

恶性实体瘤患者外周血细胞因子诱导的 杀伤细胞增殖与杀瘤活性

撒亚莲¹, 华映坤¹, 严新民¹, 贾玲², 孙建伟², 宋建新³, 杨净瑜², 徐艳¹

(云南省第一人民医院 1. 临床基础医学研究所, 2. 肿瘤科, 3. 临床检验中心, 云南 昆明 650032)

摘要:【目的】探讨恶性实体瘤患者外周血来源的细胞因子诱导的杀伤细胞的增殖能力、免疫表型及杀瘤活性。【方法】用 rhIFN- γ , rhIL-2, Anti-CD3mAb 与恶性实体瘤患者外周血单个核细胞共孵育。分别在培养第 4、7、10、13 天进行细胞计数, 通过流式细胞术检测细胞免疫表型及 MTT 法检测对 K562 细胞的杀伤活性。【结果】恶性实体瘤患者外周血单个核细胞与 rhIFN- γ , rhIL-2, Anti-CD3mAb 孵育 4、7、10、13 d, 细胞数分别增加 (2.5 \pm 1.6)、(11.9 \pm 3.5)、(22.3 \pm 7.8) 和 (29.5 \pm 6.1) 倍。CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 和 CD3⁺CD16⁺CD56⁺ 细胞在培养第 13 天分别从 (62.8 \pm 7.6)%、(31.5 \pm 5.8)%、(44.9 \pm 8.2)% 和 (1.3 \pm 1.1)% 增加到 (89.3 \pm 9.5)%、(50.1 \pm 7.2)%、(57 \pm 9.0)% 和 (37.0 \pm 12.7) %。对 K562 细胞的杀伤效应在第 4、7、13 天分别为 (23.6 \pm 8.5)%、(56.4 \pm 7.2)% 和 (80.1 \pm 4.5)%。【结论】rhIFN- γ , rhIL-2 和 Anti-CD3mAb 诱导恶性实体瘤患者外周血单个核细胞活化为以 CD3⁺CD16⁺CD56⁺ 为主的细胞因子诱导的杀伤细胞, 细胞增殖力强, 并对 K562 细胞有强大的杀伤活性。

关键词: 杀伤细胞; 增殖; 免疫; 细胞毒活性; 细胞过继免疫治疗

中图分类号: R392.12

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0090-03

Proliferation and Cytotoxicity of Cytokine Induced Killer Cells Derived from Peripheral Blood with Malignant Content Tumor

SA Ya-lian¹, HUA Ying-kun¹, YAN Xin-min¹, JIA Ling², SUN Jian-wei², SONG Jian-xin³,
YANG Jing-yu², XU Yan¹

(1. Institute of Clinical and Basic Medical Sciences, 2. Department of Oncology, 3. Clinical Laboratory Center, The First People's Hospital, Kunming 650032, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the ability to proliferate, immunity phenotype, and cytotoxicity of cytokine-induced killer (CIK) cells derived from peripheral blood of the malignant content tumor patients. 【Methods】CIK cells have been generated from peripheral blood lymphocytes (PBLs) from the patients with malignant content tumor, which incubated with rhIFN- γ , rhIL-2, and anti-CD3mAb. Cell densities were determined on the 4th, 7th, 10th, 13th d and the phenotypic patterns of CIK cells were characterized by flow cytometry on the 13th d of incubation. Then, the killing experiment of CIK cells co-cultured with K562 cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay method test on the 4th, 7th, 13th d, respectively. 【Results】In vitro incubated with rhIFN- γ , rhIL-2, and Anti-CD3mAb, the amount of cells were increased 2.5 \pm 1.6 folds, 11.9 \pm 3.5 folds, 22.3 \pm 7.8 folds and 29.5 \pm 6.1 folds on the 4th, 7th, 10th, 13th d, respectively; and the percentages of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD3⁺CD16⁺CD56⁺ cells increased significantly on the 13th d from (62.8 \pm 7.6)%, (31.5 \pm 5.8)%, (44.9 \pm 8.2)%, and (1.3 \pm 1.1)% to (89.3 \pm 9.5)%, (50.1 \pm 7.2)%, (57.3 \pm 9.0)% and (37.0 \pm 12.7)%. The ability to lyse K562 cells was slowly increased (23.6 \pm 8.5)%, (56.4 \pm 7.2)%, and (80.1 \pm 4.5)% on the 4th, 7th, 13th day, respectively. 【Conclusion】Our results indicate that rhIFN- γ , rhIL-2, and anti-CD3mAb can induce PBL from with malignant content tumor patients to produce CIK cells expressing the phenotype of CD3⁺CD16⁺CD56⁺, which have strong proliferation capacity and activity of kill tumor.

Key words: killer cells; proliferation; immunity; cytotoxicity; adoptive cellular immunotherapy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):90-92]

细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine-induced killer cells, CIK 细胞)是由多种细胞因子联合诱导

收稿日期: 2005-08-09

作者简介: 撒亚莲(1971-), 女, 云南开远人, 博士, 主要从事细胞生物学研究. E-mail:sa-yl@yahoo.com.cn

单个核细胞活化为 CD3⁺CD16⁺CD56⁺为主的异质细胞群^[1], 其溶瘤效应强, 杀瘤谱广^[2], 在肿瘤细胞过继免疫治疗中具有广阔的应用前景^[3]。由于肿瘤患者的免疫系统常受到抑制, 功能低下^[4]。在恶性实体瘤患者接受自体 CIK 细胞过继免疫治疗之前, 我们需要探讨通过多种细胞因子联合诱导恶性实体瘤患者外周血来源的 CIK 细胞在体外的增殖能力及溶瘤效应, 为临床细胞过继免疫治疗提供可靠的理论依据。

1 材料和方法

1.1 病例

25 例恶性实体瘤患者为 2002 年至 2004 年在云南省第一人民医院经手术后病理检查确诊病例。大肠癌 12 例, 乳腺癌 8 例, 肝癌 4 例, 肾透明细胞癌 1 例。男性 12 人, 女性 13 人, 平均年龄 53.6 岁 (35~75 岁)。

1.2 试剂

RPMI-1640 从 Invitrogen(GIBCO, 美国)公司购买。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 从 Hyclone (美国) 公司购买。重组人干扰素 (recombinant human interferon, rhIFN- γ) 购自上海生物制品研究所(中国)。重组人白细胞介素 2 (recombinant human interleukin-2, rhIL-2) 购自深圳科兴生物制品有限公司(中国)。小鼠抗人 CD3 单克隆抗体 (monoclonal antibody CD3, Anti-CD3 mAb) 购自 Beckman 公司(法国)。

1.3 CIK 细胞的分离和培养

取恶性实体瘤患者外周静脉血 12~15 mL, 肝素抗凝。用 Ficoll Hypaque 淋巴细胞分离液分离, 收集界面层的单个核细胞, 洗涤 2 次后, 将细胞按 1×10^6 /L 数量悬浮于含体积分数 10% FBS 的 RPMI1640 完全培养基中, 添加终浓度为 rhIFN- 3×10^6 U/L, 置 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。24 h 后添加终浓度为 CD3mAb 30 μ g/L 和 rhIL-2 1.5×10^6 U/L。每 3 d 换液 1 次。在培养第 4、7、10、13 d 进行细胞计数。

1.4 CIK 细胞的免疫表型检测

在培养第 13 d 收集 CIK 细胞, 用平衡液洗细胞后, 用 FITC 或 PE 标记的 CD3、CD4、CD8、CD16/CD56 孵育细胞, 30 min, 4 $^{\circ}$ C。洗去多余的抗体, 用流式细胞仪 (Coulter Epics-XL, Beckman-coulter

Epics-XL3, Immuno-PREP, USA) 检测阳性细胞数。

1.5 CIK 细胞的杀伤活性检测

采用 MTT 法检测 CIK 细胞对 K562 细胞的杀伤效应。CIK 细胞为效应细胞。K562 细胞为靶细胞。效: 靶比为 10:1。将培养第 4、7、13 天的 CIK 细胞与 K562 细胞置 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 培养箱 6 h, 加入 10 μ L MTT (终浓度为 5 g/L), 继续孵育 4 h。离心, 弃上清, 加入 100 μ L DMSO。用酶联检测仪 (Sigma 960, USA) 以 490 nm 光波检测光密度 (A)。杀伤活性 (%) 计算公式为: $[1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{效应细胞组}}) / A_{\text{靶细胞组}}] \times 100\%$ 。

1.6 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 CIK 细胞在光镜下形态特点

CIK 细胞形态似外周血淋巴细胞, 但体积稍大。在培养 3 d 后, 细胞增殖呈团, 可观察到细胞体积增大, 胞浆少、胞核大、圆。有时可观察到细胞分离相。在培养 5~7 d, 细胞团更大, 并悬浮在培养液中(图1)。

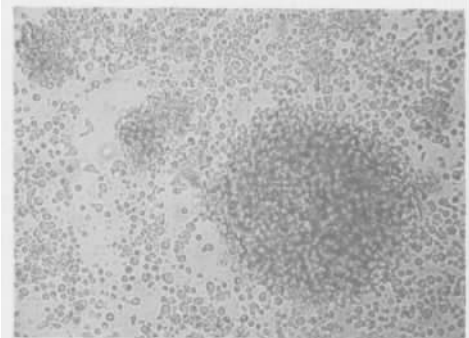


图 1 培养第 13 天的 CIK 细胞

Fig.1 CIK cells cultured on 13 d ($\times 200$)

2.2 CIK 细胞的扩增情况

细胞在培养的第 1~3 天没有明显增殖, 数量有所减少。第 4~5 天可观察到细胞开始增殖, 数量明显增多, 呈集落样生长。在培养第 4、7、10、13 d 细胞数量分别增加 (2.5 ± 1.6) 倍、(11.9 ± 3.5) 倍、(22.3 ± 7.8) 倍和 (29.5 ± 6.1) 倍。

2.3 CIK 细胞的免疫表型

在培养第 13 天, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ 和 CD3⁺CD16⁺CD56⁺ 细胞分别从 (62.8 ± 7.6)%、(31.5 ± 5.8)%、(44.9 ± 8.2)% 和 (1.3 ± 1.1)% 增加到 (89.3 ± 9.5)%、

(50.1 ± 7.2)%、(57.3 ± 9.0)%和 (37.0 ± 12.7) % (图 2)。

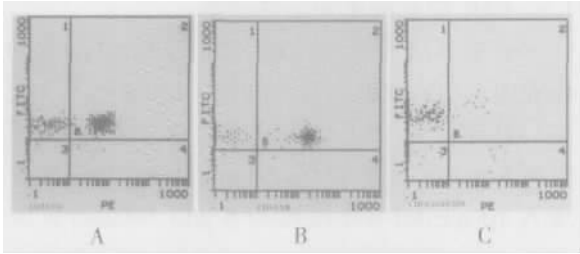


图 2 培养 13 d 的 CIK 细胞免疫表型。

Fig.2 Expression of the surface marker of CIK cells cultured on 13 d

A: CD3⁺CD4⁺; B: CD3⁺CD8⁺; C: CD3⁺CD16⁺CD56⁺

2.4 CIK 细胞的杀伤活性

在培养第 4、7、13 天, 恶性实体瘤患者外周血来源的 CIK 细胞对 K562 细胞的杀伤活力分别为 (23.6 ± 8.5)%、(56.4 ± 7.2)% 和 (80.1 ± 4.5)%。

3 讨论

CIK 细胞过继免疫治疗是继手术、化疗、放疗之后的第四种新型肿瘤治疗模式之一。CIK 细胞具有抑制肿瘤生长及清除残留微小病灶的作用。同时, 还可以调节和增强患者全身免疫功能, 在体内长期发挥抗肿瘤的活性, 进一步消灭体内的肿瘤细胞, 防止肿瘤复发、转移。对于无法手术或对化疗耐受的中晚期肿瘤患者也可以起到改善生活质量, 延长生命的积极作用^[2]。由于 CIK 细胞对正常人体细胞、免疫系统没有任何不良反应, 而且对多重耐药的肿瘤敏感, 因此 CIK 细胞过继免疫治疗具有广阔的临床应用前景。本文通过 rhIFN- γ 、rhIL-2 和 Anti-CD3mAb 联合诱导恶性实体瘤患者外周血单个核细胞为 CIK 细胞, 观察其在体外的增殖能力、免疫表型及杀伤活性, 为临床开展自体 CIK 细胞过继免疫治疗奠定理论基础。

CIK 细胞可来源于外周血、脐带血、骨髓液及胸腹水中的淋巴细胞, 其中以外周血来源较为便捷。早在 1991 年, Schmidt-Wolf 等^[1]报道, 联合 IFN- γ 、IL-1、IL-2 和 Anti-CD3mAb 诱导单个核细胞生成 CIK 细胞。近年的研究表明其关键成分是 IFN- γ 、IL-2 和 Anti-CD3mAb。在培养的第二个 24 h 加入 rhIFN- γ , 预诱导细胞表达 IL-2 受体。次日加入 rhIL-2 和 Anti-CD3mAb 联合诱导促进 T 淋巴细胞增殖并加强 T 淋巴细胞的细胞毒作用^[9]。其它细胞因子 IL-2、IL-7、IL-12、IL-15 等的不同组合也可

诱导单个核细胞为 CIK 细胞。但我们的操作方法简便, 且细胞因子 rhIFN- γ 、rhIL-2 为上市药品^[6,7]。

CIK 细胞是以 CD3⁺CD16⁺CD56⁺为主的异质细胞群, 兼有 T 细胞强大的杀瘤活性和 NK 细胞的非主要组织相容性复合物 (MHC) 限制的杀瘤特点, 故又称为 NKT 细胞。在健康状况下, 外周血 CIK 细胞大约为 1%~5%。而我们的研究表明, 恶性实体瘤患者外周血单个核细胞在 rhIFN- γ 、rhIL-2 和 Anti-CD3mAb 联合诱导培养第 13 天, 细胞数量增加 (29.5 ± 6.1) 倍。CD3⁺CD16⁺CD56⁺细胞扩增到 (37.0 ± 12.7) %。另外, 对 K562 细胞的杀伤活力明显增强, 在培养第 4、7、13 天, 杀伤活力分别为 (23.6 ± 8.5)%、(56.4 ± 7.2)% 和 (80.1 ± 4.5)%。总之, 从本研究中可以看出, 恶性实体瘤患者外周血来源的 CIK 细胞是一种在体外增殖力强、杀伤活性高的免疫效应细胞。

参考文献:

- [1] SCHMIDT-WOLF I G, NEGRIN R S, KIEM H P, et al. Use of a SCID mouse/ human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor or cell activity [J]. J Exp Med, 1991, 174 (1):139- 149.
- [2] BLATTMAN J N, GREENBERG P D. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses [J]. Science, 2004, 305 (5681):200- 205.
- [3] YAMAGUCHI Y, OHSHITA A, KAWABUCHI Y, et al. Adoptive immunotherapy of cancer using activated autologous lymphocytes-current status and new strategies[J]. Hum Cell. 2003, 16 (4):183- 189.
- [4] 彭永排, 林仲秋, 李志雄, 等. 宫颈癌患者外周血来源的树突状细胞的生物学特性观察[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2003, 24(6):547- 551.
- [5] SCHMIDT-WOLF I G, LEFTEROVA P, Mehta B A, et al. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells[J]. Exp Hematol, 1993, 21 (13):1673- 1679.
- [6] van der VLIET H J, NISHI N, KOEZUKA Y, et al. Potent expansion of human natural killer T cells using alpha-galactosylceramide (KRN7000)-loaded monocyte-derived dendritic cells, cultured in the presence of IL-7 and IL-15[J]. J Immunol Methods, 2001, 247(1-2): 61- 72.
- [7] 黎阳, 黄绍良, 魏菁, 等. 不同细胞因子培养体系对 CIK、NK 及 NKT 细胞等诱导产率的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2003, 24(4): 363- 367.

(编辑 张恩健)