

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2002 )03-0179-04

## CIK 细胞对裸鼠肝癌移植瘤生长的抑制作用

施 明, 雷周云, 王福生, 张 冰, 黎文亮, 刘敬超 ( 解放军 302 医院生物工程研究室, 北京 100039 )

[ 摘 要 ] **目的:** 观察外周血单个核细胞( PBMC )体外经 IFN- $\gamma$ , rIL-2 和 anti-CD3McAb 诱导后细胞表型的变化及 CIK 细胞对裸鼠肝癌移植瘤的抑制作用。**方法:** 采用成份血采血机采集 6 例健康自愿者 PBMC, 经多因子诱导后, 计数活细胞数, 流式细胞仪检测细胞表型; 裸鼠肩胛下接种肝癌细胞, 次日起连续 6 d 给予不同数量的 CIK 细胞, 观察对肝癌生长的抑制作用。**结果:** 诱导培养后 13 d, 效应细胞增殖 7.1 倍, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 双阳性细胞增殖约 6 倍。动物实验结果表明, CIK 细胞可明显抑制肝癌移植瘤的生长, 且肿瘤抑制率与 CIK 细胞的数量呈剂量效应关系。**结论:** PBMC 细胞体外经多因子诱导成 CIK 细胞, 其数量及抗肿瘤活性显著增加, 对肝癌细胞的生长具有明显的抑制作用。

[ 关键词 ] CIK 细胞; 细胞表型; 肝细胞癌; 生长抑制

[ 中图分类号 ] R730.3 [ 文献标识码 ] A

## Human Cytokine-Induced Killer Cells Inhibit the Growth of Hepatocellular Carcinoma Cells Transplanted in Nude Mice

SHI Ming, LEI Zhou-yun, WANG Fu-sheng, ZHANG Bing, LI Weng-liang, LIU Jing-chao ( Division of Biological Engineering, Beijing Institute of Infectious Disease, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China )

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of the cytokine-induced killer ( CIK ) cells from human peripheral blood mononuclear cells ( PBMCs ) origin on the growth of hepatocellular carcinoma ( HCC ) cells in animal model. **Methods:** PBMCs from healthy donors were enriched by using the specific program of the Cobe Spectra blood separator and induced *in vitro* into CIK cells in serum-free culture medium containing interferon-gamma ( IFN- $\gamma$  ), interleukin-2 ( IL-2 ), and anti-CD3. The phenotypes and characterization of CIK cells were identified by flow cytometric analysis. BALB/c nude mice subscapularly transplanted with  $1.5 \times 10^5$  of BEL-7402 HCC cell at the exponential growth produced 100% tumor incidence and were treated with human CIK cells for consecutive six days on the second day after HCC transplantation. **Results:** The CIK cells identified by flow cytometric analyses were shown to be a heterogeneous population with different cellular phenotypes. The total CIK cells and CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> positive cells significantly increased by 7 fold and 6-fold, respectively, in cell proliferation number at day 13 incubation, which suggested that the CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> positive cells proliferated faster than other cell populations of CIK cells. In tumor-bearing nude mice, human CIK cells showed a significant inhibitory effect on the growth of transplanted HCC, resulting in a statistical significant difference among the treated and control groups. There was dose-response dependent relationship between the inhibitory effect and number of treated CIK cells. **Conclusion:** Human CIK cells are of highly efficient cytotoxic effector cells against hepatocellular carcinoma cells in murine model and are likely to be used as an immune therapeutic strategy for HCC patients

[ **Key words** ] cytokine-induced killer cells; cell phenotype; hepatocellular carcinoma cells; growth suppression

\* CIK( cytokine-induced killer )细胞是外周血单个核细胞( peripheral blood mononuclear cell, PBMC )体外经过多种细胞因子( IFN- $\gamma$ , rIL-2, anti-CD3McAb 和 IL-1 $\alpha$  )共同诱导而获得的一群异质细胞<sup>[1]</sup>, 兼具有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性和 NK 细胞非 MHC 限制杀瘤

特点<sup>[2]</sup>, 是一类共同表达 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 的高效细胞毒

\* [ 作者简介 ] 施明( 1966- ), 男, 福建人, 博士, 主要从事肿瘤基因及细胞免疫治疗研究。

[ 通讯作者 ] 王福生, E-mail: fswang@public.bta.cn

细胞<sup>[3]</sup>。在未培养的条件下,外周血淋巴细胞中具有 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 表型的细胞仅占 1% ~ 5%<sup>[4]</sup>,经过多因子刺激后 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞的比例及数量可明显增多<sup>[2,5]</sup>。CIK 细胞具有增殖速度快,杀瘤活性高,杀瘤谱广<sup>[4]</sup>等特点。本研究观察正常自愿者 PBMC 体外经多因子诱导后细胞表型的变化及对裸鼠移植瘤的抑制作用,为临床上应用 CIK 细胞治疗肿瘤提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 靶细胞及动物

肝癌细胞系 BEL-7402 为军事医学科学院二所邱兆华博士惠赠。实验动物为 6 ~ 8 周龄 BALB/c 裸鼠,雌、雄各半,体重约 18 g,北京医科大学动物中心提供。

### 1.2 实验材料

无血清培养基:GIBCO 公司;IL-2:北京瑞得合通药业有限公司;anti-CD3McAb:古巴分子免疫中心;rhIFN- $\gamma$ :上海克隆生物高技术有限公司;检测 T 细胞亚群的各种抗体:美国 BD 公司;流式细胞分析仪:FACSCalibur,美国 BD 公司,所采用的软件有 CellQuest, SimulSET, MultiSET, FACSCOMP。

### 1.3 CIK 细胞的培养

用采血机(spectra v 6.1)采集 6 例健康自愿者 PBMC 约  $0.5 \times 10^9 \sim 6 \times 10^9$ ,体积 50 ~ 100 ml,用无血清培养基调整细胞浓度,在每 ml 细胞悬液内加入 rhIFN- $\gamma$  2 000 U。置于透气性培养袋中 37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 悬浮培养,次日加 rhIL-2 1 000 U/ml,anti-CD3MeAb 50 ng/ml。培养的第 4,7,10,13 天进行细胞表型分析,调整细胞浓度,补充 IL-2。

### 1.4 CIK 细胞悬液的制备

取出一定体积的培养的 CIK 细胞悬液,离心去上清,用生理盐水(含 0.5% 人血白蛋白,100 U/ml 的 IL-2)洗 1 遍,再用相同的生理盐水重悬浮细胞。

### 1.5 动物实验

裸鼠先经 3 Gy <sup>60</sup>Co 照射后,随机分成 5 组:对照组及 CIK 细胞治疗 I, II, III, IV 组,每组雌雄各半。每只裸鼠于左肩胛部皮下接种处于对数生长期的 BEL-7402 肝癌细胞  $1.5 \times 10^5$ 。次日,对照组裸鼠在接种肿瘤细胞部位处注射 0.25 ml 生理盐水(含 0.5% 人血白蛋白,100 U/ml 的 IL-2),CIK 细胞治疗 I, II, III, IV 组的每只动物分别注射  $6 \times 10^7$ ,  $4.5 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$  和  $1.5 \times 10^7$  数量的 CIK 细胞,体积均为 0.25 ml,连续注射 6 d。观察肿瘤生长情况,5 周后裸鼠颈椎脱臼处死,剥离肿瘤块并称重,用游标卡尺测量肿瘤的大小,并计算肿瘤的体积。

## 2 结果

### 2.1 不同培养时间效应细胞的增殖

实验发现,细胞在无血清培养培养基中培养第 4 天出现增殖,至培养第 13 天增殖到原来的 7.1 倍,细胞体积明显增大。培养期间内细胞存活率均在 90% 以上(见图 1)。

图 1 效应细胞增殖与培养时间的关系

Fig.1 The relation between effective cell proliferation and incubation time

### 2.2 培养不同时间对效应细胞表型的影响

各类细胞表型的比例随培养时间变化而改变,特别是 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞的比例迅速增多,CD25<sup>+</sup> 的比例亦增多,7 d 后逐渐下降。CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 及 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例缓慢上升,7 d 至 13 d 之间达较高水平(见表 1,图 2)。

### 2.3 不同剂量 CIK 细胞对裸鼠移植瘤的抑制作用

各组裸鼠成瘤的时间明显不同,对照组裸鼠接种肿瘤细胞后第 5 天即出现肿块,而 CIK 治疗组第 10 天才出现瘤块。50% 裸鼠成瘤时间对照组约为 8 d,而 CIK 治疗 I ~ IV 组分别为 15,14,13,13 d,19 d 后,对照组及 CIK 细胞治疗 II, III, IV 组裸鼠成瘤率为 100%,治疗 I 组成瘤率为 83.3%(见图 3)。解剖时发现绝大多数对照组和治疗 IV 组肿瘤有发生浸润现象,治疗 II, III 组有少数发生肿瘤浸润现象,且肿瘤块较小而局限,肿瘤抑制率[(对照组瘤重 - 实验组瘤重)/对照组瘤重]可高达 54.3% 和 31.2%;而对照组的肿瘤重量及体积均较 I, II 组大( $P < 0.05$ )(见表 2),且有肿瘤转移扩散现象。

### 2.4 培养不同时间对干扰素产生细胞(IFN-producing cells, IPCs)的影响

在培养的第 0 天,IPC 细胞的比例平均为 0.38%,4 d 降至 0.01%,之后至第 13 天,均未能测出 IPC。说明 PBMC 经体外培养后,IPC 逐渐消失。

表 1 培养的不同时间效应细胞表型的变化

Tab.1 The phenotype alterations of effective cell at various incubation time

| Cell phenotype                     | Rate of cell phenotype ( % ) |             |            |             |             |
|------------------------------------|------------------------------|-------------|------------|-------------|-------------|
|                                    | 0 d                          | 4 d         | 7 d        | 10 d        | 13 d        |
| CD3 <sup>+</sup>                   | 61.7 ± 2.3                   | 62.3 ± 4.2  | 71.7 ± 9.7 | 78.3 ± 6.1  | 82.3 ± 6.8  |
| CD4 <sup>+</sup>                   | 36.0 ± 5.3                   | 37.7 ± 1.5  | 39.7 ± 6.0 | 33.7 ± 6.4  | 26.3 ± 8.1  |
| CD8 <sup>+</sup>                   | 32.7 ± 2.9                   | 31.7 ± 8.5  | 40.3 ± 4.5 | 42.2 ± 7.8  | 48.0 ± 13.5 |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>  | 36.0 ± 4.0                   | 36.3 ± 2.1  | 38.3 ± 6.1 | 33.3 ± 5.8  | 32.7 ± 7.4  |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>  | 23.7 ± 1.5                   | 24.7 ± 5.0  | 38.3 ± 4.9 | 41.0 ± 13.1 | 43.3 ± 14.7 |
| CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> | 6.0 ± 3.5                    | 48.0 ± 19.0 | 73.7 ± 4.0 | 75.0 ± 3.0  | 36.3 ± 18.1 |
| CD25 <sup>+</sup>                  | 2.7 ± 2.1                    | 24.7 ± 4.7  | 25.0 ± 7.2 | 17.3 ± 2.1  | 13.7 ± 1.5  |

图 2 不同培养时间细胞 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 流式测定结果Fig.2 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cell characterized by flow cytometry in various culture time

### 3 讨论

CIK 细胞由于同时表达 CD3 和 CD56 两种膜蛋白分子,故又被称为 NK 细胞样 T 淋巴细胞,兼具有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性和 NK 细胞非 MHC 限制性杀瘤特点。在培养 CIK 细胞的过程中,经过特定的细胞因子在特定时间诱导处理后,CIK 细胞的数量可呈数十倍乃至数百倍增加,细胞毒活性也大大增加。因此 CIK 细胞被认为是新一代抗肿瘤过继细胞免疫治疗的首选方案。CIK 细胞抗瘤作用有以下几个特点:增殖速度快,杀瘤活性高,抗瘤谱广,对多重耐药肿瘤细胞同样敏感<sup>[6]</sup>,能抵抗肿瘤细胞引发的效应细胞 Fas-

Fasl 凋亡<sup>[7]</sup>等。

本研究效应细胞在培养的 13 d 内,最大增殖倍数接近 8 倍,细胞形态也发生明显变化,细胞体积增大,呈母细胞化。培养过程中 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞的百分含量也大幅度上升,由起初的 6.0% 上升到第 10 天的 75%,同时 CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> 和 CD25<sup>+</sup> 细胞的比例亦增加。CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 为 CIK 细胞的主要表型,CIK 细胞的细胞毒作用是非 TCR 和非 MHC 限制的,且细胞毒作用几乎唯一存在于 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞中,因此 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞比例的增加预示着对肿瘤细胞的免疫力的显著增强。CD25<sup>+</sup> 代表细胞的活性,综合两者及细胞增殖倍数最大时出现的时间等考虑,在培养的 10 d 至

13 d 之间的活力较好,细胞数量多,体外研究也表明,培养 2 周左右 CIK 杀瘤活性最强<sup>[8]</sup>,此时回输给患者,可能达到最佳的抗瘤效果。用病人自身的 CIK 细胞经体外扩增回输,安全性得到极大的提高,避免由于交叉感染引发的其它疾病。

本研究同时观察了培养过程中 IPCs 的变化。IPCs 是一种专职产生 IFN 的细胞,属于树突状细胞的前体细胞<sup>[9]</sup>,其特征表型标志为 CD4<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup>。IPCs 在宿主防御反应中起重要的作用<sup>[10]</sup>, IPCs 数量的增加明显有利于机体防御感染的发生。本研究在培养过程中 IPCs 逐渐消失,原因为 IPCs 发生凋亡的缘故<sup>[11]</sup>。体外培养的 IPCs 可能需要其它细胞因子如 IL-3 的诱导。在培养 CIK 的多因子中加入 IL-3 以提高 IPCs 的比例,是值得研究的课题。

图 3 各组裸鼠成瘤率与时间的关系

Fig. 3 Relation between tumor developing rate and time following tumor cell injection

表 2 CIK 细胞对裸鼠肝癌移植瘤的抑制作用

Tab. 2 The inhibition of CIK cell on transplanted hepatocellular carcinoma cells in nude mice

| Groups          | Animal number ( n ) | Tumor developed rate ( × 100% ) | Tumor weigh ( g ) | Tumor volume ( cm <sup>3</sup> ) | Tumor suppressive rate <sup>△</sup> ( % ) |
|-----------------|---------------------|---------------------------------|-------------------|----------------------------------|---|
| Control         | 6                   | 6/6                             | 1.86 ± 0.54       | 1.38 ± 0.74                      | 0   |
| CIK-treated I   | 6                   | 5/6                             | 0.84 ± 0.54 * *   | 0.58 ± 0.46 * *                  | 54.8                                      |
| CIK-treated II  | 6                   | 6/6                             | 1.28 ± 0.53 *     | 0.68 ± 0.46 *                    | 31.2                                      |
| CIK-treated III | 6                   | 6/6                             | 1.62 ± 0.84       | 1.23 ± 0.70                      | 12.9                                      |
| CIK-treated IV  | 8                   | 6/6                             | 1.83 ± 0.56       | 1.25 ± 0.51                      | 1.6                                       |

\* \* P < 0.01, \* P < 0.05, Compared with control group. △ Tumor suppressive rate = ( tumor weigh in control group - tumor weigh in experimental group ) / tumor weigh in control group

给予裸鼠皮下接种肝癌细胞,建立肝癌动物模型,同时给予 CIK 细胞,结果高剂量 CIK 细胞治疗组裸鼠成瘤率明显低于对照组及其它低剂量组,且肿瘤体积也明显小。高剂量 CIK 细胞治疗组裸鼠肿瘤的发生较局限,未发现有转移浸润现象,而其它组的肿瘤出现了扩散和转移现象。说明 CIK 细胞对肿瘤的抑制显示出一定的剂量效应关系,同时表明 CIK 细胞对肝癌的防治具有良好效果。

[ 参考文献 ]

[ 1 ] Schmidt-Wolf IGH, Negrin RS, Kiem HP, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced Killer cells with potent antitumor cell activity[ J ]. J Exp Med, 1991, 174: 139-149.

[ 2 ] Schmidt-Wolf IGH, Lefterova P, Johnston V, et al. Propagation of T cells with NK cell marker[ J ]. Br J Haematol, 1994, 87: 453-458.

[ 3 ] Schmidt-Wolf GD, Negrin RS, Schmidt-Wolf IGH. Activated T cells and cytokine-induced CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> killer cells[ J ]. Ann Hematol, 1997, 74: 51-56.

[ 4 ] Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> cells derived from T cells with potent *in vivo* anti-tumor ac-

tivity in mice with potent severe combined immunodeficiency[ J ]. J Immunol, 1994, 153: 1687-1696.

[ 5 ] 于津浦,任秀宝,张澎,等. 恶性实体瘤患者自体 CIK 细胞的体外大量扩增与生物学指标检测[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(3): 215-216.

[ 6 ] Schmidt-Wolf IGH, Lefterova P, Johnston V, et al. Sensitivity of multidrug-resistant tumor cell lines to immunologic effector cells [ J ]. Cell Immunol, 1996, 169: 85-90.

[ 7 ] Vermeris MR, Kornacker M, Mailander V, et al. Resistance of *ex vivo* expanded CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> T cells to Fas-mediated apoptosis [ J ]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 49: 335-345.

[ 8 ] 任欢,邢淑贤,徐红薇,等. CIK 的体外增殖及体内外杀瘤活性的实验研究[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6(1): 17-21.

[ 9 ] Fitzgerald-Bocarsly P. Human natural interferon- $\alpha$  producing cells [ J ]. Pharmacol Ther, 1993, 60(1): 39-42.

[ 10 ] Sousa AE, Chaves AF, Loureiro A, et al. Comparison of the frequency of interleukin ( il )-2-, interferon-gamma, and IL-4-producing T cells in 2 diseases, human immunodeficiency virus types 1 and 2, with distinct clinical outcomes[ J ]. J Infect Dis, 2001, 184 ( 5 ): 552-559.

[ 11 ] Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood[ J ]. Science, 1999, 284: 1835-1837.