确切机制尚不清楚, 可能与以下机制有关 (1)CD3AK 细胞是异质性细胞群, 末梢血单个核细胞中的 CD8<sup>+</sup> 和部分 CD4<sup>+</sup>T

细胞以及少量其他细胞随着在体外培养时间的延长, 这些细胞比例在不断的改变, 尤其是 CD8<sup>+</sup> T 细胞增高最为明显。由于乙型肝炎病毒感染者体内可存在乙肝病毒特异性 T 细胞, 而这些细胞主要为 CD8<sup>+</sup> T 细胞。因此, 从患者血中分离出的这种淋巴细胞在体外被扩增后激活, 回输体内即可杀伤被乙型肝炎病毒感染的靶细胞<sup>[8]</sup>。我们的研究表明, 正常成人 PBMC 经培养后 CD95<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup> CD<sub>45</sub>RO 细胞明显增加<sup>[9]</sup>; 大多数患者经过一个疗程治疗后, 血中 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分数及其绝对值显著增加。(2) CD3AK 细胞可分泌 IFN- $\alpha$ 、IL-2 和 TNF 等细胞因子, 已知这些细胞因子能抑制病毒的复制<sup>[10-17]</sup>。(3) 由于肝炎患者的肝细胞既表达 Fas 又表达 FasL。而 CD3AK 细胞也可以表达 Fas 与 FasL<sup>[18]</sup>。许多实验结果表明, 肝炎患者 T 细胞上 Fas 分子在用 CD3mAb 激活后明显增加, 回输的 CD3AK 细胞可以较好地作用于乙型肝炎病毒感染的肝细胞, 使其发生凋亡<sup>[19,20]</sup>。(4) 我们的实验表明, 乙型肝炎感染患者的淋巴细胞在用 CD3mAb 激活后, 淋巴细胞 CD25 比激活前明显增加, 回输后的 T 细胞可以在体内增生, 本法治疗后效应可能与此有关。

本文有部分患者一个疗程后未能达到治疗效果, 可能与以下因素有关。(1)回输的 CD3AK 细胞数量不够;(2)CD3AK 细胞质量上存在一些问题。在培养中发现, 这些患者用 CD3mAb 激活后细胞增生缓慢, CD25 表达增加不明显。当然还可能与病毒变异、某些细胞黏附分子如 MHC-I 类分子和 ICAM-I 表达缺陷有关<sup>[21]</sup>。

有关过继性免疫治疗尚无统一方案。我们认为回输细胞总数应大于  $1 \times 10^{10}$  可能才能具有治疗作用。将 CD3AK 细胞回输治疗与其他药物应用相结合, 适当调整 CD3AK 细胞亚群的比例, 增加细胞和某种细胞因子 (如干扰素、IL-2)<sup>[22,23]</sup> 用量及某些药物如拉米夫定等联合应用可能会取得更好效果。

## 4 参考文献

- 1 赵志泉, 沈斌, 吕秀珍, 徐顺福, 孙宏训. CD<sub>3</sub>AK 细胞体外对 SMMC - 7721 人肝癌细胞株杀伤作用的实验研究. 中华消化杂志 1997; 17:239-240
- 2 周岳进, 许雪延, 胡素琴, 胡操寒, 孔晓彩, 金伟虎, 池月志. 基因工程干扰素 - 2b 加 CD<sub>3</sub>AK 治疗慢性乙型肝炎. 临床肝胆病杂志 1997; 13:198-202
- 3 董寒梅, 张瑞阳. 自体与异体 LAK 细胞治疗慢性肝炎 130 例. 新消化杂志 1997; 5:313-314
- 4 方蕾, 陈复兴. 抗原的加工和提呈. 国外医学分子生物学分册 1994; 16:231-234
- 5 张言超, 吴文漪, 陈明, 韩方正. 慢性中重型肝炎自体 LAK 细胞回输治疗效果的细胞免疫分析. 华人消化杂志 1998; 6:826-827
- 6 张树林, 刘敏, 朱江, 柴宁莉. Th<sub>2</sub> 优势应答与 HBV 慢性感染. 世界华人消化杂志 1999; 7:513-515
- 7 Penna A, Prete GD, Cavalli A, Bertoletti A, Sorrentino MMDR, Damato M, Boni C, Pilli M, Fiaccadori F. Predominant T-Helper1 cytokine profile of hepatitis B viral nucleocapsid-specific T cell in acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* 1997; 25:1022-1027
- 8 Riddell SR, Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:545-586
- 9 陈复兴, 刘军权, 王涛, 黄健, 骆晓梅. 人 PBMC 经数种活化剂活化后的

- 表型变化.中国肿瘤生物治疗杂志 1999;6:186-187
- 10 Riddell SR, Greenberg PD. Therapeutic reconstitution of human viral immunity by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocyte clones. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;189:9-34
- 11 蒋道荣,姚登福,孟宪镛.乙型肝炎患者外周血 T 细胞亚群和可溶性 IL-2R 的研究.新消化病学杂志 1997;5:98-99
- 12 南月敏,王麟士,吴文娟,谢永富,庞英.乙型肝炎及原发性肝癌患者 sIL-2R 的变化.新消化病学杂志 1997;5:319-320
- 13 靖大道,邱德凯.乙型肝炎硬变患者外周血 IL-2, IL-2R 与肝功能的关系.华人消化杂志 1998;6:900-901
- 14 王九平,李新红,朱勇,王爱莲,连建奇,贾战生,谢玉梅.慢性乙型肝炎患者 T 细胞亚群, mL-2R, sIL-2R, IL-6, IL-8, TNF- 变化及意义.世界华人消化杂志 2000;8:763-766
- 15 刘军权,陈复兴,陈子鉴,王涛,张春平.IL-2 不同注射途径对慢性乙型肝炎患者 T 细胞功能的影响.世界华人消化杂志 2001;9:352-353
- 16 游晶,庄林,唐宝璋,杨惠,杨微波,李武,张宏丽,张艳梅,张祿,严绍明.干扰素联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎.世界华人消化杂志 2001;9:388-391
- 17 Wang J, Hargrove ME, Ting CC. IL-2 and IL-4 mediate through two distinct kinase pathways for the activation of  $\alpha$  CD3-induced activated killer cells. *Cellular Immunol* 1996; 174 :138-146
- 18 施广霞,程一權,钱振超.抗 CD3 单抗和 rIL-2 共刺激诱导的 PBL 增生与凋亡共存现象的研究.中国免疫学杂志 1995:44-46
- 19 郎振为,王海舰,孟忻,李俊强,张士杰.乙型肝炎患者肝组织中 Fas 配体的表达.中华内科杂志 1997;36:655-657
- 20 甘华山,陈友琴.细胞凋亡与病毒性肝炎.世界华人消化杂志 2001;9:579-581
- 21 陈复兴,武建国.病毒性疾病的 T 细胞免疫治疗.国外医学病毒学分册 1997;20:46-43
- 22 杜清友,王福生,徐东平,刘洪,雷周云,刘明旭,王业东,陈菊梅,吴祖泽.新型免疫活性细胞 CIK 体外对肝癌细胞的杀伤.世界华人消化杂志 2000;8:863-866
- 23 Ting CC, Hargrove ME. Anti-CD3 antibody-induced activated killer cells: Cytokines as the additional signals for activation of killer cells in effector phase to mediate slow lysis. *Cellular Immunol* 1991; 135:273-284

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 盘点中国科技论文:14 种医药卫生期刊影响因子超过 1

健康报 2002-12-11 报道 12 月 10 日,中国科学技术信息研究所在北京发布了 2001 年度中国科技论文统计结果.按照国际论文数量排序,我国位居世界第 6 位.

据介绍,这次国际论文数据依然取自 3 种在国际上颇具影响的检索工具:《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP).我国作者论文共 64526 篇,比 2000 年增加 14848 篇,增长率为 29.9%,占世界论文总数的 4.4%.位于我国之前的 5 个国家是:美、日、英、德、法.

国内论文数据取自《中国科技论文与引文数据库》,2001 年度收录了中国科技期刊 1447 种,其中 342 种医药卫生期刊入选.全国影响因子超过 1 的期刊有 26 种,医药卫生期刊占 14 种.在各学科影响因子总排序前 50 位中,医药卫生期刊有 25 种,占了半壁江山,特别是《世界华人消化杂志》以 3.733 的影响因子排在各学科之首,《世界胃肠病学杂志》和《解放军医院管理杂志》的影响因子均超过了 2.今年还首次评出中国百种杰出学术期刊,20 种医药卫生期刊入选其中.

分类统计还对高等学校、科研机构以及医疗机构发表论文和被引用情况的前 20 位进行了排序.在 SCI 统计的医疗机构论文数中,解放军总医院论文名列第一,第四军医大学西京医院在国内论文数中名列榜首.

(张荔子)