

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.06.011

· 基础研究 ·

寡克隆肝癌浸润淋巴细胞的制备及其对自体癌细胞的杀伤活性

张宗勤^{1,2}, 陈磊^{2▲}, 李鹏鹏^{1,2}, 张小峰¹, 孙斌², 钱海华², 施乐华¹, 殷正丰² (1. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 肝外四科, 上海 200438; 2. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 东方肝胆外科研究所 分子肿瘤实验室, 上海 200438)

[摘要] **目的:**建立一种新的寡克隆肝癌浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)分离培养方法, 获得具有更强自体肝癌细胞杀伤活性的 TIL。 **方法:**以新鲜切除的人肝癌组织标本为材料, 分别采用酶消化结合整块肝癌组织机械处理的传统方法和微小肝癌组织块培养的方法分离制备常规 TIL 和寡克隆 TIL, 培养 2 周后, 将靶细胞毒活性较高的寡克隆 TIL 合并进一步培养扩增, 采用 MTT 法分析不同寡克隆 TIL 对自体肝癌细胞的杀伤活性, 比较不同寡克隆 TIL 之间、常规 TIL 和寡克隆 TIL 对自体肝癌细胞的杀伤活性。 **结果:**在含有 IL-2 的培养体系中, TIL 可自行从微小肝癌组织块中逐渐浸润出来并增殖。各个寡克隆 TIL 对自体肝癌细胞均有一定的杀伤活性, 但是不同寡克隆 TIL 对于自体肝癌细胞的细胞毒活性有明显差异 ($P < 0.01$), 寡克隆肝癌 TIL 对于自体肝癌细胞的细胞毒活性明显高于常规肝癌 TIL [72.56 ± 6.69] % vs [46.24 ± 4.03] %, $P < 0.01$]。 **结论:**寡克隆 TIL 分离培养方法制备的寡克隆肝癌 TIL 较常规 TIL 具有更强的自体肝癌细胞杀伤活性。

[关键词] 肿瘤浸润淋巴细胞; 肝癌; 寡克隆扩增; 细胞毒活性

[中图分类号] R735.7; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)06-0696-04

Preparation of oligoclonal hepatocellular carcinoma-infiltrating lymphocytes and their cytotoxicity to autologous cancer cells

Zhang Zongqin^{1,2}, Chen Lei^{2▲}, Li Pengpeng^{1,2}, Zhang Xiaofeng¹, Sun Bin², Qian Haihua², Shi Lehua¹, Yin Zhengfeng² (1. Fourth Department of Hepatology Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Laboratory of Molecular Cancer, Institute of Oriental Hepatobiliary Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a novel method for isolation and culture of the oligoclonal tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) with a stronger cytotoxic activity to autologous hepatoma carcinoma cells. **Methods:** Fresh human hepatocellular carcinoma (HCC) tissues were dissected to prepare conventional TILs and oligoclonal TILs by the way of enzymatic digestion with physical disaggregation and the new way of oligoclonal TILs culture from a single tumor fragment in microcultures. After 2-week culture, the oligoclonal TILs with a stronger cytotoxic activity were merged for further expanding. Different TILs-mediated lysis of HCC cells *in vitro* was determined by colorimetric tetrazolium (MTT) assay to compare the specific cytotoxicity between different oligoclonal TILs and between bulk TILs and oligoclonal TILs. **Results:** Lymphocytes could gradually migrate out of each tumor fragment and expand in the culture with high levels of IL-2. Oligoclonal TILs generated from different fragments showed different cytotoxic activities against autologous HCC cells, and the difference in cytotoxic activity between different oligoclonal TILs was significant ($P < 0.01$). Moreover, the cytotoxic activity of oligoclonal TILs was significantly stronger than that of bulk TILs [72.56 ± 6.69] % vs [46.24 ± 4.03] %, $P < 0.01$]. **Conclusion:** The cytotoxic activity against autologous HCC cells of oligoclonal TILs generated from HCC tissues is much

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81101716, No. 81272669); 国家传染病重大专项课题资助项目(No. 2012ZX10002012-10)。 Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81101716, No. 81272669), and the National Key Projects for Infectious Disease of China (No. 2012ZX10002012-10)

[作者简介] 张宗勤(1984-), 男, 河南省南阳市人, 硕士生, 主要从事肝胆肿瘤防治的临床及基础研究, E-mail: zhangzqg@aliyun.com; 陈磊(1982-), 女, 江苏省通州市人, 大专生, 主要从事肿瘤细胞生物学研究, E-mail: y_cl2009@sina.com。 ▲为共同第一作者

[通信作者] 殷正丰(Yin Zhengfeng, corresponding author), E-mail: yinzfk@aliyun.com

stronger than that of conventional TILs.

[**Key words**] tumor-infiltrating lymphocytes; hepatocellular carcinoma; oligoclonal expansion; cytotoxic activity
[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(6): 696-699]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)对化疗、放疗不敏感,免疫治疗被认为具有特别重要的地位^[1-2]。鉴于肝癌组织内存在大量肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltration lymphocyte, TIL),对以TIL为主要效应细胞的过继性细胞免疫治疗(adoptive cellular immunotherapy, ACI)曾有过较多研究^[3-5]。然而,虽然以前常用的酶消化方法能分离、培养、扩增出大量TIL,但其质量常常不足以激发足够强度的抗肿瘤免疫应答,因而一直阻碍着TIL过继性免疫治疗临床转化的进程。本研究尝试使用一种寡克隆肝癌TIL培养扩增方法,即从手术切除的新鲜人肝癌肿块的不同部位切取若干微小组织块,分别进行培养,从组织中浸润出来的TIL被认为是寡克隆TIL,测试后进行选择性合并扩增,期望能够制备具有更强的抗肝癌活性的肝癌TIL。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

选取2008年10月至2009年5月在东方肝胆外科医院肝外四科手术切除并经病理证实的新鲜HCC组织。所有患者均无糖尿病、类风湿、甲状腺功能亢进等自身免疫性疾病史以及免疫治疗史。重组人IL-2(rhIL-2)购自海王药业,RPMI 1640培养基、胎牛血清均购自Thermo公司,胶原酶、DNA酶、透明质酸酶均购自Gibco公司,4-巯基乙哌啶乙磺酸(HEPES)、谷氨酰胺、 β -巯基乙醇、MTT均购自Sigma公司,二甲基亚砜(DMSO)购自上海申能博彩生物公司,人AB血清来自本院血库,HRP标记山羊抗小鼠二抗购自迈新公司。人IFN- γ ELISA试剂盒购自深圳达科为公司。

1.2 酶消化法制 备常规肝癌TIL

去除新鲜肝癌块的坏死组织和周围组织,PBS洗涤3次,RPMI 1640培养液冲洗干净,移至无菌器皿内,用手术剪将肿瘤组织剪碎至1 mm³小块,置于含有3 600 U DNA酶、50 U胶原酶和125 U透明质酸酶的RPMI 1640完全培养液中,室温搅拌混匀,4℃过夜。用200目孔径的不锈钢滤网过滤,去除未消化的组织块,再用Hank液洗涤2次。应用淋巴细胞分离液将肝癌细胞制成2×10⁶个/ml左右的细胞悬液,在梯度密度离心后,吸取75%与100%分离液面之间富含淋巴细胞的白色细胞层,用Hank

液洗涤,离心,然后在含rhIL-2(6 000 IU/ml)的完全培养基中培养扩增。完全培养基(pH 7.2)由RPMI 1640、25 mmol/L HEPES、100 U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺、 5.5×10^{-5} mol/L β -巯基乙醇和10%人AB血清组成。

1.3 寡克隆培养法制 备寡克隆肝癌TIL

参照Rosenberg等^[6-7]报道的方法并加以改进,主要步骤如下:去除新鲜肝癌坏死组织和正常组织,PBS洗涤3次。在肿瘤不同部位取大小约2 mm³的组织块,取材范围包括肿瘤中心至肿瘤交界区域(距肿瘤边缘内2 mm)。在24孔板的每孔中放入1个肿瘤组织小块,每孔预加2 ml上述完全培养基。然后将24孔板置于增湿的37℃、5% CO₂ 孵箱中,直到淋巴细胞从组织块中游出并明显生长,每隔1 d镜下观察淋巴细胞渗出和增殖情况。无论淋巴细胞是否生长,1周内需一次更换一半培养液。2周后小心剔除每个培养孔中的肿瘤组织。当细胞几乎铺满时,MTT法分别检测每个寡克隆肝癌TIL的抑瘤活性,选取抑瘤活性强的寡克隆肝癌TIL合并,调整细胞密度为1×10⁶个/孔,继续培养扩增。比较不同寡克隆肝癌TIL的细胞毒活性时,取来自同一个肝癌标本的20个微小组织块制备和培养的寡克隆TIL。

1.4 MTT法检测TIL介导的细胞毒活性

将同一个肝癌标本剖开成两等份,分别按照前述方法制备和培养常规肝癌TIL和寡克隆肝癌TIL。选取培养2周的常规肝癌TIL和寡克隆肝癌TIL作为效应细胞,靶细胞为自体肝癌细胞(新鲜分离的肝癌细胞加入10% DMSO,液氮保存备用)。在96孔板中设空白对照孔(含5%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基200 μ l)、实验孔和对照孔。实验孔加入100 μ l (2.5×10^4 /ml)自体肝癌细胞和100 μ l效应细胞,效靶比为10:1。对照孔分别设靶细胞和效应细胞对照孔。置于37℃、5% CO₂培养箱培养24 h,每孔加入20 μ l MTT溶液,继续培养4 h后终止培养,小心吸去孔内培养液,每孔加入DMSO 150 μ l,充分振荡10 min。以空白对照孔调零,490 nm波长测量各孔光密度(D值)。按照以下公式计算:细胞增殖抑制率(%) = $[1 - (D_{\text{实验孔}} - D_{\text{效应细胞对照孔}}) / D_{\text{靶细胞对照孔}}] \times 100\%$ 。实验重复3次。

1.5 统计学分析

计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 15.0统计

软件分析,不同寡克隆肝癌 TIL 靶细胞毒活性之间的比较采用单因素方差分析,常规肝癌 TIL 与寡克隆肝癌 TIL 靶细胞毒活性之间的比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 寡克隆培养法可使 TIL 游走出微小组织块并增殖

寡克隆培养 3 ~ 4 h 后可见有少量淋巴细胞游走出肿瘤组织块,24 h 后在组织块周围可见较多的淋巴细胞以及一定数量的贴壁细胞。随着培养时间延长,浸润出来的淋巴细胞数量逐渐增多,聚集在组织周围,贴壁细胞则逐渐死亡降解。14 ~ 18 d 时,培养孔几乎铺满淋巴细胞,其数量可达到 2×10^6 个/孔(图 1)。

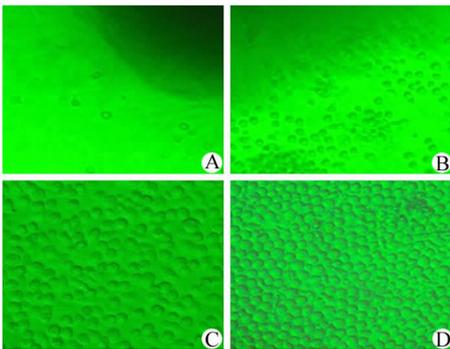


图 1 不同培养时间的寡克隆肝癌 TIL (×400)

Fig. 1 Oligoclonal HCC TIL at different time points during culture (×400)

A:1 d;B:3 d;C:7 d;D:14 d

2.2 不同寡克隆肝癌 TIL 具有不同的细胞毒活性

检测不同寡克隆肝癌 TIL 对自体肝癌细胞的细胞毒活性,结果(图 2)表明,各个寡克隆 TIL 对自体肝癌细胞均有一定的杀伤活性,但是不同寡克隆 TIL 对于自体肝癌细胞具有不同的细胞毒活性,甚至相差 30% 以上,组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。用多个肝癌标本进行相同实验,均得到与上述类似的结果。

2.3 寡克隆肝癌 TIL 的靶细胞毒活性显著高于非寡克隆肝癌 TIL

培养 2 周后,将细胞毒活性测定结果高于 50% 的寡克隆 TIL 合并进一步培养扩增。取相同数目细胞检测常规肝癌 TIL 和寡克隆肝癌 TIL 的细胞毒活性,结果(图 3)显示,寡克隆肝癌 TIL 对于自体肝癌细胞的细胞毒活性明显高于常规肝癌 TIL [$(72.56 \pm$

$6.69)\% vs (46.24 \pm 4.03)\%$, $P < 0.01$]。

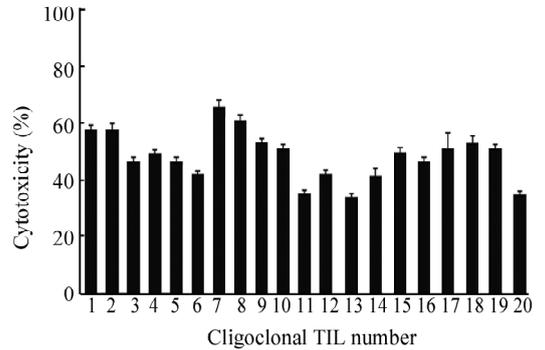


图 2 同一肝癌标本中不同寡克隆肝癌 TIL 介导的细胞毒活性

Fig. 2 Cytotoxic activities of different oligoclonal TIL from the same HCC tissue for autologous HCC cells

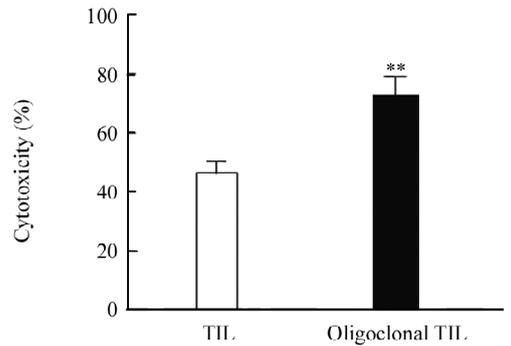


图 3 寡克隆肝癌 TIL 和常规肝癌 TIL 介导的细胞毒活性的比较

Fig. 3 Cytotoxic activities of oligoclonal TIL and conventional TIL from the same HCC tissue for autologous HCC cells

** $P < 0.01 vs TIL$

3 讨论

TIL 介导的抗肿瘤免疫是机体自身抗肿瘤免疫反应的一个重要组成部分^[7-8]。有研究^[9-12]报道,肝癌组织内有较多淋巴细胞浸润的患者术后复发转移率明显低于只有较少淋巴细胞浸润者。然而体内 TIL 的数量和质量并不足以维持强大的抗肝癌免疫反应^[13],而且随着肝癌的切除,TIL 也被清除,因而不能发挥抗肝癌复发转移的作用。因此,有必要对肝癌患者进行 TIL 过继性免疫治疗。

以往常用的肝癌 TIL 制备方法是将整块肝癌组织剪碎、多种酶消化,然后通过梯度密度离心获取 TIL。这种酶消化结合整块肝癌组织机械处理的方法获取的 TIL 纯度、抑瘤性均不高^[14-15]。分析其原因,可能主要包括:一是多个物理、化学操作步骤可能损

伤细胞;二是没有选择性取材用于分离 TIL。已知 TIL 是一群以 T 细胞为主的异质性淋巴细胞^[16]。TIL 不仅在肝癌组织内分布不均一,而且含有一定数量、分布也不均一的调节性 T 细胞(regulation T cell, Treg)^[17]。Treg 可以诱导 TIL 凋亡,抑制 TIL 的抗肿瘤活性^[18]。这意味着不含或少含 Treg 的 TIL 具有更强的抗肿瘤作用^[19-20]。鉴于上述情况,选择含有 TIL 较多、Treg 较少的肝癌组织,并采用温和的分离方法制备 TIL 进行培养扩增应该可以获得具有更强抗肿瘤活性的 TIL。为此,我们参照 Rosenberg 等^[6]报道的方法,建立了一种寡克隆肝癌 TIL 制备方法,不仅不需要采用机械的、化学的手段处理肝癌组织,让 TIL 从小肝癌组织中主动浸润出来,避免了人为操作对细胞造成损伤,保持了 TIL 的完整性和活性,而且可以舍弃抗肿瘤活性较低的寡克隆肝癌 TIL,选择性合并抗肿瘤活性较强的寡克隆肝癌 TIL 进一步培养扩增。实验结果正如预期的一样,如此制备的寡克隆肝癌 TIL 的细胞毒活性显著高于常规肝癌 TIL。而之所以选择性合并扩增抗肿瘤活性较强的寡克隆 TIL,则是基于实验结果所见:来自于同一肝癌标本的不同寡克隆肝癌 TIL 介导的靶细胞毒活性并不相同。推测其原因,Treg 在肝癌组织内分布不均匀的情形可能导致不同寡克隆肝癌 TIL 中所含有的 Treg 数量不等,而细胞毒活性与 Treg 含量有关。目前,本课题组正在检测不同寡克隆肝癌 TIL 的 Treg 数量和细胞毒活性,分析两者之间的相关性,进一步验证这一推测,为寡克隆肝癌 TIL 的临床转化应用提供理论依据及实验基础。

[参 考 文 献]

[1] Maluccio M, Covey A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(6): 394-399.

[2] Faivre S, Bouattour M, Raymond E. Novel molecular therapies in hepatocellular carcinoma [J]. Liver Int, 2011, 31(Suppl 1): 151-160.

[3] Schmidt N, Büttner N, Thimme R. Perspectives on immunotherapy for hepatocellular carcinoma [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2013, 138(14): 740-744.

[4] Huang Y, Wang FM, Wang T, et al. Tumor-infiltrating FoxP3⁺ Tregs and CD8⁺ T cells affect the prognosis of hepatocellular carcinoma patients [J]. Digestion, 2012, 86(4): 329-337.

[5] Hiraoka N. Tumor-infiltrating lymphocytes and hepatocellular carcinoma: Molecular biology [J]. Int J Clin Oncol, 2010, 15(6): 544-551.

[6] Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. Generation of

tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients [J]. J Immunother, 2003, 26(4): 332-342.

[7] Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes [J]. Science, 1986, 233(4770): 1318-1321.

[8] Scurr M, Gallimore A, Godkin A. T cell subsets and colorectal cancer: Discerning the good from the bad [J]. Cell Immunol, 2012, 279(1): 21-24.

[9] Shirabe K, Matsumata T, Maeda T, et al. A long-term surviving patient with hepatocellular carcinoma including lymphocytes infiltration a clinicopathological study [J]. Hepatogastroenterology, 1995, 42(6): 996-1001.

[10] Wada Y, Nakashima O, Kutami R, et al. Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration [J]. Hepatology, 1998, 27(2): 407-414.

[11] Parmiani G, Anichini A. T cell infiltration and prognosis in HCC patients [J]. J Hepatol, 2006, 45(2): 178-181.

[12] Harlin H, Kuna TV, Peterson AC, et al. Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites [J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(10): 1185-1197.

[13] Shi H, Liu L, Wang Z. Improving the efficacy and safety of engineered T cell therapy for cancer [J]. Cancer Lett, 2013, 328(2): 191-197.

[14] Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, et al. Minimally cultured or selected autologous tumor-infiltrating lymphocytes after a lympho-depleting chemotherapy regimen in metastatic melanoma patients [J]. J Immunother, 2009, 32(4): 415-423.

[15] Tran KQ, Zhou J, Durlinger KH, et al. Minimally cultured tumor-infiltrating lymphocytes display optimal characteristics for adoptive cell therapy [J]. J Immunother, 2008, 31(8): 742-751.

[16] Weber J, Atkins M, Hwu P, et al. White paper on adoptive cell therapy for cancer with tumor infiltrating lymphocytes: A report of the CTEP subcommittee on adoptive cell therapy [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(7): 1664-1673.

[17] Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells [J]. Immunity, 2013, 38(3): 414-423.

[18] Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease [J]. Immunol Rev, 2006, 212: 8-27.

[19] Ortiz V, Wands JR. Chronic ethanol fed mice increase Treg activity and inhibit HCV core-specific cellular immune responses [J]. Hepatol Res, 2013 [Epub ahead of print].

[20] Tucker RM, Feldman AG, Fenner EK, et al. Regulatory T cells inhibit Th1 cell-mediated bile duct injury in murine biliary atresia [J]. J Hepatol, 2013, 59(4): 790-796.

[收稿日期] 2013 - 07 - 10

[修回日期] 2013 - 09 - 25

[本文编辑] 黄静怡