

论著·基础研究

树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞抗前列腺癌细胞的免疫效应

匡幼林,邓远忠,梁思敏,苟 欣[△]
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

摘要:目的 探讨树突状细胞(DC)与细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)共培养后抗前列腺癌细胞的免疫效应。方法 采集健康人外周血单个核细胞,用含重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和重组人白细胞介素-4(rhIL-4)的培养基培养诱导 DC 产生,用含干扰素- γ (IFN- γ)、CD3 单克隆抗体和重组人白细胞介素-2(rhIL-2)的培养基诱导细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)产生,然后将 DC 与 CIK 共培养,制备成 DC-CIK 细胞。实验分 DC 组、DC-CIK 组、DC-T 组和 CIK 组。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组细胞培养上清液中的 IFN- γ 和白细胞介素-12(IL-12)水平,流式细胞仪(FCM)检测 CD3、CD8 和 CD56 等细胞表型变化,细胞计数试剂盒 CCK-8 法检测 DC-CIK 对前列腺癌细胞的体外杀伤活性。结果 DC-CIK 组细胞培养上清液中 IL-12 和 IFN- γ 的含量分别为(105.14 $\pm$ 2.16)、(726.28 $\pm$ 21.35)pg/mL,明显高于其他 3 组($P<0.05$)。DC-CIK 组细胞表达 CD3⁺/CD8⁺ (60.9 $\pm$ 1.28)%、CD3⁺/CD56⁺ (27.8 $\pm$ 1.01)%也明显增加($P<0.05$),而 CD3 表达与 DC-T 组和 CIK 组差异无统计学意义。比较各组免疫细胞对前列腺癌细胞的杀伤活性,DC-CIK 组为(52.31 $\pm$ 2.14)%,相比 DC 组(11.14 $\pm$ 1.02)%、DC-T 组(14.19 $\pm$ 1.63)%和 CIK 组(34.43 $\pm$ 2.01)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 DC-CIK 在体外可诱导明显的抗前列腺癌免疫效应,为前列腺癌的免疫治疗奠定实验和理论基础。

关键词:前列腺肿瘤;免疫治疗;树突状细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.17.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)17-2167-03

Immune effects of DC-CIK cells against prostate cancer cells

Kuang Youlin, Deng Yuanzhong, Liang Siming, Gou Xin[△]

(Department of Urological Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the anti-prostate cancer immunological effect of dendritic cells(DC) and cytokine induced killers (CIK) cells after co-culture. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy human and used for generating DC with the treatment of recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor(rhGM-CSF) and recombinant human interleukin-4(rhIL-4) as well producing CIK with interferon- γ (IFN- γ), CD3 and rhIL-2 in vitro, and then the DC and CIK were cocultured together to produce DC-CIK. The experiment was performed with four groups composed of DC group, DC-CIK group, DC-T group and CIK group. ELISA was used to detect the concentration of IL-12 and IFN- γ in cultured supernatant, and the flow cytometry (FCM) was used to measure the cell phenotype, including CD3, CD8 and CD56. The lymphocytes cytotoxic activity against prostate cancer cell was analyzed by the CCK-8 way. **Results** The concentrations of IL-12 and IFN- γ in the cultural supernatant in the DC-CIK group were (105.14 $\pm$ 2.16) pg/mL and (726.28 $\pm$ 21.35) pg/mL respectively, which were significantly higher than those in other three groups ($P<0.05$). Meanwhile, the expression of CD3⁺/CD8⁺ and CD3⁺/CD56⁺ were up-regulated significantly[(60.9 $\pm$ 1.28)% and (27.8 $\pm$ 1.01)%, $P<0.05$]. However, there is no statistics difference among the DC-CIK, DC-T and CIK groups in the CD3 expression. The cytotoxicity against prostate cancer cells was (52.31 $\pm$ 2.14)% in the DC-CIK group, (11.14 $\pm$ 1.02)% in the DC group, (14.19 $\pm$ 1.63)% in the DC-T group and (34.43 $\pm$ 2.01)% in the CIK group, the differences among them had statistical significance ($P<0.05$). **Conclusion** DC-CIK can induce potent immunological effect against prostate cancer cells, which provides the experimental and theoretical basis for the immunotherapy of prostate cancer.

Key words: prostate neoplasms; immunotherapy; dendritic cell

前列腺癌是老年男性常见的恶性肿瘤之一,近年来,我国前列腺癌发病率呈上升趋势,前列腺根治性切除术和放疗是治疗早期前列腺癌的有效手段。但对于局部进展期或有远处转移的前列腺癌患者,目前却没有令人满意的治疗方法^[1]。众多研究表明肿瘤患者的免疫功能低下,肿瘤细胞可通过多种机制逃避机体的免疫系统识别^[2]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前发现的功能最强的抗原提呈细胞,可以诱导抗肿瘤细胞毒 T 淋巴细胞免疫反应。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced cells, CIK)是一种经多重细胞因子诱导的,增殖能力强、高效杀灭肿瘤细胞的免疫活性细胞。研究表明,DC 和 CIK 联合使用,能提高肿瘤患者的 T 淋巴细胞免疫能力,达到

抗肿瘤免疫的作用。同时,DC-CIK 对很多肿瘤细胞的杀伤活性较相同条件下单纯 CIK 细胞明显增强^[3]。本研究通过探讨 DC-CIK 体外作用于前列腺癌细胞的免疫效应,为前列腺癌免疫治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 重组人白细胞介素-2(rhIL-2)、重组人白细胞介素-4(rhIL-4)、干扰素- γ (IFN- γ)、重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)购自 PeproTech 公司,白细胞介素-12(IL-12)和 IFN- γ ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司;CD3 单克隆抗体、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocynate, FITC)标记的抗人 CD3 抗体、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标

记的 CD8 和 CD56 抗体均购自德国 BD Pharmingen 公司; CCK-8 购自日本同仁化学研究所; RPMI 1640 和胎牛血清培养液购自 Gibico 公司; 淋巴细胞分离液(Ficoll)购自中国医学科学院血液病研究所; 人前列腺癌细胞株 PC3 购自中国科学院。

1.2 DC 和 CIK 的体外诱导 采集健康志愿者的外周血 80 mL 左右, 用淋巴细胞分离液分离并收集单个核细胞(PBMC), 再用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬, 并调整细胞浓度为 $6 \times 10^6/\text{mL}$, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 2 h。收获未贴壁的细胞, 取部分重悬于含有 1 000 U/mL IFN- γ 的完全培养基中培养, 24 h 后添加 500 U/mL 的 rhIL-2 和 50 ng/mL 的 CD3 单克隆抗体, 每隔 3 d 半量换液 1 次, 培养第 7 天, 收获 CIK 细胞; 另取部分细胞培养于含有 50 ng/mL CD3 单克隆抗体的完全培养基, 每隔 3 d 半量换液 1 次, 培养第 7 天即为 T 细胞。将贴壁细胞用含有 10 ng/mL 的 rhGM-CSF 和 10 ng/mL 的 rhIL-4 完全培养基继续培养, 隔天半量换液 1 次, 培养第 7 天收获 DC 细胞。

1.3 DC-CIK 共培养 收获培养第 7 天的 DC, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 按 1 : 10 的比例和 CIK 细胞共培养, 用含 500 U/mL 的 rhIL-2 完全培养基隔天半量换液 1 次, 共培养 7 d。

1.4 IL-12 和 IFN- γ 的检测 分别取培养第 7 天的 DC 组、DC-CIK 组、DC-T 组和 CIK 组培养上清液 100 μL , 按照 IL-12 和 IFN- γ ELISA 试剂盒的操作要求, 分别检测各组培养上清液中的 IL-12 和 IFN- γ 含量。

1.5 FCM 检测细胞表型 分别离心收集培养第 7 天的 DC 组、DC-CIK 组、DC-T 组和 CIK 组细胞, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤 3 次后, 分别添加 FITC 标记的人 CD3 抗体及 PE 标记的 CD8、CD56 抗体, 4°C 避光孵育 30 min 后, 流式细胞仪检测。

1.6 细胞毒效应检测 收集 PC3 细胞, 调整细胞浓度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$, 并接种至 96 孔培养板中, 作为检测细胞毒效应的靶细胞。分别取培养第 7 天的 DC 组、DC-CIK 组、DC-T 组和 CIK 组细胞, 作为效应细胞。将效应细胞按 10 : 1、20 : 1、50 : 1 接种到靶细胞孔中进行混合培养。24 h 后, 采用 CCK-8 法检测各孔吸光度值, 按公式计算效应细胞对靶细胞的杀伤效应。杀伤活性(%) = [(靶细胞对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 靶细胞对照组 A 值] $\times 100\%$ 。

1.7 统计学处理 数据用 SPSS13.0 软件处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IL-12 和 IFN- γ 的检测 用 IL-12 和 IFN- γ ELISA 试剂盒分别检测细胞培养上清液中的 IL-12 和 IFN- γ 的浓度, 结果表明: DC-CIK 组细胞分泌的 IL-12、IFN- γ 浓度分别为 (105.14 ± 2.16)、(726.28 ± 21.35) pg/mL, 较 DC 组、DC-T 组和 CIK 组均显著增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 细胞表型分析 FCM 分析显示: DC-CIK 组、DC-T 组和 CIK 组细胞均高表达 CD3, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。DC-CIK 组 $\text{CD}3^+/\text{CD}56^+$ 和 $\text{CD}3^+/\text{CD}8^+$ 细胞数分别为 (27.80 ± 1.01)%、(60.90 ± 1.28)%, 较 DC-T 组和 CIK 组均明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 细胞毒效应评价 以 PC3 细胞为靶细胞, DC 组、DC-CIK 组、DC-T 组和 CIK 组细胞分别作为效应细胞, CCK-8 法检测淋巴细胞杀伤效应。结果显示: DC-CIK 组细胞对 PC3 细

胞产生高细胞杀伤率 (52.31 ± 2.14)%, 相比 DC 组 (11.14 ± 1.02)%、DC-T 组 (14.19 ± 1.63)% 和 CIK 组 (34.43 ± 2.01)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。

表 1 ELISA 检测细胞培养上清液中 IL-12 和 IFN- γ 的浓度 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

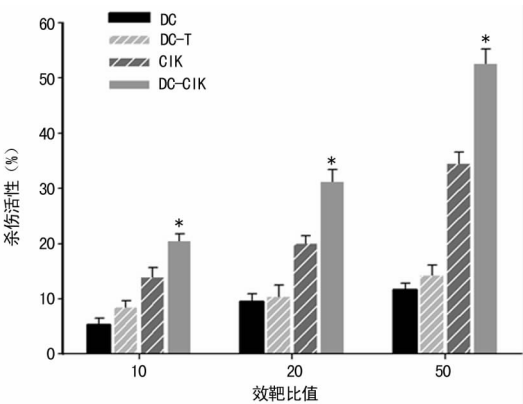
组别	IL-12	IFN- γ
DC 组	23.34 ± 3.07	121.36 ± 11.49
DC-T 组	34.28 ± 1.33	152.28 ± 14.91
CIK 组	59.17 ± 1.13	348.15 ± 17.33
DC-CIK 组	$105.14 \pm 2.16^*$	$726.28 \pm 21.35^*$

* : $P < 0.05$, 与 DC、DC-T、CIK 组比较。

表 2 细胞表型检测 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	CD3 $^+$	CD3 $^+$ /CD8 $^+$	CD3 $^+$ /CD56 $^+$
DC 组	0	0	0
DC-T 组	82.10 ± 0.19	29.90 ± 1.41	5.90 ± 0.11
CIK 组	87.90 ± 1.15	40.30 ± 0.82	21.10 ± 0.64
DC-CI 组 K	88.30 ± 0.81	$60.90 \pm 1.28^*$	$27.80 \pm 1.01^*$

* : $P < 0.05$, 与 DC、DC-T、CIK 组比较。



* : $P < 0.05$, 与 DC 组、DC-T 组和 CIK 组比较。

图 1 前列腺癌细胞杀伤活性检测

3 讨 论

前列腺癌是老年男性的常见恶性肿瘤之一, 前列腺根治性切除术和放疗是治疗早期前列腺癌的有效手段。但对于局部进展期或有远处转移的前列腺癌患者, 目前却没有令人满意的治疗方法^[1]。为此, 本研究探讨以 DC-CIK 为基础的免疫途径抗前列腺癌的作用。

DC-CIK 细胞作为免疫效应细胞在抗肿瘤治疗中因其增殖能力强、杀瘤活性高的广谱抗癌免疫等优势越来越引起人们的关注。目前, 以自体 DC-CIK 细胞免疫疗法来治疗骨肉瘤、淋巴瘤等恶性肿瘤已显示出良好的应用前景^[4]。研究发现, 利用 DC-CIK 治疗自体造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)后复发的 9 例淋巴瘤患者, 有 2 例患者部分缓解, 2 例患者病情稳定, 其中 1 例持续了 18 个月^[5]。龚奕等^[6]在对 50 例急性髓细胞白血病进行自体 DC-CIK 细胞回输治疗中, 发现患者总体生存率、无病生存率均高于对照组。尽管如此, DC-CIK 细胞毒性增强的免疫效应机制目前尚未完全明了。

DC 是目前发现最有效的抗原提呈细胞, 可摄取、加工、处

理抗原,通过高表达主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC)分子、共刺激分子、细胞黏附因子 1(intercellular cell adhesion molecule 1,ICAM-1)以及淋巴细胞功能相关抗原(lymphocyte function associated antigen 1,LFA-1)等细胞表面分子,在体内外能有效激发初始和继发性 T 细胞免疫应答效应,同时可分泌辅助性 T 细胞 1 型细胞因子 IL-12,诱导 T 细胞和自然杀伤细胞(natural killer,NK)产生 IFN- γ 和增强激活 NK 细胞的细胞毒活性。CIK 细胞是由多种细胞因子如 IL-2、IFN- γ 和 CD3 单克隆抗体等诱导的一种免疫活性细胞,兼有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性与 NK 细胞的非主要组织相容性复合物(MHC)限制性杀瘤特点,并通过分泌高水平的 IL-12、IFN- γ 等辅助性 T 细胞 1 类细胞因子,以调节体内其他细胞因子的分泌达到促进 CIK 对肿瘤细胞杀伤作用的敏感性,起到抑制肿瘤和杀伤肿瘤的作用^[7]。将具有强大肿瘤抗原提呈能力的 DC 与具有高效杀瘤活性的 CIK 细胞共培养,二者可分别通过识别抗原、激活获得性免疫系统和发挥自身的细胞毒活性、分泌细胞因子协同杀伤肿瘤细胞,从而形成高效能的免疫效应。本研究证实 DC-CIK 组培养上清液中 IL-12、IFN- γ 浓度水平明显高于 CIK 组及其他两组。可见,大量分泌细胞因子是 DC-CIK 细胞抗肿瘤免疫效应的重要机制。

本研究通过体外诱导扩增 DC 和 CIK 细胞,将其一起培养,观察共培养物 DC-CIK 细胞对前列腺癌细胞的杀伤作用。结果显示 DC-CIK 细胞能产生强大的抗前列腺癌效应,比同条件下单纯 CIK 细胞抗肿瘤活性增强,与方慧云等^[8]报道的 DC-CIK 细胞抗鼻咽癌免疫应答效果一致。同时也证实 DC-CIK 细胞具有比 CIK 细胞更强的抗肿瘤活性。CIK 细胞属于异质细胞群,其抗肿瘤作用与 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 双阳性细胞及分泌细胞因子的水平密切相关。同时 CIK 细胞又是具有 NK 活性的 T 细胞,具有 T 细胞的抗肿瘤活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤优点^[9]。本研究结果表明,DC-CIK 细胞具有高表达 CD8⁺ 细胞和 CD3⁺/CD56⁺ 细胞,即产生了大量的 NK 细胞样淋巴细胞和细胞毒性淋巴细胞,使抗前列腺癌细胞的免疫效应进一步增强。同时 DC 的抗原提呈作用能促使 CIK 细胞分泌 IFN- γ 的时间延长,分泌量增加,进一步增强对肿瘤细胞的细胞毒活性。本研究结果显示,DC-CIK 细胞作为一类强大的抗肿瘤免疫效应细胞,可作为一种抗前列腺癌的免疫治疗方法。

(上接第 2166 页)

- 医药出版社,2003:314.
- [8] 胡卫东. 针灸治疗非酒精性脂肪肝的临床观察[J]. 中国针灸,2005,12(1):13-15.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005:114-116.
- [10] Diab D, Yerian L, Schauer P, et al. Cytokeratin 18, a marker of cell death, is increased in children with suspected nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2008, 47(4):481-485.
- [11] Gonzalez - Quintela A, Mallo N, Mella C, et al. Serum levels of cytokeratin - 18(tissue polypeptide - specific antigen) in liver diseases[J]. Liver International, 2006, 26(10):1217-1224.
- [12] Gilbert S, Lorange A, Daigle N, et al. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas - mediated ap-

参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4):225-249.
- [2] Bedognetti D, Wang E, Sertoli MR, et al. Gene-expression profiling in vaccine therapy and immunotherapy for cancer [J]. Expert Rev Vaccines, 2010, 9(6):555-565.
- [3] Wang QJ, Wang H, Pan K, et al. Comparative study on anti-tumor immune response of autologous cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells-CIK (DC-CIK), and semi-allogeneic DC-CIK [J]. Chin J Cancer, 2010, 29(7):641-648.
- [4] Li XD, Xu B, Wu J, et al. Review of Chinese clinical trials on CIK cell treatment for malignancies [J]. Clin Transl Oncol, 2012, 14(2):102-108.
- [5] Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, et al. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2005, 11(3):181-187.
- [6] 龚奕, 陈幸华, 张曦, 等. DC-CIK 细胞输注治疗急性髓细胞白血病 50 例分析[J]. 重庆医学, 2011, 40(30):3039-3041.
- [7] Sangiolo D, Mesiano G, Carnevale-Schianca F, et al. Cytokine induced killer cells as adoptive immunotherapy strategy to augment graft versus tumor after hematopoietic cell transplantation [J]. Expert Opin Biol Ther, 2009, 9(7):831-840.
- [8] 方慧云, 程伟民, 李晓玲, 等. CIK、DC-CIK 细胞抗鼻咽癌 CNE2 细胞的作用比较[J]. 现代肿瘤医院, 2009, 17(11):2077-2078.
- [9] Joshi PS, Liu JQ, Wang Y, et al. Cytokine-induced killer T cells kill immature dendritic cells by TCR-independent and perforin-dependant mechanisms [J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(6):1345-1353.

(收稿日期:2013-11-02 修回日期:2014-02-05)

op tosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation [J]. J Cell Biol, 2001, 154(4):763-773.

- [13] Malik R, Chang M, Bhaskar K, et al. The clinical utility of biomarkers and the nonalcoholic steatohepatitis CRN liver biopsy scoring system in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(4):564-568.
- [14] Diab D, Yerian L, Schauer P, et al. Cytokeratin 18, a marker of cell death, is increased in children with suspected nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2008, 47(4):481-485.
- [15] 胡卫东. 针灸治疗非酒精性脂肪肝性肝炎的临床观察[J]. 中国针灸, 2005, 21(9):5-8.

(收稿日期:2013-10-08 修回日期:2014-01-10)