

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.01.016

· 短篇论著 ·

链式 CIK 细胞对白血病 K562 细胞的体外杀伤活性

Tumor killing effect of mCIK cells against leukemia K562 cells *in vitro*

王文浩¹, 李贵新², 刘锦², 孙秀梅², 巩佃霞¹(1. 潍坊医学院 研究生院, 山东 潍坊 261053; 2. 潍坊医学院附属医院 肿瘤科, 山东 潍坊 261031)

[摘要] 目的: 研究细胞因子诱导的体外细胞经过链式激活后获得的链式 CIK 细胞对白血病 K562 细胞的杀伤效应。方法: 采用血细胞单采机从外周血分离单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 经过细胞因子诱导、扩增、培养得到链式 CIK 细胞, 以 CIK 细胞作对照, 检测链式 CIK 细胞的增殖能力, LDH 释放法测定其对 K562 细胞的杀伤活性。结果: 链式 CIK 细胞组在培养第 5、第 14 天的细胞数低于 CIK 细胞组($P < 0.01$); 链式 CIK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性在效靶比 40:1 和 20:1 时分别为(56.1 ± 2.24)%、(34.4 ± 3.56)%, 均低于 CIK 细胞(均 $P < 0.01$)。结论: 链式 CIK 细胞是一种培养周期短、对白血病 K562 杀伤活性较弱的免疫细胞。

[关键词] 链式 CIK 细胞; 白血病; K562 细胞; 杀伤活性

[中图分类号] R733.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)01-0095-03

链式 CIK 细胞(cascade primed immune cells)是将患者外周血分离获得外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 一部分经固化的 CD3 单克隆抗体激活后, 加入外源性细胞因子, 收获抗原提呈细胞——树突状细胞, 再加入剩余未经激活的 PBMC 共同培养后获得免疫活性细胞^[1-2]。链式 CIK 细胞是一个级联激活的免疫细胞的集群, 主要包括 CD3⁺ CD56⁺ 和 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞。单个核细胞在体外用 CD3 单抗激活的 T 淋巴细胞进行刺激, 以提高 HLA 分子和共刺激分子的表达。继 LAK、TIL 及 CIK 后, 链式 CIK 细胞作为一种新技术, 其抑瘤作用日益受到重视^[3]。本研究通过外周血诱导产生链式 CIK 细胞, 检测链式 CIK 细胞的增殖能力及对白血病 K562 细胞系的杀伤活性, 探讨其抗肿瘤的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

K562 细胞购于中国肿瘤细胞库(北京)。RPMI1640 购自索莱宝公司, 胎牛血清购自 HyClone 公司, rHuIFN- γ 和 rHuIL-2 均购自 PEPROTECH 公司, 鼠抗人 CD3 单抗购自北京同立海源生物技术有限公司, 链式 CIK 细胞培养专利试剂购自德国慕尼黑大学免疫研究所, 人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司, 细胞裂解液 9% TRIton X-100、底物液 Substrate Mix 均购自 PRO-

MEGA 公司, Tris-HCl(pH 8.8)购自碧云天生物技术研究所。酶标分析仪购自深圳雷杜生命科学股份有限公司。

1.2 链式 CIK 细胞、CIK 细胞的培养

采用血细胞单采机分离外周血, 获得 PBMC, 再经过淋巴细胞分离液处理, 洗涤后调整细胞密度为 1×10^6 个/ml。链式 CIK 细胞的诱导: 经固化的抗 CD3 单克隆抗体和专利试剂激活半数 PBMC, 培养诱导为树突状细胞。再加入未经激活的半数 PBMC, 在树突状细胞和专利细胞因子的作用下, 经 4 d 培养 T 淋巴细胞被激活并大量增殖, 在培养的第 5 天收获链式 CIK 细胞, 冻存一部分, 另一部分继续培养至 14 d。CIK 细胞的诱导: PBMC 在 1 000 U/ml 的 IFN- γ 完全培养基中培养 24 h 后, 加入 IL-2 300 U/ml、CD3 单抗 50 ng/ml, 每 3 d 量换液或扩瓶 1 次, 并补加 IL-2 300 U/ml; 培养至第 14 天收获 CIK 细胞。

1.3 LDH 释放法检测效应细胞的杀伤活性

取培养第 15 天的 CIK 细胞和冻存的链式 CIK 细胞作为效应细胞, 以 K562 细胞为靶细胞, 按 40:1、20:1、10:1 效靶比分别把效应细胞和靶细胞加入 96 孔板, 另设效应细胞、靶细胞自然释放组、靶细

[作者简介] 王文浩(1987-), 男, 山东省潍坊市人, 硕士生, 主要从事肿瘤生物免疫治疗方面的研究。E-mail: hao1433@126.com

[通信作者] 李贵新(Li Guixin, corresponding author), E-mail: liguixin@wfmc.edu.cn

胞最大释放组、对照组、每组设 5 个复孔, 放置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4-6 h, 在培养结束前 45 min, 靶细胞最大释放组和体积纠正对照组加入 20 μl 细胞裂解液。离心后每孔吸取 50 μl 上清转移入另一 96 孔板, 每孔加入底物液 50 μl, 室温避光孵育 30 min。每孔加入 50 μl 终止液, 振荡打散后, 用酶标仪测 490 nm 波长处光密度(D)值。试验组、靶细胞自然释放组和效应细胞自然释放组的 D 值均值减去培养液空白对照组 D 值, 获得校正值 A、E、T。靶细胞最大释放组的 D 度值减去体积纠正组值, 获得校正值 T_{max}。杀伤活性(%) = (A-E-T) / (T_{max} - T) × 100%。

1.5 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 17.0 统计软件行两独立样本的 t 检验, P < 0.05 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 链式 CIK 细胞的增殖活性低于 CIK 细胞

实验结果(图 1, 表 1)显示, 细胞在培养第 2 天开始出现增殖, 第 3 天以后进入增殖期, 培养至 14 天细胞数达 $(10.68 \pm 2.55) \times 10^6$ 个/ml。CIK 细胞增殖活性: 培养细胞在第 3 天开始出现增殖, 第 5 天以后进入快速增殖期, 培养至第 14 天细胞数达 $(60.71 \pm 5.01) \times 10^6$ 个/ml。CIK 细胞培养第 5 天时两者增殖倍数相差 3 倍, CIK 细胞组培养第 14 天增殖约 60 倍, 是链式 CIK 细胞的 6 倍。倒置显微镜下均可见细胞呈集落样悬浮生长, 细胞体积明显增大, 培养期内细胞存活率均达 95% 以上(图 1)。根据链式 CIK 细胞专利试剂说明, 培养至第 5 天收获细胞用于临床, 因试验需要培养至第 14 天。

表 1 链式 CIK 细胞与 CIK 细胞的增殖比较($\bar{x} \pm s$)

时间 (t/d)	链式 CIK 细胞 ($\times 10^6$ /ml)	CIK 细胞 ($\times 10^6$ /ml)	t 值	P 值
1	1.26 ± 0.25	1.21 ± 0.23	0.329	0.769
3	2.15 ± 1.58	5.35 ± 3.36	1.927	0.089
5	4.34 ± 2.41*	12.47 ± 6.18	2.741	0.025
14	10.68 ± 2.55*	60.71 ± 5.01	19.90	< 0.001

* P < 0.05 vs CIK 细胞组

2.2 链式 CIK 细胞的杀伤活性低于 CIK 细胞

以 K562 细胞为靶细胞, 以链式 CIK 细胞和

CIK 细胞为效应细胞, 对其细胞杀伤活性进行了分析, 结果(表 2)显示, 链式 CIK 细胞组杀伤活性在效靶比 40:1、20:1 时分别达 $(56.1 \pm 2.24)\%$ 、 $(34.4 \pm 3.56)\%$, 均低于 CIK 细胞组(均 P < 0.01)。在效靶比 10:1 时两组杀伤活性无差异(P > 0.05)。

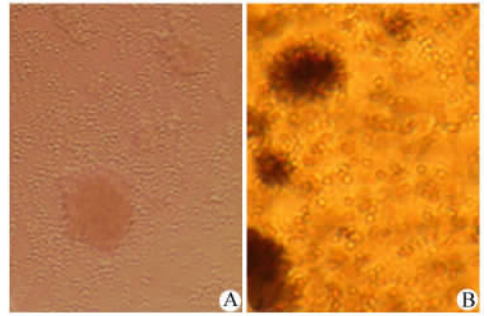


图 1 培养第 14 天的 CIK 细胞、链式 CIK 细胞呈集落样悬浮生长($\times 100$)
A: CIK 细胞; B: 链式 CIK 细胞

表 2 链式 CIK 和 CIK 细胞对 K562 细胞杀伤活性的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	效靶比		
	40:1	20:1	10:1
CIK 细胞	61.8 ± 2.76	41.5 ± 2.39	32.4 ± 1.99
链式 CIK 细胞	56.1 ± 2.24*	34.4 ± 3.56*	28.6 ± 3.26
t 值	3.207	3.312	1.990
P 值	0.007	0.004	0.06

* P < 0.05 vs CIK 细胞组

3 讨论

链式 CIK 细胞是自体链式激活的免疫细胞, 效应细胞包括 NK 细胞、NKT 细胞、DC 细胞以及 CD4⁺ 的 T 辅助细胞(Th)和 CD8⁺ 的细胞毒 T 细胞(CTL), 后两者是主要的杀伤效应细胞; 在数量方面, Th 和 CTL 细胞约占总数的 80%, 其余占 20%^[1,4-5]。CIK 的主要功能细胞是自然杀伤 T 细胞(NKT), 其作用类似于自然杀伤细胞(NK 细胞), 是非组织相容性抗原(major histocompatibility complex, MHC)限制性的免疫活性细胞^[6-7]。链式 CIK 细胞的效应细胞不仅涵盖了 CIK 的主要效应细胞, 同时 Th 和 CTL 细胞有着显著的肿瘤杀伤作用, 尤其细胞

毒 T 细胞是重要的杀伤细胞,专门杀伤表达或高表达 MHC 分子(HLA 抗原)的肿瘤细胞,是典型的特异性杀伤。在培养过程中通过多种细胞因子的共同刺激,以及独特的培养方法,激活为有细胞毒作用的链式 CIK 细胞,可以调节机体免疫平衡,同时能分泌 IL-2、IL-6、IFN- γ 、TNF 等细胞因子,可提高细胞毒作用^[8]。

本研究结果表明,链式 CIK 细胞组和 CIK 细胞组培养至第 14 天时,细胞数分别为 $(10.68 \pm 2.55) \times 10^6$ 、 $(60.71 \pm 5.01) \times 10^6$,链式 CIK 细胞的增殖活性低于 CIK 细胞($P < 0.001$)。链式 CIK 细胞到收获细胞(5 d)时增殖倍数为 4 倍,CIK 细胞同期增殖倍数为 12 倍,CIK 细胞收获时(14 d)增殖倍数约为 60 倍。由细胞的杀伤实验可看出,链式 CIK 细胞对 K562 细胞有细胞毒作用,在效靶比 40:1 和 20:1 时均低于 CIK 细胞组($P = 0.007/0.004$)。在效靶比 10:1 时两组杀伤活性无差异($P = 0.06$)。链式 CIK 在对癌细胞成功裂解的过程中需要 HLA- I 型和 HLA- II 型表达的相互协同,表明一种 T 辅助细胞和细胞毒性 T 细胞的全面的相互依存性。K562 通常不表达白细胞抗原,K562 细胞的裂解通常是由 PBMC 培养中的活化的 NKT 细胞介导的^[9-10]。结果表明,链式 CIK 细胞对 NK 靶细胞 K562 有较弱的杀伤活性。

肿瘤的过继免疫治疗的关键是要有足量的、杀伤活性强的免疫活性细胞^[11-12]。在临床工作中,可以通过血细胞单采分离机获取大量 PBMC,提升链式 CIK 的细胞量,该技术培养周期短(5 天)、特异性强,收获后可以进行细胞冻存,为临床使用提供了方便。实验结果表明,链式 CIK 细胞对白血病细胞株杀伤活性低于 CIK 细胞,该研究方法可作为实验模型,进一步探讨该技术对实体肿瘤细胞的杀伤活性,为临床工作中选择治疗适应症提供指导。从理论上分析,链式 CIK 细胞可裂解 MHC 限制型肿瘤细胞,弥补 CIK 细胞的不足。由于两种细胞培养时间不同,抗瘤谱、作用机制存在区别,这为联合应用两种细胞进行抗肿瘤治疗提供了可能,但需要更多实验研究和临床研究的证实。

[参 考 文 献]

- [1] Laumbacher B, Gu S, Wank R. Activated monocytes prime native T cells against autologous cancer: Vigorous cancer destruction *in vitro* and *in vivo* [J]. *Scand J Immunol*, 2012, 75(3): 314-328.
 - [2] Wank R. Rapid responses of lymphocytes in an optimized mixed lymphocyte culture [J]. *Tissue Antigens*, 1982, 19(5): 329-339.
 - [3] Gross S, Walden P. Immunosuppressive mechanisms in human tumors: Why we still cannot cure cancer [J]. *Immunol Lett*, 2008, 116(1): 7-14.
 - [4] Fu GF, Chen X, Hu HY, et al. Emergence of peripheral CD3⁺ CD56⁺ cytokine-induced killer cell in HIV-1-infected Chinese children [J]. *Int Immunol*, 2012, 24(3): 197-206.
 - [5] Shi M, Zhang B, Tang ZR, et al. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(8): 1146-1151.
 - [6] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, et al. Functions of natural killer cells [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(5): 503-510.
 - [7] Couzin-Frankel J. Immune therapy steps up the attack [J]. *Science*, 2010, 330(6003): 440-443.
 - [8] Su X, Zhang L, Jin L, et al. Immunotherapy with cytokine-induced killer cells in metastatic renal cell carcinoma [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2010, 25(4): 465-470.
 - [9] Petvises S, Pakakasama S, Wongkajornsilp A, et al. *Ex vivo* generation of cytokine-induced killer cells (CD3⁺ CD56⁺) from post-stem cell transplant pediatric patients against autologous-Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines [J]. *Pediatr Transplant*, 2007, 11(5): 511-517.
 - [10] Walker D, Jason J, Wallace K, et al. Spontaneous cytokine production and its effect on induced production [J]. *Clin and Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(5): 1049-1056.
 - [11] Koretzky GA, Myung PS. Positive and negative regulation of T cell activation by adaptor proteins [J]. *Nat Rev Immunol*, 2000, 1(2): 95-107.
 - [12] Laport GG, Sheehan K, Baker J, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011, 17(11): 1679-1687.
- [收稿日期] 2013 - 09 - 26 [修回日期] 2013 - 12 - 25
[本文编辑] 韩丹