

白细胞介素—2 基础及其肿瘤临床

虞冠华 许祥裕 丁树标 编著

Fundamental and
Clinical Oncology Aspects
of Interleukin- II

东南大学出版社

Fundamental and
Clinical Oncology Aspects
of
Interleukin—Ⅱ

白细胞介素—2 基础 及其肿瘤临床

虞冠华 许祥彦 丁树标 编著

· 东南大学出版社

(苏)新登字第 012 号

内 容 简 介

本书是一本关于白细胞介素-2 基础研究和临床应用方面的专著。作者参阅了大量国内外文献并结合所在实验室多年来在该领域的研究结果,对白细胞介素-2 的发现、性质、结构、生物功能、受体、天然和重组白细胞介素-2 生产制备、质量控制、检测方法、药理毒理、临床应用等分七个章节进行了系统的介绍,是一本理论和实际操作相结合的论著。本书可供广大免疫学、细胞学、分子生物学、生物制品学、肿瘤学等方面的科研工作者、大专院校师生及临床医生使用。

白细胞介素-2 基础及其肿瘤临床

虞冠华 许祥裕 丁树标 编著

*

东南大学出版社出版发行

(南京四牌楼 2 号 邮编 210018)

南京新文印刷厂印刷

*

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 8 字数 207.9 千

1994 年 12 月第 1 版 1995 年 6 月第 1 次印刷

印数:1—2000 册

ISBN 7-81023-989-9/Q·8

定价:9.20 元

(凡因印装质量问题,可直接向承印厂调换)

撰稿人(按姓氏笔划为序):

丁树标	邓书增	王荣田
龙 娜	许祥裕	朱东亚
朱有华	朱敏生	闵 贤
吴文智	岑芳桂	余琬芬
罗丽华	施凤霞	唐治华
凌明圣	虞冠华	

前 言

1976年Morgan发现白细胞介素-2以后,有关白细胞介素-2的性质、结构、制备、活性检测、生物学功能等方面的研究,引起了许多学者的浓厚兴趣,且获得了巨大进展;1983年基因工程重组人白细胞介素-2研制成功,大大促进了白细胞介素-2的基础与临床应用研究。人们还证实,白细胞介素-2是机体免疫调节的中心环节。

采用白细胞介素-2诱导成“淋巴因子激活的杀伤细胞”,即LAK细胞和激活的“肿瘤浸润淋巴细胞”(TIL)具有显著的抗肿瘤作用,将LAK和TIL细胞联合白细胞介素-2过继免疫治疗肿瘤,取得了明显的临床疗效,被认为是肿瘤治疗的一重大突破,成为近年医学研究的热点之一。

作者及其课题组同志于1986年进行人白细胞介素-2的制备、纯化、活性检测、生物学特性研究,至1988年初相继完成了急性毒性、慢性毒性、药理学、药动学、药效学研究,在此基础上,参照卫生部生物制品的质量标准,制订了人白细胞介素-2的质量控制标准,1991年9月按新生物制品三类标准,向国家卫生部申报新药,1993年8月16日卫生部批准在七家医院进行I、II期临床研究,批准文号为(93)制申体第13号。在进行人白细胞介素-2研究的同时,于1988年底完成了重组人白细胞介素-2的基因克隆及纯化研究。

在实际研究工作中,作者及其课题组同志发表了几十篇论文和专著一册,深感白细胞介素-2是一种具有重大实际应用价值的生物制品,此领域的研究具有重要的理论意义,而且将成为免疫学、肿瘤学、细胞学、分子生物学等有关科技工作者及临床医师十分关心的

课题。

本书主要内容是作者及其课题组同志近十年的实际研究工作结晶,一部分基础理论凝集了国内外研究的最新成果,相信对从事有关的科研、教学和临床工作者有一定的参考价值。

虽然作者及其课题组同志尽最大努力编写了本书,但由于理论和实践水平有限,拙作错误之处在所难免,恳切希望读者予以批评指正。

许祥裕

1994年10月

南京军区军事医学研究所

目 录

第一章 白细胞介素-2 基础理论

第一节 白细胞介素-2 发现背景	1
一、IL-2 发现的意义	1
二、促有丝分裂淋巴因子和 T 细胞克隆	2
三、白细胞介素名称的由来	5
第二节 白细胞介素-2 的生物活性和理化性质	6
一、IL-2 的生物学活性	6
二、IL-2 的理化性质	8
第三节 白细胞介素-2 基因与分子结构	10
一、IL-2 基因	10
二、IL-2 分子一级结构	10
三、IL-2 分子高级结构	11
四、IL-2 分子结构与功能的关系	12
第四节 白细胞介素-2 受体	14
一、IL-2R 的结构与作用模式	14
二、IL-2R 与 T 细胞免疫反应的调节	18
三、IL-2R 与 T 细胞循环进程的调节	20
四、IL-2R 系统对免疫学和治疗学的影响	22

第二章 天然白细胞介素-2 的制备、纯化

第一节 T 细胞白血病细胞株 Jurkat-FHCRC 产生的白细胞介素-2 的制备

与纯化	25
一、筛选分泌 IL-2 的 Jurkat 细胞	25
二、Jurkat 细胞产生 IL-2 的最适条件	25
三、Jurkat 细胞产生的 IL-2 纯化	30
第二节 人外周血和人扁桃体淋巴细胞白细胞介素-2 的制备与纯化	30
一、用人 PBL 诱生 IL-2 及其纯化	30
二、用人扁桃体淋巴细胞诱生 IL-2 及其纯化	31
第三节 人脾脏淋巴细胞白细胞介素-2 的制备与纯化	32
一、人脾脏淋巴细胞 IL-2 的制备	32
二、人脾脏淋巴细胞 IL-2 的纯化	37
第四节 纯化天然白细胞介素-2 性质鉴别	40
一、PHA 残留量测定	40
二、NIL-2 糖蛋白染色	46
三、人脾脏纯化 IL-2 对温度的稳定性	47
四、人脾脏纯化 IL-2 的特异性鉴别	49
五、NIL-2 纯化过程中 IL-2 抑制因子的去除	51
第五节 天然白细胞介素-2 制备及检定要求	54
一、人 IL-2 制备及检定规程	54
二、乙型肝炎 HBsAg、抗 HBc、HBeAg 检测方法	59
三、丙型肝炎抗体检测方法	64
四、PHA 残留量测定——PHA 血凝测定法	66

第三章 重组白细胞介素-2 的制备、纯化

第一节 表达人白细胞介素-2 重组菌的构建和重组菌的发酵培养	67
一、IL-2 基因克隆及表达	67
二、rIL-2 工程菌的发酵培养	70
第二节 重组白细胞介素-2 的纯化	70
一、rIL-2 纯化的一般策略	70
二、rIL-2 包含体的制备和氧化复性	76
— 2 —	

三、rIL-2 的纯化	79
四、rIL-2 纯化过程中影响活性的因素	84
第三节 重组白细胞介素-2 制备和检定规程	87
一、基因工程人白细胞介素-2 注射剂制造规程	87
二、基因工程人白细胞介素-2 注射剂检定规程	92
三、附录:卫生部人用重组 DNA 制品质量控制要点	95

第四章 白细胞介素-2 活性测定

第一节 白细胞介素-2 的生物学测定法	103
一、生物测定中常用的细胞	103
二、 ^3H -TdR 掺入法	104
三、MTT 比色分析法	106
第二节 白细胞介素-2 的免疫学测定法	111
一、酶免疫测定法	112
二、放射免疫测定法	114
第三节 白细胞介素-2 标准品	117
一、第一国际 IL-2 标准品的建立	117
二、第一国际 IL-2 标准品的使用	119
三、我国建立的 IL-2 国家标准品	119

第五章 白细胞介素-2 临床前药理毒理

第一节 白细胞介素-2 代谢动力学	121
一、IL-2 在小鼠的半衰期	121
二、IL-2 在人体的半衰期及血浓度	122
三、延长 IL-2 半衰期的方法	124
第二节 天然白细胞介素-2 与重组白细胞介素-2 抗肿瘤效果比较	125
一、对 EAC 实体瘤的抑制作用及对荷瘤鼠生存期延长作用	125
二、对 S_{180} 实体瘤的抑制作用及对荷瘤鼠的生存期延长作用	128

三、对 U_{14} 宫颈癌实体瘤的抑制作用及对荷 U_{14} 腹水瘤小鼠的生存期延长作用	130
第三节 白细胞介素-2 毒理学研究	132
一、IL-2 的急性毒性实验	132
二、NIL-2 对大鼠的长期毒性试验	135
三、NIL-2 对家犬的长期毒性试验	144

第六章 白细胞介素-2 和 LAK 细胞临床

第一节 LAK 细胞基础	155
一、LAK 细胞发现及其性质	155
二、LAK 细胞对小鼠的抗肿瘤作用	156
三、LAK 细胞活性测定	165
四、LAK 细胞制备	170
第二节 白细胞介素-2 的临床疗效	173
一、全身性应用 IL-2 临床疗效	173
二、局部应用 IL-2 临床效果	174
三、低剂量 IL-2 的临床效果	179
四、IL-2 与其它淋巴因子及化疗、联合应用的临床疗效	202
第三节 IL-2/LAK 联合应用的临床效果	204
一、IL-2/LAK 对黑色素瘤、肾癌、非何杰金氏淋巴瘤的临床疗效	206
二、IL-2/LAK 对恶性胸腹水的临床疗效	209
三、IL-2/LAK 对其它肿瘤的临床疗效	212
四、IL-2 与 IL-2/LAK 联合治疗的疗效比较	213
第四节 白细胞介素-2 和 LAK 细胞临床应用的一些新观点	219
一、肿瘤治疗中 IL-2 剂量之争——高剂量与低剂量治疗	219
二、IL-2 免疫治疗疗效的机理：非特异性 LAK 活性与特异性 T 细胞	221

第七章 白细胞介素-2 激活的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL) 及其临床应用

第一节 肿瘤浸润淋巴细胞性质	224
一、原位 TIL 的性质	224
二、新鲜分离 TIL 的性质	225
三、IL-2 培养激活后 TIL 的性质	226
第二节 TIL 的分离和培养	227
一、TIL 的分离	227
二、TIL 的培养、增殖	231
第三节 IL-2 激活的 TIL 在体内器官及肿瘤组织中的分布特征	234
第四节 肿瘤浸润淋巴细胞抗肿瘤作用的实验研究	238
一、TIL 的体外抗肿瘤作用	238
二、TIL 的体内抗肿瘤作用	240
第五节 TIL 的临床应用	242
一、国外 TIL 临床应用	242
二、本实验室 TIL 临床应用	246
主要参考文献	251

第一章 白细胞介素-2 基础理论

第一节 白细胞介素-2 发现背景

一、IL-2 发现的意义

1976 年 Morgan 等人报告了将 PHA 刺激的人末梢血淋巴细胞培养上清液加入骨髓细胞中,它能够有选择地使骨髓细胞的 T 淋巴细胞增殖和长期持续生长。1977 年 Gillis 等报告用同样的方法长期培养小鼠的杀伤细胞 (killer),其抗原特异性与功能不变。于是,这种存在于淋巴细胞刺激培养上清液中能使 T 细胞在体外增殖的可溶性因子,便被称为 T 细胞生长因子 (TCGF)。1979 年,第二次国际免疫学会议淋巴因子分组会上,将 TCGF 命名为 Interleukin-2 (IL-2)。

白细胞介素-2 (IL-2) 的发现并确定它为淋巴细胞激素,能促进 T 淋巴细胞增殖,对于免疫学研究具有重要的影响。IL-2 成为原型淋巴因子所产生的免疫学概念已为内分泌学、药理学及酶学等领域的人员所熟悉。尤其是配体—受体相互反应的亲和力、淋巴因子及其受体的结构—功能的相互关系、受体介导的信号传递机制以及淋巴因子诱导的特异性基因表达等已成为免疫学研究的中心议题。这也反映了从 20 世纪 60 年代和 70 年代细胞免疫学的历史性转变。在那时,人们认为抗原是促进细胞增殖和分化的唯一的细胞内生物化学反应。实际上,T 细胞、B 细胞及巨噬细胞间的接触是影

响细胞间交流的重要的必不可少的条件。因此，抗原—受体遗传网络、细胞—细胞间相互反应、抑制性 T 细胞以及抗原特异性辅助和抑制因素可以调节免疫反应。目前，已经完全确认细胞间交流是受淋巴因子分子所推动。

在过去十年中，对于淋巴因子的研究已从最初相当模糊不清直至今天合理的认识，在这一短暂时间内，有证据表明免疫系统将激素机制直接用于抗原反应的所有方面，其中包括克隆扩增和分化成特异性功能细胞，如杀伤性 T 细胞、辅助性 T 细胞以及产生抗体的 B 细胞。事实上淋巴因子起着把开始阶段的外部环境抗原转移到由特异配体和受体组成的内部调节系统的作用，这实际上就是刺激不同的细胞内途径，促进特征性细胞变化。因此，免疫学家的看法和他们进行的实验与其它生物学科有密切关系。应用淋巴细胞和淋巴因子进行实验已成为生理学、生物学、生物化学及基因研究所选择的细胞和分子，并直接用来了解细胞是如何执行识别和区分外部刺激反应的。

二、促有丝分裂淋巴因子和 T 细胞克隆

开始认识 T 细胞的生长应追溯到 1960 年，当时 Nowell 发现植物血凝素 (PHA) 可促进淋巴细胞有丝分裂。在此以前，人们认为淋巴细胞是分化到最后的末期细胞，且不能再进一步增殖。Nowell 观察的结果推翻了这一结论。接受特异性抗原同样在试管内显示它可触发 T 细胞增殖反应。因此，在以后整整 20 年中，抗原特异性 T 细胞增殖与细胞介导免疫实际上是同样的含义。

1965 年有两篇论文同时描述了从同种基因和白细胞混合培养中获得了第一个可溶性促有丝分裂因子，在这些上清液中确实含有目前我们称之为的白细胞介素-2 分子。然而，在当时大多数免疫学家对促有丝分裂淋巴因子不太重视，并且认为即使它们存在的话，也

不如特异性抗原来得重要。认为促有丝分裂淋巴因子只起到营养或支持作用，仅仅是扩大了抗原的信号而已，没有人认为淋巴因子本身能刺激细胞分裂。

最初，人们假设激活的淋巴细胞是白细胞培养基中促有丝分裂因子的唯一来源。当采用淋巴因子名词时，它同细胞介导免疫是一致的。然而，远在1970年Bach等报告，粘附的非淋巴细胞可释放具有促有丝分裂活性的物质进入培养基中。1972年Gery等采用淋巴细胞激活因子(LAF)名称，与来自淋巴细胞的巨噬细胞诱导的活性相区别。

在以后的数年中，研究者十分重视进行具有促有丝分裂活性分子的浓缩和提纯工作。当时最盛行的想法是对整个系列的每个分子进行活性测定，然而对于这种分离各个分子的期望实际上是难以实现的。即使假定这种活性是由单个淋巴因子和个别靶细胞相互作用的话，这也难以得到证实。在那时，淋巴因子活性的测定通常用异源性靶细胞群体来进行，通常为T细胞、B细胞以及巨噬细胞的混合体，以致于实际上不可能确定所测定的活性是否是由于靶细胞直接或间接相互反应所致。进一步试图用生化方法分离淋巴因子非常费时而且结果也不理想。在早期的工作中，即使获得最低程度的提纯，也需要许多升的条件培养基才行。

1976年有文章报告了一种克服这些实际问题的新方法。Morgan等指出，正常人T细胞能长时间培养，甚至长达1年，而这种培养基具有PHA刺激人周围单个核细胞生长的条件。该报告当时未引起大多数免疫学家的重视，因它所涉及的方法是培养骨髓中的T细胞，而该部位原先人们认为它不是产生成熟T细胞的来源，即使细胞能在条件培养基中连续增殖，但从免疫学上来看也是不成熟的，因为它们不能显示出能执行任何特异性抗原功能，而且这种现象也因在条件培养基中促有丝分裂因子的非特异性抗原特性而否定。事

实上, 根据这一点就足以相信不能为免疫学的原理所承认。

在这期间, Dartmouth 的实验继续产生对鼠肿瘤抗原特异的细胞毒 T 细胞。虽然肿瘤特异性细胞毒 T 细胞能够检测, 但它们只能在增殖的培养基中维持几天。在 Morgan 等报告以后, 把调配好的介质加到培养基中, 试图保持抗原特异性细胞增殖, 而这些细胞是在体内及试管中免疫所重复挑选出来的。根据免疫学观点来看, 仅由抗原本身来启动和保持 T 细胞增殖, 在当时认为似乎是不会成功的。而且, 人们认为在功能上已分化的细胞引起无限的增殖是决不可能的。然而, 人们建立了对肿瘤抗原特异的鼠细胞毒 T 淋巴细胞 (CTLL) 系, 事实上, 直至 10 年以后的今日, 原来的 CTLL 仍在继续培养中。

应该认识到抗原特异性 T 细胞长期成功地生长关键是抗原, 它使细胞能对存在于培养基中的促有丝分裂因子发生反应。与当时流行的看法相反, 抗原特异性 CTLL 的发现得出了令人信服的结论, 即原发性促有丝分裂的效果可见于抗原以外的分离出来的某些物质, 这种见解促进了对人抗原特异性细胞毒 T 细胞的研究。同样, 对 CTLL 克隆的试验证明, 通过有限稀释, 克隆容易产生。即使没有滋养细胞, 仅通过条件培养基也可获得 100% 的平板效应, 且经分离克隆后, 证明 80% 是细胞毒性的。

在以前, 对这种抗原特异性克隆 T 细胞的产生及维持是不可能的, 因此, 抗原特异性 T 细胞克隆对免疫学的影响可与单克隆分泌免疫球蛋白的浆细胞瘤相提并论。例如, 使用抗原特异性克隆 T 细胞使得具有高度特异性的大多数组织相容性复合物 (MHC) 限制反应的研究成为可能, 而使用异源性 T 细胞群只能得到模棱两可的数据。而且, 产生大量克隆的功能 T 细胞的能力可明确用于生化和分子学研究, 而在此之前是不可能的。克隆 T 细胞可用来确证 T 细胞抗原受体作为 90-KD 结合二硫化物异二聚物的一种手段。细胞毒

性 T 细胞克隆的提供同样能使 T 细胞介导的细胞毒分子机制的研究成为可能。用于分离特征细胞毒颗粒的一株细胞,实际上是 CTLL-2,它是最初的 IL-2 依赖的细胞株。因此,克隆抗原特异性 T 细胞确实证明是一种独特的细胞试剂。

三、白细胞介素名称的由来

克隆 T 细胞群的产生可用来研究条件培养基中促有丝分裂的淋巴因子的特性。由于克隆 CTLL 是单细胞无性后代,解决了异质性靶细胞的问题,因而允许通过确定促有丝分裂分子的生物或生化特点来减少在条件培养基中活性的复杂性。用克隆化的 CTLL 建立了一种快速和灵敏的生物鉴定法来检测保持 T 细胞长期生长的促有丝分裂因子的活性,可对各种待测样品中的活性浓度进行定量测定。

生物学试验确定了 T 细胞作为具有促有丝分裂活性物质的来源,因而可确定这种物质是一种淋巴因子。由于 T 细胞可对该活性发生反应,因此称之为 T 细胞生长因子 (TCGF),以便与任何由巨噬细胞产生的促有丝分裂因子相区别。在这方面,LAF 和 TCGF 之间的区别可能仅在于 LAF 不具有促使 CTLL 生长的活性。即使如此,LAF 像 TCGF 那样也可明显刺激胸腺细胞及不含有巨噬细胞的 T 细胞增殖。为了使得这种奇怪的现象一致起来,一系列的试验最后揭示了 LAF 具有潜在产生 TCGF 的功能,从而提供了令人信服的解释。尽管对这方面了解得还不深入,但能对最佳的 T 细胞增殖提供辅助作用,这些观察使得在理论和实践上促使采用白细胞介素这一名称,即 LAF 称为白细胞介素-1,TCGF 称为白细胞介素-2。

虽然白细胞介素这一名称用来阐明及简化促有丝分裂淋巴因子的命名,但是名称的改变不够成熟,其中的活性尚未达到分子水平,而且在条件培养基中巨噬细胞的 LAF 活性并未包括在称之为 IL-

1 α 和 IL-1 β 分子中。另一种巨噬细胞诱导的细胞因子(以前称为 IL-6) 最近发现能促进纯 T 细胞产生 IL-2, 类似于未经分离的条件培养基中巨噬细胞 LAF 活性, 因此, 由 IL-1 α 和 IL-1 β 为标志的分子的确切功能在目前尚不清楚, 而且以往所描述的 LAF 活性可能实际上是通过 IL-6 所介导的。

第二节 白细胞介素-2 的生物活性和理化性质

一、IL-2 的生物学活性

1. IL-2 对 T 细胞的增殖作用

IL-2 能在体外选择性地维持 T 细胞的生长。大量实验证明, 在含有 IL-2 的培养基中, 抗原特异性细胞毒 T 细胞、抑制性 T 细胞(T_S) 或辅助性 T 细胞(T_H) 均能长期生长, 大量扩增。将细胞毒 T 细胞在含有 IL-2 的培养基中长期培养, 经过两个月, 细胞毒 T 细胞的数量从开始的 10^5 增加至 9.3×10^{13} , 增加了 9.3×10^8 倍。IL-2 除了能在体外长期维持 T 细胞生长并使之大量扩增外, 当其大剂量体内应用时, 也可使体内的淋巴细胞大量增殖。

IL-2 促进 T 细胞增殖的增强因素主要有抗原、丝裂原和细胞因子。抗原并不能直接激活 T 细胞, 须由抗原提呈细胞(HLA-DR⁺, Ia⁺) 介导才能激活 T 细胞, 从而使 T 细胞产生内源性 IL-2, 通过自分泌方式(Autocrine) 维持自身的生长。T 细胞丝裂原 ConA 可直接激活 T 细胞, 使 T 细胞产生对 IL-2 的反应性, PHA 和 OKT₃ 抗体也有同样的作用。此外, 有多种细胞因子如 IL-1、IFN、TNF 等能增强 IL-2 诱导的 T 细胞增殖反应。

2. IL-2 对 B 细胞的作用