

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.03.012

· 基础研究 ·

细胞因子诱导杀伤细胞对裸鼠胃癌移植瘤的靶向抑制作用

刘超, 毛伟征*, 赵宝成, 李辉 (青岛大学医学院附属医院 普外科, 青岛 266003)

[摘要] 目的: 探讨细胞因子诱导杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)对裸鼠胃癌移植瘤的靶向抑制作用。方法: 将人胃癌细胞 SGC-7901 注射到裸鼠腹股沟皮下建立胃癌移植瘤裸鼠模型, 荷瘤裸鼠随机分为 CIK 细胞组与成纤维细胞组, 分别注射荧光染料 SP-DiI 标记的 CIK 细胞与成纤维细胞(HFL-I)于裸鼠种植瘤对侧腹股沟皮下, 观察其在荷胃癌裸鼠体内各种组织中的分布情况; 同时观察 CIK 治疗后肿瘤的体积大小并计算抑瘤率, 病理观察肿瘤的坏死面积。结果: SP-DiI 标记的 CIK 细胞注射后 10 d 主要浓集在荷瘤裸鼠的肿瘤组织, 注射局部、肝脏、脾脏和肺脏组织中无 CIK 细胞或分布极少($P < 0.01$); 标记的成纤维细胞没有出现在肿瘤组织、肝脏、脾脏和肺脏组织, 主要集中于注射局部。CIK 细胞治疗后裸鼠的移植瘤体积显著小于对照组($P < 0.05$), 其抑瘤率为 29.82%; 移植瘤组织坏死面积评分显著高于对照组($P < 0.01$)。结论: CIK 细胞对裸鼠胃癌移植瘤有良好的靶向性和杀伤性。

[关键词] 细胞因子诱导杀伤细胞; 胃癌; 移植瘤; 靶向; 杀伤

[中图分类号] R735.2; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)03-0267-05

Cytokine-induced killer cells specifically inhibits implanted gastric cancer cells

LIU Chao, MAO Wei-zheng*, ZHAO Bao-cheng, LI Hui (Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of cytokine-induced killer cells (CIK) against implanted gastric cancer cells. **Methods:** Gastric cancer SGC-7901 cells were subcutaneously injected into the inguina of nude mice to establish gastric cancer model. The tumor bearing mice were randomly divided into CIK group and fibroblasts group, in which mice were subcutaneously injected with fluorescence dye SP-DiI labeled CIK and fibroblasts HFL-I cells, respectively. Distribution of CIK and HFL-I cells in different tissues of gastric cancer bearing mice were observed. Meanwhile, tumor volume was measured after different treatments and tumor inhibitory rate was calculated. Tumor necrosis areas in different groups were observed. **Results:** SP-DiI labeled CIK was mainly located in the gastric cancer tissues 10 d after injection, and was hardly detected at the injection sites, liver, spleen and lung tissues ($P < 0.01$); SP-DiI labeled fibroblasts were not found in tumors, liver, spleen and lung tissues, and were mainly located in the injection sites. Volume of implanted tumor in CIK treated mice was significantly smaller than that in the control group ($P < 0.05$), and tumor inhibitory rate of CIK group was 29.82%. The necrosis area score of implanted tumors was significantly higher in CIK group compared with that in the control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** CIK exhibits satisfactory ability to specifically kill implanted gastric cancer.

[Key words] cytokine-induced killer cell; gastric neoplasms; implanted tumor; target; cytotoxicity

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(3): 267-271]

具有靶向肿瘤部位特性的免疫细胞能携带病毒、基因等进行生物治疗, 研究表明一些免疫细胞, 如巨噬细胞、T 细胞、NK 细胞等都具有这种特性, 这些细胞通过感应肿瘤微环境发出的信号, 发挥追踪肿瘤、传递基因的作用。但这类免疫细胞也存在少量与正常组织结合、靶向肿瘤特性不确定等问题。细胞因子诱导杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)不论是体外还是体内^[1-4]实验都证实对胃癌细胞有明显杀伤效应。目前, 动物实验中运用生物发

光体内成像检测技术等观察 CIK 细胞对胃癌的靶向性, 可对效应细胞进行非侵入性的体内评价^[5-6]。为证实 CIK 细胞对肿瘤的靶向性杀伤作用, 本实验

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(No. Y2006C22)。Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. Y2006C22)

[作者简介] 刘超(1978-), 男, 汉族, 山东省日照市人, 硕士, 主要从事胃肠道肿瘤防治的研究

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: maoweizheng@hotmail.com

通过荧光染料标记 CIK 细胞, 观察其在荷胃癌裸鼠肿瘤组织以及其他组织中的分布, 并观察 CIK 细胞对胃癌细胞的杀伤效果。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清(FCS)购自中国杭州四季青公司。PMI Medium 1640 培养基、低糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司。蛋白酶(trypsin)购自美国 Difco 公司, PBS 缓冲液购自北京中山生物技术有限公司。基因重组人干扰素 γ (IFN- γ)购自上海生物制品所, CD3 单抗购自武汉博士德生物公司, 重组人白细胞介素 2(rhIL-2)购自北京远策药业有限公司, 荧光染料 SP-DiI(1,1'-双十八烷基-3,3',3'-四甲基吡啶羧基花青高氯酸盐)购自北京博蕾德生物科技有限公司。 α -MEM 培养液购自美国 Hyclone 公司。

1.2 实验动物和细胞株

BALB/c 裸鼠, 雄性, 4 周龄, 17 ~ 20 g, 购于上海斯莱克实验动物有限公司[许可证号: SCXX(沪)2007-0005]; 人胃癌细胞 SGC-7901 由青岛大学医学院附属医院肿瘤研究室提供。人胚肺成纤维细胞株 HFL-I 购于上海细胞库。

1.3 CIK 细胞与成纤维细胞 HFL-I 的制备及其荧光染料的标记

取健康人的新鲜抗凝血, PBS 倍比稀释后, 用淋巴细胞分离液(Ficoll, 1.077 g/ml)分离出外周血单个核细胞, 用含 10% FCS 的 1640 培养基悬浮, 调整密度至 1×10^6 /ml, 第 1 天加入 IFN- γ 2 000 U/ml, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h, 然后加 CD3McAb 5 μ g/ml、rhIL-2 1 000 U/ml, 继续培养, 每 3 d 半量换液, 同时补加 rhIL-2 1 000 U/ml, 调整细胞密度为 1×10^6 /ml。人胚肺成纤维细胞 HFL-I 接种于培养瓶中, 加入适量 α -MEM 培养液(含 10% 胎牛血清), 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱中培养, 细胞呈单层贴壁生长, 每 5 ~ 6 d 传代 1 次, 传代时用 0.25% 胰蛋白酶消化 2 ~ 3 min, 以培养液吹打制成细胞悬液。将荧光染料 SP-DiI 染色剂溶于二甲基甲酰胺中, 使 SP-DiI 终质量浓度为 2.5 mg/ml; 然后加入 CIK 细胞或成纤维细胞 HFL-I 培养基中, 使 SP-DiI 终质量浓度为 10 μ g/ml。将 CIK 细胞(1×10^6)或成纤维细胞 HFL-I(1×10^7)加入 25 ml 含 SP-DiI 培养基的 T175 烧瓶中培养 48 h, PBS 冲洗后再放入无染料的培养基中培养, 此为实验用荧光标记的 CIK 细胞或成纤维细胞。

1.4 胃癌细胞 SGC-7901 的传代培养及荷瘤裸鼠模型的制备

将 SGC-7901 细胞加入含 10% FBS 的 1640 培养基悬浮, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 饱和湿度条件下传代培养, 收集对数生长期的 SGC-7901 细胞, 用 PBS 液离心洗涤 2 遍, 用 PBS 液调整密度至 5×10^7 /ml, 每只裸鼠右侧腹股沟皮下注射 0.2 ml 胃癌细胞悬液, 注射后第 7 天瘤块最大直径达 0.5 cm 左右, 荷瘤裸鼠模型制备成功。

1.5 靶向实验检测 CIK 细胞在裸鼠体内的分布

荷瘤裸鼠随机分为 CIK 细胞组和成纤维细胞组(对照组), 每组 5 只。于裸鼠左侧腹股沟皮下注入荧光标记的 CIK 细胞(1×10^6 个)或成纤维细胞(1×10^7 个)。注射后 10 d 处死裸鼠取出瘤体组织及肝脏、脾脏、肺脏组织。组织切成 6 ~ 8 μ m 切片, 取连续两张, 分别制成常规 H-E 染色和冰冻切片。冰冻切片在荧光显微镜下观察, 移动载玻片的位置, 每张切片随机选取 3 个视野, 分别照相。利用 ACD-see5.0 软件和 Matlab 数学分析软件测定图像中红色荧光所占的面积。

1.6 抑瘤实验检测 CIK 细胞对胃癌组织的杀伤

裸鼠移植瘤直径达 0.5 cm 时随机分为 2 组, 每组 6 只, 分别为成纤维细胞对照组和 CIK 细胞组。CIK 组裸鼠于种植瘤对侧腹股沟皮下注射 CIK 细胞 0.2 ml(1×10^6 个); 对照组注射成纤维细胞 0.2 ml(1×10^7 个)。每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤长径、短径, 瘤体体积(mm^3) = 肿瘤长径 \times 肿瘤短径²/2, 求得肿瘤体的近似体积。抑瘤率(%) = (对照组肿瘤体积 - 实验组肿瘤体积)/对照组肿瘤体积 \times 100%。

第 14 天处死裸鼠, 瘤组织病理切片, H-E 染色, 观察各组肿瘤瘤体内坏死区域的大小, 按坏死面积所占瘤体面积比例评分。评分标准:(1)肿瘤无坏死为 0 分;(2)坏死面积 < 1/4 为 1 分;(3)坏死面积占 1/4 ~ 1/2 为 2 分;(4)坏死面积 > 1/2 为 3 分。

1.7 统计学处理

使用 SPSS12.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用方差分析比较各组间均数差异的显著性, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光标记 CIK 细胞在荷瘤裸鼠体内靶向分布

CIK 细胞组荷胃癌裸鼠注射 CIK 细胞后, 10 d 处死, 取出肿瘤组织、肝脏、脾脏、肺脏及注射点局部的组织, 分别制成常规 H-E 染色和冰冻切片, 在荧

光显微镜下观察细胞分布情况。从肿瘤组织的冰冻切片中观察到 CIK 细胞主要集中在肿瘤部位(图 1A、B)。而在肝脏、脾脏、肺脏及注射部位局部的组

织中,各组织 H-E 染色所对应的荧光显微镜下的照片中仅有极少的 CIK 细胞或没有发现 CIK 细胞的存在(图 2A1 ~ D1, A2 ~ D2)。

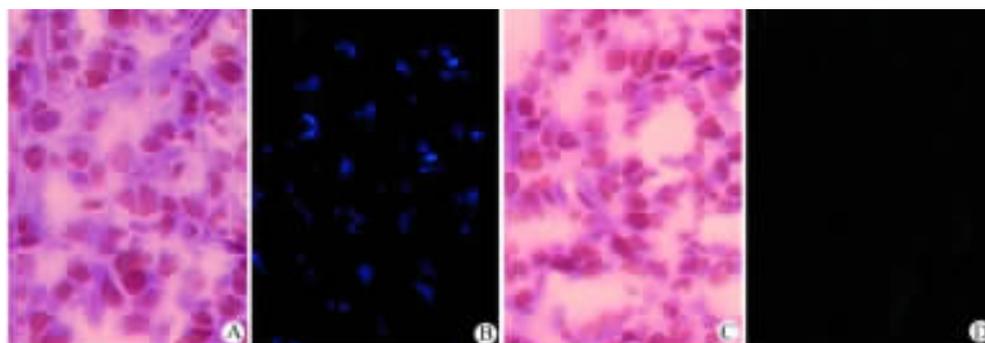


图 1 CIK 细胞组与成纤维细胞组裸鼠胃癌组织的 H-E 染色及荧光显微镜下细胞的分布(×200)

Fig.1 Gastric cancer tissues in CIK group and fibroblasts group as detected by H-E staining and fluorescence microscope

A: H-E staining of gastric cancer tissues in CIK group; B: CIK distribution in implanted gastric cancer tissues under fluorescence microscope; C: H-E staining of gastric cancer tissues in fibroblasts group; D: Fibroblasts distribution in implanted gastric cancer tissues under fluorescence microscope

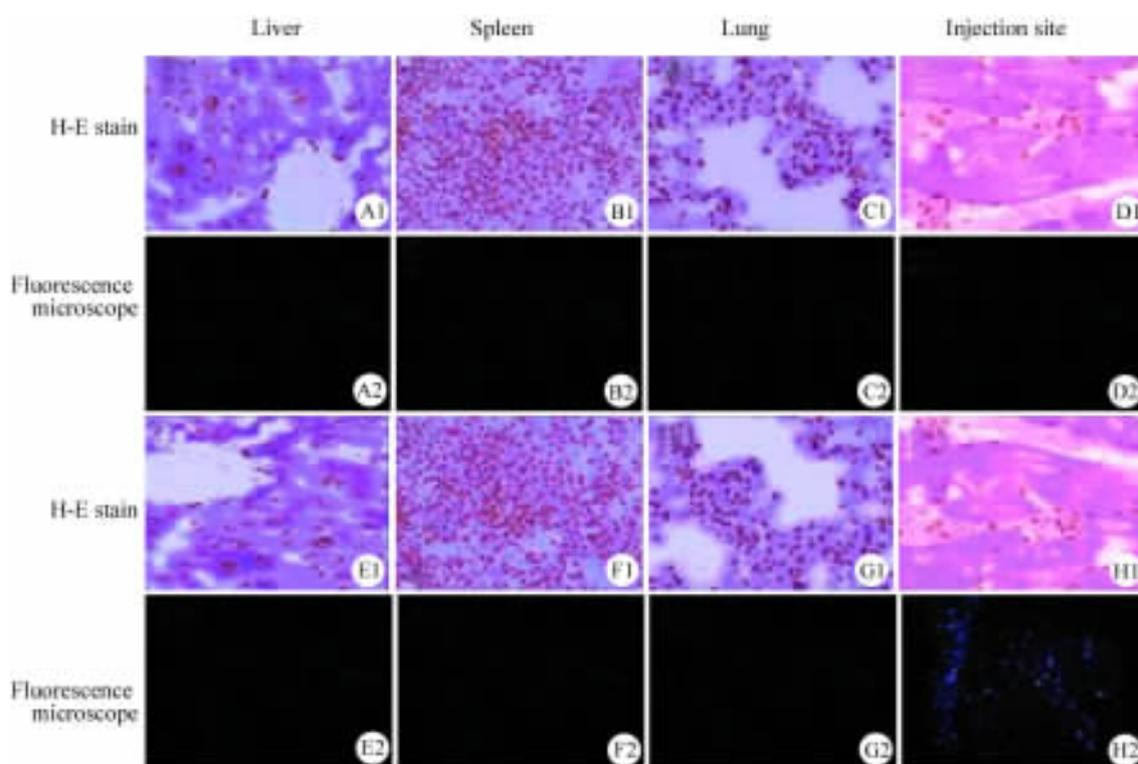


图 2 CIK 细胞组与成纤维细胞组裸鼠肝脏、脾脏、肺脏和注射部位 H-E 染色及荧光显微镜下细胞的分布(×200)

Fig. 2 Liver, spleen, lung and injection sites tissues in CIK group or fibroblast group as detected by H-E staining and fluorescence microscope(×200)

A1-D1: H-E staining of liver, spleen, lung and injection sites tissues in CIK group; A2-D2: CIK distribution in liver, spleen, lung and injection sites tissues under fluorescence microscope; E1-H1: H-E staining of liver, spleen, lung and injection sites tissues in fibroblasts group; E2-H2: Fibroblasts distribution in liver, spleen, lung and injection sites tissues under fluorescence microscope

经 ACDsee 5.0 软件和 Matlab 软件分析,CIK 细胞组裸鼠的肿瘤、注射点、肝脏、脾脏、肺脏各组织中 CIK 细胞的荧光分布的面积分别为: 0.0190 ± 0.0087 ; 0.0023 ± 0.0012 ; 0.0010 ± 0.0005 ; 0.0015 ± 0.0012 ; 0.0014 ± 0.0008 。肿瘤组织切片中荧光面积比注射点、肝脏、脾脏和肺脏等组织中面积有显著增加 ($P < 0.01$)。结果说明,CIK 细胞注射荷胃癌裸鼠后,CIK 细胞主要靶向性集中在肿瘤部位。

2.2 荧光标记成纤维细胞在荷瘤裸鼠各组织中的靶向分布

作为对照的成纤维细胞组裸鼠,10 d 后处死,以相同的方法将取出的肿瘤组织、肝脏、脾脏和肺脏及注射部位组织制成 H-E 染色及冰冻切片,在荧光显微镜下观察,肿瘤组织、肝脏、脾脏和肺脏组织均未发现成纤维细胞的存在,只在注射点局部发现成纤维细胞的浓集(图 1C、D;图 2 E1 ~ H1, E2 ~ H2)。CIK 细胞组小鼠肿瘤组织内 CIK 细胞荧光面积为 0.0190 ± 0.0087 ,成纤维细胞组肿瘤组织中无荧光染色,两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 CIK 细胞对裸鼠移植胃癌的抑制作用

胃癌细胞 SGC-7901 种植于裸鼠腹股沟皮下 3 d 后出现皮下结节,种植 7 d 后肿瘤体积约为 62.48 mm^3 ,其后肿瘤体积迅速增长。成瘤后随机分为 2 组,给予不同的治疗方法。第 14 天时成纤维细胞组荷瘤裸鼠瘤体平均体积为 $(2.67 \pm 0.28) \text{ cm}^3$;CIK 细胞组的肿瘤体积为 $(1.41 \pm 0.52) \text{ cm}^3$ 抑瘤率为 29.82%。无论从瘤体体积以及抑瘤率来看,CIK 细胞组裸鼠的治疗效果明显优于成纤维细胞对照组。

第 14 天时处死裸鼠,两治疗组裸鼠瘤组织进行常规病理切片,H-E 染色,显微镜下观察肿瘤坏死情况。成纤维细胞组裸鼠肿瘤内无明显坏死,而 CIK 细胞组坏死较多。对肿瘤组织坏死面积评分:CIK 细胞组平均为 (1.41 ± 0.52) 分,成纤维细胞对照组为 0 分。两组间差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。显示 CIK 治疗对胃癌细胞有显著的杀伤作用(图 3,表 1)。

3 讨论

靶向性细胞载体在基因治疗中起着特异的导向作用,是基因治疗能否成功的前提条件^[7]。CIK 细胞作为载体已应用于胃癌的治疗^[8],证实这些生物细胞能靶向胃癌,具有诊断与治疗价值。本实验用染料标记 CIK 细胞,观察其在荷胃癌裸鼠体内各组织中的分布情况;在 CIK 细胞抑瘤实验中观察 CIK

细胞对胃癌种植瘤的抑制,为 CIK 细胞靶向胃癌治疗提供依据。

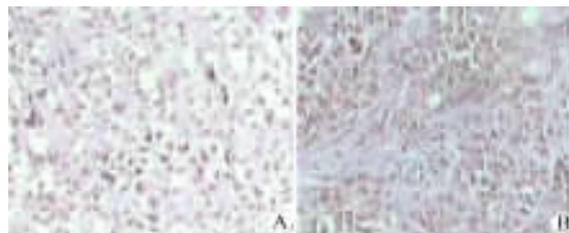


图 3 CIK 细胞治疗后裸鼠移植胃癌组织的病理变化(H-E, ×200)

Fig.3 Pathological changes of tumor tissues in gastric cancer implanted mice after CIK treatment (H-E, ×200)

A: Fibroblast treatment; B: CIK cell treatment

表 1 CIK 细胞对移植胃癌的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Inhibitory effect of CIK cells against implanted gastric cancer

Group	Tumor volume (V/cm ³)	Inhibitory rate(%)	Necrosis score
Fibroblast	2.67 ± 0.28	-	0
CIK	$1.84 \pm 0.25^{**}$	29.82	$1.41 \pm 0.52^{**}$

** $P < 0.01$ vs fibroblast group

NKG2D 是表达于大多数 NK 细胞、CD8⁺T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞及活化的巨噬细胞的活化性受体,通过识别感染细胞及应激细胞表面诱导产生的配体,并与之结合^[8]。最早发现的 NKG2D 配体是人类 MIC,人类基因组分析确定有 7 个 MIC 基因(MICA ~ MICG),其中只有 MICA 和 MICB 编码、表达和转录^[9],这两个基因的编码区有 90% 以上的同源序列。MHC-I 类相关分子 MICA 介导细胞应激时的信号转导,是机体应激的一个标志。CIK 细胞识别靶细胞上的 NKG2D 配体,NKG2D 在应激的状态下表达上调^[10-13],比如细胞在肿瘤的微环境或受病毒感染以后,通过 NKG2D-MICA 系统同时参与调节固有性免疫应答和适应性免疫应答,对肿瘤发生具有免疫监视作用^[14]。这可能从分子机制上解释了 CIK 细胞对胃癌的靶向性,为本实验提供了理论依据。CIK 细胞能够靶向肿瘤,与 NKG2D-MICA 受体、配体之间的相互作用有关系。

活体显像法能观察 CIK 细胞靶向肿瘤的能

力,比如生物发光体内成像检测技术,它从宏观的角度观察 CIK 细胞在肿瘤内的分布,具有直观、特异性高等优点,但这种方法的缺陷在于:只能收集二维空间的发光信号,有可能使不同组织或器官的三维发光信号产生叠加;即使从几个不同视角对动物成像以降低这一限制的影响,但仍然不能解决肺部和腹腔内淋巴结掩盖存在于临近组织(如肝、脾)中的一部分发光信号的问题^[15]。另外,因为发射光的衰减受很多因素的影响,如发光信号距离动物体表的深度以及器官和皮肤的着色等。本实验采用 SP-DiI 荧光染料标记 CIK 细胞,然后以荧光显微镜观察 CIK 在实验动物体内各组织中的分布,克服了上述方法的缺陷,取得了良好的效果。

本研究在 CIK 靶向实验中通过组织冰冻切片、荧光显微镜下观察以及用 Matlab 软件精确计算荧光分布的面积,证实 CIK 细胞的靶向性。实验结果显示:肿瘤组织中荧光分布的面积约是注射局部组织的 8 倍、肝脏组织中的 19 倍、脾脏肺脏组织的 13 倍,说明了 CIK 细胞的定向趋化潜能。从观察细胞本身说明 CIK 细胞在荷胃癌裸鼠体内的分布,不受组织距离体表深度的影响;而且采取连续冰冻切片的办法可精细观察组织中细胞的分布,与活体显像法相比,具有更加精细、敏感性高、不受发射光衰减的影响等优势。在 CIK 细胞的抑瘤实验中,通过观察种植瘤的大小以及病理切片中肿瘤的坏死面积,直观地证实了 CIK 细胞对胃癌组织的杀伤作用。

本实验证实 CIK 细胞在移植胃癌组织内高度浓集,且能有效杀伤胃癌细胞,因此 CIK 细胞有应用于临床的良好前景。

[参考文献]

- [1] 代震波,毛伟征,牛兆建,等. 体外扩增 CIK 细胞杀伤胃癌细胞 SGC-7901 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(2): 100-103.
- [2] 安岗,毛伟征,代震波,等. 抗原致敏树突细胞增强细胞因子诱导杀伤细胞抗胃癌的效应 [J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(4): 422-424.
- [3] 于津浦,任秀宝,刘虹,等. CIK 细胞中 CD4⁺ T 细胞亚群抗肿瘤免疫活性 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(2):

126-129.

- [4] Sun S, Li X, Li X, *et al.* Studies on inducing apoptosis effects and mechanism of CIK cells for MGC-803 gastric cancer cell lines [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2005, 20(2): 173-180.
- [5] Hardy J, Francis KP, Deboer M, *et al.* Extracellular replication of listeria monocytogenes in the murine gall bladder [J]. *Science*, 2004, 303 (5659): 851-853.
- [6] Zhang N, Fang Z, Contag PR, *et al.* Tracking angiogenesis induced by skin wounding and contact hypersensitivity using a Vegfr2-luciferase transgenic mouse [J]. *Blood*, 2004, 103 (2): 617-626.
- [7] 钱其军,张琪. 肿瘤靶向治疗的现状与展望 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(4): 239-242.
- [8] Thorne SH, Negrin RS, Contag CH. Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy [J]. *Science*, 2006, 311(5768): 1780-1784.
- [9] Kato N, Tanaka J, Sugita J, *et al.* Regulation of the expression of MHC class I -related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells [J]. *Leukemia*, 2007, 21(10): 2103-2108.
- [10] Strid J, Roberts SJ, Filler RB, *et al.* Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(2): 146-154.
- [11] Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity [J]. *Oncogene*, 2008, 27(45): 5944-5958.
- [12] Spies T. Regulation of NKG2D ligands: a purposeful but delicate affair [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(9): 1013-1015.
- [13] Zhang S, Hue S, Sene D, *et al.* Expression of major histocompatibility complex class I chain-related molecule A, NKG2D, and transforming growth factor-beta in the liver of human with alveolar echinococcosis: new actors in the tolerance to parasites [J]? *J Infect Dis*, 2008, 197(9): 1341-1349.
- [14] Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV, *et al.* Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: Role of the MICA-NKG2D system [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007, 18(1-2): 159-170.
- [15] Luker GD, Prior JL, Song J, *et al.* Bioluminescence imaging reveals systemic dissemination of herpes simplex virus type 1 in the absence of interferon receptors [J]. *J Virol*, 2003, 77(20): 11082-11093.

[收稿日期] 2009 - 01 - 14

[修回日期] 2009 - 04 - 11

[本文编辑] 韩丹

欢迎投稿、欢迎订阅

《中国肿瘤生物治疗杂志》