

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

黎 阳¹, 黄绍良¹, 魏 菁², 吴燕峰³, 周敦华¹

(中山大学附属第二医院 1. 儿科; 2. 医学研究中心; 3. 干细胞研究中心, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探索不同细胞因子(IL-2、IL-7、IL-15)组合的诱导培养体系对人脐血来源细胞因子诱导杀伤(CIK)细胞、自然杀伤(NK)细胞和自然杀伤样 T(NKT)细胞的扩增效果。【方法】通过 IL-2、IL-7、IL-15 的不同组合诱导扩增脐血来源的 CIK 细胞、NK 细胞和 NKT 细胞, 通过流式细胞分析法对不同培养条件下 CIK 细胞、NK 细胞和 NKT 细胞免疫表型的比例进行了分析。【结果】经过 21 d 的培养, CD3 + CD56 + CIK 细胞以 IL-2 + IL-7 + IL-15 组扩增比例最高, 为(24.5 ± 5)%; NK 细胞以 IL-2 + IL-15 组扩增比例最高, 为(59.1 ± 0.5)%; 上述细胞因子体系对脐血 Vα24 + CD161 + NKT 细胞扩增效果不明显。【结论】脐血中免疫效应细胞 CIK、NK 细胞等可通过 IL-2、IL-7、IL-15 的联合培养体系进行扩增。

关键词: 细胞因子; 杀伤细胞; 脐血干细胞移植; 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(2003)04-0363-05

Generation of CIK, NK and NKT Cells Using Exogenous Interleukin-2, -7 and -15

LI Yang¹, HUANG Shao-liang¹, WEI Jing², WU Yan-feng³, ZHOU Dun-hua¹

(1 Pediatric Department, 2 Medical Research Center, 3 Stem Cells Research Center, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the efficacy of different combination of IL-2, -7 and -15 on the induction and expansion of umbilical cord blood derived cytokine-induced killer (CIK), natural killer (NK) and natural killer-like T(NKT) cells. 【Methods】 IL-2, -7 and -15 were combined in different ways to expand the CIK, NK and NKT cells in cord blood. The phenotype and percentage of these cells were identified by flow cytometric analysis. 【Results】 The combination of IL-2 + IL-7 + IL-15 was optimal for CD3 + CD56 + CIK cells expansion and that of IL-2 + IL-15 was optimal for CD3-CD56 + NK cells generation. After culture for 21 days of, the highest production of CIK and NK cells from cord blood were (24 ± 5)% and (59.1 ± 0.5)%. The culture system had almost no effect on the expansion of Vα 24 + CD161 + NKT cells. 【Conclusion】 The immunological effectors (CIK cells and NK cells) in umbilical cord blood can be generated by culture system with combination of IL-2, -7 and -15.

Key words: cytokines; killer cells; cord blood stem cell transplantation; adoptive cellular immunotherapy

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(4):363 ~ 367]

脐血移植(umbilical cord blood transplantation, UCBT), 已成为人体干细胞移植领域关注的焦点之

一。近 10 多年的 UCBT 迅速发展, 至今已近 3 000 例, 90% 以上的 UCBT 是小儿病例, 即使人白细胞

收稿日期: 2002-11-18

作者简介: 黎 阳(1971-), 男, 广东东莞人, 博士生, 主治医师; 黄绍良, 教授, 博士生导师。

抗原(human leucocyte antigen, HLA)多个位点不匹配的非血缘相关的UCBT效果也与HLA相合的非血缘骨髓移植(unrelated-donor bone marrow transplantation, UD-BMT)接近。但大量的临床资料显示,造血干细胞移植前的预处理并不能完全杀灭白血病细胞,移植后体内仍存在微小残留病(minimal residual disease, MRD),并成为移植后复发的根源,有约20%~80%的患者最终因复发而死亡^[1];由于脐血中具移植物抗白血病(graft versus leukemia, GVL)效应的T细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞等的前体细胞幼稚,如何进一步减少UCBT后儿科白血病患儿的复发率、提高其无病生存率,已成为儿科UCBT急需解决的问题。目前对造血干细胞移植后残留肿瘤细胞的清除多需通过过继免疫治疗的手段,如淋巴因子激活杀伤(lymphokine activated killer, LAK)细胞及近年来的研究热点细胞因子诱导杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞、自然杀伤样T(natural killer-like T, NKT)细胞输注等来解决。本实验通过常用的不同细胞因子(IL-2、IL-7、IL-15)组合的诱导培养体系对人脐血来源CIK细胞(主要为CD3+CD56+双阳细胞)、NK细胞(CD3-CD56+细胞)、NKT细胞(主要为V α 24+CD161+双阳细胞)的诱导、扩增产率的影响进行了初步的研究,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和试剂

淋巴细胞分离液,相对质量:1.077 \pm 0.002(中国医学科学院血液学研究所),IMDM(GIBCO BRL公司),小牛血清(FCS,杭州四季青公司)。重组人细胞因子:rhIL-2、rhIL-7及rhIL-15(10 μ g/支,美国Peprotech EC公司);抗人V α 24-PE、CD161-FITC、CD3-PerCP、CD56-PE及CD34-PE流式细胞荧光标记抗体(分别购自美国BD、Peprotech EC公司,)。

1.2 脐血单个核细胞分离

脐血来自本院健康足月妊娠产妇经产道或剖宫产分娩之胎儿脐静脉血,用含肝素抗凝剂的无菌干燥瓶收集,采血量为30 mL,24 h内分选。采用Ficoll-Hypaque法分离脐血单个核细胞(cord blood mononuclear cells, CBMNCs),将脐血用等体积磷酸盐缓冲液充分混匀稀释后,分管,按1:1比例缓慢加至Ficoll-Hypaque淋巴细胞分离液上,20 $^{\circ}$ C离心(LD5-2A北京医用离心机厂,2500 r/min, $r = 30$

cm, 25 min);将富含CBMNCs的液层吸出,用磷酸盐缓冲液洗涤两次。用Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM) + 150 mL/L灭活小牛血清重悬细胞,充分混匀,制成CBMNCs悬液,血细胞记数仪测定细胞数,台盼蓝染色测定分离细胞的活性后备用。

1.3 细胞制备

将上述CBMNCs以每孔 1×10^6 细胞接种于24孔培养板,每孔终体积1 mL(含150 mL/L小牛血清的IMDM);分A(IL-7 + IL-15)、B(IL-2 + IL-15)、C(IL-2 + IL-7 + IL-15)3组;每组共分离3份脐血,每份脐血复种3孔,共9孔。另设不添加任何细胞因子的脐血空白对照组;培养开始A组加入IL-7及IL-15各40 μ g/L;B组加入IL-2 80 μ g/L、IL-15 40 μ g/L;C组加入IL-2 80 μ g/L、IL-7及IL-15各40 μ g/L。A、B、C组每隔3 d半量换液及全量补充上述细胞因子。

1.4 细胞扩增集落形态的观察及细胞免疫表型测定

用光镜观察实验组、对照组细胞扩增集落形态的变化。在细胞培养开始及第21 d,实验各组(A、B、C组)取细胞浓度为每管 2×10^9 /L的细胞悬液50 μ L,分别加入上述单抗,混匀,置4 $^{\circ}$ C冰箱避光孵育30 min后PBS洗涤两次,用流式细胞仪检测CD3 + CD56 + CIK细胞、CD3-CD56 + NK细胞、V α 24 + CD161 + NKT细胞及CD34 + 细胞含量,并用血细胞记数仪计算培养15 d细胞扩增倍数。

1.5 统计学处理

采用SPSS(V10.0)软件包处理,进行多组间one-way ANOVA Test。

2 结 果

2.1 细胞增殖情况及扩增倍数

空白对照组在培养开始有零星小集落出现,3 d后逐渐出现细胞凋亡,7~10 d细胞完全凋亡。实验组在培养第21 d用Olympus光学显微镜分别在 10×4 及 10×20 倍视野下观察各组细胞的增殖情况,不同细胞因子组合的各组细胞均有集落形成,其中A组(IL-7 + IL-15)镜下集落数多,每孔集落(细胞数 > 40)数为 60.3 ± 13.2 ,但集落组成细胞数较少,单位集落的细胞数多为50~80左右,色淡。而B(IL-2 + IL-15)、C(IL-2 + IL-7 + IL-15)两组镜下集落数较A组显著减少($P < 0.05$),分别为 33.6 ± 10.3 和 42.5 ± 11.8 ,但集落组成细胞数多,

单位集落的细胞数多为 150 个以上, 色深, 细胞呈堆积样, 尤以 C 组明显 (图 1), 用血细胞记数仪计算培养 21 d 细胞扩增倍数结果基本与镜下观察的结果一致, C 组细胞的扩增倍数最高, 为 (10.56 ±

1.41) 倍 (7.90 ~ 12.00 倍), 其次为 B 组细胞数扩增 (7.04 ± 1.75) 倍 (4.50 ~ 8.90 倍), 而 A 组细胞扩增倍数为 (4.92 ± 1.29) 倍 (3.80 ~ 6.80 倍), 3 组间有显著性差异 ($P < 0.05$) 显示 IL-2 联合应用

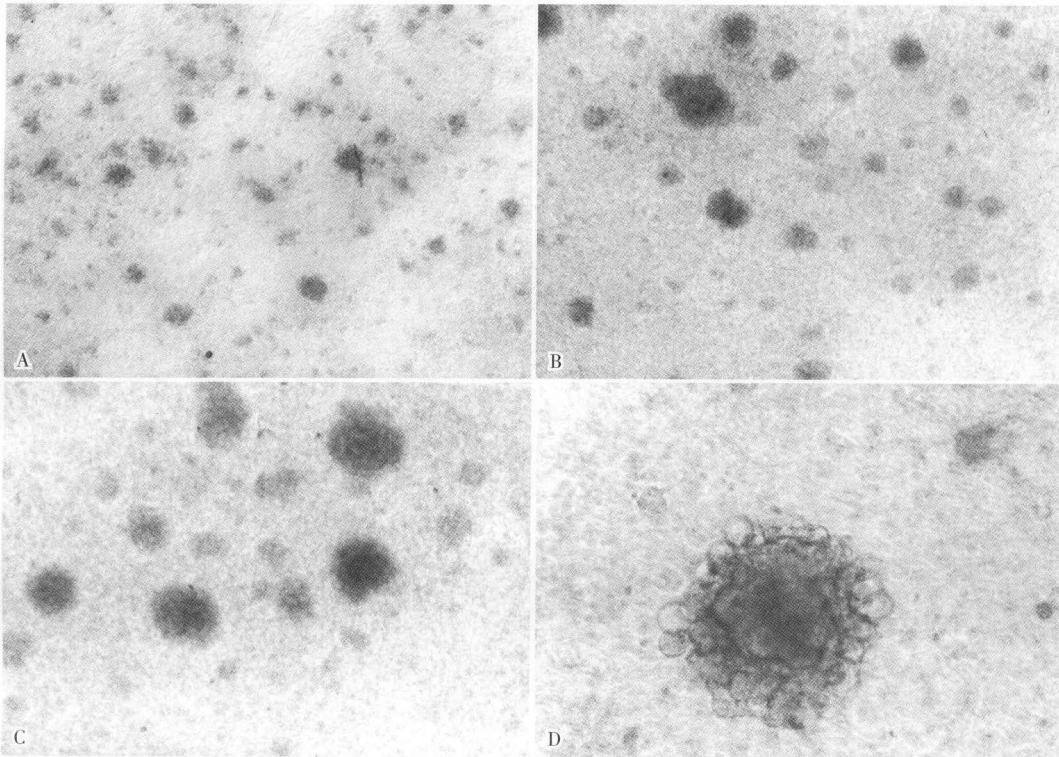


图 1 培养 21 d CIK/NK 细胞集落图

Fig. 1 Cell colonies of CIK/NK after cultured 21 d

A. Group of IL-7 + IL-15, 40 ×; B. Group of IL-2 + IL-15, 40 ×; C. Group of IL-2 + IL-7 + IL-15, 40 ×; D. Group of IL-2 + IL-7 + IL-15, 200 ×

IL-7、IL-15 有较好的扩增效果, 可比单纯应用 IL-7 + IL-15 的细胞数增加约 1 倍。

2.2 细胞免疫表型的测定

由表 1 可见, 扩增前脐血 CIK 和 NKT 细胞的含量均较低, 尤其后者几乎为零。而在培养第 21 天

用流式细胞仪检测实验各组脐血中 CD3 + CD56 + CIK 细胞、CD3-CD56 + NK 细胞、Vα24 + CD161 + NKT 细胞及 CD34 + 细胞含量, 发现 CD3 + CD56 + CIK 细胞比例的扩增倍数为 18 ~ 55 倍, 以 C 组扩增比例最高, 其次为 B 组, A 组最少, 3 组均较扩增

表 1 不同细胞因子组合 (IL-2、IL-7 和 IL-15) 对人脐血来源 NKT、CIK 和 NK 细胞产率的影响

Table 1 The production of CIK, NK and NKT cells in human cord blood by combined effect of IL-2, -7 and -15

Group	CD3 + CD56 + CIK cells (%)	CD3 - CD56 + NK cells (%)	Vα24 + CD161 + NKT cells (%)	CD34 + cells (%)	Cell number fold increase
Control	0.44 ± 0.17	13.98 ± 8.53	0.03 ± 0.03	0.55 ± 0.18	
IL-7 + IL-15	8.21 ± 1.03 ¹⁾	47.62 ± 3.53 ⁴⁾	3.10 ± 1.59 ⁷⁾	0.53 ± 0.16	4.92 ± 1.29
IL-2 + IL-15	10.42 ± 0.22 ²⁾	59.11 ± 0.52 ⁵⁾	0.44 ± 0.44	0.37 ± 0.06	7.04 ± 1.75
IL-2 + IL-7 + IL-15	24.03 ± 4.99 ³⁾	30.85 ± 8.12 ⁶⁾	0.27 ± 0.24	0.04 ± 0.01 ⁸⁾	10.56 ± 1.41

1) Compared with control group, $F = 10.93, t = 22.21, P < 0.01$; 2) Compared with control group, $F = 0.35, t = 111.49, P < 0.01$; 3) Compared with control group, $F = 25.79, t = 14.14, P < 0.01$; 4) Compared with control group, $F = 3.20, t = 14.29, P < 0.01$; 5) Compared with control group, $F = 17.26, t = 21.58, P < 0.01$; 6) Compared with control group, $F = 0.73, t = 5.27, P < 0.01$; 7) Compared with control group, $F = 12.94, t = 5.78, P < 0.01$; 8) Compared with control group, $F = 9.38, t = -10.75, P < 0.01$

前有极显著性差异($P < 0.01$)。各组细胞因子组合对 CD3-CD56+ NK 细胞比例的扩增倍数均较低,为 2~4 倍,其绝对含量均高,B 组 NK 细胞的扩增比例最高,其次为 A 组和 C 组,3 组均较扩增前有极显著性差异($P < 0.01$)。V α 24+CD161+NKT 细胞的比例扩增倍数为 9~103 倍,但绝对含量均低,A 组扩增比例最高也仅为(3.10 \pm 1.59)%,B、C 两组扩增 NKT 细胞的均值均不超过 0.5%。显示 IL-7+IL-15 细胞因子的组合对扩增脐血中的 NKT 细胞有一定的效果,但加入 IL-2 后反而对 NKT 细胞的诱导起抑制作用。经过不同细胞因子 21 d 的扩增培养,CD34+造血干细胞的比例较扩增前下降,均值均不超过 0.6%,以 C 组为最低,较扩增前有极显著性差异($P < 0.01$),显示 IL-2 联合应用 IL-7、IL-15 可起良好地促进造血干细胞分化的作用。

3 讨论

3.1 脐血抗肿瘤免疫细胞的组成

通过对 CIK、NKT 细胞的细胞杀伤毒性和增殖力等方面的研究发现,无论在体内还是体外,其均为显著优于 LAK 细胞的一类具有非主要组织相容性复合体(major histocompatibility complexes, MHC)限制性杀伤活力的新型免疫活性细胞。这类细胞为同时表达 NK 样标记的 T 细胞,CIK、NKT 细胞的免疫表型为 CD3+同时伴 CD56+、CD16 或 CD161 等其它 NK 细胞的免疫标志阳性,而在此细胞亚群中有一小部份还表达一种特殊的,人、鼠同源性极高的高度保守的 V α 24+(人)、V α 14+(鼠) T 细胞受体(TCR)的细胞,目前在人类的研究中 CIK 细胞多指 CD3+CD56+双阳细胞,而将 V α 24+CD161+双阳细胞称为经典(classical) NKT 细胞,简称 NKT 细胞。CIK、NKT 以及 NK 细胞在肿瘤发生、转移和监视的动物模型中已显示出重要的抗肿瘤和排斥肿瘤细胞的作用,目前认为上述抗肿瘤效应细胞的杀伤癌细胞的机制是非 MHC 限制性的,主要通过穿孔素介导的细胞毒作用及 IL-12、干扰素- γ 等细胞因子的作用而实现。故在造血干细胞后通过各种细胞因子组合的诱导、扩增上述具抗肿瘤效应的细胞群用于以后的过继免疫治疗将具有极大的临床应用价值。

对脐血、骨髓(bone marrow, BM)和成人外周

血(adult peripheral blood, APB)等造血干细胞移植物的细胞组份的研究表明,脐血中含有较高比例(12.1%)CD34+CD7+CD3-的较原始 T 细胞的前体细胞,高于 BM(5.1%)和 APB(3.6%);以及较高比例的 CD3-CD16/CD56+NK 细胞,后者可能为 UCBT 后具 GVL 作用的重要免疫效应细胞^[2],但以较幼稚的 CD3-CD16+NK 细胞为主,而较成熟的 CD3-CD56+NK 细胞比例亦不高;而几乎不含有 CD3+CD56+CIK 细胞,V α 24+CD161+NKT 细胞在脐血和 APB 中的含量均低,一般 <0.1%^[3]。我们对未诱导、扩增前脐血的检测显示,脐血中 CIK 和 NKT 细胞的含量均较低,前者为(0.44 \pm 0.17)%、后者几乎为零,而 CD3-CD56+NK 细胞的含量为(13.98 \pm 8.53)%,与文献[3]报道基本一致,显示脐血中部份免疫活性细胞数量不足。

Rocha 等^[4]对 99 例接受无关供体脐血移植、180 例去除 T 细胞的无关供体骨髓移植及 262 例无关供体骨髓移植的儿童白血病患者研究显示,预计的两年生存率和无病生存率(event-free survival rates, EFSR)在组中分别为 35%和 31%、41%和 37%、49%和 43%,故急需进一步提高 CBT 后白血病患儿的无病生存率。由于脐血造血干细胞(HSC)具有多向分化潜能,如何应用不同组合的细胞因子刺激,高效地使 CBHSC 诱导成熟和扩增为具备理想 GVL 和抗感染的免疫效应细胞(肿瘤特异性细胞毒 T 细胞或具广谱抗肿瘤、抗感染效应的 NK、CIK 和 NKT 细胞)是目前接受 CBT 后的血液病肿瘤患儿过继免疫的研究方向,以及进一步提高 CBT 早期成功率、降低死亡率的重要方法。

3.2 通过不同细胞因子组合扩增脐血抗肿瘤免疫细胞的可行性及其特点

已有的研究表明 V α 24+NKT 细胞较 NK 细胞来说具有更强、更广泛的抗肿瘤活性及较低的 GVH 效应,是一类深具临床应用前景的 GVL 免疫效应细胞,目前可通过含有半乳糖神经酰胺(α -galactosylceramide, α -GalCer, KRN7000)的培养体系进行扩增^[5]。Vander 等^[6]在 IL-7+IL-15 的培养体系中联合 KRN7000 对 APB 中的 NKT 细胞的进行扩增,1 周后 NKT 细胞比例最高扩增至 32%。虽然 NKT 细胞在 IL-7R α 及 IL-2R β /IL-15R 缺陷的小鼠中是明显减少的,提示上述细胞因子对扩增 NKT 细胞的重要性,但单独应用 KRN7000、IL-7 或 IL-15 对 NKT 细胞并无扩增作用。我们在不

含 KRN7000 的情况下联合应用 IL-7 + IL-15 对 V α 24 + NKT 细胞经过 3 周的扩增, V α 24 + NKT 细胞比例仅 (3.10 \pm 1.59)%, 显示 KRN7000 对扩增 V α 24 + NKT 细胞是很必要的; 而 IL-2 + IL-15 的组合对 V α 24 + NKT 细胞基本无扩增作用。由于 KRN7000 目前尚未有商品上市, 其来源困难将明显限制 V α 24 + NKT 细胞的临床应用。我们还发现在 IL-7 + IL-15 的体系中加入细胞生长因子 IL-2 后, 虽然体系扩增细胞数增加, 但 V α 24 + NKT 细胞的比例反而减少, 由于 V α 24 + NKT 细胞来源于 CD3 + T 细胞, 这可能与 IL-2 诱导 T 细胞的凋亡有关^[7]。

大部分 CD3 + CD56 + CIK 细胞均来源于 CD3 + CD56-T 细胞而不是来源于 CD3-CD56 + NK 细胞^[8], 大部分研究者均通过 IL-1、IL-2、干扰素- γ 、Anti-CD28 及 Anti-CD3 单抗等来诱导外周血或脐血中的 CIK 细胞, 经过 14 ~ 21 d 扩增的 CIK 细胞其比例可由 0.10% ~ 0.13%, 上升至 19.0% ~ 20.5%, 细胞数量平均增加 25 倍(2.2 ~ 525 倍)^[9]。有研究显示 CIK 细胞在含 IL-2、IL-7 的培养体系中的扩增能力明显高于含 IL-12 的培养体系, 但含上述 3 种细胞因子的不同体系所扩增 CIK 细胞的细胞毒作用无显著性差异, 并且含 IL-12 培养体系的细胞凋亡的比例明显高于 IL-2 或 IL-7 的培养体系^[10]。由于 IL-15 对 T、NK 细胞均有促进增殖的作用, 故我们以 IL-15 替代 IL-12, 探讨其分别与 IL-2, IL-7 组合对脐血 CIK 细胞扩增效果的影响。本实验结果显示 IL-15 联合 IL-2、IL-7 对人脐血 CD3 + CD56 + CIK 细胞均有显著的扩增效果, 以 IL-2 + IL-7 + IL-15 3 者联合应用效果最佳, 诱导扩增后 CIK 细胞比例为 (24.03 \pm 4.99)%, 达到国外文献报道^[8]使用 4 或 5 种细胞因子进行 CIK 细胞扩增的类似效果。我们的体系同时对 CD3-CD56 + NK 细胞亦有一定的扩增作用, 其中 IL-2 + IL-15 和 IL-2 + IL-7 + IL-15 组合对脐血 CIK、NK 细胞的扩增后总比例超过 50%, 优于 Lu 等^[8]的培养体系。目前认为血液系统肿瘤复发与机体 CIK、NK 细胞数量减少, 其免疫监视的作用减弱有关。而我们的初步研究显示通过 3 种细胞因子(IL-2、IL-7 及 IL-15) 对人脐血中的 CIK、NK 细胞等进行扩增, 可使两者的细胞总比例超过 50%, 较扩增前显著增加。对 CBT 后通过上述细胞因子组合扩增 GVL 和抗感染

的免疫效应细胞行免疫治疗, 以达到减少 CBT 后白血病复发和移植早期感染等并发症奠定了一定的实验基础, 具有广阔的临床应用前景。

参考文献:

- [1] Martino R, Badell I, Brunet S, *et al.* Second bone marrow transplantation for leukemia in untreated relapse [J]. *Bone Marrow Transplant*, 1994, 14(4): 589.
- [2] 陈纯, 段连宁, 黄绍良, 等. 人脐血 T/NK 细胞 KIR 分子表达的初步探讨 [J]. *中山医科大学学报*, 2002, 23(1): 69.
- [3] Lee P T, Benlagha K, Teyton L, *et al.* Distinct functional lineages of human V(α) 24 natural killer T cells [J]. *J Exp Med*, 2002, 195(5): 637.
- [4] Rocha V, Cornish J, Sievers EL, *et al.* Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia [J]. *Blood*, 2001, 97(10): 2962.
- [5] Stremmel C, Exley M, Balk S, *et al.* Characterization of the phenotype and function of CD8(+), α / β (+) NKT cells from tumor-bearing mice that show a natural killer cell activity and lyse multiple tumor targets [J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31(9): 2818.
- [6] Van der V H, Nishi N, Koezuka Y, *et al.* Potent expansion of human natural killer T cells using α -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.
- [7] Jean D, Sara L, Cliona O F, *et al.* Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15 [J]. *J Immunol*, 2001, 167(6): 3129.
- [8] Lu P H, Negrin R S. A novel population of expanded human CD3 + CD56 + cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency [J]. *J Immunol*, 1994, 153(4): 1687.
- [9] Wang F S, Liu M X, Zhang B, *et al.* Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(3): 464.
- [10] Zoll B, Lefterova P, Csipai M, *et al.* Generation of cytokine-induced killer cells using exogenous interleukin-2, -7 or -12 [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1998, 47(4): 221.

(编辑 张恩健)