

· 基础研究 ·

3 种不同来源 CIK 对食管癌细胞杀伤作用的比较*

姚文健¹, 白玉², 赵宝生^{1△}

(1. 新乡医学院第一附属医院胸外科, 河南卫辉 453100; 2. 新乡医学院病理学教研室, 河南新乡 453003)

摘要:目的 探讨 3 种不同来源细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)对食管癌细胞杀伤作用的差异。方法 采用密度梯度离心法从健康人和食管癌患者外周血、脐血中分离获得单个核细胞,以细胞因子为诱导剂制备 CIK;采用直接细胞计数法比较 CIK 的增殖速度;流式细胞仪检测 CIK 的细胞表型;MTT 法比较三者对食管癌细胞的杀伤作用。结果 3 种不同来源单个核细胞的 CD3⁺CD56⁺表型细胞所占百分比比较,差异无统计学意义($P>0.05$),经 14 d 诱导后,其 CIK 的 CD3⁺CD56⁺表型细胞所占百分比较诱导前有显著提高($P<0.05$);脐血来源的 CIK 增殖速度明显高于健康人和食管癌患者外周血来源 CIK($P<0.05$);脐血 CIK 的食管癌细胞杀伤活性最强。结论 脐血来源的 CIK 体外增殖快,对食管癌细胞的杀伤活性强。

关键词: 杀伤细胞;食管肿瘤;免疫疗法;过继

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.014

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)01-0043-03

Comparison of killing effects of CIK from three different sources on esophageal cancer cells*

Yao Wenjian¹, Bai Yu², Zhao Baosheng^{1△}

(1. Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan 453100, China; 2. Department of Pharmacology, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To explore differences of killing effects of cytokine-induced killer(CIK) from three different sources on esophageal cancer cells. **Methods** Density gradient centrifugation was employed to separate mononuclear cells from peripheral blood of healthy people and patients with esophageal cancer and cord blood. Cytokine served as inducer to prepare CIK. Direct cell counting was adopted to compare proliferation speed of CIK with different sources. Flow cytometry was used to detect the cell phenotype of CIK. MTT was employed to compare the killing effect of these three cells. **Results** Compared the percentage of mononuclear cells with CD3⁺CD56⁺ phenotype from three different sources, their difference showed no statistical significance($P>0.05$). After 14 days induction, percentages of CIK with CD3⁺CD56⁺ phenotype increased significantly($P<0.05$). Proliferation speed of CIK from cord blood was higher than those from peripheral blood of healthy people and patients with esophageal cancer. CIK derived from cord blood showed the strongest esophageal cancer cell-killing effect. **Conclusion** CIK derived from cord blood possess high speed of proliferation in vitro and strong killing effect toward esophageal cancer cells.

Key words: killer cells; esophageal neoplasms; immunotherapy; adoptive

中国是食管癌高发国家,同时也是食管癌病死率最高的国家。食管癌一般发病隐匿,大多数病例确诊时已是晚期。虽然近年来对恶性肿瘤的诊断和治疗已有不少进展,但食管癌患者的预后仍不容乐观,其 5 年生存率不足 10%^[1]。一直以来,国内多采用食管癌术后辅助放、化疗的治疗方法,但这会引起消化道反应、抑制骨髓造血、降低患者免疫力等诸多不良反应。现在许多学者开始积极探索生物治疗、基因靶向治疗等新途径。肿瘤的过继性免疫治疗是肿瘤治疗的一个全新领域^[2],细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)是近年来发现的一种新型抗肿瘤细胞,其主要效应细胞表面既有 T 细胞的表面标志 CD3,也有自然杀伤细胞的表面标志 CD56,因而兼有 T 细胞的抗肿瘤活性和自然杀伤细胞的非主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)限制性杀伤肿瘤细胞的特点^[3]。CIK 具有体外增殖数量大、对肿瘤杀伤活性强、抗肿瘤谱广、不良反应小等特点,逐渐受到人们的关注^[4]。CIK 可由外周

血及脐血的单个核细胞诱导培养而成,但目前对不同来源 CIK 的比较研究较少。本实验观察来源于健康人和食管癌患者的外周血、脐血的 CIK 体外增殖能力及其对食管癌细胞的杀伤活性,旨在为食管癌的治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、RPMI-1640 培养液购自美国 Gibco 公司,基因重组人白介素-2(recombinant human interleukin-2, rhIL-2)购自上海华新生物高技术有限公司,基因重组人干扰素-γ(recombinant human interferon-γ, rhIFN-γ)、CD3 单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)购自美国 Cytolab 公司,CD3⁺CD56⁺双标记荧光抗体及阴性对照试剂购自美国 BD 公司,淋巴细胞分离液购自上海化学试剂总厂试剂二厂;仪器包括:芬兰热电雷勃全自动酶标仪、流式细胞仪及分析软件(美国 BD 公司)等。

1.2 血样来源 脐血为新乡医学院第一附属医院妇产科提供,

系健康产妇正常分娩胎儿的脐带血;健康人外周血采自该院健康志愿者;食管癌患者的外周血采自该院食管癌患者。分别将上述 3 种来源的血样作为脐血组($n=20$)、健康组($n=20$)及食管癌组($n=20$)。

1.3 方法

1.3.1 食管癌细胞的原代培养 肿瘤标本取自食管癌患者手术切除的肿瘤组织,经快速病理学检查确诊,均为分化低、恶性程度高的鳞癌,经分离与原代培养,从第 5 代开始冻存部分细胞。

1.3.2 CIK 的制备 参照美国斯坦福大学 CIK 培养方法^[5]。外周血经血细胞分离机采集,经 Ficoll 液密度梯度离心,分离单个核细胞,用无血清培养液混悬,调整混悬液的细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 。CIK 的诱导:第 0 天向培养袋中加入 rhIFN- γ (2000 U/mL),置 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 孵箱中孵育;1 d 后向培养袋中加入 rhIL-2(1 000 U/mL)、CD3McAb(50 ng/mL),置 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 孵箱中孵育;然后每 2~3 d 更换培养液并补加细胞因子 rhIL-2(1 000 U/mL)和 CD3McAb(50 ng/mL)以维持其浓度。

1.3.3 细胞表型的测定 分别收集健康人和食管癌患者外周血、脐血的单个核细胞以及培养 14 d 的 CIK,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)调整细胞密度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$,分别加入 $\text{CD}3^+ \text{CD}56^+$ 双标记荧光抗体、阴性对照试剂,用流式细胞仪检测细胞表型。

1.3.4 CIK 的增殖能力测定 采用台盼蓝拒染法,用细胞计数板分别于培养的第 0、7、10、14、21 天计数健康人和食管癌患者外周血、脐血的 CIK 数量,每份样本重复计数 3 次,取平均值。

1.3.5 MTT 检测 效应细胞为健康人和食管癌患者外周血、脐血诱导及培养了 14 d 的 CIK,将效应细胞密度调至 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 和 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 备用;培养的食管癌细胞为靶细胞,分别将靶细胞密度调至 1×10^5 个/mL。效-靶比为效应细胞密度与靶细胞密度之比,按效-靶比将细胞分为 20:1 和 10:1 两组。将细胞接种于 96 孔板,并将其分为 3 组,每组 6 个复孔:(1)靶细胞组:加入 $50 \mu\text{L}$ 培养液和 $50 \mu\text{L}$ 靶细胞液;(2)效应细胞组:加入 $50 \mu\text{L}$ 培养液和 $50 \mu\text{L}$ 效应细胞液;(3)实验组:加入 $50 \mu\text{L}$ 靶细胞液和 $50 \mu\text{L}$ 效应细胞液。 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 孵育 24 h 后,每孔加入 $10 \mu\text{L}$ MTT 溶液(5 mg/mL),置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 环境孵育 4 h 后终止培养,每孔加入 0.4% 的酸化异丙醇 $100 \mu\text{L}$,振荡 5 min,静置 5 min。在酶标仪上检测各组细胞在 630 nm 处的吸光度(absorbance, A)值。杀伤活性 = $[(\text{靶细胞 A 值} + \text{效应细胞 A 值} - \text{实验组 A 值}) / \text{靶细胞 A 值}] \times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CIK 的表型分析 分别比较 3 种不同来源单个核细胞的细胞表型以及培养 14 d 后 CIK 的细胞表型,结果显示:3 种不同来源单个核细胞的 $\text{CD}3^+ \text{CD}56^+$ 表型细胞所占百分比比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),经 14 d 诱导后,其 CIK 的 $\text{CD}3^+ \text{CD}56^+$ 表型细胞所占百分比比较诱导前有显著提高($P < 0.05$),见表 1。

2.2 CIK 的增殖情况 3 种来源的 CIK 大量增殖,达到增殖前的 80~150 倍。光镜下观察刚分离的单个核细胞,大小均匀,细胞形态无明显异型。加入细胞因子培养,前 3 d 细胞体积无明显

变化。培养第 4 天,部分细胞明显增生,可见团状增生细胞集落,并出现细胞体积增大、细胞核大、细胞质少的多形性细胞。在 7~10 d 快速增殖期,细胞集落增多,可见分裂相,细胞呈明显的不规则形。第 14 天时,细胞增殖形成巨大的增生集落,异型性明显。图 1 提示培养前 4 d 细胞数变化尚不明显,而其脐血来源的 CIK 增殖速度明显高于健康人和食管癌患者外周血来源的 CIK,在第 14 天达到高峰,然后维持在较高水平,食管癌患者的 CIK 增殖缓慢,健康组的 CIK 增殖介于食管癌组与脐血组之间。

表 1 3 种不同来源的单个核细胞和 CIK 的 $\text{CD}3^+ \text{CD}56^+$ 表型细胞所占百分比($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	单个核细胞	CIK
食管癌组	20	1.89 ± 0.33	17.46 ± 1.51
健康组	20	2.02 ± 0.24	26.65 ± 1.72
脐血组	20	2.11 ± 0.16	34.35 ± 2.01

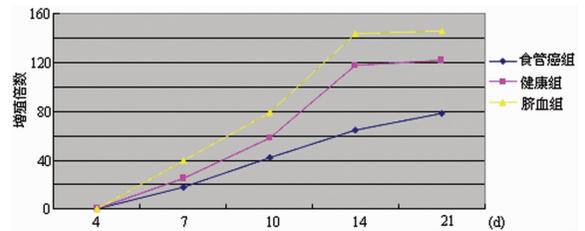


图 1 3 种来源 CIK 的增殖情况

2.3 CIK 对食管癌细胞的杀伤活性 在第 14 天,3 种来源的 CIK 对食管癌细胞均表现出一定的杀伤活性。同种来源,效-靶比为 20:1 的 CIK 对癌细胞的杀伤活性明显高于 10:1 的。由此可见,随着效-靶比的增高,CIK 的杀伤活性逐渐增强($P < 0.05$);其中,健康组 CIK 的杀伤活性高于食管癌组($P < 0.05$);脐血 CIK 的杀伤活性最强,与其他两种来源比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 种来源的 CIK 不同效-靶比对食管癌细胞的杀伤活性

组别	<i>n</i>	效-靶比(%)	
		10:1	20:1
食管癌组	20	43.12 ± 4.01	58.21 ± 4.54
健康组	20	$57.34 \pm 5.11^*$	$66.01 \pm 6.12^*$
脐血组	20	$69.11 \pm 5.01^* \Delta$	$80.39 \pm 6.54^* \Delta$

*: $P < 0.05$, 与食管癌组比较, Δ : $P < 0.05$, 与健康组比较。

3 讨论

用免疫活性细胞输注的过继免疫疗法是肿瘤生物治疗的研究热点之一,此疗法不仅是常规抗肿瘤治疗的补充,更为晚期不宜手术或无法承受放疗、化疗不良反应的患者开辟了新的治疗途径^[6]。CIK 为细胞因子诱导的杀伤细胞,被认为是新一代抗肿瘤过继细胞免疫治疗的优选细胞。CIK 的疗效在一些基础实验和临床运用中得到肯定,CIK 对肝癌^[7]、乳腺癌^[8]、白血病^[9]等多种肿瘤细胞都有显著抑制作用。Jiang 等^[10]用 CIK 治疗晚期胃癌患者,发现患者血清中的肿瘤标志物下降,患者的免疫功能、生活质量得到提高。徐永茂等^[11]应用化疗联合 CIK 治疗晚

期非小细胞肺癌,发现该疗法可明显延长肺癌患者的生存期。

CIK 的疗效取决于是否获得足够数量且具有高效杀伤活性的免疫效应细胞。CD3⁺CD56⁺ 细胞是 CIK 群体中主要的效应细胞^[12]。本实验中 3 种来源的单个核细胞均可增殖为 CIK,且都对食管癌细胞具有一定杀伤效应。其中,脐血来源的 CIK 增殖速度、杀伤活性及主要效应细胞 CD3⁺CD56⁺ 百分比均显著高于其他两种外周血来源的 CIK,这与王家祥等^[13]的研究结果一致。食管癌患者外周血来源的 CIK 增殖效率低,杀伤活性弱,CD3⁺CD56⁺ 百分比低。健康人外周血来源的 CIK 作用介于二者之间。临床上肿瘤患者常伴有恶病质、贫血等症状,存在免疫功能缺陷,不能引发有效抗肿瘤免疫反应,且反复多次输注自体外周血,容易提高感染概率,显著影响患者的疗效及预后^[14]。而脐血来源方便,免疫源性弱,对授、供者移植抗原相符的要求比较低,不易受病毒及残留肿瘤细胞的污染^[15]。因此,脐血来源的 CIK 是食管癌过继细胞免疫治疗的首选。

当然本研究结果仅基于体外实验,为准确评价 CIK 及其临床应用还需提供更多的实验依据。

参考文献:

- [1] 蒋光耀. 食管癌外科的治疗进展[J]. 重庆医学, 2004, 33(2):161-162.
- [2] 曹世龙. 肿瘤学新理论与新技术[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 1997.
- [3] 张志凯, 祁岩超. 健康人和肿瘤患者 CIK 细胞的生物学特性[J]. 中国热带医学, 2009, 9(2): 253-255.
- [4] Thorne SH, Negrin RS, Contag CH. Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy[J]. Science, 2006, 311(5768):1780-1784.
- [5] Lu PH, Negrin RS. 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):1687-1696.

- [6] 聂鑫, 刘侃峰, 滕少侠. CIK 治疗恶性肿瘤的研究进展及临床应用现状[J]. 中国实用医药, 2007, 2(7): 106-107.
- [7] Weng DS, Zhou J, Zhou QM, et al. Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas[J]. J Immunother, 2008, 31(1): 63-71.
- [8] 李香丹, 孙抒, 杨万山, 等. CIK 细胞对乳腺癌细胞株抗增殖及诱导凋亡的作用[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(12): 872-874.
- [9] 文钦, 张曦, 陈幸华, 等. 父供女 HLA 半相合造血干细胞移植后供者 DC-CIK 细胞输注治疗儿童难治复发性急性髓细胞白血病 1 例并文献复习[J]. 重庆医学, 2010, 39(14): 1852-1853.
- [10] Jiang J, Xu N, Wu C, et al. Treatment of advanced gastric cancer by chemotherapy combined with autologous cytokine-induced killer cells[J]. Anticancer Res, 2006, 26(3B): 2237-2242.
- [11] 徐永茂, 徐冬云, 张南征, 等. 化疗联合过继免疫细胞治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. 实用癌症杂志, 2010, 25(2):163-166.
- [12] 牟青杰, 王洁, 崔为发, 等. 三种来源 CIK 细胞体外增殖及杀伤活性比较[J]. 山东医药, 2010, 50(11): 7-9.
- [13] 王家祥, 郑树, 刘秋亮. 不同来源 CIK 细胞的体外扩增和杀伤活性的比较[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(7): 616-618.
- [14] 邓笑伟, 徐铭宝, 高锦, 等. 不同来源 CIK 与 DC 细胞联合治疗中晚期肺癌的临床研究[J]. 科技导报, 2008, 26(11): 35-38.
- [15] 席作明, 赵青, 周长辉, 等. 脐血浆在 CIK 细胞培养中的应用[J]. 山东医药, 2011, 51(35): 94-96.

(收稿日期: 2012-07-09 修回日期: 2012-10-13)

(上接第 42 页)

- promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells[J]. Stem Cell Res, 2012, 9(1): 24-34.
- [7] Temple S. The development of neural stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 112-117.
 - [8] Mitome M, Low HP, van den Pol A, et al. Towards the reconstruction of central nervous system white matter using neural precursor cells[J]. Brain, 2001, 124(Pt 11): 2147-2161.
 - [9] Chang KA, Kim JA, Kim S, et al. Therapeutic potentials of neural stem cells treated with fluoxetine in Alzheimer's disease[J]. Neurochem Int, 2012, 61(6): 885-891.
 - [10] Yoon K, Gaiano N. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants

[J]. Nat Neurosci, 2005, 8(6): 709-715.

- [11] Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, et al. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells[J]. Genes Dev, 2002, 16(7): 846-858.
- [12] Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P. Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling[J]. Science, 1999, 286(5440): 741-746.
- [13] Kabos P, Kabosova A, Neuman T. Blocking HES1 expression initiates GABAergic differentiation and induces the expression of p21 (CIP1/WAF1) in human neural stem cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(11): 8763-8766.

(收稿日期: 2012-07-19 修回日期: 2012-09-25)