

己酸羟孕酮在治疗细胞因子释放综合征中的应用

胡 涛

深圳埃格林医药有限公司, 中国·广东 深圳 518000

【摘要】细胞因子释放综合征是指淋巴细胞在机体受到感染或者应用单克隆抗体、细胞因子等治疗后出现活化、溶解,并释放出大量细胞因子所导致的一组临床综合征。抑制细胞因子释放综合征在免疫性疾病和感染类疾病治疗领域有重要的意义,本文为己酸羟孕酮在制备抑制细胞因子释放综合征的药物中的应用提供了数据支持。

【关键词】己酸羟孕酮; 细胞因子; 细胞因子释放综合征; 细胞因子风暴

1 细胞因子释放综合征

细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)是指淋巴细胞在机体受到感染或者应用单克隆抗体、细胞因子等治疗后出现活化、溶解,并释放出大量细胞因子所导致的一组临床综合征。这一现象最早在20世纪90年代初抗移植排斥反应药莫罗莫那-CD3单抗(OKT3)的使用中即已被发现。2006年3月,在单克隆抗体TGN1412的英国I期临床试验中,试验组6名健康男性出现了多器官的衰竭,其中2名出现深度昏迷,后证实与诱发机体CRS有关。这次事件使科学界和药品管理机构对单克隆抗体的临床前研究尤其是CRS重新进行了审视,并提出了相应的临床试验指导原则。CRS是器官移植、新冠肺炎、CAR-T和大分子药物治疗后患者的主要致死原因之一,据报道高达93%的CAR-T治疗患者和20%的新冠肺炎患者会产生不同程度的CRS。

目前临床治疗CRS主要是以对症处理为主,常用的治疗措施包括:(1)生命支持。维持体温、肠道内外营养和能量供给;(2)呼吸支持。一般氧疗,机械通气和表面活性物质等;(3)循环支持。调整出入量,维持水电解质酸碱平衡。酌情使用胶体、晶体、血管活性药物和弥漫性血管内凝血时肝素的使用;(4)皮质类固醇,对乙酰氨基酚和抗组胺药如苯海拉明等,可以预防性使用,在发病时亦可以重复使用;(5)其他,包括血液滤过和持续肾脏替代治疗等。迄今为止,临床上仍然缺乏安全有效的、针对CRS病因进行治疗的药物。鉴于此,针对CRS病因来治疗该疾病的药物在本领域中仍存在着极大的需求。^[1]

2 实验设计与方法

以下实验中采用的人外周血单核细胞(PBMCs)是来源于Eurofins Discovery(St Charles, MO, USA),混合自3个健康人类供试者(Lot#98, 99, 101)。

己酸羟孕酮(HPC)抑制人外周血单核细胞(PBMCs)内的细胞因子释放

2.1 采用抗CD28超激动剂的T细胞炎症抑制实验方法

实验第一天

将溶于1xPBS的抗CD28超激动剂(clone ANC28.1/5D10, 2 μg/孔)接种于高结合力酶标板内,并在生物安全柜内开盖孵育过夜,固定风干。冻存PBMCs滴融化冻,混合并稀释至适当密度,接种入U形底的聚丙烯96孔板(1.2x10⁵ cells每孔),每孔加入228 μL的培养基(RPMI1640, 10%热灭活胎牛血清, 1%青霉素/链霉素, 2mM L-谷氨酰胺)。细胞在加入HPC之前在37°C, 5%CO₂孵育1小时。HPC溶于50%的乙醇&PBS,并进一步用20X的细胞培养基进行稀释。将HPC加入PBMCs中,平行重复三组,每组12 μL (1X), 37°C, 5%CO₂孵育16小时。

实验第二天

孵育16小时后,将200 μL (1x10⁵)加入HPC或对照试剂

的细胞转移至接种抗CD28的酶标板内,在37°C, 5%CO₂孵育48小时。对于阴性对照组,将200 μL (1x10⁵)的细胞转移至接种抗CD28或同型IgG1的酶标板内。孵育48小时后,酶标板在200xg下离心10分钟。收集细胞培养上清,并保存于-80°C直至分析。

2.2 采用抗CD3(OKT3)或PHA的T细胞炎症抑制实验方法

实验第一天

冻存PBMCs经过滴融化冻,混合并稀释至适当密度,接种入聚丙烯96孔板(2x10⁵ cells每孔)并在每孔内加入150 μL的培养基(RPMI1640, 10%热灭活胎牛血清, 1%青霉素/链霉素, 2mM L-谷氨酰胺)。在加入HPC之前,细胞于37°C, 5%CO₂下孵育1小时。HPC溶于50%的乙醇&PBS,并进一步用20X的细胞培养基进行稀释。将HPC加入PBMCs中,平行重复三组,每组10 μL (1X), 37°C, 5%CO₂孵育16小时。

实验第二天

孵育16小时后,根据实验设计向酶标板的孔内加入40 μL的抗CD3(OKT3, 3 μg/孔 or 15 μg/mL)或PHA(10 μg/mL),并在37°C, 5%CO₂孵育48小时。孵育48小时后,酶标板在200xg下离心10分钟。收集细胞培养上清,并保存于-80°C直至分析。

3 细胞因子的测定

每个样品的细胞因子水平测定是采用Luminex方法,并按照厂商提供的实验操作进行。对细胞培养上清的细胞因子水平测定,是使用由Millipore Sigma(catalogue No. HCYTOMAG-60K)提供的人细胞因子/趋化因子磁珠并按照厂商提供的实验操作进行的,标准范围为3.2, 16, 80, 400, 2000, 10000 pg/mL。^[2]

4 结语

抗CD28成功刺激人外周血单核细胞中特定细胞因子的释放,其中IL-6, IL-10, TNF-α和IFN-γ的释放受到HPC的显著抑制,且其对于IL-10和IFN-γ释放的抑制具有浓度依赖性。

OKT3成功刺激人外周血单核细胞中特定细胞因子的释放,其中IL-6, IL-10和IFN-γ的释放受到HPC的显著抑制,且其对于IL-6和IL-10释放的抑制具有浓度依赖性。

PHA成功刺激人外周血单核细胞中特定细胞因子的释放,其中IL-2, IL-6, IL-10和TNF-α的释放受到HPC的显著抑制,并显示出浓度依赖性。

参考文献:

- [1]陈丽霞.小剂量雌激素、孕激素替代治疗围绝经期综合征的疗效观察[J].中国妇幼保健, 2013, (27) 4595-4596.
- [2]陈洁.对比针灸结合温经汤加减与雌、孕激素、促排卵药物周期疗法治疗月经不调的临床疗效[J].中文科技期刊数据库(文摘版)医药卫生2016(2).00048-00048.