

# 原发性肝癌肿瘤浸润性淋巴细胞的特性<sup>①</sup>

邓美海<sup>1,②</sup> 区庆嘉<sup>2</sup>

(中山医科大学 1 附属第三医院外科,广州,510630 2 孙逸仙纪念医院肝胆外科)

**提 要** 10例原发性肝癌手术切除的肿瘤标本用于分离培养肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。分离制备 TIL 采用机械剪切,酶消化和用 Ficoll-Hypaque 分离结合的方法。分离制得的 TIL 以一定浓度于含 rIL-2 1 000U/ml, PHA20 $\mu$ g/ml 的 RPMI 1640 完全培养液中,在 5%CO<sub>2</sub>, 37℃条件下培养 30~40d。实验观察了 TIL 悬液中的细胞组成、TIL 的体外扩增及肿瘤细胞的消失情况;用透射电镜观察了培养前后 TIL 的超微结构变化;实验采用免疫组化和单克隆抗体技术(ABC 法)检测了培养前后 TIL 的主要淋巴细胞亚群变化;还采用<sup>3</sup>H-TdR 释放法测定了 TIL 的体外抗肿瘤活性。实验结果表明,原发性肝癌(HCC)的 TIL 在体外培养可以得到较好扩增并显示其在体外对新鲜自体瘤靶细胞的抗肿瘤活性。

**主题词** 肝细胞瘤;淋巴细胞,肿瘤浸润;白细胞介素-2;淋巴细胞亚群;细胞毒性;免疫

**中图分类号** R730.3;735.7

肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TIL)是癌肿宿主反应的标志<sup>[1]</sup>,研究发现肿瘤内淋巴细胞浸润的程度与患者的预后有关。近年来的研究认为 TIL 具有抗肿瘤作用强并有一定的靶细胞特异性等优点,可能是一种比淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine-activated killer cells, LAK 细胞)更适合于肿瘤过继免疫治疗(adoptive immunotherapy, AIT)的抗肿瘤效应细胞,被誉为是继 LAK 细胞之后的第二代抗肿瘤效应细胞。原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,目前临床常规治疗方法的总体疗效仍不满意,尤其是对中晚期肝癌的疗效更不理想。本实验针对国内外报道均较少的原发性肝癌 TIL 的主要免疫学特性进行研究,为 TIL 过继免疫治疗原发性肝癌的临床应用打下基础。

## 1.1 癌组织标本

选择 10 例原发性肝癌手术切除标本,用于分离培养 TIL。标本都经病理检查确诊,其中 9 例为肝细胞癌,1 例为肝细胞癌和胆管细胞癌混合型。所选病例要求在接受手术前 1 个月内未作化疗、放疗等特殊治疗。

## 1.2 TIL 的分离培养

按文献介绍的方法制备 TIL<sup>[2,3]</sup>。用 1% 的台盼蓝拒染试验法检测活着的细胞比例。取部分分离制备的细胞用于培养,培养液为含 1 000U/ml rIL-2(第一军医大学免疫室提供)、20 $\mu$ g/ml PHA(广州医工所产品)、2mmol/ml L-谷氨酰胺、青霉素和链霉素各 100U/ml、0.25 $\mu$ g/ml 二性霉素 B(SQUIBB 产品)和 10%灭活人 AB 型血清的 RPMI 1640 完全培养液,细胞浓度为(0.2~1) $\times$

## 1 材料和方 法

① 本课题由学校 93 年度科学基金资助;

② 第一作者,1964 年出生,男,硕士

$10^6/\text{ml}$ , 置入 24 孔细胞培养板(Corning 产品, 每孔加入含有细胞的培养液总量为 1ml) 及玻璃培养瓶(国产, 每瓶加入培养液总容量为瓶容量的 1/3) 中, 培养条件为  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 。培养细胞每 3~6d 传代或更换新培养液 1 次, 并重新调整细胞浓度在  $(0.2\sim 2)\times 10^6/\text{ml}$  范围。10 例 TIL 体外培养 30~40d。

### 1.3 TIL 的冻存和复苏

取部分制备的 TIL 悬液, 离心去上清, 加入含 10% DMSO (MERCK 产品)、50% 人 AB 型血清的 RPMI 1640 培养液中, 调整细胞浓度为  $(0.5\sim 1)\times 10^7/\text{ml}$ , 序贯降温, 保存于液氮中。复苏时, 迅速将冻存管于  $37^\circ\text{C}$  水浴中复温, 20% 人 AB 型血清的 RPMI 1640 培养液洗涤, 1% 台盼蓝拒染法计数细胞存活率。复苏的 TIL 悬液用于作为新鲜的自体瘤靶细胞和 TIL 再培养的来源。

### 1.4 TIL 的形态学观察

用 Wright-Giemsa 双重细胞涂片染色法和少部分细胞涂片加作 HE 染色法, 观察 TIL 悬液中各种细胞的形态学变化; 用透射电镜观察新鲜制备及培养后 30d 的 TIL 在超微结构上的变化。

### 1.5 体外培养的 TIL 扩增情况

每 5 d 计数细胞浓度 1 次, 根据细胞浓度变化及每次稀释换液情况计算出 TIL 的扩增倍数, 描计 TIL 增长曲线。通过涂片染色观察得出的细胞比例, 了解 TIL 悬液中各组成部分随培养时间的变化情况。

### 1.6 TIL 的淋巴细胞亚群检测

采用卵白素-生物数-过氧化酶复合物法(ABC 法)<sup>[4]</sup>测定 TIL 培养前及培养后 30d 时的淋巴细胞亚群情况(ABC 试剂盒为美国 Vector 公司产品), 所选单克隆抗体及其特异性等情况见表 1。结果观察, 在高倍镜或油镜下计数 5 个或 5 个以上视野中的淋巴细胞, 其中细胞膜上有黄棕色着色的为阳性细胞, 蓝色者为阴性细胞, 计算出阳性细胞百分率。

表 1 单克隆抗体特性情况

单抗	稀释度	特异性	动物来源
CD <sub>2</sub>	1:200	全 T	鼠抗人
CD <sub>4</sub>	1:20	辅助/诱导 T	同上
CD <sub>8</sub>	1:80	杀伤/抑制 T	同上
HLA-DR	1:80	H 抗原 I 类抗原	同上
Pan-B	1:80	B 淋巴细胞	同上

### 1.7 TIL 体外抗肿瘤活性的检测

采用  $^3\text{H-TdR}$  释放法<sup>[5]</sup>测定了 TIL 的细胞毒性作用  $^3\text{H-TdR}$  中科院上海原子核研究所产品, 比率为  $40.5\text{Ci}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 批号 91-01-22)。靶细胞选用新鲜的自体瘤细胞(即新鲜制备的 TIL 冻存后复苏的细胞)、K562 细胞株(为人红白血病瘤细胞株, 是 NK 敏感性靶细胞)和 Raji 细胞株(为人 Burkitt 淋巴瘤细胞株, 是 NK 非敏感性靶细胞)。

### 1.8 统计学处理

计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。培养前后的比较用配对资料的  $t$  检验, 两样本均数的比较用  $t$  或  $t'$  检验。

## 2 结 果

### 2.1 TIL 的分离

用于分离制备 TIL 的 10 例癌组织湿重为  $14.92\pm 7.30\text{g}$ 。新鲜制备的 TIL 悬液中, 淋巴细胞占  $40.19\pm 17.16\%$ , 肿瘤细胞占  $21.45\pm 9.68\%$ , 其他细胞占  $38.26\pm 16.35\%$ 。1% 台盼蓝拒染法计数新鲜制备的 TIL 悬液的活细胞率均在 90% 以上。每克湿重癌组织能分离得到活的淋巴细胞和肿瘤细胞数量分别为  $12.68\pm 8.41\times 10^6$  和  $10.21\pm 12.27\times 10^6$ 。

### 2.2 TIL 的扩增时间动力学

体外培养 30d 时, TIL 扩增倍数从 24。

87~16 951.14 倍,中位数是 232.16 倍,10 例中有 7 例扩增在 100 倍以上。图 1 表示 TIL 扩增随时间变化情况,显示在培养的第 20 天(d20)TIL 扩增能力达到一个高峰。

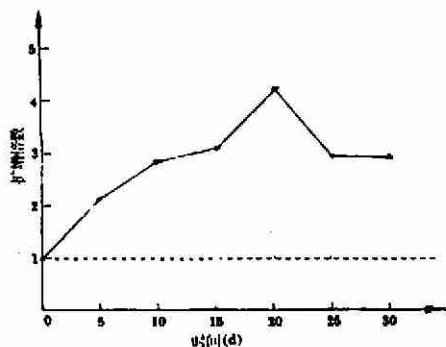


图 1 TIL 体外培养扩增时间动力学曲线  
 $n=10$

### 2.3 TIL 悬液中各细胞比例的变化

见图 2,显示体外培养中随时间不断增长的主要是淋巴细胞,而肿瘤细胞则逐渐消失,其消失时间从 10~25d,  $\bar{x} \pm s$  是  $19 \pm 5.16$ d。图 3 所示为培养 d30 时 TIL 悬液细胞涂片染色情况,片中见大片淋巴细胞,无肿瘤细胞成份。

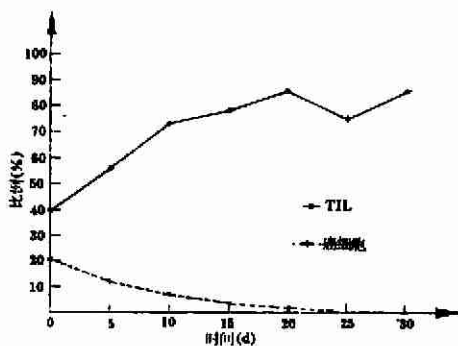


图 2 TIL 悬液各细胞比例随培养时间变化  
 $n=10$

### 2.4 TIL 的冻存复苏

本实验冻存后复苏的 TIL 用台盼蓝拒染法计数,细胞的存活率均在 90% 以上,其  $\bar{x} \pm s$  为  $94.7 \pm 2.3\%$ 。实验还观察到冻存后复苏的 TIL 体外继续培养,活体下所见其生长良好。

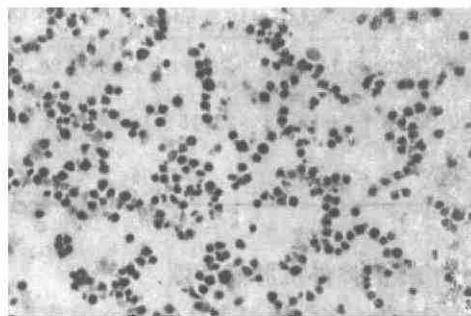


图 3 培养 d30TIL 悬液细胞涂片  
Wright-Giemsa 双重染色 ( $\times 400$ )

### 2.5 TIL 培养前后的超微结构变化

在透射电镜下观察,培养前的 TIL 多是体积较小的淋巴细胞,细胞膜微绒毛少,胞浆少,核/浆比例大,核异染色质较多;培养后 30d 时的 TIL 大多是体积较大的淋巴细胞,细胞表面有较多的微绒毛,胞浆丰富,胞浆内有较多的空泡和其他细胞器,核仁也较明显,如图 4 所示。

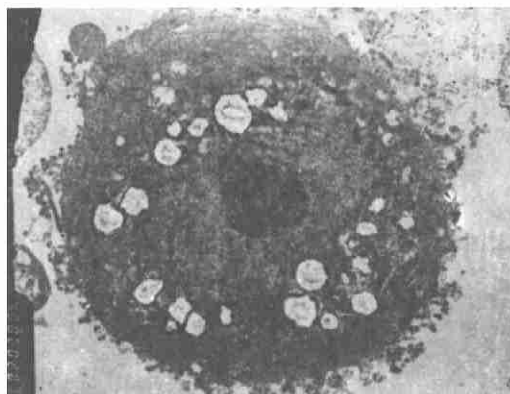


图 4 培养 30d 时 TIL 的超微结构图  
放大  $4\ 000 \times 1.4$

### 2.6 培养前后 TIL 的淋巴细胞亚群改变

表 2 中比较了培养前和培养后 d30 时 TIL 各淋巴细胞亚群表达情况。结果显示,  $CD_2^+$  细胞,  $CD_4^+$  细胞和  $HLA-DR^+$  细胞表达明显增加, B 细胞表达明显减少,  $CD_4^+/CD_8^+$  比值明显缩小,  $CD_4^+$  细胞表达培养前后无统计学上显著性差异。

表2 10例TIL培养前,后淋巴细胞亚群变化

天数	CD <sub>2</sub> <sup>+</sup> (%)	CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> (%)	Pan-B(%)	HLA-DR <sup>+</sup> (%)	CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> /CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>
0	60.14±16.32	29.42±9.16	26.84±9.54	8.82±7.21	29.65±19.63	1.17±0.43
30	78.53±12.44	23.15±10.00	59.07±11.65	2.76±1.89	68.53±7.30	0.40±0.18
P值	<0.05	>0.05	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01

2.7 TIL的体外抗肿瘤活性

TIL体外杀伤新鲜自体瘤细胞的作用被5~10d一次地检测。图5显示TIL体外杀伤自体瘤细胞的作用逐渐增强,d20达到高峰。表3中比较了培养d5和d30时TIL杀伤新鲜自体瘤,K562和Raji细胞株靶细胞的活性。显示在d30时TIL抗自体瘤活性较d5时明显升高,而杀伤K562,Raji瘤株的作用无显著性差异。实验表明IL-2体外不断激活的主要是TIL对自体瘤细胞的杀伤作用。

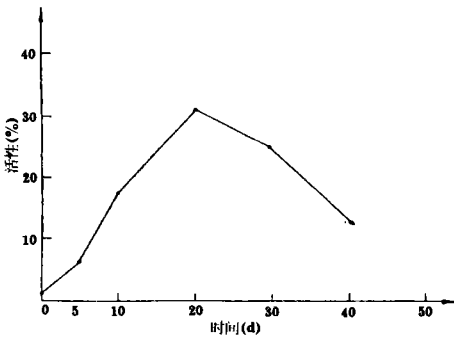


图5 TIL杀伤自体瘤细胞毒性作用随时间变化

n=10,采用<sup>3</sup>H-TdR释放法,E/T为50/1

表3 TIL培养d5及d30抗肿瘤活性比较<sup>1)</sup>

效应细胞	靶细胞		
	自体瘤细胞	K562	Raji
TIL (d5)	6.09 ±6.97	9.10 ±13.41	13.05±16.56
TIL (d30)	25.07±10.52 <sup>2)</sup>	11.98±9.08	22.31±16.52

1)d5,代表第5天,d30代表第30天  
2)指TIL<sub>30</sub>抗自体瘤活性较TIL<sub>5</sub>强,P<0.01

3 讨论

TIL的分离大多取自实体瘤切除或活检的标本,少数取自恶性胸腹水和肿瘤引流的淋巴结。分离提取的方法很多,而目前较多实验室采用的方法<sup>[2,3,6]</sup>是肿瘤标本经机械剪切后,用酶消化成单细胞悬液,再用机械分离获取含TIL的细胞悬液,经体外培养,在IL-2的作用下得到较为纯化的TIL。本实验采用了与此相类似的方法,实验显示原发性肝癌TIL在高浓度IL-2和PHA条件下可获得较好扩增。

有人<sup>[7]</sup>用免疫组化和单克隆抗体技术研究发现TIL主要局限于肿瘤间质中,肿瘤实质中极少。T淋巴细胞是浸润的主要成份,TIL中只有少数的T细胞表达IL-2R<sup>+</sup>和HLA-DR<sup>+</sup>,表明原位或新鲜制备的TIL处于非活化状态。TIL经IL-2培养后,其细胞表型各实验结果报道不一。本实验结果显示经IL-2培养后d30,TIL中T细胞占绝大部分,其中CD<sub>4</sub><sup>+</sup>细胞和HLA-DR<sup>+</sup>细胞表达较培养前明显增加,结合体外抗自体瘤活性不断增强的改变,实验结果表明TIL在IL-2的作用下已处于活化状态。

有实验报道<sup>[8]</sup>,TIL在不含IL-2的培养基中短期培养,肿瘤细胞生长旺盛,而淋巴细胞却逐渐消失,说明TIL的生长依赖于IL-2。许多实验也发现<sup>[9]</sup>,原位和新鲜制备的TIL功能受到抑制,但其在体外经IL-2作用可逆转这一抑制,表现在TIL对PHA等丝裂原刺激的增殖反应和分泌细胞因子的能力

增强,及其对自体瘤或同种异体瘤细胞的杀伤活性明显增强等方面。较多的实验证明能从实体瘤中分离培养得到具有高特异性杀伤自体瘤细胞的 TIL 培养物,表明 TIL 有一定的靶细胞特异性。本实验结果也显示,IL-2 不断激活的主要是 TIL 杀伤自体瘤细胞的活性。

本实验结果表明,原发性肝癌的 TIL 在体外培养可以获得较好增长,其培养物中不断增长的主要是淋巴细胞,而肿瘤细胞逐渐消失。培养前后 TIL 在超微结构上也发生了明显变化。结合培养后 TIL 中 CD<sub>3</sub><sup>+</sup> 及 HLA-DR<sup>+</sup> 细胞明显高于培养前,以及抗自体瘤活性的增强,本实验提示 TIL 过继免疫治疗原发性肝癌可能是一种有用的治疗手段。有关原发性肝癌 TIL 过继免疫治疗的临床应用疗效尚有待进一步验证。

#### 参 考 文 献

- 1 Vose BM, Moore M. Human tumorinfiltrating lymphocytes; a maker of host response. *Semin Hemintol*, 1985,22(1): 27
- 2 Topalian SL, Solomon D, Avis FP, et al. Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2; a pilot study. *J Clin On-*

- col, 1988, 6(5): 839
- 3 Topalian SL, Muul LM, Solomon D, et al. Expansion of human tumor-infiltrating lymphocytes for use immunotherapy trials. *J Immunol Methods*, 1987, 102(2): 127
- 4 刘彦仿. 免疫组织化学. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 94
- 5 吴厚生. 用<sup>3</sup>H-TdR 释放法测量细胞介导的细胞毒功能. *上海免疫学杂志*, 1987, 7: 230
- 6 Whiteside TL, Miescher S, Macdonald HR, et al. Separation of tumor-infiltrating lymphocytes from tumor cells in human solid tumors. *J Immunol Methods*, 1986, 90(2): 221
- 7 Whiteside TL, Miescher S, Hurliman J, et al. Clonal analysis and in situ characterization of lymphocytes infiltrating human breast carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 1986, 23(3): 169
- 8 曹雪涛,叶天星,杨嗣坤. 肿瘤浸润性淋巴细胞的分离、培养及其表形分析. *上海免疫学杂志*, 1989, 9(5): 262
- 9 Miescher S, Whiteside TL, Carrel S, et al. Functional properties of tumorinfiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors; effects of tumor cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes. *J Immunol*, 1986, 136(5): 1899

(1993-12-24 收稿 1995-03-09 修回)

# CHARACTERIZATION OF TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES FROM HUMAN PRIMARY LIVER CANCER

Deng Meihai      Ou Qingjia

(Department of Surgery, 3rd Affiliated Hospital,  
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) were obtained from surgically excised specimens taken from ten patients with liver cancer including nine hepatocellular carcinoma and one cholangiohepatocellular carcinoma. Liver tumor tissue underwent mechanical dispersion and enzymatic digestion, and then cells were separated by the Ficoll-Hypaque gradient method. The isolated TIL were cultured in RPMI 1640 supplemented with rIL-2 (1 000 U<sub>g</sub>/ml) and PHA (20 $\mu$ g/ml) at 37 $^{\circ}$ C humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 30 to 40 days. Changes of the composition, expansion folds and the ultrastructure of TIL were investigated respectively, lymphocytes subsets of TIL were also determined by mean of monoclonal antibodies and immunohistological methods (ABC methods). A 18-hour <sup>3</sup>H-TdR release assay was used to measure the lytic activity of TIL killing activity against target cells in vitro. It was shown that TIL isolated from primary hepatocellular carcinoma could be generally expanded in the culture with rIL-2 and PHA and exhibited cytotoxic activity against fresh autologous tumor cell targets in vitro. These results suggested that adoptive immunotherapy of IL-2/TIL might be a useful adjunctive treatment for primary hepatocellular carcinoma.

**Subject headings** hepatoma; lymphocytes, tumor-infiltrating; interleukin-2; lymphocyte subsets; cytotoxicity, immunologic