

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.018

两种不同成分培养基制备 CIK 细胞的生物学特征

Biologic specificity of cytokine-induced killer cells derived from two different culture systems

郑秀娟, 刘荣军, 李丽, 张一评, 汪强(上海复仁生物科技有限公司, 上海 200032)

[摘要] 目的: 采用细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cell, CIK cell)培养基(含低浓度 IL-2、IFN- γ 、IL-12 和 anti-CD3)和 NK 培养基(含高浓度 IL-2 和 anti-CD3)体外刺激诱导 CIK, 分析 CIK 细胞的扩增、表型和细胞因子分泌情况。**方法:** 健康自愿者来源的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 分别加入 CIK 培养基和 NK 培养基进行诱导培养, 24 h 后, 换用含 IL-2 的 1% 自体血浆培养基继续诱导培养 2 周。在培养的第 6 天和第 10 天检测培养上清中 IFN- γ 的分泌情况, 在培养的第 10 天以流式细胞术检测两组培养细胞表面 CD3、CD4、CD8、CD16、CD56 的表达情况。**结果:** CIK 培养基和 NK 培养基均可使培养细胞在第 7 天时开始明显扩增, 第 10 天时可扩增至 200 倍。其中, CIK 培养基获得的细胞扩增倍数明显高于 NK 培养基, 其 IFN- γ 分泌明显高于 NK 培养基组[(724.7 \pm 434.8) vs (108.9 \pm 60.6) pg/ml, $P < 0.01$]; 而以 NK 培养基培养的细胞, CD3⁻CD16⁺CD56⁺ 细胞比例高于 CIK 培养基[(6.27 \pm 3.33)% vs (2.88 \pm 1.88)% , $P < 0.05$]。**结论:** 不同成分的 CIK 培养基和 NK 培养基均可促进 CIK 细胞的扩增和成熟, 但呈现不同的生物学特征。

[关键词] 外周血单个核细胞; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 细胞表型

[中图分类号] R730.51; R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)03-0317-03

细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cell, CIK)是一类由特定细胞因子诱导产生的具有肿瘤杀伤活性的免疫活性细胞的统称。CIK 具有增殖速度快、杀瘤活性高、杀瘤谱广、毒性作用小等优点^[1]。自 1993 年美国发表 CIK 治疗肿瘤研究报告以来, CIK 受到国内外学者的广泛关注^[2,4]。国内的一些临床研究机构也相继开展了这方面的研究工作并取得了一定的成效^[5,6]。但是, 目前 CIK 细胞的制备尚没有统一的规范, 各个研究中心报道的培养方法并不一致, 所制备 CIK 细胞的扩增倍数、细胞表型、生物学活性等均存在一定的差异。本研究利用含细胞因子的两种不同培养基, 将人外周血淋巴细胞诱导成 CIK, 分析不同培养基获得的 CIK 细胞的扩增倍数, 细胞表型等生物学特征, 旨在为临床 CIK 治疗提供相应的参考。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

无血清培养基购自宝日医北京有限公司, 细胞因子购自联科生物科技有限公司, 流式细胞仪检测用抗人 CD3、CD4、CD16、CD56 荧光抗体购自 BD 公司。IL-4、IFN- γ ELISA 检测试剂盒为 eBioscience 公司产品。

1.2 CIK 细胞培养

取肝素抗凝的健康志愿者外周血 30 ml, 用人淋

巴细胞分离液密度梯度离心(2 000 \times g, 20 min), 轻轻吸取灰白色层单个核细胞, 置于 15 ml 离心管中, 经生理盐水洗涤 3 次。用 CIK 培养基(含低浓度 IL-2、IFN- γ 、IL-12 和 anti-CD3)或 NK 培养基(含高浓度 IL-2 和 anti-CD3)悬浮细胞, 调整细胞密度 1×10^5 /ml, 加入 12 孔板中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养。培养 24 ~ 48 h, 收集细胞, 洗涤离心后, 加入含 1% 自体血浆和 1 000 U/ml IL-2 的培养基继续培养, 根据细胞生长情况更换培养液并扩大培养。

1.3 显微镜观察 CIK 细胞的增殖

细胞培养至第 4、7、10 天时, 显微镜下观察细胞生长情况; 取样进行细胞计数, 用台盼蓝染色检测细胞活力。

1.4 流式细胞仪检测 CIK 细胞表型

细胞培养 10 d 后, 取一定数量细胞洗涤离心, 用 PBS 调整细胞密度至 1×10^6 /ml, 加入流式细胞检测管中, 200 μ l/管; 分别加入不同荧光标记的抗人 CD3、CD4、CD8、CD16、CD56 抗体, 置暗处 4 $^{\circ}$ C 标记 20 min, PBS 洗涤 2 次, 用流式细胞仪进行检测。

1.5 ELISA 检测培养上清中 IFN- γ 的水平

细胞培养至第 6 天和第 10 天时, 采集细胞培养

[作者简介] 郑秀娟(1956 -), 女, 上海市人, 主管技师, 主要从事肿瘤生物治疗技术开发方面的研究。E-mail: 335443928@qq.com

[通信作者] 汪强(WANG Qiang, corresponding author), E-mail: wq_hhq@msn.com

上清,ELISA 检测培养上清中 IFN- γ 的水平。

1.6 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种培养基体外诱导 CIK 细胞的增殖水平

实验结果(图 1)显示,从外周血分离单个核细胞体外经 CIK 培养基($n = 17$)诱导培养至第 4、7、10 天时,细胞平均扩增倍数为 5、116 和 252 倍;经 NK 培养基($n = 10$)诱导培养至第 4、7、10 天时,细胞平均扩增倍数为 4.5、73 和 150 倍。至第 10 天时,用 CIK 培养基获得的 CIK 细胞扩增倍数明显高于 NK 培养基($P < 0.05$)。培养期间,台盼蓝染色活力检测显示,以两种培养基获得的 CIK 细胞活力均 $> 98\%$ 。NK 培养基诱导 7 d 的 CIK 细胞呈明显克隆生长,但单一克隆扩增量较 CIK 培养基的少。

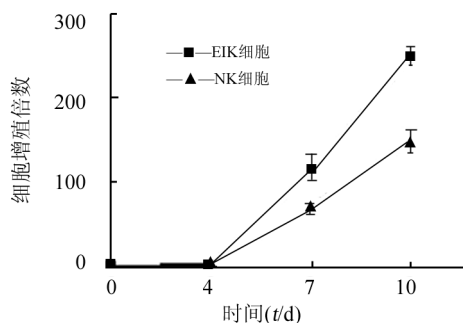


图 1 两种培养基诱导 CIK 细胞的增殖水平

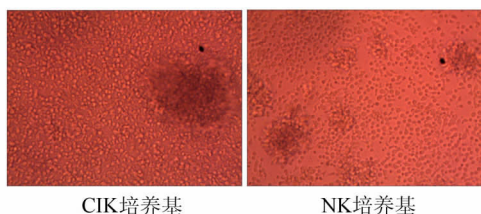


图 2 两种培养基诱导的 CIK 细胞形态($\times 200$)

2.2 两种培养基诱导的 CIK 细胞表型

细胞培养至第 10 天时,流式细胞术进行检测,结果(图 3,表 1)显示,CIK 培养基和 NK 培养基诱导的 CIK 细胞中 $CD3^- CD16^+ CD56^+$ 细胞百分比分别为(2.88 ± 1.88)% 和(6.27 ± 3.33)% ($P < 0.05$), $CD3^+ CD16^+ CD56^+$ 细胞百分比为(5.39 ± 3.16)% 和(4.50 ± 2.96)%; $CD3^+$ 细胞的百分比分别为(91.14 ± 5.33)% 和(80.03 ± 15.63)%, $CD4/$

$CD8$ 分别为 $1:2.27$ 和 $1:4.54$ 。

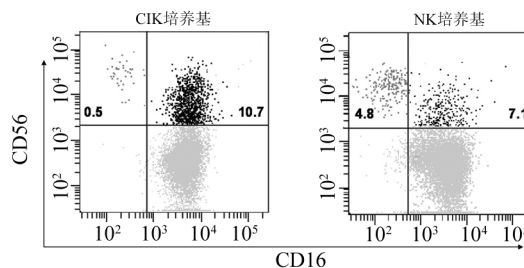


图 3 两种培养基诱导第 10 天的 $CD3^+$ T 细胞表面 $CD16$ 和 $CD56$ 的表达

表 1 两种培养基诱导第 10 天获得的 CIK 细胞的表型

组别	CIK 培养基	NK 培养基	P 值
CD3	91.14 ± 5.33	80.03 ± 15.63	-
CD4	24.75 ± 12.48	14.20 ± 3.46	-
CD8	56.10 ± 15.11	64.53 ± 13.05	-
$CD3^- CD16^+ CD56^+$	2.88 ± 1.88	6.27 ± 3.33	< 0.05
$CD3^+ CD16^+ CD56^+$	5.39 ± 3.16	4.50 ± 2.96	> 0.05

2.3 两种培养基诱导的 CIK 细胞的 IFN- γ 分泌

细胞培养至第 6 天和 10 天时分别取培养上清,ELISA 检测 IFN- γ 的分泌水平,结果见图 4。CIK 培养基($n = 12$)诱导培养至第 6 天和第 10 天时,培养上清中 IFN- γ 分别为(279.7 ± 202.0)和(724.7 ± 434.8) pg/ml ;NK 培养基($n = 7$)诱导培养至第 6 天和第 10 天时,培养上清中 IFN- γ 的浓度分别为(167.9 ± 91.2)和(108.9 ± 60.6) pg/ml 。检测结果提示,CIK 培养基诱导培养所获得的 CIK 细胞 IFN- γ 分泌水平明显高于 NK 培养基。

3 讨论

免疫细胞疗法是肿瘤生物治疗的重要方法之一^[7-9]。自上世纪 90 年代发现 CIK 细胞以来,人们尝试了多种细胞因子组合培养体系,以期获得肿瘤杀伤活性更强、体内存活时间更长、扩增能力更高的 CIK 细胞^[10-12]。Hontscha 等^[13]报道,CIK 在多种恶性肿瘤,包括肝细胞癌、胃癌、Hodgkin 和非 Hodgkin 病的辅助治疗中均具有一定的疗效,患者的总体反应率可达 23.7%($91/384$),其疗效主要体现在控制肿瘤复发及提高生活质量等方面。CIK 细胞治疗肿瘤的疗效主要取决于输注的有效细胞数量及其杀伤

活性^[14-15]。尽管目前国内已有多家临床机构在开展 CIK 治疗恶性肿瘤的临床应用研究,但是所采用的 CIK 培养方法并无统一的标准,基于现有培养体系获得的 CIK 细胞,在细胞扩增倍数、细胞表型、生物学活性等方面均存在一定的差别^[16-19]。

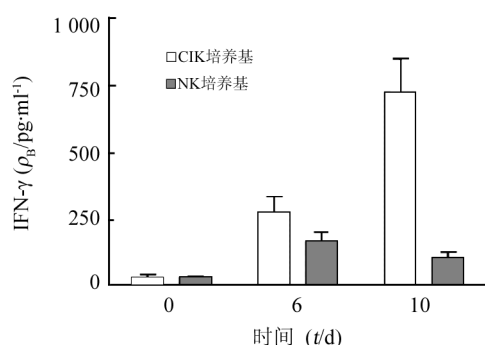


图 4 两种培养基诱导的 CIK 细胞 IFN- γ 的分泌

* $P < 0.05$ vs NK 培养基

本研究比较了两种含不同细胞因子组合的培养基诱导刺激对人外周血单个核细胞制备 CIK 的影响,结果发现,两种培养基诱导刺激均可使培养细胞在第 7 天时即开始明显扩增,在培养 10 d 时即可扩增至 200 倍左右,但用 CIK 培养基获得的 CIK 细胞扩增能力明显高于 NK 培养基。NK 培养基所获得的 CIK 细胞中,CD3⁻CD16⁺CD56⁺细胞的比例稍有增加,但仍以 CD3⁺细胞为主。在细胞因子分泌方面,CIK 培养基获得的 CIK 细胞至培养第 10 天时,培养上清中 IFN- γ 的分泌明显上升,可达培养第 6 天时的 3 倍;而 NK 培养基获得的 CIK 细胞培养上清中 IFN- γ 的水平在培养第 6 天和第 10 天时无明显增加,个别样本还有所下降。本实验结果提供了两种不同效应 CIK 细胞的体外培养方法,为今后临床上体外高效扩增培养 CIK 提供了一定的参考。

[参 考 文 献]

[1] 吴肇颢,徐建民. CIK 细胞:过去、现在与将来 [J]. 中国临床医学, 2006, 13(5): 782-784.

[2] Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: Immune-related response criteria [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(23): 7412-7420.

[3] Chan JK, Hamilton CA, Cheung MK, et al. Enhanced killing of primary ovarian cancer by retargeting autologous cytokine-induced killer cells with bispecific antibodies: A preclinical study [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6): 1859-1867.

[4] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [J]. J Cancer, 2011, 2: 363-368.

[5] Hui D, Qiang L, Jian W, et al. A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma [J]. Dig Liver Dis, 2009, 41(1): 36-41.

[6] Shi M, Zhang B, Tang ZR, et al. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(8): 1146-1151.

[7] 钱其军,吴孟超. 肿瘤过继细胞治疗——老故事新演绎 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(1): 1-6.

[8] Dayyani F, Gallick GE, Logothetis CJ, et al. Novel therapies for metastatic castrate-resistant prostate cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103(22): 1665-1675.

[9] Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer [J]. N Engl J Med, 1985, 313(23): 1485-1492.

[10] Fujimiya Y, Suzuki Y, Katakura R, et al. *In vitro* interleukin 12 activation of peripheral blood CD3(+)CD56(+) and CD3(+)CD56(-) gammadelta T cells from glioblastoma patients [J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(4): 633-643.

[11] Mesiano G, Todorovic M, Gammaitoni L, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors [J]. Expert Opin Biol Ther, 2012.

[12] Lin G, Wang J, Lao X, et al. Interleukin-6 inhibits regulatory T cells and improves the proliferation and cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells [J]. J Immunother, 2012, 35(4): 337-343.

[13] Hontscha C, Borck Y, Zhou H, et al. Clinical trials on CIK cells: First report of the international registry on CIK cells (IRCC) [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(2): 305-310.

[14] 王惠成,冯毅,戴国华. CIK 细胞免疫治疗原发性肝癌的研究进展 [J]. 国际消化病杂志, 2011, 31(4): 223-227.

[15] 杜清友,刘明旭,王福生,等. CIK 细胞体内外抗肝癌细胞作用 [J]. 中国癌症杂志, 2001, 11(4): 325-327, 330.

[16] 孙耘玉,陈宝安,高冲,等. CIK 细胞治疗难治复发性非霍奇金淋巴瘤临床观察 [J]. 白血病·淋巴瘤, 2007, 16(4): 255-258.

[17] 艾丽梅,毛淑丹,宋盈盈. DC-CIK 细胞体外抗淋巴瘤细胞的免疫效应研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(10): 898-900.

[18] 方慧云,程伟民,李晓玲,等. CIK 细胞对晚期非小细胞肺癌预后的影响 [J]. 实用癌症杂志, 2011, 26(6): 573-574.

[19] 杨莉莉,曹水,李慧,等. DC + CIK 联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床疗效评价 [J]. 中国肿瘤临床, 2009, 36(17): 969-971.

[收稿日期] 2012 - 01 - 23

[修回日期] 2012 - 04 - 15

[本文编辑] 韩丹