

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.014

不同培养基与血清的培养体系对细胞因子诱导杀伤细胞增殖和功能的影响

高群^{1,2}, 王菲^{1,3}, 王丽萍², 杨黎¹, 张震^{1,2}, 岳冬丽^{1,2}, 王盟^{1,4}, 张毅^{1,2,3,5} (1. 郑州大学第一附属医院 生物细胞治疗中心, 河南 郑州 450052; 2. 郑州大学第一附属医院 肿瘤科, 河南 郑州 450052; 3. 郑州大学 生命科学院, 河南 郑州 450001; 4. 郑州大学第一附属医院 消化内科, 河南 郑州 450052; 5. 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的:**探讨不同细胞培养基及血清的培养体系对细胞因子诱导杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞的增殖和功能的影响。**方法:**采集6例肺癌患者外周血,分离获得单个核细胞,按照不同血清与培养基分为8组:GT-T551培养基+患者自体血清组、GT-T551培养基+健康人血清组、GT-T551培养基+FBS组、GT-T551培养基组、RPMI 1640培养基+患者自体血清组、RPMI 1640培养基+健康人血清组、RPMI 1640培养基+FBS组及RPMI 1640培养基组。采用CFSE染色法检测细胞增殖能力,流式细胞术检测CIK细胞CD3⁺CD8⁺T细胞及CD3⁺CD4⁺T细胞颗粒酶B、IFN- γ 、穿孔素的分泌情况及以白血病NB4、K562细胞为靶细胞时CD3⁺CD56⁺T细胞、CD3⁺CD4⁺T细胞及CD3⁺CD8⁺T细胞表面CD107a的表达。**结果:**GT-T551培养基加入患者自体血清组CIK细胞的增殖指数显著高于其他各组($P < 0.05$)。GT-T551培养基或RPMI 1640培养基中加入患者自体血清组CD4⁺T细胞颗粒酶B的分泌水平平均显著高于加健康人血清组[(22.85 ± 3.50)% vs (13.28 ± 1.75)%, (22.57 ± 3.45)% vs (15.37 ± 4.08)%],均 $P < 0.01$],而且GT-T551+患者自体血清组CD8⁺T细胞分泌IFN- γ 的能力显著高于加健康人血清组($P < 0.05$)。以白血病细胞系NB4和K562细胞作为靶细胞时,检测CD3⁺CD56⁺NKT细胞表面CD107a的表达,GT-T551培养基中加入患者自体血清组优于加健康人血清组[(7.10 ± 1.94)% vs (2.73 ± 0.79)%, (8.00 ± 1.82)% vs (3.03 ± 0.78)%], $P < 0.01$],同时优于RPMI1640+患者自体血清组[(4.45 ± 1.96)% vs (3.30 ± 1.47)%], $P < 0.01$]。**结论:**GT-T551培养基加患者自体血清的培养体系更有利于CIK细胞的增殖、细胞因子分泌及发挥杀伤功能,可推荐作为CIK细胞最佳培养体系。

[关键词] 细胞因子诱导的杀伤细胞;培养基;血清;增殖;细胞毒性;白血病细胞

[中图分类号] R735.1; R392.12 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2014)06-0680-07

Effects of different cell culture medium and different sources of serum on proliferative and functional activities of cytokine-induced killer cells

Gao Qun^{1,2}, Wang Fei^{1,3}, Wang Liping², Yang Li¹, Zhang Zhen^{1,2}, Yue Dongli^{1,2}, Wang Meng^{1,4}, Zhang Yi^{1,2,3,5} (1. Biological Cell Therapy Center, Zhengzhou University-Affiliated First Affiliated Hospital, Zhengzhou 450052, He'nan, China; 2. Department of Oncology, Zhengzhou University-Affiliated First Affiliated Hospital, Zhengzhou 450052, He'nan, China; 3. College of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, He'nan, China; 4. Department of Gastroenterology, Zhengzhou University-Affiliated First Affiliated Hospital, Zhengzhou 450052, He'nan, China; 5. Key-Disciplines Laboratory of Clinical-Medicine of Henan Province, Zhengzhou 450052, He'nan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of different culture media and different sources of serum on proliferative

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81171986, No. 81271815);卫生部科研攻关基金资助(No. 20110110001);河南省科技厅基础与前沿技术研究基金资助(No. 112300410153, No. 122300410155);河南省科技厅科技创新人才计划资助(No. 124200510006);郑州大学第一附属医院内创新团队基金资助。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81171986, No. 81271815), the Research Grant from the Chinese Ministry of Health (No. 20110110001), the Basic and Advanced Technology Research Foundation from Science and Technology Bureau of He'nan Province (No. 112300410153, No. 122300410155), the Program of Innovation Talents of Science and Technology from Science and Technology Bureau of He'nan Province (No. 124200510006), and the Foundation for Innovation Team of the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University

[作者简介] 高群(1988-),女,黑龙江省齐齐哈尔市人,硕士生,主要从事肿瘤的生物细胞免疫治疗研究, E-mail: qungao1988126@126.com

[通信作者] 张毅(Zhang Yi, corresponding author), E-mail: yizhang@zzu.edu.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20141209.1520.009.html>

and functional activities of cytokine-induced killer (CIK) cells. **Methods:** Mononuclear cells were isolated from peripheral blood of 6 lung cancer patients and were induced to differentiate into CIK cells in 8 different culture conditions: GT-T551 + autologous serum, GT-T551 + serum from a healthy individual, GT-T551 + FBS, GT-T551, RPMI 1640 + autologous, RPMI 1640 + serum from a healthy individual, RPMI 1640 + FBS, and RPMI 1640. After induction for 6 days, cell proliferation was assessed carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) labeling assay, and CD3⁺CD8⁺ cell proportion, CD3⁺CD4⁺ T cell expression of Granzyme B and IFN- γ and perforin and the expression of CD107a on CD3⁺CD56⁺, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells in the presence of leukemia NB4 and K562 cells as targets were assessed by flow cytometry. **Results:** The proliferation index of CIK cells cultured in GT-T551 medium supplemented with autologous serum was significantly higher than that in other culture conditions ($P < 0.05$). The expression of Granzyme B on CD4⁺ T cells was significantly higher ($P < 0.01$) in the GT-T551 + autologous serum group [22.85 ± 3.50] % than in the GT-T551 + healthy serum group [13.28 ± 1.75] % and significantly higher ($P < 0.01$) in the RPMI 1640 + autologous serum group [22.57 ± 3.45] % than in the RPMI 1640 + healthy serum group [15.37 ± 4.08] %. Furthermore, the amount of IFN- γ secreted from CD8⁺ T cells was significantly higher in the GT-T551 + autologous serum groups compared to GT-T551 + healthy serum group. In the presence of killing NB4 and K562 cells, the expression of CD107a on the CD3⁺CD56⁺ NKT cells was significantly higher in the GT-T551 + autologous serum group ([7.10 ± 1.94] %, [8.00 ± 1.82] %) than in the GT-T551 + healthy serum group ([2.73 ± 0.79] %, [3.03 ± 0.78] %; $P < 0.01$) and in the RPMI 1640 + autologous serum group ([4.45 ± 1.96] %, [3.30 ± 1.47] %; all $P < 0.01$). **Conclusion:** GT-T551 medium supplemented with autologous serum appears the optimal in vitro system to stimulate proliferation, cytokine secretion and enhance the cytotoxicity of CIK cells. This finding may have some clinical significance in CIK therapy.

[**Key words**] cytokine-induced killer (CIK) cell; culture medium; serum; proliferation; cytotoxicity; leukemia cell
[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(6): 680-686]

细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞是一群异质性、非 MHC 限制性的高效溶肿瘤细胞毒性 T 淋巴细胞,1991 年 Schmidt-Wolf 等^[1]首先报道了此类细胞,目前已经广泛应用于肿瘤患者的临床治疗^[2,4]。CIK 细胞治疗对手术或放化疗后患者疗效显著,能消除残留微小的转移病灶,防止癌细胞扩散和复发,提高机体免疫力。Hontscha 等^[5]研究发现,CIK 细胞在辅助治疗多种恶性肿瘤的过程中均具有一定的疗效,患者的总体反应率可达 23.7%,其疗效主要体现在防止肿瘤复发及提高生活质量等方面。由于 CIK 细胞主要通过非 MHC 限制的 CD3⁺CD56⁺ NKT 细胞的自然杀伤能力来消除肿瘤细胞,并通过激活和重建免疫系统来识别和杀伤肿瘤细胞^[6],故其应用在临床上一方面要保证足够的数量,另一方面要保证具有较强的生物学活性。国内已有研究提出自体血清培养 CIK 细胞具有一定的优越性^[7],但是比较不同血清与培养基联合作用对增殖的影响,目前还尚未见报道。因此,本研究观察不同细胞培养基与血清对 CIK 细胞增殖的影响,以便寻找一种更适合 CIK 细胞增殖与激活其杀伤活性的培养体系,为 CIK 细胞进一步临床应用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂、仪器和细胞株

Hyclone RPMI 1640 培养基购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司,GT-T551 培养基购自 KOHJIN 生物有限公司,抗 CD3 单克隆抗体购自以色列 Prospec-tang 公司,多种免疫荧光抗体购自于美国 BD Pharmingen 公司,胎牛血清购自美国 Gibco 公司,重组人白介素-2(interleukin-2, IL-2)购自北京双鹭药业股份有限公司,Ficoll-Plaque 淋巴细胞分离液购自上海华精生物高科技术有限公司,重组人 IFN- γ 购自上海凯茂药业有限公司。白血病 NB4、K562 细胞由本实验室保存。流式细胞仪 BD FASCanto II 购自美国 BD 公司。

1.2 外周血单个核细胞的分离和 CIK 细胞的培养

6 例肺癌患者的外周血标本均来自郑州大学第一附属医院肿瘤科。所有病例均为鳞癌,男性 2 例,女性 4 例,平均年龄(60 ± 5)岁,KPS 评分 > 70 分,临床常规治疗均结束 1 个月以上,预期生存 > 3 个月。无菌条件下采集外周血 20 ~ 30 ml(肝素钠抗凝),采用 Ficoll-Plaque 淋巴细胞分离液进行密度梯度离心,提取白膜层,PBS 洗涤后分别重悬于 GT-T551 + 患者自体血清、GT-T551 + 健康人血清、GT-T551 + FBS、GT-T551、RPMI 1640 + 患者自体血清、

RPMI 1640 + 健康人血清、RPMI 1640 + FBS 及 RPMI 1640 培养基中, 调整细胞密度至 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 IFN- γ (1 000 U/ml) 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后加入抗 CD3 单抗 (100 ng/ml)、IL-2 (2 000 U/ml) 继续培养, 每隔 3 d 分瓶一次, 并补加培养液及 IL-2, 培养 13 d 后 CIK 细胞成熟^[8-10]。

1.3 CFSE 染色法检测不同培养基和血清对 CIK 细胞增殖的影响

在 CIK 细胞培养至第 6 天时, 取各实验组细胞 1×10^6 个, PBS 清洗后加入 1 ml 各组培养基重悬细胞, 加入 1 μl CFSE (5 $\mu\text{mol/L}$) 染色, CO₂ 培养箱中孵育 15 min, PBS 清洗 2 次, 加入 1 ml 各组培养基重悬细胞于 24 孔板中, 并加入各组相应的血清进行培养。各组取 100 μl 的细胞进行 CFSE 母本流式术检测, 之后连续 7 d 取各组细胞 100 μl 进行 CFSE 流式术检测, 采用 Modifit 软件分析细胞增殖指数 (即处于 S 期和 G₂/M 期细胞之和占总细胞数的比例)。

1.4 流式细胞术检测不同培养基和血清对 CIK 细胞免疫表型和细胞因子表达的影响

培养第 13 天时, 取各组成熟 CIK 细胞 1×10^6 个, 加入细胞表面 PE-CY7-CD3 抗体、percp-CD8 抗体、APC-CY7-CD4 抗体各 20 μl , 室温避光 15 min, 清洗、固定、破膜后加入胞内抗体 (PE-Granzyme-B 抗体、APC-IFN- γ 抗体、FITC-Perforin 抗体) 室温避光共孵育 30 min, 流式细胞术分别检测 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞及 CD3⁺ CD4⁺ T 细胞颗粒酶 B、IFN- γ 及穿孔素的分泌情况。

1.5 流式细胞术检测不同培养基和血清对 CIK 细胞杀伤作用的影响

培养第 13 天时, 取各组成熟 CIK 细胞 2×10^6 个, 离心弃上清 (350 $\times g$, 5 min), 重悬于 1 ml 对应的培养基中, 取白血病细胞系 (NB4 及 K562 细胞) 各 1×10^5 个作为靶细胞, 调整效靶比为 20:1, 置于 24 孔板中, 分别加入 1 μl BFA, 37 °C 共同孵育 5 h^[11]。收集细胞, 离心、弃上清, 加入抗体 (PE-CY7-CD3 抗体、percp-CD8 抗体、CD56-APC 抗体、APC-CY7-CD107a 抗体) 各 20 μl , 并加入相应的同型对照抗体^[12], 室温避光孵育 15 min 后以流式术检测 CD3⁺ CD56⁺ T 细胞、CD3⁺ CD4⁺ T 细胞及 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞表面 CD107a 的表达。

1.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析方法分析各个时间点不同组的差异; 多组样本均数两两比较, 方差齐者用 LSD-t 检

验, 方差不齐者用 Dunnett's T3 法检验; 在不同时间点不同组间的比较采用双因素方差分析并进行重复测量。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者自体血清促进 CIK 细胞增殖最明显

CIK 细胞经过多天培养, 其增殖指数检测结果显示, 在培养第 7、8、9、10、12 天时, GT-T551 + 患者自体血清组增殖指数较其他组均有显著升高 ($P < 0.05$, 图 1); 第 11 天时, GT-T551 和 RPMI 1640 加入患者自体血清组的增殖指数都显著高于加入健康人血清的实验组 ($P < 0.05$, 图 1), 说明在 GT-T551 或 RPMI 1640 培养基中加入患者自体血清更有利于 CIK 细胞的增殖。并且, 无论在单独或加入患者自体血清时, GT-T551 均较 RPMI 1640 对 CIK 细胞的增殖有更强的促进作用 (图 2)。

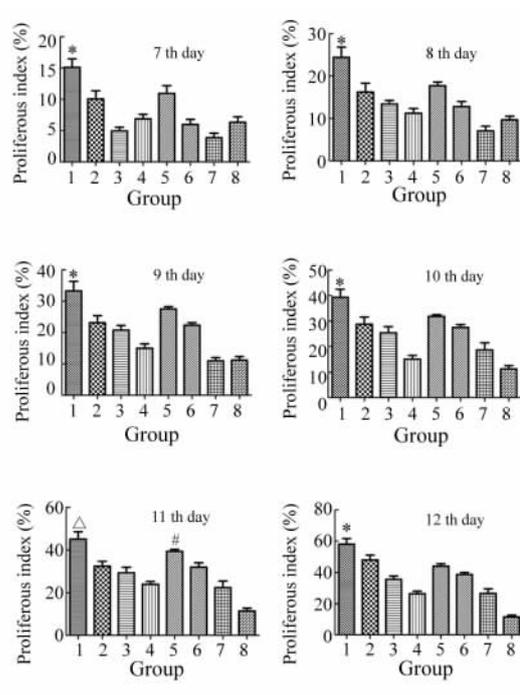


图 1 不同条件培养至第 7~12 天的 CIK 细胞增殖指数 (%)

Fig.1 The proliferation index of CIK cells cultured with different medium and serum in day 7-12(%)

1: GT-T551 + Autologous serum; 2: GT-T551 + Healthy Serum; 3: GT-T551 + FBS; 4: GT-T551; 5: RPMI 1640 + Autologous serum; 6: RPMI 1640 + Healthy serum; 7: RPMI 1640 + FBS; 8: RPMI 1640

* $P < 0.05$ vs the other group, respectively;

Δ $P < 0.05$ vs 2, 3 or 4 group, respectively

$P < 0.05$ vs 6, 7 or 8 group, respectively

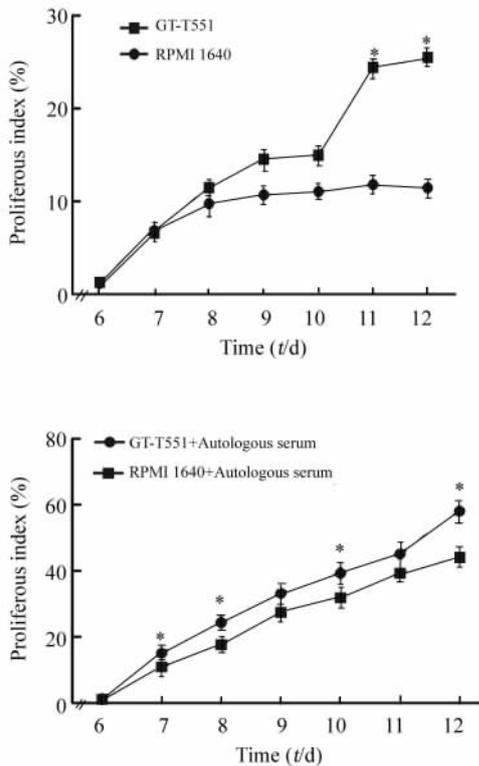


图2 GT-T551 较 RPMI 1640 更利于 CIK 细胞增殖
 Fig. 2 GT-T551 is more conducive than RPMI 1640 to the proliferation of CIK cells
 * $P < 0.05$, vs RPMI 1640 or RPMI 1640 + Autologous serum

2.2 不同培养条件对 CIK 细胞分泌细胞因子的影响

GT-T551 和 RPMI 1640 加入患者自体血清组的 CD4⁺T 细胞颗粒酶 B 分泌均较加入健康人血清组显著升高[GT-T551:(22.85 ± 3.50)% vs(13.28 ± 1.75)% ,RPMI 1640:(22.57 ± 3.45)% vs(15.37 ± 4.08)% ;均 $P < 0.01$](图 3A),但不同培养条件对 CD8⁺T 细胞的颗粒酶 B 分泌没有显著影响($P > 0.05$)。

GT-T551 培养基加患者自体血清组 CD8⁺T 细胞分泌 IFN- γ 的能力要明显高于其他组(图 3B, $P < 0.05$),但在 CD4⁺T 细胞上没有显著差异($P > 0.05$)。

GT-T551 加入患者自体血清组 CD8⁺T 细胞上穿孔素的分泌水平显著高于 RPMI 1640 加入患者自体血清组((15.25 ± 3.73)% vs(7.85 ± 3.92)% , $P < 0.01$](图 3C)。但在 CD4⁺T 细胞上没有显著差异($P > 0.05$)。

2.3 不同培养条件对 CIK 细胞功能的影响

细胞毒性检测结果显示,针对白血病细胞系 NB4,GT-T551 + 患者自体血清组 CD3⁺ CD56⁺ NKT 细胞表面 CD107a 的表达显著高于其他 6 组(由于 RPMI 1640 组在培养过程中细胞逐渐凋亡,故在功能和表型方面均未检测)($P < 0.05$),并且 GT-T551 培养基中 + 患者自体血清[(7.10 ± 1.94)% vs (2.73 ± 0.79)% , $P < 0.01$]和 RPMI 1640 培养基中 + 患者自体血清 [(4.45 ± 1.96)% vs (2.52 ± 0.76)% , $P < 0.05$] 均比加入健康人血清更有利于增强 CIK 细胞的细胞毒活性(图 4A)。

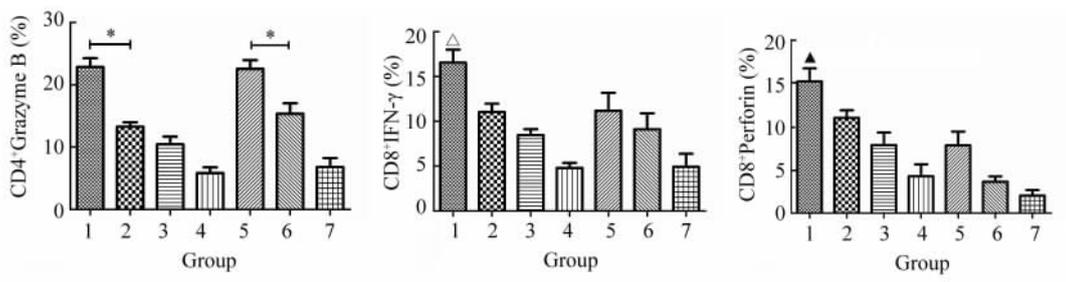


图3 不同培养条件对 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞颗粒酶 B 或 CD8⁺T 细胞 IFN- γ 或穿孔素的表达的影响(%)
 Fig. 3 Influence of different culture conditions on Grazyme-B expression of CD4⁺T cells and IFN- γ or Perforin expression on CD8⁺T cells (%)

1: GT-T551 + Autologous serum; 2: GT-T551 + Healthy serum; 3: GT-T551 + FBS; 4: GT-T551;
 5: RPMI 1640 + Autologous serum; 6: RPMI 1640 + Healthy serum; 7: RPMI 1640 + FBS
 ** $P < 0.05$ vs 2 or 6 group; $\Delta P < 0.05$ vs the other group, respectively; $\blacktriangle P < 0.05$ vs 5 group

GT-T551 + 患者自体血清组 CD3⁺ CD8⁺T 细胞 表面 CD107a 的表达显著高于 RPMI 1640 + 患者自

体血清组[(34.83 ± 3.28)% vs(27.78 ± 3.59)% , $P < 0.01$] (图 4B), 而 GT-T551 + 患者自体血清组 CD4⁺T 细胞表面 CD107a 的表达与其他组(除 GT-T551 组) 均无显著差异。

针对白血病细胞系 K562(图 5), GT-T551 + 患者自体血清组 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞与[(8.00 ± 1.82)% vs(3.03 ± 0.78)% , $P < 0.01$] CD3⁺CD8⁺T 细胞[(34.52 ± 3.25)% vs(22.05 ± 0.82)% , $P < 0.05$] CD107a 的分泌均显著高于 GT-T551 + 健康人血清组; 且 GT-T551 + 患者自体血清组优于 RPMI 1640 + 患者自体血清组 [CD3⁺CD56⁺NKT: (8.00 ± 1.82)% vs(3.30 ± 1.47)% , $P < 0.01$; CD3⁺CD8⁺T: (34.52 ± 3.25)% vs(25.05 ± 2.03)% , $P < 0.05$]。

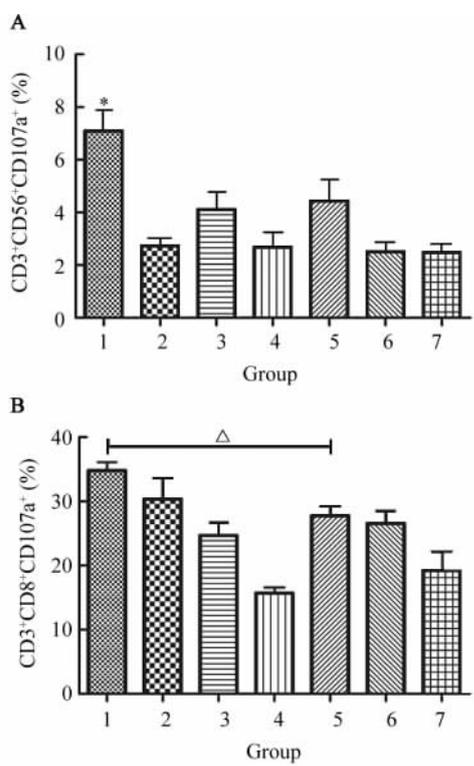


图 4 不同培养系统对 CIK 细胞杀伤白血病 NB4 细胞时 CD107a 表达的影响

Fig. 4 Influence of different culture system on the CD107a expression in CIK cells against leukemia NB4 cells
 1: GT-T551 + Autologous serum; 2: GT-T551 + Healthy serum; 3: GT-T551 + FBS; 4: GT-T551; 5: RPMI 1640 + Autologous serum; 6: RPMI 1640 + Healthy serum; 7: RPMI 1640 + FBS
 * $P < 0.05$ vs the other group, respectively; $\Delta P < 0.05$ vs 5 group

3 讨论

随着肿瘤治疗技术的发展,过继性免疫细胞治

疗已成为肿瘤生物治疗的重要方法之一 [13]。CIK 细胞具有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性及自然杀伤细胞的非 MHC 限制性杀瘤的优点,并具有增殖速度快、杀瘤活性高、杀瘤谱广、对正常骨髓造血前体细胞毒性小等多种优势 [14-15]。自发现 CIK 细胞以来,研究者 [16-17] 尝试了多种培养体系,希望能够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。虽然目前国内已有多家机构开展 CIK 治疗恶性肿瘤的临床应用研究,但是 CIK 培养方法并没有达成一致标准,基于现有培养体系获得的 CIK 细胞,在细胞的增殖能力及功能等方面均存在一定的差别 [18]。

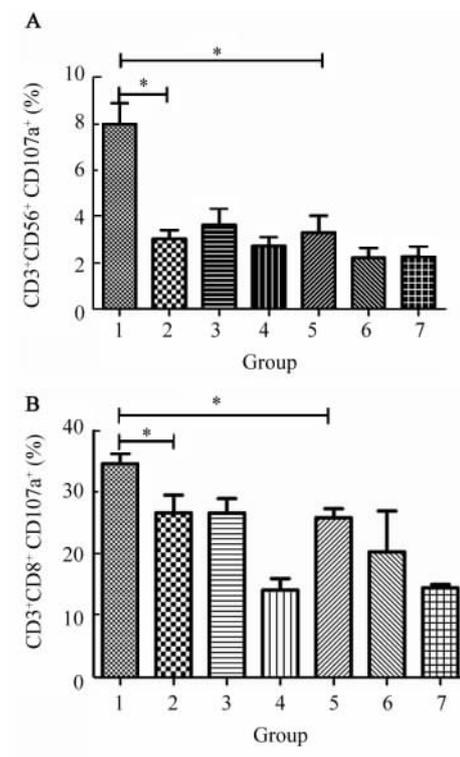


图 5 不同培养系统对 CIK 细胞杀伤白血病 K562 细胞时 CD107a 表达的影响

Fig. 5 Influence of different culture system on the CD107a expression in CIK cells against leukemia K562 cells
 1: GT-T551 + Autologous serum; 2: GT-T551 + Healthy Serum; 3: GT-T551 + FBS; 4: GT-T551; 5: RPMI 1640 + Autologous serum; 6: RPMI 1640 + Healthy serum; 7: RPMI 1640 + FBS
 * $P < 0.05$ vs 2 or 5 group, respectively

本研究比较了 GT-T551 + 患者自体血清、GT-T551 + 健康人血清、GT-T551 + FBS、GT-T551、RPMI 1640 + 患者自体血清、RPMI 1640 + 健康人血清、

RPMI 1640 + FBS 及 RPMI 1640 培养基等 8 种不同的培养体系对 CIK 细胞的增殖能力、表型及功能的影响。结果表明,GT-T551 + 患者自体血清组较其他组增殖能力强,第 11 天时,GT-T551 组和 RPMI 1640 组加入患者自体血清比加入健康人血清的增殖指数高,说明加患者自体血清要比加健康人血清更好,但不能说明 GT-T551 + 患者自体血清组与 RPMI 1640 + 患者自体血清组之间的差异,即便如此,较其他组来说,也能体现 GT-T551 + 患者自体血清组的优势。

检测细胞内因子实验结果显示,在 CD4⁺T 细胞培养基中加入患者自体血清后颗粒酶 B 的分泌要比加入健康人血清的更高,在 GT-T551 + 患者自体血清组 CD8⁺T 细胞增殖能力最强、分泌 IFN- γ 的能力也高于 GT-T551 + 健康人血清组。GT-T551 + 患者自体血清也比 RPMI 1640 + 患者自体血清更能促进 CD3⁺CD8⁺T 细胞上穿孔素的分泌。间接说明了 GT-T551 + 患者自体血清组最有利于 CIK 细胞发挥杀伤与细胞毒功能。

CD3⁺CD56⁺NKT 细胞以及 CD3⁺CD8⁺细胞毒性 T 细胞是免疫反应中重要的杀伤细胞,应用脱颗粒实验可以间接说明细胞的杀伤功能^[19]。针对白血病细胞系 NB4 的脱颗粒实验应用了活细胞染色的方法^[20],通过检测 CD107a 的表达来间接说明细胞毒性功能,CD107a 的表达和细胞毒性细胞杀伤靶细胞明显相关,具有杀伤活性的 T 细胞 CD107a 表达明显上调^[21]。GT-T551 + 患者自体血清组 NKT 细胞表面 CD107a 的表达显著高于其他 6 组,并且 GT-T551 培养基或 RPMI 1640 培养基中加入患者自体血清组 NKT 细胞表面 CD107a 的表达均比加入健康人血清的 CD107a 表达水平高。在 CD3⁺CD8⁺T 细胞检测中,GT-T551 + 患者自体血清组 CD3⁺CD8⁺T 细胞上 CD107a 的表达水平较 GT-T551 + 健康人血清组高,虽然无统计学差异,但仍能说明 GT-T551 + 患者自体血清组具有较强的杀伤潜能。此外,GT-T551 + 患者自体血清组表面 CD107a 的表达显著高于 RPMI 1640 + 患者自体血清组。通过针对白血病细胞系 NB4 的脱颗粒实验就可看出,GT-T551 + 患者自体血清组的增殖指数最高的前提下,细胞毒性功能也是相应增高的,而且 GT-T551 比 RPMI 1640 更有利于细胞毒性功能的提高;同时,针对白血病细胞系 K562 的脱颗粒实验也同样说明了 GT-T551 + 患者自体血清组的优势。

总之,GT-T551 培养基中加入患者自体血清是一种更适于 CIK 细胞增殖和提高细胞毒性功能的

培养体系,为临床肿瘤患者治疗的应用提供了高效率、高质量的培养条件,有利于临床疗效的发挥,但对不同条件下培养 CIK 细胞功能的检测还有待进一步完善。

[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 activity [J]. *J Exp Med*, 1991, 174(1): 139-149.
- [2] Wolchok JD, Hoos A, ODay 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/OL]. *J Cancer*, 2011, 2: 363-368 [2014-06-02]. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>.
- [5] 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.
- [6] Hongeng S, Petwases S, Worapongaihoon S, et al. Generation of CD3⁺CD56⁺ cytokine-induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells [J]. *Int J Hematol*, 2003, 77(2): 175-179.
- [7] 樊琳, 徐全晓. 不同类型培养基对 CIK 细胞增殖及抗肿瘤活性影响的实验研究 [J]. *医学信息*, 2013, 26(4): 114-115.
- [8] Velegriaki M, Papakonstanti E, Mavroudi I, et al. Impaired clearance of apoptotic cells leads to HMGB1 release in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes and induces TLR4-mediated cytokine production [J]. *Haematologica*, 2013, 98(8): 1206-1215.
- [9] Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, et al. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity [J]. *Cell Immunol*, 2009, 254(2): 149-154.
- [10] Zhang Y, Wang J, Wang Y, et al. Autologous CIK cell immunotherapy in patients with renal cell carcinoma after radical nephrectomy [J/OL]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 195691 [2014-06-02]. <http://www.hindawi.com/journals/jir/2013/195691/>.
- [11] Demotte N, Wieërs G, Van Der Smwassen P, et al. A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4⁺ and CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(19): 7476-7488.
- [12] Marcenaro S, Gallo F, Martini S, et al. Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): Defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease

[J]. Blood, 2006, 108(7): 2316-2323.

[13] 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.

[14] Hongeng S, Petvises S, Worapengpaiboon S, et al. Generation of CD3 + CD56 + cytokine - induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells [J]. Int J Hematol, 2003, 77(2): 175-179.

[15] Karlens S, Gilljam M, Chambers BJ, et al. A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3 + CD56 + natural killer cells [J]. Hum Immunol, 2001, 62 (10): 1092-1098.

[16] 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(6): 673-684.

[17] 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.

[18] 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.

[19] Ezinne CC, Yoshimitsu M, White Y, et al. HTLV-1 specific CD8 + T cell function augmented by blockade of 2B4/CD48 interaction in HTLV-1infection [J]. PLoS ONE , 2014 , 9(2): e87631.

[20] Pievani A, Belussi C, Klein C, et al. Enhanced killing of human B-cell lymphoma targets by combined use of cytokine-induced killer cell (CIK) cultures and anti-CD20 [J]. Blood, 2011, 117(2): 510-518.

[21] Choluřová D, Jakubřkovaá J, Kubes M, et al. Comparative study of four fluorescent probes for evaluation of natural killer cell cytotoxicity assays [J]. Immunobiology, 2008, 213(8): 629-640.

[收稿日期] 2014 -06 -30 [修回日期] 2014 -10 -27

[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》征稿和征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的高级学术刊物,为 RCCSE 中国权威学术期刊、中国中文核心期刊,中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库源期刊、中国人民解放军优秀医学期刊,为同行专家评审期刊和开放获取(OA)期刊。本刊主要报道肿瘤生物治疗领域基础研究和临床应用的新成果、新理论、新技术和新经验,常设有述评、院士论坛、专家论坛、研究快报、青年学者论坛、基础研究、临床研究、转化医学、技术方法、短篇论著、学术争鸣、文献综述、个案报告等栏目,以从事肿瘤防治的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及相关学科科技人员为读者对象。双月刊,每双月底 20 日出版,国内外公开发刊。

本刊主编为中国医学科学院院长、中国免疫学会理事长曹雪涛院士,编委会由包括 12 名院士和 9 名外籍专家的众多名家大师组成。本刊已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、荷兰《医学文摘》(EMbase)等 11 国际著名检索系统收录。本刊在国内肿瘤学领域的学术地位和影响力名列前茅,在国际学术界的显示度日益广泛和增强。

本刊使用网络远程投稿、审稿系统和编校管理系统进行编辑出版工作,工作效率高,编校质量好,论文发表周期短。另设“快速发表通道”,将有较高创新性的论文以 2~3 个月的速度快速发表。

热忱欢迎广大肿瘤防治工作者通过本刊网站投稿系统、电子信箱踊跃投稿。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价 15.00 元,全年定价 90.00 元。邮发代号: 4-576,请通过邮局订阅。若错过,可从本刊编辑部补订,请将 72.00 元(优惠免邮资)寄编辑部,并注明详细通讯地址及邮政编码,编辑部负责将每期杂志准时寄给您。

联系地址:上海市翔殷路 800 号,第二军医大学免疫楼《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部(邮编 200433)

联系人:韩丹

联系电话:021-55620605×22, 021-81871002×22

传真:021-81871007

网址:www.biother.org

电子邮箱:cjcb@biother.org