

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.03.015

## 体外培养不同时间后冻存对脐血来源 CIK 细胞生物学活性的影响

王小燕<sup>1</sup>, 王翔<sup>1</sup>, 赵令卉<sup>1</sup>, 郑榆坤<sup>1</sup>, 陈静娴<sup>1</sup>, 申重阳<sup>1</sup>, 邓红梅<sup>1</sup>, 张校通<sup>1</sup>, 漆巨兰<sup>1</sup>, 张蓉<sup>2</sup>, 海泉<sup>1</sup>(1. 成都清科生物科技(集团)有限公司, 四川 成都 610000; 2. 四川大学基础医学与法医学院, 四川 成都 610041)

**[摘要]** **目的:**观察体外培养不同时间后冻存对人脐血来源细胞因子诱导杀伤(cytokine induced killer, CIK)细胞增殖、免疫表型、细胞毒活性以及细胞因子分泌的影响。**方法:**CIK细胞在体外培养6、9、12 d后冻存1个月,复苏后培养至72 h,其间每隔24 h检测细胞增殖情况,并采用流式细胞术检测复苏后细胞免疫表型、CCK-8法检测复苏后细胞对A549细胞的杀伤活性、ELISA方法检测复苏后CIK细胞分泌细胞因子IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的变化。**结果:**体外培养不同时间后冻存的CIK细胞在复苏后仍然显示出较好的增殖活性,其中,体外培养6 d后冻存组CIK细胞增殖活性明显高于体外培养9 d和12 d后冻存组CIK细胞,复苏72 h时,6、9、12 d冻存组CIK细胞数分别为 $(35.90 \pm 1.67) \times 10^6$ 、 $(18.98 \pm 2.13) \times 10^6$ 和 $(11.76 \pm 2.12) \times 10^6$ 个( $P < 0.01$ )。体外培养6、9、12 d后冻存组CIK细胞复苏24 h后,各冻存组CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞比例逐渐增加,且复苏72 h后6 d冻存组CIK细胞中CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>和CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞比例最低。体外培养后冻存组CIK细胞在复苏24 h内对A549细胞的杀伤活性较低,但24 h后细胞毒活性有较大幅度的增加,且体外培养12 d后冻存组CIK细胞对A549细胞的杀伤活性高于6 d和9 d冻存组CIK细胞,如复苏后72 h,12、6、9 d冻存组CIK细胞对A549细胞的抑瘤率分别为 $(0.81 \pm 0.09)\%$ 、 $(0.59 \pm 0.06)\%$ 、 $(0.42 \pm 0.08)\%$ ( $P < 0.01$ )。ELISA检测结果显示,随着复苏时间的延长,体外培养不同时间后冻存的CIK细胞分泌IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的水平也逐渐上升;复苏72 h时,体外培养6 d后冻存组CIK细胞分泌IFN- $\gamma$ 的量要高于其他组,而体外培养12 d后冻存组TNF- $\alpha$ 的分泌量则明显高于其他组。**结论:**体外培养不同时间后冻存对CIK细胞的生物学活性有一定影响,但复苏后经短时间培养后基本恢复,提示CIK细胞可以在培养至12 d后进行冻存。

**[关键词]** 细胞因子诱导杀伤细胞;冻存;细胞毒活性;免疫表型

**[中图分类号]** R392.33; R734.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)03-0342-06

## Effect of cryopreservation on bioactivity of cytokine induced killer cells derived from human cord blood after *in vitro* culture of different time

Wang Xiaoyan<sup>1</sup>, Wang Xiang<sup>1</sup>, Zhao Linghui<sup>1</sup>, Zheng Yukun<sup>1</sup>, Chen Jingxian<sup>1</sup>, Shen Chongyang<sup>1</sup>, Deng Hongmei<sup>1</sup>, Zhang Xiaotong<sup>1</sup>, Qi Julan<sup>1</sup>, Zhang Rong<sup>2</sup>, Hai Quan<sup>1</sup>(1. Chengdu Qingke Biotechnology (Group) Co., Ltd., Chengdu 610000, Sichuan, China; 2. College of Basic and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China)

**[Abstract]** **Objective:**To observe the effect of *in vitro* culture of different time on proliferation, immunophenotype, cytotoxicity and cytokine secretion of human cord blood derived cytokine induced killer (CIK) cells after cryopreservation. **Methods:** CIK cells were cryopreserved for 1 month after *in vitro* culture for 6, 9 and 12 d. The cell proliferation was detected every 24 h when they were recovered and cultured for 72 h. The immunophenotype, cytotoxicity on A549 cells and the secretion of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  of CIK cells after recovery were detected by flow cytometry, CCK-8 assay and ELISA assay, respectively. **Results:** CIK cells, *in vitro* culture of different time before cryopreservation still showed a superior proliferation activity after recovery, among which the proliferation of CIK cells *in vitro* cultured for 6 d before cryopreservation, was significantly higher than those *in vitro* cultured for 6 and 12 d before cryopreservation. The CIK cell counts were  $([35.90 \pm 1.67] \times 10^6, [18.98 \pm 2.13] \times 10^6, \text{ and } [11.76 \pm 2.12] \times 10^6, P < 0.01)$  in 6, 9 and 12 d cryopreservation groups after recovery for 72 h. After recovery for 24 h, the proportions of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells increased gradually in all the three 6, 9 and 12 d cryopreservation groups. Moreover, both two cell proportions in 6 d cryopreservation group after recovery for 72 h was the lowest. The cytotoxicity of CIK cells on A549 cells within 24 h of recovery

**[作者简介]** 王小燕(1986-),女,重庆市人,本科,主要从事细胞免疫功能方面的研究。E-mail:wangxyhi@163.com

**[通信作者]** 海泉(Hai Quan, corresponding author),E-mail: haiq984@163.com

ery in all the three cryopreservation groups was much low. However, their cytotoxicity increased considerably after 24 h. The cytotoxicity of CIK cells on A549 cells in 12 d cryopreservation group was higher than those in the 6 and 9 d cryopreservation groups. For example, the anti-tumor rate of CIK cells on A549 cells in 6, 9 and 12 d cryopreservation groups after recovery for 72 h was ( $[0.81 \pm 0.09]\%$ ,  $[0.59 \pm 0.06]\%$  and  $[0.42 \pm 0.08]\%$ ,  $P < 0.01$ ). ELISA assay results showed that, the levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  secreted by CIK cells increased along the recovery time in all cryopreservation groups that had been *in vitro* cultured for various times. After recovery for 72 h, the level of secreted IFN- $\gamma$  in 6 d cryopreservation group was higher than those of the other groups, and the level of secreted TNF- $\alpha$  in 12 d cryopreservation group was higher than those of the other groups. **Conclusion:** *In vitro* culture of different time can influence the bioactivity of cryopreserved CIK cells. However, the bioactivity can be restored after recovery for a short time, demonstrating that CIK cells can be cryopreserved after *in vitro* culture for 12 d.

[ **Key words** ] cytokine induced killer ( CIK ) cell; cryopreservation; cytotoxicity; immunophenotype

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20( 3 ): 342-347 ]

细胞因子诱导杀伤( cytokine induced killer, CIK )细胞是在体外利用多种细胞因子刺激诱导单个核细胞而获取的异质性细胞群,自 1991 年 Schmidt-Wolf 等<sup>[1]</sup>成功培养之后,CIK 细胞以其培养简单、扩增速度快、杀瘤活性高、使用安全等特点,越来越广泛地应用于肿瘤的生物治疗中<sup>[2-5]</sup>。在过继细胞免疫治疗的临床应用中,CIK 细胞一般需要进行多次回输,且其数量和质量对疗效有着重要的影响<sup>[6]</sup>,因此,在 CIK 细胞活性较好的时候进行保存显得非常重要。目前,有关 CIK 细胞冻存的资料尚缺乏<sup>[7]</sup>。本研究通过对 CIK 细胞生长速度、免疫表型、细胞毒活性以及分泌细胞因子的检测,评价体外培养不同时间然后冻存对其生物学活性的影响,旨在为 CIK 细胞体外冻存后的临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

收集 2012 年 6 月成都市妇幼保健院产妇产血。选取产前检查无传染病和血液系统疾病、肝炎表面抗原阴性的健康产妇 3 人,采集脐静脉血 80 ml( 肝素钠抗凝)。取标本征得产妇本人及其家属同意,并签署知情同意书。全部研究方案和程序报医院伦理委员会审查并获批准。

### 1.2 主要试剂

人肺腺癌细胞株 A549 购自美国 ATCC 公司,抗人 CD3 单克隆抗体购自武汉生物制品研究所,IL-2、IFN- $\gamma$  购自美国 PeproTech 公司,TBD 淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物科技有限公司,胎牛血清、DMEM 培养基、CIK 细胞培养基、RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司,抗 CD45、CD3、CD19、CD56、CD45、CD3、CD4、CD8、CD8、CD28 抗体及同型对照

抗体均购自美国 BD 公司,红细胞裂解液购自北京索莱宝科技有限公司,细胞毒活性检测试剂盒 CCK-8 购自碧云天公司。FACS Aria 流式细胞仪购自美国 BD 公司,Multiskan Mk3 酶标仪购自美国 Thermo 公司,TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的 ELISA 检测试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司。

### 1.3 CIK 细胞体外扩增、冻存与复苏

脐血采用 Ficoll 密度梯度离心获得单个核细胞,加入细胞因子( IL-2 1 000 U/ml 和 IFN- $\gamma$  1000 U/ml)和抗 CD3 单克隆抗体( 50 ng/ml ),用含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基培养;未冻存组 CIK 细胞连续培养至 21 d,每 3 d 换液一次,冻存组在体外培养 6、9、12 d 后冻存。采用血球计数板进行计数,冻存细胞密度为  $3 \times 10^7$ /ml。细胞放入程序降温盒中,放  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  过夜,转移到液氮罐内  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  存放 1 个月。 $37\text{ }^\circ\text{C}$  水浴复苏 CIK 细胞 ( $6 \times 10^7$  个/ml),加入 5 ml PBS 缓冲液, $800 \times g$ ,离心 5 min,弃上清,加入 CIK 细胞培养基培养。

### 1.4 流式细胞术检测 CIK 细胞免疫表型

未冻存组 CIK 细胞每 3 d 以及冻存组 CIK 细胞复苏后每 24 h 取细胞悬液 100  $\mu\text{l}$  ( $2 \times 10^6$  个/ml),加入相应免疫荧光标记的抗体或同型对照抗体,混匀后室温避光孵育 15 min,加入 2 ml PBS 缓冲液, $800 \times g$ ,离心 5 min,弃上清,用 400  $\mu\text{l}$  PBS 重悬细胞,流式细胞术检测 CD3/CD19、CD3/CD56、CD3/CD4/CD8、CD8/CD28 阳性率。

### 1.5 CCK-8 法检测 CIK 细胞对 A549 细胞的杀伤作用

未冻存组 CIK 细胞每 3 d、冻存组 CIK 细胞冻存复苏后每 24 h 测定细胞对 A549 细胞的杀伤活性。调整肿瘤 A549 的细胞密度至  $1 \times 10^5$  个/ml,CIK 细胞为  $1 \times 10^6$  个/ml,各 100  $\mu\text{l}$  加入 96 孔板,

并设 A549 细胞未冻存组、CIK 细胞未冻存组、A549 细胞培养基未冻存组和 CIK 细胞培养基未冻存组。细胞置于 37 °C 细胞培养箱内孵育 48 h, 加入 CCK-8, 并设 CCK-8 阴性对照, 再培养 2.5 h 后, 酶标仪检测 450 nm 处光密度 ( $D$ ) 值。抑瘤率 (%) = (肿瘤细胞  $D$  值 + CIK 细胞  $D$  值 - 实验组  $D$  值) / 肿瘤细胞  $D$  值  $\times$  100%, 其中  $D$  值均为减去培养基对照  $D$  值和 CCK-8 对照  $D$  值, 实验组培养基对照  $D$  值为 A549 细胞培养基和 CIK 细胞培养基对照的平均值。

1.6 ELISA 法检测 CIK 细胞上清中 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  蛋白的水平

冻存组 CIK 细胞复苏后取  $6 \times 10^7$  个细胞, 培养 0、24、48、72 h 后分别取 2 ml 培养上清, 按照 ELISA 检测试剂盒的操作说明检测 CIK 细胞培养上清中 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  蛋白的水平, 比较体外培养不同时间后复苏的 CIK 细胞分泌细胞因子的变化。

1.7 统计学处理

采用 PASW Statistics 19.0 统计软件, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间数据比较采用配对  $t$  检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养不同时间后冻存对 CIK 细胞增殖的影响

体外培养的未冻存组 CIK 细胞呈现出经典的细胞增殖曲线, 但其平台期较短, 于 18 d 细胞数量达到峰值后迅速下降, 这与以往的研究一致<sup>[8]</sup>。

体外培养不同时间后冻存组 CIK 细胞在复苏后仍然显示出较好的增殖活性, 复苏后 24 h 内细胞数量虽基本无变化, 但 24 h 后细胞增殖迅速 (图 1)。其中, 体外培养 6 d 后冻存组 CIK 细胞增殖活性明显高于体外培养 9 d 和 12 d 后冻存的 CIK 细胞, 复苏 72 h 时, 6、9、12 d 冻存组 CIK 细胞数分别为  $(35.90 \pm 1.67) \times 10^6$ 、 $(18.98 \pm 2.13) \times 10^6$  和  $(11.76 \pm 2.12) \times 10^6$  个 ( $P < 0.01$ )。

2.2 体外培养不同时间后冻存对 CIK 细胞免疫表型的影响

流式细胞术结果 (表 1) 显示, 未冻存组 CIK 细胞从第 6 天开始, T 淋巴细胞 ( $CD3^+ CD19^-$ ) 比例基本维持在 94% 以上, 而 B 淋巴细胞 ( $CD3^- CD19^+$ ) 则从第 6 天开始趋近于 0。培养 3 ~ 18 d 过程中, 未冻存组 CIK 细胞的主要效应细胞  $CD3^+ CD8^+$ 、 $CD3^+ CD56^+$  细胞的比例不断增加, 21 d 时,  $CD3^+ CD8^+$  有所下降; 另外, 培养至 21 d 时, 细胞毒性 T 细胞 ( $CD8^+ CD28^+$ ) 比例与 18 d 相比明显下降 [ $(9.93 \pm 2.28)\%$  vs  $(54.40 \pm 11.44)\%$ ,  $P <$

$0.01$ ], 而抑制性 T 细胞 ( $CD8^+ CD28^-$ ) 比例与 18 d 相比明显上升 [ $(47.83 \pm 7.25)\%$  vs  $(3.07 \pm 1.36)\%$ ,  $P < 0.01$ ], 提示, 此时 CIK 细胞已老化。

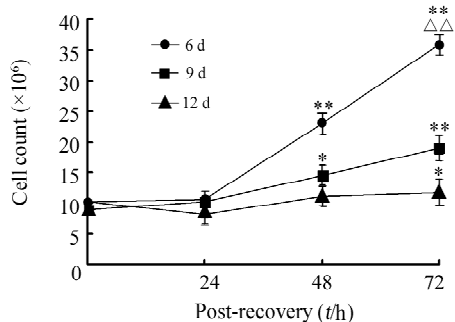


图 1 体外培养不同时间后冻存对 CIK 细胞增殖的影响  
Fig. 1 Effect of cryopreservation after *in vitro* culture of different time on proliferation of CIK cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 h post-recovery;  
 $\Delta\Delta P < 0.01$  vs 9 or 12 d group

体外培养 6、9、12 d 后冻存组 CIK 细胞复苏后不同时间, 检测不同细胞亚群的比例。结果 (图 2) 发现, 各冻存组  $CD3^+ CD4^+ CD8^-$  细胞比例复苏后 72 h 呈持续下降趋势, 而  $CD3^+ CD19^-$  细胞比例在 48 h 内呈下降趋势, 但之后其比例会逐步上升。其余细胞亚群的比例, 如  $CD3^+ CD4^- CD8^+$  细胞、 $CD3^+ CD56^+$  细胞、 $CD8^+ CD28^+$  细胞、 $CD8^+ CD28^-$  细胞, 都呈现出复苏后 24 h 内下降, 24 h 后上升的趋势。如 9 d 冻存组复苏后 24 h,  $CD3^+ CD56^+$  细胞比例显著下降 [ $(6.60 \pm 1.23)\%$  vs  $(12.60 \pm 0.20)\%$ ,  $P < 0.05$ ], 而复苏后 72 h,  $CD3^+ CD56^+$  细胞比例恢复至  $(21.00 \pm 2.72)\%$ 。进一步分析发现, 6、9、12 d 冻存组细胞复苏后不同细胞亚群的分布也不同: 6 d 冻存组复苏后  $CD3^+ CD4^- CD8^+$  细胞、 $CD3^+ CD56^+$  细胞、 $CD8^+ CD28^-$  细胞比例较低, 而 12 d 冻存组复苏后  $CD3^+ CD4^+ CD8^-$  细胞、 $CD8^+ CD28^+$  细胞比例较低。

2.3 体外培养不同时间后冻存对 CIK 细胞杀伤活性的影响

未冻存组 CIK 细胞在培养过程中对 A549 细胞的杀伤活性在前 6 d 呈较快增强趋势, 但 9 d 时下降, 与 6 d 和 12 d 相比差异显著 [ $(0.29 \pm 0.05)\%$  vs  $(0.55 \pm 0.05)\%$ ,  $(0.62 \pm 0.08)\%$ ,  $P < 0.01$ ], 此后杀伤活性逐渐恢复, 至 18 d 后又开始下降。

体外培养 6、9、12 d 后冻存组 CIK 细胞在复苏后 24 h 内对 A549 细胞的杀伤活性呈下降趋势, 之后 24 h 内迅速增长, 48 h 后趋于平稳 (图 3)。其中 12 d 冻存组复苏后 0、24、48、72 h 对 A549 细胞的杀

伤活性分别为(0.48 ± 0.08)%、(0.01 ± 0.03)%、(0.75 ± 0.05)%、(0.81 ± 0.09)% ( $P < 0.01$ )。此外,48~72 h后,12 d 冻存组 CIK 细胞对 A549 细胞的杀伤活性高于 6 d 和 9 d 冻存组 CIK 细胞,如复

苏后 72 h,12、6、9 d 冻存组 CIK 细胞对 A549 细胞的杀伤活性分别为(0.81 ± 0.09)%、(0.59 ± 0.06)%、(0.42 ± 0.08)% ( $P < 0.01$ )。

表 1 未冻存组 CIK 细胞体外培养后不同细胞亚群的比例(%)

Tab. 1 Proportions of different cell subsets in un-cryopreservation CIK cells after *in vitro* culture(%)

Time (t/d)	CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>
0	70.90 ± 7.56	4.87 ± 4.36	60.00 ± 5.33	10.13 ± 2.52	10.07 ± 2.06	0.40 ± 0.26	10.23 ± 1.43	3.39 ± 0.81
3	77.13 ± 10.54	1.93 ± 1.83	45.17 ± 5.23	8.83 ± 1.55	5.46 ± 1.94	0.50 ± 0.36	10.43 ± 2.32	2.33 ± 1.40
6	94.27 ± 3.12	0.27 ± 0.15	63.73 ± 2.40	36.70 ± 6.08	1.53 ± 0.31	1.07 ± 0.67	22.03 ± 8.16	1.20 ± 0.66
9	97.03 ± 1.62	0.10 ± 0.10	55.80 ± 10.09	41.97 ± 7.00	1.10 ± 0.66	11.53 ± 6.94	30.13 ± 5.01	11.97 ± 5.58 <sup>**</sup>
12	92.23 ± 6.12	0	38.57 ± 6.71	43.13 ± 9.07	4.23 ± 0.99	18.00 ± 2.52	40.10 ± 10.66	2.47 ± 1.29
15	97.00 ± 2.19	0	32.83 ± 13.61	52.10 ± 11.55	2.07 ± 2.25	30.03 ± 13.12	50.10 ± 12.36	3.30 ± 1.75
18	95.93 ± 0.98	0	27.20 ± 2.61	66.73 ± 2.47	2.53 ± 1.12	37.20 ± 12.17	54.40 ± 11.44	3.07 ± 1.36
21	93.03 ± 2.85	0.07 ± 0.06	21.80 ± 10.77	54.63 ± 8.02	3.17 ± 0.93	44.50 ± 13.45	9.93 ± 2.28 <sup>**</sup>	47.83 ± 7.25 <sup>**</sup>

<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs 18 d group

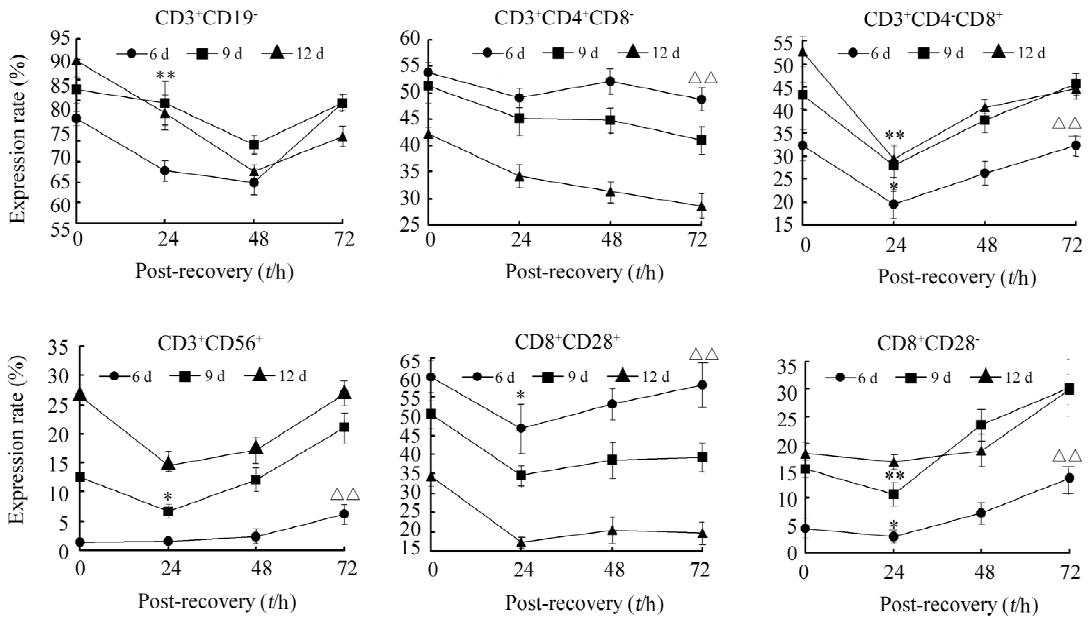


图 2 体外培养不同时间后冻存对 CIK 细胞免疫表型的影响

Fig. 2 Effect of cryopreservation after *in vitro* culture of different time on immunophenotypes of CIK cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs previous or next time point;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs 9 or 12 group

2.4 体外培养不同时间后冻存对 CIK 细胞分泌细胞因子的影响

除体外培养 6 d 后冻存组 CIK 细胞在复苏后 24 h 分泌 TNF- $\alpha$  的水平降低外,体外培养 6、9、12 d 后冻存组 CIK 细胞在复苏后 72 h 分泌 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的

水平总体呈上升趋势(图 4)。且体外培养 6 d 后冻存组 CIK 细胞复苏后 IFN- $\gamma$  分泌量高于 9、12 d 冻存组,而 12 d 冻存组 CIK 细胞复苏后 TNF- $\alpha$  分泌量高于 6、9 d 冻存组。如 72 h 时,6 d 冻存组 IFN- $\gamma$  的分泌量明显高于 9 d 冻存组和 12 d 冻存组

[ ( 138. 29 ± 15. 21 ) vs ( 66. 84 ± 9. 43 ), ( 78. 73 ± 11. 84 ) pg/ml,  $P < 0.01$  ]; 12 d 冻存组 TNF- $\alpha$  的分泌水平明显高于 6 d 和 9 d 冻存组 [ ( 16. 62 ± 1. 29 ) vs ( 9. 16 ± 1. 14 ), ( 12. 93 ± 1. 26 ) pg/ml,  $P < 0.01$  ]。

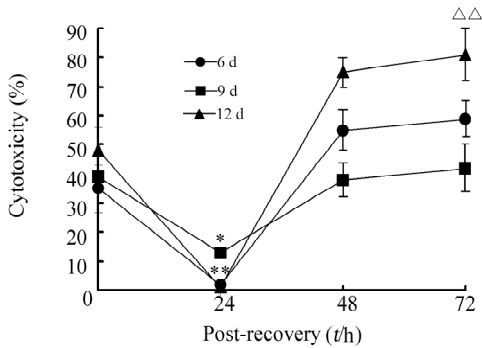


图 3 体外培养不同时间后冻存对 CIK 细胞杀伤活性的影响

Fig. 3 Effect of cryopreservation after *in vitro* culture for various times on cytotoxicity of CIK cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs previous or next time point;  
 $\Delta\Delta P < 0.01$  vs 6 or 9 d group

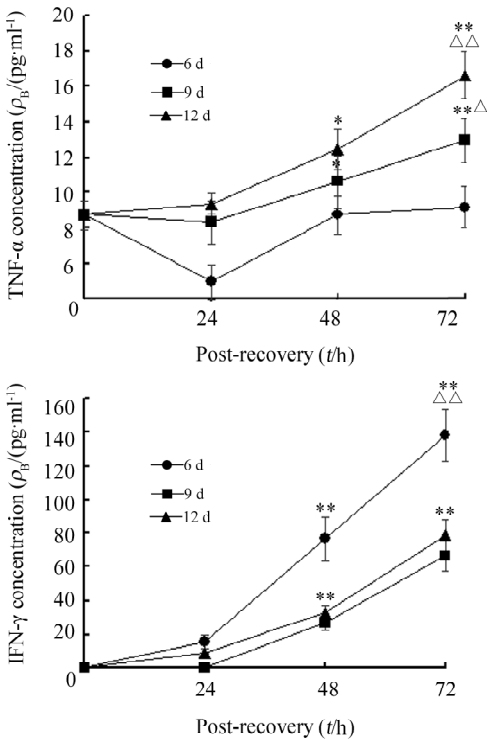


图 4 体外培养不同时间后冻存对 CIK 细胞分泌 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平的影响

Fig. 4 Effect of cryopreservation after *in vitro* culture of different time on the secretion of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  by CIK cells.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 h post-recovery;  
 $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs 6 or 9 d group

### 3 讨论

肿瘤过继免疫疗法中 CIK 细胞以其强大的增殖和杀伤活性等优点, 逐渐取代了淋巴因子激活的杀伤细胞( lymphokine activated killer, LAK)细胞和肿瘤浸润淋巴细胞( tumor infiltrating lymphocyte, TIL), 成为了目前最为有效的肿瘤生物治疗手段<sup>[9]</sup>。以往 CIK 细胞的主要来源是肿瘤患者的外周血, 其采集不仅对患者造成了痛苦, 并且患者 CIK 细胞活性也不如健康人。近年来有研究<sup>[10]</sup>发现, 异体来源 CIK 细胞依然能够发挥强大的杀伤效应, 脐血来源 CIK 细胞的基础<sup>[11-12]</sup>及临床研究<sup>[13]</sup>中脐血 CIK 细胞的安全性和有效性得到了肯定。但脐血 CIK 细胞临床应用中所面临的首要问题是细胞的保存, 本研究旨在探究体外培养不同时间后冻存对脐血 CIK 细胞活性的影响。

体外培养不同时间后冻存组 CIK 细胞在复苏 24 h 内数量变化不大, 此时细胞应处于适应期, 提示, CIK 细胞不可在复苏后立即使用。且体外培养 6 d 后冻存组 CIK 细胞复苏 72 h 内增殖数量明显高于其他组, 可能与体外培养 6 d 后细胞状态较为年轻, 增殖潜力较大有关。流式细胞术结果(表 1)所示的未冻存组 CIK 细胞不同细胞亚群比例随体外培养时间的变化趋势基本和刘等<sup>[14]</sup>的报道一致。此外, 作为一种不仅对辅助 T 细胞( helper T cell, Th)的辅助作用以及细胞毒性 T 细胞( cytotoxic T cell, Tc)介导的细胞毒作用都有负调节作用的细胞<sup>[15-16]</sup>, CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> 抑制性 T( suppressor T cell, Ts)细胞 21 d 比例比 18 d 显著增加, 而其比例的增加会 CIK 细胞增殖和杀伤活性下降, 这也很好地解释了无论是增殖实验还是杀伤 A549 细胞的实验中, 21 d CIK 细胞的活性都较 18 d 的 CIK 细胞有很大程度的下降。

体外培养 6、9、12 d 后冻存组 CIK 细胞复苏 24 h 内的主要免疫表型(除 CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>)都有不同程度的下降, 说明了低温冻存的确对 CIK 细胞有一定的损伤, 提示这一群异质细胞抵抗低温损伤的能力是有差异性的, 这可能导致了各种细胞亚群比例变化的差异。但 24 h 后, 各冻存组 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 细胞比例逐渐增加, 说明了短期培养可以弥补冻存、复苏对细胞造成的损伤。由于复苏 72 h 后 6 d 冻存组 CIK 细胞中 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 细胞比例是 3 个冻存组中最低的, 所以不推荐体外培养 6 d 后冻存 CIK 细胞。

由图 3 可以看出, 未冻存组 CIK 细胞杀伤活性

在增殖活性下降的同时也降低,这点与前人的研究是一致的,但本实验中体外培养 9 d 后 CIK 细胞杀伤活性大幅度下降,这却与曹等<sup>[17]</sup>的研究报道不相符,这可能是由于不同的培养体系对不同细胞亚群增殖的影响不同,体外培养 9 d 时 CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>细胞较之前和之后都有明显的上升,这可能是细胞毒活性降低的直接原因,其更深层次的原因尚在进一步的研究中。

体外培养后冻存组 CIK 细胞在复苏后 24 h 时细胞毒活性最低,说明此时细胞经复苏后尚处于适应期,细胞较为脆弱,回输至肿瘤患者后可能会进一步影响其生存环境,因此在使用过程中应避开此时期。复苏后 24 ~ 48 h 细胞毒活性有很大幅度增加,说明了此时细胞增殖活跃,细胞杀伤活性高,提示 CIK 细胞选择合适的体外培养时间冻存后再经复苏培养,亦可以使用。

最后,体外培养后冻存组细胞复苏后的效应因子 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  分泌量检测结果显示,随复苏时间的延长,这两个细胞因子的分泌量也逐渐上升。从横向来看,72 h 时,体外培养 6 d 后冻存组 IFN- $\gamma$  的分泌量要高于其他组,而体外培养 12 d 后冻存组 TNF- $\alpha$  的分泌量则明显高于其他组。IFN- $\gamma$  能够调节机体的免疫力,抑制病毒复制,抑制肿瘤细胞的增殖;TNF- $\alpha$  除能够诱导肿瘤细胞凋亡之外,还能够促进细胞毒性 T 细胞的分化以及其他效应因子,如 IL-2、IFN- $\gamma$  的产生。因此综合来看,在 CIK 细胞用于杀伤、清除肿瘤细胞时建议以 TNF- $\alpha$  为首要考虑的细胞因子。

综上,通过研究体外连续培养以及体外培养不同时间后冻存对 CIK 细胞增殖、细胞表面标志、细胞毒活性以及分泌细胞因子的研究,本研究认为冻存对 CIK 细胞的确有一定的影响,但经复苏后短时间培养,其能够恢复其生物学活性。在本实验条件下,体外培养 6 d 后冻存的 CIK 细胞复苏后细胞增殖较快,并且 IFN- $\gamma$  的分泌量也高于另外两组;而体外培养 12 d 后冻存的 CIK 细胞复苏后 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞比例、细胞毒活性以及 TNF- $\alpha$  高于另外两组。在实际应用中仍应该在培养条件改变时重复上述检测,以选择活性较高的细胞。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 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.

- [ 2 ] Hontscha C, Borck Y, Zhou H, et al. Schmidt-Wolf IG. 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.
- [ 3 ] Hongeng S. Generation of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cytokine-induced killer cells and their *in vitro* cytotoxicity against pediatric cancer cells [ J ]. Int Hematol, 2003, 77( 2 ): 175-179.
- [ 4 ] 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 ]. Immunol, 1994, 153( 4 ): 1687-1696.
- [ 5 ] Ma Y, Xu YC, Tang L, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cell therapy for patients with hepatocellular carcinoma: Efficacy and safety [ J ]. Exp Hematol Oncol, 2012, 1( 1 ): 11-20.
- [ 6 ] Jiang JT, Shen YP, Wu CP. 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.
- [ 7 ] 袁玉涛, 梁小亮, 黄连江, 等. 冻存对 CIK 细胞活性的影响 [ J ]. 实用肿瘤学杂志, 2009, 23( 6 ): 509-512.
- [ 8 ] 刘刚, 任宏, 孙学军, 等. 脐血源性 CIK 细胞的体外增殖及其对人胆囊癌细胞株 GBC-SD 杀伤活性的实验研究 [ J ]. 中华肝胆外科杂志, 2007, 13( 8 ): 540-543.
- [ 9 ] 张震, 赵先兰, 王丽萍, 等. 脐血来源 CIK 细胞高表达激活型表面标志物及耐药基因 ABCG2 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20( 1 ): 20-25.
- [ 10 ] 王南, 杨文慧. 异体 CIK 细胞治疗放疗后肝癌患者的临床观察 [ J ]. 中国医学创新, 2010, 7( 5 ): 84-86.
- [ 11 ] 牟青杰, 王洁, 崔为发, 等. 三种来源 CIK 细胞体外增殖及杀伤活性比较 [ J ]. 山东医药, 2010, 50( 1 ): 7-9.
- [ 12 ] 郑秀娟, 刘荣军, 李丽, 等. 两种不同成分培养基制备 CIK 细胞的生物学特征 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19( 3 ): 317-319.
- [ 13 ] Niu Q, Wang Wei, Li Yong, et al. Cord blood-derived cytokine-induced killer cells biotherapy combined with second-line chemotherapy in the treatment of advanced solid malignancies [ J ]. Int Immunopharmacol, 2011, 11( 4 ): 449-456.
- [ 14 ] 刘运洪, 孟明耀, 解燕华, 等. 人外周血淋巴细胞体外诱导培养前后细胞表型与杀伤活性相关性研究 [ J ]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33( 5 ): 531-537.
- [ 15 ] Gershon RK, Cohen P, Hencin R, et al. Suppressor T cells [ J ]. Immunol, 1972, 108( 3 ): 586-590.
- [ 16 ] Kapp JA, Bucy RP. CD8<sup>+</sup> suppressor T cells resurrected [ J ]. Hum Immunol, 2008, 69( 11 ): 715-720.
- [ 17 ] 曹建平, 姜志明, 张晓晨. CIK 在无血清培养体系中的增殖、表型变化和抗肿瘤活性 [ J ]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21( 5 ): 583-586.

[ 收稿日期 ] 2013 - 02 - 25

[ 修回日期 ] 2013 - 04 - 20

[ 本文编辑 ] 周玲琳