

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.006

· 基础研究 ·

## CIK 体内外抗宫颈癌 HeLa 细胞的作用及其荷瘤小鼠体内分布特点

艾军<sup>1</sup>, 白引苗<sup>2</sup>, 李巧霞<sup>1</sup>, 张超<sup>1</sup>, 单保恩<sup>1</sup> (1. 河北医科大学第四医院暨河北省肿瘤研究所, 河北石家庄 050011; 2. 第四军医大学西京医院肿瘤科, 陕西西安 710030)

**[摘要]** **目的:**探讨细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)对荧光素酶标记的人宫颈癌 HeLa-luc 细胞的体内外抗肿瘤作用,了解 CIK 回输荷瘤小鼠后在不同器官的分布特点。**方法:**由健康志愿者外周血单个核细胞体外诱导培养 CIK,流式细胞术检测 CIK 表面分子的表达,RT-PCR 法检测 *IFN- $\gamma$*  mRNA 的表达,MTT 法和瑞氏-姬姆萨染色测定 CIK 对 HeLa-luc 细胞的杀伤作用。建立荷 HeLa-luc 瘤 BALB/c 裸鼠模型,体内成像系统观察荷瘤小鼠肿瘤大小变化及 CIK 治疗效果,共聚焦显微镜观察不同器官中 CIK 的分布情况。**结果:**CIK 在体外诱导培养 14~21 d,其生长达到高峰,此时 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T 细胞的比例增加 50 倍以上,*IFN- $\gamma$*  mRNA 表达水平也达到高峰。在效靶比为 20:1、40:1 时,CIK 对 HeLa-luc 细胞的杀伤率分别为(51.16±2.64)%、(72.14±4.21)%,明显高于对照组的(16.33±3.09)%、(21.26±2.71)%( $P<0.05$ )。CIK 治疗 5 周和 8 周后,对荷瘤小鼠的抑瘤率分别为 47.18%、64.38%。CIK 治疗组荷瘤小鼠外周血中 *IFN- $\gamma$*  水平为(61.92±6.49)pg/ml,明显高于对照组的(34.30±1.78)pg/ml( $P<0.05$ )。CFSE 标记的 CIK 经腹腔和瘤旁注射入荷瘤小鼠 3 h,在肺、肝、脾、外周血、肿瘤中均可观察到绿色荧光;腹腔途径注射 24 h 时,肿瘤组织中 CIK 浓度达到高峰(20.56±1.72)%;瘤旁途径注射 3 h 时,肿瘤组织中 CIK 达到高峰(25.75±3.45)%。**结论:**CIK 在体内外对宫颈癌 HeLa-luc 细胞均有较强的杀伤作用,CIK 经不同途径注射荷瘤小鼠后可以广泛分布于全身器官,其到达各脏器的浓度与输注途径及时间密切相关。

**[关键词]** 细胞因子诱导的杀伤细胞;宫颈癌;HeLa-luc 细胞;*IFN- $\gamma$* ;抗肿瘤作用;体内分布

**[中图分类号]** R737.33; R730.51

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)04-0374-07

## Anti-tumor activity of CIK cells on cervical cancer HeLa cells *in vitro* and *in vivo* and their distribution characteristics in tumor-bearing mice

AI Jun<sup>1</sup>, BAI Yin-miao<sup>2</sup>, LI Qiao-xia<sup>1</sup>, ZHANG Chao<sup>1</sup>, SHAN Bao-en<sup>1</sup> (1. Tumor Research Institute of Hebei Province, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Oncology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710030, Shaanxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the anti-tumor activity of cytokine-induced killer cells (CIK cells) against HeLa-luc cells (cervical cancer HeLa cells labeling luciferase) *in vivo* and *in vitro*, and to analyze the distribution characteristics of CIK cells in different organs in a mouse xenograft model of cervical cancer nude. **Methods:** CIK cells were induced from peripheral blood mononuclear cells of health volunteers and cultured *in vitro*. The phenotype of CIK cells were determined by flow cytometry. The expression of *IFN- $\gamma$*  mRNA in CIK cells was detected by RT-PCR assay. The killing activity of CIK cells on HeLa-luc cells was determined by MTT assay and Wright-Giemsa's staining. HeLa-luc cell-bearing BALB/c nude mouse model was established. Tumor size changes and treatment effect were detected using *in vivo* Xenogen IVIS Imaging System. The distribution characteristics of CIK cells in different organs were detected by confocal microscopy. **Results:** CIK cells grew up to the peak after being cultured for 14-21 d. The percentage of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T cells was increased more 50 times than that of the beginning. The expression level of *IFN- $\gamma$*  mRNA in CIK cells was also increased to

**[基金项目]** 河北省科技计划资助项目(No. 09276101D-29);河北省高校强势特色学科资助项目(No. 200552)。Project supported by the Science and Technology Projects of Hebei Province (No. 09276101D-29), and the Key Specific Discipline Foundation of Higher Institutions of Hebei Province (No. 200552)

**[作者简介]** 艾军(1956-)女,河北省河间市人,教授,硕士生导师,主要从事肿瘤生物治疗方面研究。E-mail: liangaiyudi@yahoo.com.cn

**[通信作者]** 单保恩(SHAN Bao-en, corresponding author), E-mail: baoenshan@yahoo.com.cn

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120727.1056.003.html>

the peak. When the ratios of effect to target were 20:1, and 40:1, the cytotoxicity of CIK cells on HeLa-luc cells was ( $51.16 \pm 2.64$ )% and ( $72.14\% \pm 4.21$ )%, respectively, and was significantly higher than that of the control group ( $[16.33 \pm 3.09]$ %,  $[21.26 \pm 2.71]$ %, respectively,  $P < 0.05$ ). The inhibitory rate of CIK cells on the tumor was 47.18% and 64.38% at the fifth week and the eighth week, respectively. The level of IFN- $\gamma$  mRNA in the CIK experiment group ( $61.92 \pm 6.49$ ) pg/ml was significantly higher than that in the control group ( $34.30 \pm 1.78$ ) pg/ml ( $P < 0.05$ ). Green fluorescence can be observed in the lung, liver, spleen, peripheral blood and tumor tissues under the confocal microscope 3 h after CFSE-labeled CIK cells injection via peritoneal cavity and tumor adjacent. 24 h after injection via peritoneal cavity, the highest concentration of CIK cells was 20.56% in the tumor tissues, and 3 h after injection via tumor adjacent, the highest concentration of CIK cells was 25.75% in the tumor tissues. **Conclusion:** CIK cells show a strong cytotoxicity on cervical cancer HeLa-luc cells *in vivo* and *in vitro*. The CIK cells are extensively distributed into different organs after injection via peritoneal cavity or tumor adjacent. The concentration of CIK cells in different organ is closely related to the injection route and time.

[ **Key words** ] cytokine-induced killer cell; cervical cancer; HeLa-luc cell; IFN- $\gamma$ ; anti-tumor effect; distribution pattern *in vivo*

[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19(4): 374-380 ]

过继免疫治疗(adoptive cellular immunotherapy, ACI)是生物治疗的一种,它是一种将具有抗肿瘤活性的、能直接或间接介导抗肿瘤效应的免疫细胞输注肿瘤宿主体内进行肿瘤治疗的方法,对于促进患者免疫系统的重建、消除残留病变及骨髓净化都具有良好效果<sup>[1-2]</sup>。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIK)是一种新型、高效、广谱的免疫细胞,为目前最新的肿瘤过继免疫治疗的方法<sup>[3-5]</sup>。近年来 CIK 治疗在临床上取得了可喜的成绩,多项研究<sup>[6-8]</sup>结果显示,CIK 抗肿瘤作用较强,毒性作用较弱。但 CIK 治疗仍存有一些问题,如 CIK 的培养最佳时间、给药途径及细胞在瘤体的分布等有待于进一步深入探讨。本课题以荧光素酶标记的宫颈癌细胞 HeLa-luc 为研究对象,建立荷瘤小鼠模型,通过腹腔、瘤周两种途径回输 CIK,观察其在荷瘤小鼠体内的分布情况,研究 CIK 体内外抗肿瘤作用,初步探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

荧光素酶标记的人宫颈癌 HeLa 细胞株(HeLa-luc 细胞)由美国 Zongmed 公司惠赠;SPF 级 4~5 周龄免疫缺陷 BALB/c 裸鼠,48 只,雌性,体重 12~15 g,购自中科院北京实验动物中心(实验动物合格证号:Scxk 京-2005-0013)。Xenogen IVIS Imaging System(精诺真成像系统)系美国 Zongmed 公司产品,流式细胞仪(EPICS-XL 型)系美国 Beckman Coulter 公司产品;激光共聚焦显微镜(LSM510 型)购自德国 Carlzeiss 公司。人重组 IL-1、IFN- $\gamma$ 、IL-2 和抗

CD3 单抗购自 Peprotech 公司,FITC-抗 CD3 抗体、PE-抗 CD56 抗体、FITC-抗 CD4 抗体和 PE-抗 CD8 抗体购自北京晶美基因谷科技有限公司,荧光素酶购自 Xenogen 公司,CFSE 购自美国 Invitrogen 公司。

### 1.2 CIK 细胞的体外诱导培养

采集健康志愿者外周血,经密度梯度离心法提取单个核细胞,按一定顺序添加人重组 IFN- $\gamma$ 、IL-1、IL-2 和抗 CD3 单抗进行培养,不同培养时间收集 CIK 细胞,并通过流式细胞技术进行表型鉴定。

### 1.3 RT-PCR 法检测 CIK 中 IFN- $\gamma$ mRNA 的表达

常规提取 CIK 的 RNA,经 RT-PCR 法检测培养不同时间 CIK 中 IFN- $\gamma$  mRNA 表达水平变化。 $\beta$ -actin 上游引物为 5'-AGCCCTTCTCAAGGACCAC-3',下游引物为 5'-GCACTTCTCCGCAGTTTCC-3'。IFN- $\gamma$  上游引物为 5'-GCATCGTTTTGGTTCTCTTG-GCTGTTACTGC-3';下游引物为 5'-CTCCTTTTCGCTTCCCTGTTTTAGCTGCTGC-3'。 $\beta$ -actin PCR 参数:95 °C 2 min $\rightarrow$ 94 °C 30 s $\rightarrow$ 55 °C 30 s $\rightarrow$ 72 °C 30 s,共 35 次,72 °C 5 min;IFN- $\gamma$  PCR 参数:95 °C 2 min $\rightarrow$ 94 °C 45 s $\rightarrow$ 63 °C 1 min $\rightarrow$ 72 °C 30 s,共 40 次,72 °C 5 min。

### 1.4 MTT 法及瑞氏-姬姆萨染色法检测 CIK 对 HeLa-luc 细胞的杀伤作用

收集 CIK 及对数生长期的 HeLa-luc 细胞制成单细胞悬液,以 HeLa-luc 细胞作为靶细胞接种于 96 孔板中, $1 \times 10^4$ /孔,CIK 作为效应细胞,以效靶比为 20:1 和 40:1 进行作用,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h。在培养结束前 4 h,加入 MTT (5 mg/ml) 20  $\mu$ l/孔,继续培养至实验结束。1 000  $\times$  g 离心 5 min

后弃上清,加入 DMSO 150  $\mu\text{l}$ /孔,振荡 10 min,用酶标检测仪测定各孔在 492 nm 的光密度值( $D$ ),按以下公式计算杀伤率:杀伤率(%) = [1 - (实验孔  $D$  值 - 效应细胞空白对照组  $D$  值) / 靶细胞空白对照组  $D$  值]  $\times$  100%。

瑞氏-姬姆萨染色法观察 CIK 作用前后 HeLa-luc 细胞的形态变化:6 孔板中放入无菌玻片,将 CIK 与 HeLa-luc 细胞铺于玻片上,进行细胞爬片 48 h;取出玻片滴加瑞氏-姬姆萨 A 溶液 0.5 ~ 0.8 ml,染液覆盖于整个玻片,染色 1 min;将瑞氏-姬姆萨 B 溶液 1.5 ~ 2 ml 加于 A 液面上,用吸耳球微吹使 A、B 液充分混匀,染色 5 ~ 10 min。水洗、干燥后显微镜下观察。

### 1.5 建立荷瘤小鼠模型

收集处于对数生长期的 HeLa-luc 细胞,经裸鼠的右侧胸背部皮下注射 HeLa-luc 细胞  $1 \times 10^7$ /只,建立荷瘤鼠模型。将荷瘤鼠分为两部分,一部分用于体内治疗实验,一部分用于 CIK 体内分布实验。

### 1.6 CIK 体内抗肿瘤作用

将荷瘤小鼠 12 只随机分为实验组和对照组,实验组经瘤旁途径注射 CIK 0.2 ml/(只·次),细胞  $6 \times 10^7 \sim 7 \times 10^7$  个/次,共进行 4 次治疗,总计 CIK 细胞  $2.5 \times 10^8$ /只。对照组经瘤旁途径注射 PBS,0.2 ml/次。每次治疗 7 d 后用活体成像技术观察肿瘤大小,并用游标卡尺测量荷瘤小鼠移植瘤大小(长径和短径),按公式(体积 = 长径  $\times$  短径<sup>2</sup>/2)计算肿瘤体积,并绘制肿瘤生长曲线。成瘤 5 周和 8 周后分别处死实验组和对照组各 3 只小鼠,剥离肿瘤组织,滤纸吸干后称重,计算抑瘤率。抑瘤率(%) = 1 - [治疗组肿瘤质量(或体积) / 对照组肿瘤质量(或体积)]  $\times$  100%。总抑瘤率为质量及体积两组抑瘤率的均数。留取外周血用于 ELISA 法检测血清中 IFN- $\gamma$  的含量。

### 1.7 激光共聚焦显微镜观察 CIK 的体内分布

收集体外经细胞因子培养 14 d 的 CIK,以 CFSE 荧光染料染色,采用激光共聚焦技术观察标记情况。以生理盐水悬浮 CFSE 标记好的 CIK,调整密度为  $2 \times 10^8$ /ml。将荷瘤小鼠随机分为腹腔注射组、瘤周注射组、对照组。每只荷瘤小鼠经腹腔或瘤周注射 0.1 ml CIK 悬液,对照组在相应部位注射 PBS。于注射 CIK 后 3、6、12、24 h,分别处死各个注射途径及对照组荷瘤小鼠各 3 只,取荷瘤小鼠的肺、肝、脾、肿瘤组织,并取血样 0.1 ml。剪碎待测组织均浆后,制成单细胞悬液,用激光共聚焦显微镜测定绿色荧光强度了解 CIK 的分布情况,调整激发波长为 488

nm,荧光信号的检测通道为 505 nm 的长通滤光片。

### 1.8 统计学处理

应用 SPSS11.5 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数比较用  $t$  检验,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P > 0.05$  和  $P > 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CIK 细胞增殖活性

将人外周血单个核细胞体外经细胞因子诱导培养成 CIK,开始细胞呈悬浮生长,大小一致,经 7 d 培养后细胞逐渐呈集落状生长,胞膜光滑,未见突起,细胞数目也迅速增多。14 ~ 21 d 时,增殖速度达到高峰,细胞总数可达  $1.8 \times 10^9 \sim 16 \times 10^9$  个,染色检测活细胞比例均超过 95%(图 1)。

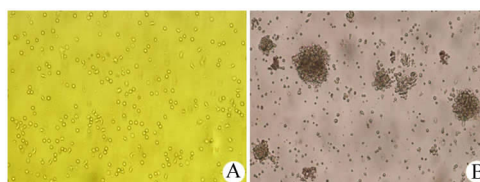


图 1 不同培养时间 CIK 的形态( $\times 200$ )

Fig. 1 Morphology of CIK cells after being cultured for different times ( $\times 200$ )

A: 0 d; B: 14 d

### 2.2 CIK 的免疫表型

不同诱导时间 CIK 表型变化见表 1。在经过 7 d 诱导后,CIK 中  $CD3^+$  T 细胞由(60.0  $\pm$  3.4)% 增加至(76.7  $\pm$  3.6)%;14 d 时达高峰(89.4  $\pm$  2.6)%, $CD3^+$   $CD56^+$  T 细胞数也逐渐明显增多,诱导 14 d, $CD3^+$   $CD56^+$  T 效应细胞的百分率平均为(38.8  $\pm$  2.3)%;而  $CD3^-$   $CD56^+$  T 细胞数明显减少。体外培养 2 周,CIK 的效应细胞数量最高,效应细胞数量增加,预示 CIK 抗肿瘤能力增加<sup>[9]</sup>。

### 2.3 CIK 中 IFN- $\gamma$ mRNA 表达情况

提取体外培养不同时间的细胞点 RNA,RT-PCR 检测结果显示,随着体外培养时间的延长,CIK 中 IFN- $\gamma$  mRNA 表达水平逐渐增加,以培养 14 d 时的 CIK 中 IFN- $\gamma$  mRNA 表达水平最高,以后则逐渐下降。对照组 CIK 中 IFN- $\gamma$  mRNA 表达水平一直处于很低的水平,与培养当天相比无明显变化(图 2)。

### 2.4 CIK 体外杀伤活性

CIK 对 HeLa-luc 细胞有很强的杀伤作用,并呈现明显的效靶比依赖性。经效靶比为 20:1、40:1 的 CIK

作用 48 h,对 HeLa-luc 细胞的杀伤率分别为( 51. 16 ± 2. 64 )%和( 72. 14 ± 4. 21 )%。对照组则为( 16. 33 ± 3. 09 )%和( 21. 26 ± 2. 71 )%(  $P < 0. 05$  )。经瑞氏-姬姆萨染色显微镜下可见:正常靶细胞呈菱形或多边

形,形态饱满,细胞核染色均匀;与 CIK 共培养的靶细胞周围有多个效应细胞围绕,形成花环状,靶细胞膜疏松,胞质中有空泡(图 3)。

表 1 不同培养时间 CIK 表型的变化(  $\bar{x} \pm s, \%$  )

Tab. 1 Phenotype changes of CIK cells after being cultured for different times

Time ( t/d )	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> /CD56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>
0	60.0 ± 3.4	40.4 ± 3.1	25.2 ± 2.2	20.9 ± 2.3	1.4 ± 2.0
7	76.7 ± 3.6	32.8 ± 1.5	44.5 ± 5.3	15.7 ± 4.2	9.3 ± 1.8
14	89.4 ± 2.6**	20.2 ± 2.0	77.5 ± 3.6**	10.9 ± 2.6	38.8 ± 2.3**
21	85.4 ± 3.2	18.9 ± 2.8	72.3 ± 3.4	8.1 ± 1.1	31.0 ± 3.2
28	80.5 ± 2.7	15.2 ± 3.3	54.5 ± 1.6	5.2 ± 0.6	18.5 ± 2.1

\*\*  $P < 0. 01$  vs 0 d group

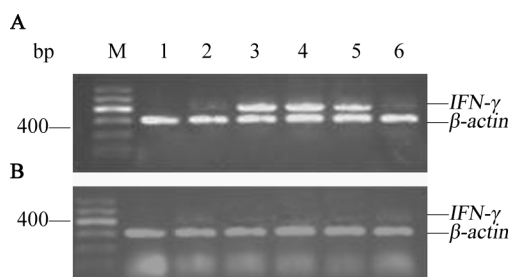


图 2 CIK 中 *IFN-γ* mRNA 的表达水平

Fig. 2 Expression of *IFN-γ* mRNA in CIK cells

A: Cultured with cytokines;

B: Cultured without cytokines

M: DNA maker; 1: 0 d; 2: 7 d; 3: 14 d;

4: 21 d; 5: 28 d; 6: 35 d

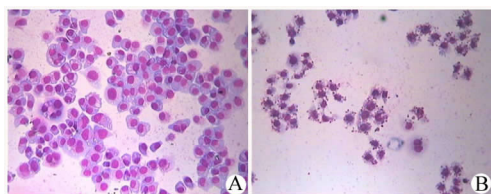


图 3 CIK 作用后 HeLa-luc 细胞的形态学变化( ×200 )

Fig. 3 Morphological changes of HeLa-luc cells treated with CIK cells ( ×200 )

A: HeLa-luc; B: CIK + HeLa-luc

## 2.5 CIK 治疗体内抗肿瘤作用

免疫缺陷型 BALB/c 裸鼠在接种 HeLa-luc 细胞 7 d 后,接种部位出现质地较硬的结节,说明荷瘤小鼠模型成功建立,成瘤率达 100%。荷瘤小鼠瘤旁

注射 CIK 0.2 ml/( 只 · 次 ),细胞(  $6 \times 10^7$  )~(  $7 \times 10^7$  )个/次,共进行 4 次治疗。体内成像系统动态观察结果(图 4)显示:荷瘤小鼠肿瘤明显比对照组减小(  $P < 0. 05$  ),CIK 治疗 5、8 周的总抑瘤率分别为 47. 18%、64. 38%,对照组 5、8 周的总抑瘤率均为 0%。实验组与对照组的差异有统计学意义(  $P < 0. 05$  )。CIK 治疗组荷瘤小鼠血清中 *IFN-γ* 含量(  $61. 92 \pm 6. 49$  )pg/ml,明显高于对照组的(  $34. 30 \pm 1. 78$  )pg/ml(  $P < 0. 05$  )。

## 2.6 腹腔途径回输的 CIK 在荷瘤小鼠体内分布

将 CIK 经腹腔注射荷瘤小鼠 3 h,可在肺、肝、脾、外周血、肿瘤中观察到绿色荧光,以肺脏的分布浓度最高为(  $32. 22 \pm 1. 43$  )%,其次是肝脏,肿瘤组织只有(  $9. 44 \pm 2. 57$  )%;注射 6 h 后观察,肺、肝、脾脏的 CIK 分布浓度逐渐下降,而外周血、肿瘤组织浓度逐渐增加;注射 24 h 后,肿瘤组织中 CIK 浓度达到最高[ (  $20. 56 \pm 1. 72$  )% ],而肺脏浓度最低[ (  $6. 73 \pm 0. 66$  )% ]。CIK 的最大值出现于 6 h 的外周血[ (  $45. 82 \pm 3. 92$  )% ],其次是 12 h 的外周血[ (  $38. 6 \pm 2. 76$  )% ],肿瘤组织的峰值在 24 h 为(  $20. 56 \pm 1. 72$  )%。肝、肺、脾、外周血中 CIK 的峰值分别出现在 3、3、3、6 h(图 5)。去除各器官的自然本底因素,标记细胞在各器官的分布浓度从高到低排列依次为外周血、肺、肝、肿瘤和脾。

## 2.7 瘤旁注射途径回输的 CIK 在荷瘤小鼠体内分布

将 CIK 经瘤旁注射荷瘤小鼠 3 h,同样可以在肺、肝、脾、外周血、肿瘤中观察到绿色荧光,肺脏的分布浓度最高为(  $36. 83 \pm 5. 63$  )%,其次是肿瘤组织[ (  $25. 75 \pm 3. 45$  )% ];注射 6 h 观察,外周血浓度达到

最高为  $(48.02 \pm 7.31)\%$  ,在其他器官的浓度逐渐下降。24 h 观察, CIK 在外周血中浓度为  $(23.41 \pm 3.76)\%$  ,肿瘤组织为  $(13.18 \pm 2.56)\%$  ,肝、脾、肺中的浓度下降到3%以下。CIK 在体内的最大值出现于6 h 的外周血中  $[(48.02 \pm 7.31)\%]$  ,其次是3 h 的肺

中  $[(36.83 \pm 5.63)\%]$  。肿瘤组织的峰值在3 h 达  $(25.75 \pm 3.45)\%$  ,并且是最早的。肝、脾的峰值分别出现在3、6 h。标记细胞在各器官的分布浓度从高到低排列依次为外周血、肺、肿瘤、脾和肝(图6)。

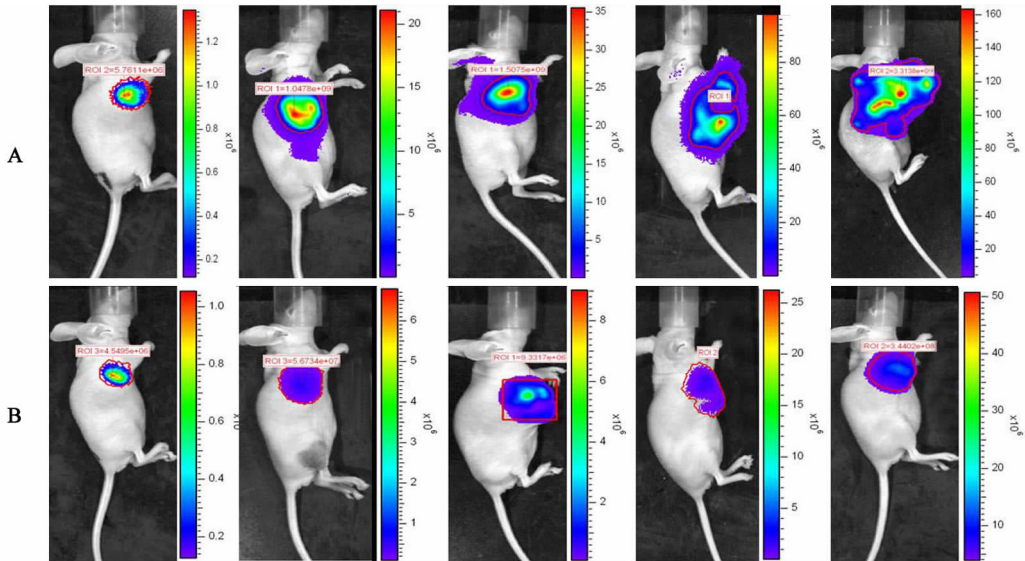


图4 CIK 治疗后 HeLa-luc 细胞种植瘤大小的变化

Fig. 4 Changes of HeLa-luc cell-transplanted tumor size after CIK therapy

A: CIK group; B: Control group

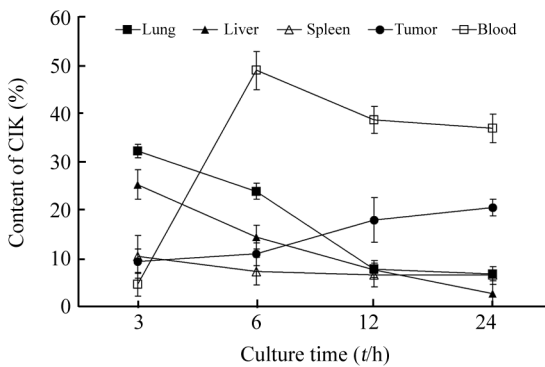


图5 CIK 腹腔输注后在荷瘤小鼠各器官的分布

Fig. 5 Distribution of CIK cells in different organs in tumor-bearing mice after intraperitoneal injection

### 3 讨论

过继免疫治疗的关键是能否获得足够数量并且具有高效杀伤活性的免疫效应细胞。CIK 的体外扩增需要多种外源性细胞因子的刺激。研究<sup>[10-12]</sup>证明, CIK 中发挥作用的主要是  $CD3^+ CD56^+$  T 效应细胞。  $CD3^+ CD56^+$  T 效应细胞在正常人外周血中极

其罕见, 仅为  $1\% \sim 5\%$ <sup>[13]</sup>。本研究中, 培养前的人外周血单个核细胞中  $CD3^+ CD56^+$  T 细胞平均仅占  $1.4\%$  ,经多种细胞因子诱导培养 14 d,  $CD3^+ CD56^+$  T 效应细胞的百分率平均为  $38.8\%$  ,最高达到  $63.34\%$  ,增加了 57.5 倍, 细胞的绝对数量扩增了 1 000 倍以上, 充分体现出 CIK 在细胞因子的作用下扩增能力强的优点。

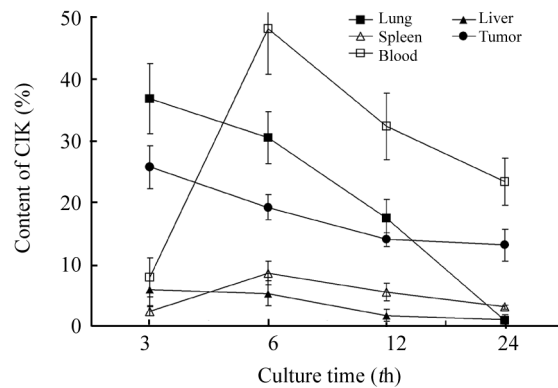


图6 CIK 瘤旁注射后在荷瘤小鼠各器官的分布

Fig. 6 Distribution of CIK cells in different organs in tumor-bearing mice after tumor adjacent injection

CIK 除了增殖速度快以外,还具有强大的抗癌活性和非 MHC 限制性杀瘤优点。体外细胞毒实验结果提示,经细胞因子诱导的 CIK 具有较强的细胞毒活性,随效靶比增高,对靶细胞杀伤活性增强。CIK 作为一种在体外诱导扩增的免疫活性细胞,在体外具有强大的抗癌活性,但作为一种临床治疗手段,其疗效必然要取决于其体内的杀瘤活性。

活体动物体内成像技术是近年来新兴的检测活体动物体内基因表达及细胞活动的光学成像技术。其中生物发光,是将荧光素酶 luc 基因整合到细胞染色体 DNA 上,以表达荧光素酶,当外源给予其底物荧光素,即可在几分钟内产生发光现象。利用此技术可间接反映细胞的增殖数量、肿瘤的大小和肿瘤转移部位以及治疗效果。本研究利用活体动物体内成像技术直观和动态观察了荷瘤小鼠肿瘤生长的大小变化以及 CIK 治疗效果。接种肿瘤细胞 5 d 时,通过活体成像技术就可观察到肿瘤的生长,第 7 天时可肉眼观察到肿瘤,此时成瘤率达 100%。CIK 开始治疗时,实验组荷瘤小鼠的肿瘤生长与对照组没有明显差别,经 2 次 CIK 治疗后,实验组小鼠的肿瘤明显小于对照组,此后,对照组肿瘤迅速增大,而实验组肿瘤处于一种稳定的状态,增长速度明显比对照组缓慢。

Hwan 等<sup>[14]</sup>研究显示,CIK 分泌出大量的 IFN- $\gamma$ ,此外,CIK 可以释放大量 IL-4、IL-2、GM-CSF、TNF- $\gamma$  等细胞因子,诱导效应细胞和/或靶细胞释放更高水平的炎性因子<sup>[15-17]</sup>,这些因子不仅对肿瘤细胞有直接抑制作用,还可以通过调节机体免疫系统间接杀伤肿瘤细胞。本实验对细胞因子诱导的 CIK 培养不同时间 IFN- $\gamma$  mRNA 表达水平进行了检测,结果显示,CIK 在体外诱导培养 14 d 时,细胞增殖达高峰的同时,IFN- $\gamma$  mRNA 表达量也处于最高水平,明显高于培养 0、7、21、28、35 d 时的水平。CIK 治疗组荷瘤鼠外周血中的 IFN- $\gamma$  水平显著高于对照组,提示 CIK 释放效应分子 IFN- $\gamma$ ,IFN- $\gamma$  进一步通过抗肿瘤血管生成及增加肿瘤细胞对 CIK 的敏感性,发挥抗肿瘤作用。

效应细胞能否到达靶器官,实现与肿瘤细胞的直接接触,是影响过继免疫治疗效果的重要因素。了解免疫活性细胞在体内的分布迁徙规律对于其发挥调节免疫、杀伤肿瘤作用来说非常重要<sup>[18]</sup>。本实验结果显示,经腹腔注射 CIK 后,3 h 肺脏 CIK 浓度最高,其次是肝脏。随后肺脏、肝脏中 CIK 含量逐渐降低,24 h 达最低值。这可能与 CIK 进入腹腔后迅速进入血液系统有关。输注 6 h 后,血液中 CIK

浓度达到最高,以后趋于平稳,24 h 的 CIK 浓度维持在(36.83 $\pm$ 2.97)%。肿瘤组织中的 CIK 在注射 3 h 时仅有(9.44 $\pm$ 2.57)%,以后逐渐升高,24 h 浓度达到最高。CIK 经瘤旁回输 3 h,同样可以在肺、肝、脾、外周血、肿瘤中观察到绿色荧光,肺脏的分布浓度最高。不同的是,在 3 h 肿瘤组织中 CIK 达到最高水平,随后在 6~24 h,CIK 的含量趋于稳定。由此可见,CIK 在各脏器的分布规律与不同的输注途径存在一定联系。

综上所述,CIK 在体内外对宫颈癌 HeLa-luc 细胞均有较强的杀伤作用,在体内能明显抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长,其作用机制可能与促进免疫细胞产生 IFN- $\gamma$  有关。将 CIK 经不同途径注射荷瘤小鼠后,可以广泛分布于全身器官,但在各脏器的分布与输注途径的不同有关。提示腹腔注射可能适用于腹腔内肿瘤及恶性腹腔积液的治疗,而瘤旁注射可能适用于体表肿瘤的治疗。

#### [参考文献]

- [1] 黄体龙,杨跃煌. 外周血单个核细胞冻存后诱导为 CIK 及其抗肿瘤效应的研究[J]. 中国小儿血液及肿瘤杂志, 2007, 12(5): 204-208.
- [2] Schmidt-Wolf IG, 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(1): 139-149.
- [3] Wu C, Jiang J, Shi L, et al. Prospective study of chemotherapy in combination with cytokine-induced killer cells in patients suffering from advanced non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2008, 28(6B): 3997-4002.
- [4] 张静,刘亮,于津浦,等. 细胞因子诱导的杀伤细胞治疗肾细胞癌临床疗效的评价[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(5): 480-484.
- [5] Olioso P, Giancola R, Di Riti M, et al. Immunotherapy with cytokine induced killer celler in solid and hematopoietic tumours: A pilot clinical trial[J]. Hematol Oncol, 2009, 27(3): 130-139.
- [6] Li H, Wang C, Yu J, et al. Dendritic cell-activated cytokine-induced killer cells enhance the anti-tumor effect of chemotherapy on non-small cell lung cancer in patients after surgery[J]. Cytotherapy, 2009, 11(8): 1076-1083.
- [7] Jiang JT, Shen YP, Wu CP, et al. Increasing the frequency of CIK cells adoptive immunotherapy may decrease risk of death in gastric cancer patients[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(48): 6155-6162.
- [8] Su X, Zhang L, Jin L, et al. Immunotherapy with cytokine-induced killer cells in metatgatic renal cell carcinoma[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2010, 25(4): 465-470.

[ 9 ] Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, et al. Phenotypic characterization and identification of effectorcell recognition of cytokine-induced killer cells [ J ]. ExpHematol, 1993, 21( 13 ): 1673-1679.

[ 10 ] 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.

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

[ 12 ] Yoon SH, Lee JM, Woo SJ, et al. Transfer of Her-2/neu specificity into cytokine-induced killer ( CIK ) cells with RNA encoding chimeric immune receptor ( CIR ) [ J ]. J Clin Immunol, 2009, 29( 6 ): 806-814.

[ 13 ] 罗虎, 周向东. CIK 及其在肺癌治疗中的研究进展 [ J ]. 中国肺癌杂志, 2011, 14( 12 ): 954-958.

[ 14 ] Hwan MK, Jaeseung L, Yeo DY, et al. Anti-tumor activity of *ex vivo* expanded cytokine-induced killer cells against human hepatocellular carcinoma [ J ]. Int Immunopharmacol, 2007, 7( 13 ): 1793-1801.

[ 15 ] Kornacker M, Moldenhauer G, Herbst M, et al. Cytokine-induced killer cells against autologous CLL: Direct cytotoxic effects and induction of immuneaccessory molecules by interferon-gamma [ J ]. Int J Cancer, 2006, 119( 6 ): 1377-1382.

[ 16 ] 张辉, 赵群, 左连富, 等. 细胞因子诱导的杀伤细胞对卵巢癌耐药细胞 SKOV3/CDDP 的作用机制 [ J ]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23( 12 ): 1167-1171.

[ 17 ] 叶韵斌, 周志峰. 原发性肝癌免疫治疗现状及展望 [ J ]. 中国肿瘤, 2011, 20( 2 ): 108-114.

[ 18 ] 岳欣, 李慧, 于津浦, 等. 不同输注途径对 CIK 治疗后的体内分布的影响 [ J ]. 中国免疫学杂志, 2007, 2( 3 ): 416-420.

[ 收稿日期 ] 2012-02-11 [ 修回日期 ] 2012-04-26

[ 本文编辑 ] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

### 参考文献题名后须标注文献类型和文献载体的标志代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求每条文献的题名后都需标上[ 文献类型标志 ]或[ 文献类型标志/文献载体标志 ]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[ J ];如为专著中析出文献,题名后应标上[ M ]。对电子文献,如为网络期刊析出文献,题名后需标上[ J/OL ];如为网络专著中析出文献,题名后需标上[ M/OL ]。

现将常用的文献类型标志代码和文献载体标志代码介绍如下:

表 1 文献类型和文献载体的标志代码

文献类型	标志代码	文献类型	标志代码	载体类型	标志代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联机网络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		

( 本刊编辑部 )