

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )02-0126-04

## CIK 细胞中 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群抗肿瘤免疫活性

于津浦, 任秀宝, 刘虹, 张澎, 郝希山 ( 天津医科大学附属肿瘤医院免疫室, 天津 300060 )

[ 摘要 ] **目的:** 观察 CIK 细胞中 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群抗肿瘤免疫活性。**方法:** 体外大规模扩增 CIK 细胞, 利用磁珠分离系统富集纯化 CIK 细胞中的 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群。采用胞内染色法分析其中 Th1/Th2 的比例变化; LDH 法和荧光染色法比较 4 h 和 20 h 其对 raji 细胞的杀伤率和 raji 凋亡。**结果:** 经磁珠分离法富集的 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞纯度高达 96%, 其中 Th1/Th2 的分布较 PBMC 有显著的改变: Th1 亚群、Th0 亚群明显升高, Th2 亚群无显著变化。CD4<sup>+</sup> CIK 细胞虽然不能在 4 h 之内溶解 raji 细胞, 但可在 20 h 时产生同 CD4<sup>-</sup> CIK 细胞同样强大的杀伤活性, 荧光染色可见其在 4 h 之内诱导 raji 出现早期凋亡的迹象。**结论:** 本研究提示 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞具有明显的“Th1 优势”可以调节宿主免疫细胞活性; 同时 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞可通过诱导肿瘤细胞凋亡实现对肿瘤的抑制和杀伤。

[ 关键词 ] CIK 细胞; CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群; 抗肿瘤免疫; Th1 优势; 凋亡

[ 中图分类号 ] R730.3 [ 文献标识码 ] A

## Antitumor Immunity of CD4<sup>+</sup> T Cells Subset in CIKs

YU Jin-pu, REN Xiu-bao, LIU Hong, ZHANG Peng, HAO Xi-shan ( Department of Immunology, Cancer Institute and Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China )

[ Abstract ] **Objective:** To observe antitumor immunity of CD4<sup>+</sup> T cells subset in CIKs. **Methods:** After large scale of amplification *in vitro*, CD4<sup>+</sup> T cells subset in CIKs was isolated by magnetic beads separation columns. Distribution of Th1/Th2 in CD4<sup>+</sup> T cells subset in CIKs was analyzed by intracellular cytokine staining. Cytotoxicity of purified CD4<sup>+</sup> T cells subset in CIKs against raji cells and apoptosis of raji cells after 4 h and 20 h coculture were determined by LDH method and fluorescent staining method. **Results:** Purity of enriched CD4<sup>+</sup> T cells subset in CIKs reached 96%. Comparing with PBMCs, significant increase in Th1 subset and Th0 subset were observed but no statistical differences were found in Th2 subset. Few raji cells were lysed by CD4<sup>+</sup> T cells subset in CIKs after 4 h co-incubation. But after 20 h co-incubation, the same effective lysis of raji cells as CD4<sup>-</sup> T cells subset was obtained in CD4<sup>+</sup> T cells subset in CIKs. Fluorescent staining showed that CD4<sup>+</sup> T cells subset in CIKs induced apoptosis of raji after 4 h coculture. **Conclusion:** The present study suggested that CD4<sup>+</sup> T cells in CIKs were not only regulatory cells capable of modulating host immune system, but also immune effectors capable of inducing apoptosis in tumor cells.

[ Key words ] CIK; CD4<sup>+</sup> T cells subset; antitumor immunity; Th1 dominance; apoptosis

\* CIK( cytokine-induced killer )细胞是人外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子刺激后获得的一群异质细胞<sup>[1]</sup>, 因其增殖速度快、杀瘤活性高、杀瘤谱广、对正常造血影响轻微等特点, 在血液系统疾病及部分感染性疾病的临床治疗中表现出明显优于其他过继性免疫治疗手段的强大优势<sup>[2-3]</sup>。目前已确定 CIK 细胞抗肿瘤机制主要是其中 CD3CD56 双阳性细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的直接杀伤作用, 对于同样在 CIK 细胞中占较大比重的 CD4<sup>+</sup> T 细胞的作用始终没有涉及。本研究对 9 例恶性实体瘤患者体外扩增 CIK 细胞, 利用磁珠法富集纯化 CD4<sup>+</sup> T 细胞, 检测其中 Th1/Th2 亚群分布, 对

肿瘤细胞的杀伤作用, 和诱导凋亡的能力, 初步探讨 CIK 细胞中 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群抗肿瘤免疫活性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 病例选择

恶性实体瘤患者 9 例, 其中肺癌 3 例、肾癌 3 例、

[ 基金项目 ] 天津科委自然科学基金资助项目( 项目编号 023611011 )

[ 作者简介 ] 于津浦( 1974- ), 女, 天津人, 实习研究员, 硕士, 主要从事肿瘤细胞免疫研究。

乳腺癌 1 例、直肠癌 1 例、甲状腺癌 1 例;晚期转移患者 6 例,术后患者 3 例。男女比例为 6:3,中位年龄为 51(29~72)岁。

1.2 自体 CIK 细胞的体外大量扩增及生物活性检测  
具体步骤详见文献[4]。

1.3 细胞表型鉴定

具体步骤详见文献[4]。

1.4 CIK 细胞中 CD4<sup>+</sup>T 细胞的纯化

自体 CIK 细胞或 PBMC 细胞用 PBS 0.5%, BSA 2 mmol/L EDTA 洗液洗涤后调成  $12.5 \times 10^7$ /ml, 加入抗 CD4 的单抗包被磁珠 0.1 ml, 6~12℃ 孵育 15 min 后洗涤并调整体积为 0.5 ml。经高强度磁珠分离柱(MACS)分离除去 CD4<sup>-</sup>细胞,而吸附于分离柱上的 CD4<sup>+</sup>细胞在去除磁场后用 PBS 加压冲洗收集,用 FACS 和台盼蓝检测纯度和活率。

1.5 胞内染色法分析 CIK 细胞和 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 Th1 和 Th2 亚群分布

自体 CIK 细胞和 PBMC 细胞中纯化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞在含有 PHA-P 10 ng/ml 和 2 mmol/L monensin 的含 10% FCS 的 RPMI-1640 完全培养基中培养 5 h, 收集细胞洗涤、固定、破膜,用 PE-抗人 IL-4 和 FITC-抗人 IFN- $\gamma$  的单抗在 4℃ 染色 30 min 后上 FACS 检测分泌 IL-4 和 IFN- $\gamma$  的 CD4<sup>+</sup>Th 细胞的分布情况。

1.6 LDH 法检测 CD4<sup>+</sup>和 CD4<sup>-</sup>CIK 细胞对 raji 细胞的杀伤活性

分别调节富集纯化的 CD4<sup>+</sup>CIK 细胞和 CD4<sup>-</sup>CIK 细胞浓度为  $8 \times 10^6$ /ml, 与 raji 细胞按 E:T 比为 40:1, 20:1, 10:1 混合加入 96 孔板, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 4 h 和 20 h 后用 LDH 试剂盒检测细胞上清中释放出的乳酸脱氢酶活性。

1.7 检测 CD4<sup>+</sup>CIK 细胞诱导 raji 细胞凋亡活性

收集经磁珠法富集纯化的 CD4<sup>+</sup>CIK 细胞, 与 raji 细胞按 10:1, 5:1 和 1:1 的比例混合, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 4 h 和 20 h 后, 利用 annexin V-FITC 检测试剂盒, 于荧光显微镜下观察 raji 细胞的凋亡情况。

1.8 统计学方法

所有数据采用平均值  $\pm$  标准差的格式, 统计学比较采用配对 *t* 检验方法。

## 2 结果

2.1 患者 CIK 细胞培养前后的扩增

经 10~12 d 培养后不同病人 CIK 细胞数增幅 10~57.4 倍(平均为 26.8 倍), CIK 细胞总数可达到  $(40 \sim 78) \times 10^8$  (平均值为  $69.1 \times 10^8$ ), 台盼蓝染色检测活细胞比例超过 95%。

2.2 患者 CIK 细胞培养前后的表型变化

比较培养前后 CIK 细胞表型特点, 可发现总 CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>56<sup>+</sup> 和 CD25<sup>+</sup> 细胞比例均较培养前显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而 CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> 细胞比例则降低 ( $P < 0.05$ , 如图 1)。

图 1 自体 CIK 细胞培养前后细胞表型的变化

Fig. 1 Phenotypic alteration of autologous CIKs pre and post culture

2.3 CIK 细胞中 CD4<sup>+</sup>T 细胞的纯化和 Th1/Th2 的分布

本实验中纯化后的 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群纯度高达 96%, 活率超过 95% (图 2 A)。比较 CIK 和 PBMC 的 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群中 Th1/Th2 的分布有显著的改变: ①经多因子培养后 PBMC 中处于静止期的 Th 细胞前体(Thp)被大量活化, 细胞向右上方偏移, 形成具有合成分泌 IFN- $\gamma$  和 IL-4 能力的 Th0 细胞(图 2 B 中 2 区域), 并且其中一大部分 Th0 细胞逐渐出现 IFN- $\gamma$  合成优势——即 Th1 类细胞(图 2 B 中 4 区域), 胞内荧光染色呈现 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 细胞比例升高, 但绿色荧光(抗 IFN- $\gamma$ -FITC)仍集中于临近域值的区域, 分群不明显。②经多因子培养后 PBMC 中明显的 Th2 细胞团(图 2 C 中 1 区域)的细胞分散、稀疏, 比例下降, 但统计学未观察到显著差异。③总之, 比较 CIK 和 PBMC 的 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群中 Th1/Th2 的分布: Th1(IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-4<sup>-</sup>)亚群、Th0(IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>)亚群均有明显升高, 而 Th2(IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL-4<sup>+</sup>)亚群无显著变化(见表 1)。

2.4 CD4<sup>+</sup>和 CD4<sup>-</sup>CIK 细胞在不同孵育时间对 raji 的非特异性杀伤活性

4 h 时, 无论在何效靶比下, 纯化的 CD4<sup>+</sup>CIK 细胞对 raji 的杀伤活性均明显低于 CD4<sup>-</sup>CIK 细胞 ( $P < 0.05$ ), 但到 20 h 时则两种细胞成分均表现出对 raji 细胞的强大的杀伤活性, 两者之间比较无统计学差异(见表 2)。

2.5 荧光法检测 CD4<sup>+</sup>CIK 细胞诱导 raji 细胞凋亡活性

CD4<sup>+</sup>CIK 同 raji 在不同效靶比下孵育 4 h 均可观察到靶细胞的胞膜磷脂外翻, 形成荧光显微镜下可见的点状绿色荧光, 提示 raji 细胞出现早期凋亡迹象, 并且凋亡细胞与效应细胞数呈依赖关系(图 3 B, D); 在

共同孵育 20 h 后,则可观察到 raji 细胞出现胞膜裂解、死亡,荧光显微镜下呈红绿交杂的细胞外观(图 3 C),

而此种现象在 CD4<sup>-</sup>CIK 同 raji 孵育 4 h 之后即可观察到(图 3 E)。

图 2 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞中 IFN- $\gamma$  和 IL-4 分泌情况的 FACS 检测结果

Fig. 2 IFN- $\gamma$  and IL-4 secretion in CD4<sup>+</sup> CIKs analyzed by flow cytometry

A: Purity of CD4<sup>+</sup> T cells subset enriched by magnetic beads methods; B: Distribution of Th1/Th2 in CD4<sup>+</sup> CIKs; C: Distribution of Th1/Th2 in CD4<sup>+</sup> PBMCs

表 1 CIK 细胞与 PBMC 中 Th1 亚群与 Th2 亚群的分布情况比较(%)

Tab. 1 Comparison of different Th cell subsets distribution in CIK and PBMC

	IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-4 <sup>-</sup>	IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup>	IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> IL-4 <sup>+</sup>
CIK	33.93 $\pm$ 6.38	23.07 $\pm$ 8.23	10.21 $\pm$ 7.05
PBMC	1.18 $\pm$ 0.94	0.19 $\pm$ 0.16	17.56 $\pm$ 16.71
<i>P</i>	0.001	0.009	0.521

表 2 CD4<sup>+</sup> 和 CD4<sup>-</sup> CIK 细胞在不同效靶比和不同时间内对 raji 的杀伤活性(%)

Tab. 2 Cytotoxicity of CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> CIKs at different E/T ratios and time against raji

	Purified CD4 <sup>+</sup> CIK cells		CD4 <sup>-</sup> CIK cells	
	4 h	20 h	4 h	20 h
40:1	11.72 $\pm$ 1.16	52.29 $\pm$ 8.08	41.94 $\pm$ 8.04	52.5 $\pm$ 3.44
20:1	5.79 $\pm$ 1.85	29.24 $\pm$ 12.01	22.54 $\pm$ 9.64	32.19 $\pm$ 12.0
10:1	0.79 $\pm$ 0.54	14.23 $\pm$ 4.04	5.76 $\pm$ 2.23	18.91 $\pm$ 14.5

### 3 讨论

在我们以往的实验中已经证实 CIK 细胞不仅具有强大的增殖功能,并且对多种 NK 敏感或不敏感的实体瘤细胞系显示出比 LAK 细胞更强的杀伤活性<sup>[4]</sup>。由于自体 CIK 细胞的广谱高效的杀瘤活性并不会受患者病情轻重、临床分期早晚或肿瘤转移与否的影响而表现出明显的差异,这就为中晚期患者的临床治疗提供了一条有效而副作用又小的可控制肿瘤进展和术后复发的新途径<sup>[5]</sup>。

我们发现经过 10 ~ 12 d 的多因子体外诱导,自体 CIK 细胞中 NK 细胞、单核细胞和 B 淋巴细胞的比例降低,而 T 淋巴细胞的比例却较 PBMC 明显增高,尤其是其中活化 T 淋巴细胞,包括 CD3CD56 双阳性细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的比例均比培养前显著升高。以往研究已经证实 CD3CD56 双阳性细胞和 CD8<sup>+</sup> 杀伤性 T 细胞是构成 CIK 细胞强大杀瘤活性的主要效应细胞<sup>[6]</sup>,但培养后迅速升高的 CD4<sup>+</sup> T 细胞在整个 CIK 细胞中的作用机制目前尚不清楚。由于 CIK 的培养过程涉及多种正向免疫调节因子,如 IL-1 $\alpha$ , IL-2 和

IFN- $\gamma$  等。因此我们推测 CIK 细胞中高比例的 CD4<sup>+</sup> T 细胞可能具有强大的正向免疫调节功能。为此我们对

这部分进行了初步研究。

图3 raji 细胞在不同处理情况下的荧光显微镜下形态(200×)

Fig. 3 Fluorescent microscopical configuration of raji cells under different treatments(200×)

A: Negative control of raji cells; B: After 4 h co-incubation with CD4<sup>+</sup> CIK (E/T=1); C: After 20 h co-incubation with CD4<sup>+</sup> CIK (E/T=1); D: After 4 h co-incubation with CD4<sup>+</sup> CIK (E/T=1); E: After 4 h co-incubation with CD4<sup>-</sup> CIK (E/T=1)

利用磁珠法可以富集出高纯度的 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞,比例高达 96%,活率超过 95%,适于进行各项生物功能实验。利用 PE-抗人 IL-4 和 FITC-抗人 IFN- $\gamma$  的单抗结合 FACS 检测这部分细胞中 IL-4 和 IFN- $\gamma$  分泌细胞,发现纯化 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞中具有同时分泌 IL-4 和 IFN- $\gamma$  能力的活化 Th0 细胞的比例较 PBMC 有显著增加,并且该 Th0 细胞中有相当部分(约 33%)的细胞开始呈现 IFN- $\gamma$  合成优势,被极化朝向 Th1 亚群分化,胞内荧光染色显示 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞中的 Th1(单纯分泌 IFN- $\gamma$ )类细胞较 PBMC 升高达 27.75 倍,而 Th2(单纯分泌 IL-4)类细胞则下降 42%,虽然降低并没有统计学意义,但“Th1/Th2”的比例则从培养前的 0.07 升高到 3.32,表明 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞是一种典型的免疫调节细胞,由于其显著“Th1 优势”和庞大的数量,回输后可调节宿主体内各种免疫效应细胞的功能,纠正恶性实体瘤患者体内较明显的“Th2 优势”和由此产生的免疫抑制状态,提高肿瘤患者体内各种效应细胞的免疫活性,推动整个抗肿瘤免疫反应朝正向发展。

同时我们比较了不同时段纯化 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞对肿瘤细胞 raji 的杀伤活性,发现与 CD4<sup>-</sup> CIK 细胞对 raji 细胞在不同时段均表现出的强大的杀伤率不同,纯化 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞在 4 h 时对 raji 细胞并没有明显的杀伤作用,只有到 20 h 时才观察到接近 CD4<sup>-</sup> CIK 细胞的杀伤活性。利用 Annexin-V-FITC 试剂盒可发现纯化 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞在 4 h 时可以诱导 raji 细胞出现早期凋亡的表现——细胞膜脂质层的局部外翻,提示 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞虽然不能在短时间内使肿瘤细胞破裂,但可通过诱导肿瘤细胞凋亡而引发肿瘤细胞的逐渐死亡,实现抑制和杀灭肿瘤的作用。已证实 TRAIL/TRAIL-R 途径在特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞杀伤肿瘤细胞的过程中似乎是不可忽视的,Kayagaki 和 Jeremias 等<sup>[7-8]</sup>均报道在

人 PBMC 来源的 CD4<sup>+</sup> T 细胞克隆或活化 CD4<sup>+</sup> T 细胞表面观察到 TRAIL 的表达,因此关于纯化 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞中 TRAIL/TRAIL-R 介导的细胞凋亡的研究将成为进一步探讨 CD4<sup>+</sup> CIK 细胞抗肿瘤免疫机制的关键。

#### [参考文献]

- [1] 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* antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency[J]. J Immunol, 1994, 153(4): 1687-1696.
- [2] Schmidt-Wolf GD, Negrin RS, Schmidt-Wolf IG. Activated T cells and cytokine-induced CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> killer cells[J]. Ann Hematol, 1997, 74(2): 51-56.
- [3] Hoyle C, Bangs CD, Negrin RS, et al. Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: *in vitro* and *in vivo* efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice[J]. Blood, 1998, 92(9): 3318-3327.
- [4] 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.
- [5] Schmidt-Wolf IG, Finke S, Huhn D, et al. Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma[J]. Br J Cancer, 1999, 81(6): 1009-1016.
- [6] Margolin KA, Negrin RS, Forman SJ, et al. Cellular immunotherapy and autologous transplantation for hematologic malignancy[J]. Immunol Rev, 1997, 157: 231-240.
- [7] Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, et al. Involvement of TNF-related apoptosis inducing ligand in human CD4<sup>+</sup> T cell-mediated cytotoxicity[J]. J Immunol, 1999, 162: 2639-2647.
- [8] Jeremias I, Herr I, Boehler T, et al. TRAIL-APO-2-ligand-induced apoptosis in human T cells[J]. Eur J Immunol, 1998, 28: 143-152.

[收稿日期] 2002-12-02

[修回日期] 2003-01-15