

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.016

脐血和合并乙型肝炎病毒感染肝癌患者来源 CIK 细胞的增殖及杀伤活性

Proliferation and cytotoxicity of CIK cells from diferent cources of liver cancer patients with hepatitis B virus infection and umbilical cord blood

刘力伟¹, 李嘉嘉², 朱立新², 刘波¹(1. 解放军第 105 医院 生物治疗中心, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽医科大学附属第一医院 中心实验室, 安徽 合肥 230035)

[摘要] **目的:**观察脐血和乙型肝炎病毒感染肝癌患者外周血诱导的 CIK 细胞的体外增殖能力及杀伤活性的特点。**方法:**分别采集解放军第 105 医院妇产科住院的健康产妇剖宫产胎儿的脐带血 5 份(A 组)、感染科住院的合并乙型肝炎病毒感染的原发性肝癌患者自体外周血 15 份(B 组)、无乙型肝炎病毒感染的原发性肝癌患者自体外周血 5 份(C 组),采用 Ficoll 两步分离法分离出单个核细胞,细胞因子诱导培养成细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞,流式细胞仪检测 CIK 细胞的免疫表型 CD3\CD8\CD16\CD56, MIT 法测定其对白血病 K562 细胞的杀伤活性。**结果:**体外培养 15 d 时, C 组 CIK 细胞体外增殖倍数与 A 组相似[(577.24 ± 202.4) vs (600.93 ± 249.1)倍, $P > 0.05$], 该两组均显著高于 B 组[(385.16 ± 117.3)倍, $P < 0.05$]; A 组 CIK 细胞杀伤活性显著高于 B 组和 C 组[(77.3 ± 5.1)% vs (44.1 ± 3.4)%、(54.5 ± 3.7)%], $P < 0.01$ 。**结论:**脐血来源的 CIK 细胞体外增殖快、杀伤活性强;合并有乙型肝炎病毒感染的肝癌患者 CIK 细胞体外增殖能力和杀伤能力明显降低,不宜接受自体 CIK 细胞移植。

[关键词] 脐血; CIK 细胞; 乙型肝炎病毒; 肝细胞癌; 杀伤能力

[临床试验注册号] ChiCTR-CNC12002101

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)06-0690-03

自体 CIK 细胞治疗对合并乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的原发性肝癌患者疗效不佳,而在我国,80%的肝细胞癌患者合并 HBV 感染^[1]。慢性 HBV 感染者特异性细胞毒性 T 细胞及 DC 的功能低下^[2],这是否是造成 CIK 治疗疗效不佳的原因之一?在应用异体健康人外周血来源 CIK 治疗存在诸多困难的情况下,是否可以应用脐带血来源的 CIK 细胞来治疗?为解决这些疑问,本研究观察无或有 HBV 感染的肝癌患者外周血与脐血在体外诱导形成 CIK 细胞的增殖特点和杀伤活性异同,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料

A 组脐血 5 份,不回输,采自解放军第 105 医院妇产科健康产妇剖宫产足月胎儿,事先经家属同意并签署捐献同意书,采集后与患者自体外周血同等条件下体外培养。自体外周血 20 份,采自解放军第 105 医院感染科住院接受 CIK 细胞治疗的原发性肝癌患者,按照是否合并 HBV 感染分为: B 组 15 例,合并 HBV 感染,年龄 33 ~ 62 岁,中位年龄 43 岁; C 组 5 例,无 HBV 感染,年龄 35 ~ 62 岁;中位年龄 45 岁。诊断符合中华医学会肝病学会肝癌学组-原

发性肝癌规范化诊治专家共识^[3]。所有患者治疗前均经医院伦理委员会批准,签署知情同意书,并在中国临床试验研究注册中心注册(ChiCTR-ONC-12002101)。

1.2 细胞、主要试剂与仪器

白血病 K562 细胞为安徽医科大学中心实验室朱立新教授惠赠。IL-2、INF- γ 、CD3 单抗、IL-1、IL-4 购自 Peprotech 公司,鼠抗人 CD3-FITC/CD8-PE、CD56-PE 及同亚型对照抗体兔抗鼠 IgG 抗体购自美国贝克曼公司, RPMI 1640 购自 Hyclone 公司, FBS 购自杭州四季青公司, MTT 检测试剂盒购自 Gibco 公司,淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物科技有限公司。流式细胞仪和相应软件购自贝克曼公司。

1.3 CIK 细胞的分离、纯化和培养

Ficoll 两步分离法分离出脐血和自体外周血的单个核细胞,用含血清培养基调整细胞密度至 3×10^6 /ml,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,于培养的第 1 天加入终活性浓度为 1 000 U/ml 的 IFN- γ ,第 2

[作者简介] 刘力伟(1987 -)女,安徽合肥人,学士,主要从事肿瘤的生物治疗研究, E-mail: iull@163.com

[通信作者] 刘波(Liu Bo, corresponding author), E-mail: 18909696241@163.com

天加入终质量浓度为 100 ng/ml 的 CD3 单抗、1 000 U/ml 的 IL-2、100 μ g/ml 的 PHA、10 ng/ml 的 IL-4 和 1 000 U/ml 的 GM-CSF;而后每隔 1~2 d 加入新鲜的含 1 000 U/ml IL-2 的完全培养液,并调整细胞密度至 3×10^6 /ml,培养箱中继续培养、传代,定期补充抗 CD3 单抗和 IL-2。

1.4 流式细胞术检测 CIK 细胞免疫表型

第 0、4、7、10、14 天光镜下连续动态观察各组细胞形态,细胞计数板计数细胞,并绘制增殖曲线。取培养第 14 天的细胞,调整细胞密度至 5×10^9 /ml,100 μ l 细胞悬液加入相应抗体 20 μ l,混匀,室温避光放置 15 min 后加入溶血剂 0.5 ml,继续放置 10 min 后加入 0.5 ml PBS,5 min 后流式细胞仪检测。Back-Gating 设门,双色免疫荧光染色分析培养细胞的 CD3\CD8\CD16\CD56 免疫表型。

1.5 改良 MTT 法检测各组 CIK 细胞毒活性

细胞毒活性检测采用。取培养第 15 天的 CIK 细胞,按效靶比为 20:1 将 1×10^5 /100 μ l CIK 细胞与 2×10^3 /100 μ l K562 细胞(靶细胞)混合,加入 96 孔板中,设 3 个复孔。将培养板置饱和湿度、37 $^{\circ}$ C、

5% CO₂ 孵箱内培养 20 h,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μ l,继续培养 4 h,离心、弃上清,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μ l,振荡 5 min,待沉淀物完全溶解后用酶联免疫检测仪检测 490 nm 波长处的光密度(D)值,计算杀伤率。杀伤率(%)=[靶细胞 D 值-(效应细胞 D 值-实验组 D 值)]/靶细胞 D 值 \times 100%。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较采用 F 检验,其中两组间均数的比较采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示具有显著差异。

2 结果

2.1 各组细胞诱导后的免疫表型

流式细胞术检测细胞表型结果(表 1)显示,诱导培养第 7、14 天时 B 组 CD3⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 细胞比例均低于 A、C 两组。各组 CD3⁺ 和 CD3⁺CD56⁺ 细胞比例均随时间延长逐渐升高,但 CD3⁺/CD8⁺ 细胞比例在第 7 天即达到高峰。

表 1 3 组细胞诱导培养第 7、14 天时的免疫表型

| 组别 | 例数 | 培养第 7 天(%) | | | 培养第 14 天(%) | | |
|----------------------|----|------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | | CD3 ⁺ | CD3 ⁺ CD8 ⁺ | CD3 ⁺ CD56 ⁺ | CD3 ⁺ | CD3 ⁺ CD8 ⁺ | CD3 ⁺ CD56 ⁺ |
| A(脐血) | 5 | 90.2 \pm 5.6 | 83.4 \pm 6.7 | 34.8 \pm 3.5 | 98.6 \pm 7.1 | 83.7 \pm 5.4 | 42.5 \pm 3.7 |
| B(HBV ⁺) | 15 | 75.5 \pm 6.3* | 67.5 \pm 4.8* | 26.3 \pm 3.2* | 87.1 \pm 6.5* | 71.3 \pm 5.6* | 28.6 \pm 3.4* |
| C(HBV ⁻) | 5 | 88.7 \pm 5.7 | 84.2 \pm 7.1 | 31.4 \pm 3.6 | 97.8 \pm 6.9 | 80.2 \pm 6.3 | 40.3 \pm 3.6 |

* $P < 0.05$ vs A 组或 C 组

2.2 脐血及合并 HBV 感染原发肝癌患者外周血诱导的 CIK 细胞具有较强的增殖能力

3 组不同来源的单个核细胞在体外诱导为 CIK 细胞时均可获得大量增殖。光镜下观察到,刚分离的单个核细胞在镜下单个散落,呈圆形,大小均匀,细胞形态无明显异型;第 4 天部分细胞明显增生,可见团状增生集落,出现体积增大、胞核大、胞质少的外形不规则细胞;第 7~10 天细胞快速增殖,细胞团集落明显增多,有时可见分裂相,细胞成明显的不规则形,头端胞核丰富,胞质量少;第 14 天时细胞扩增成巨大的增生集落,异型性明显。

CIK 细胞在培养的第 3~5 天开始增殖,第 7~14 天快速增殖;第 15 天时, A、C 两组 CIK 细胞的扩增倍数显著高于 B 组[(600.9 \pm 249.1)、(577.2 \pm 202.4)vs (385.2 \pm 117.3)倍, $P < 0.05$], A、B 两组组间无明显差异($P > 0.05$)。

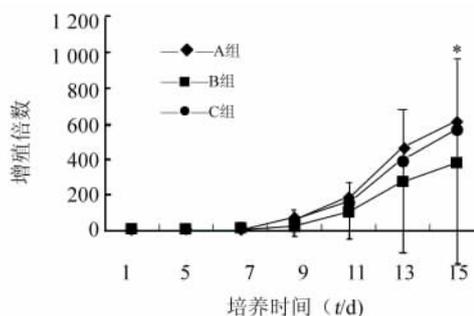


图 1 3 组 CIK 细胞增殖曲线

* $P < 0.05$ vs A 组或 C 组

2.3 脐血诱导的 CIK 细胞对 K562 细胞具有较高的杀伤活性

MTT 法检测结果显示,效靶比 20:1、培养的第 15 天时, A 组 CIK 细胞对白血病细胞株 K562 的杀

伤率高于 B 组和 C 组, $(77.3 \pm 5.1)\% vs (44.1 \pm 3.4)\%$ 、 $(54.5 \pm 3.7)\%$, $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$]。

3 讨论

合并乙型肝炎病毒感染的原发性肝癌的治疗一直是研究的焦点, 通常认为应该在抗肿瘤治疗的同时采取积极的抗病毒治疗^[4]。CIK 细胞是具有非 MHC 限制性杀伤能力的一群细胞, 可以杀伤溶解肿瘤细胞或病毒感染的细胞^[5]。理论上应用自体 CIK 细胞回输治疗此类患者应该会有较好疗效, 但在临床应用^[6-10]中发现, 细胞治疗效果的个体差异较大。国际上应用 CIK 的临床研究相对较少, 一般认为, $\leq 1 \times 10^{10}$ 细胞输注不足以产生明显抗肿瘤疗效^[11-13]。为进一步了解其原因, 本研究初步探讨了脐血来源的 CIK 细胞和肝癌患者自体来源 CIK 细胞的区别, 以及乙型肝炎病毒感染对 CIK 细胞增殖和杀伤能力的影响。结果发现, 脐血来源的 CIK 细胞初始提取效率高, 扩增速度快, 显著高于合并慢性乙型肝炎的肝癌患者自体外周血 CIK。应用改良后的培养方案可以在 14 ~ 21 d 时细胞数目扩增到分离时的 400 ~ 800 倍, 免疫表型 CD3⁺/CD56⁺ 双阳性率达到 $(38.2 \pm 4.56)\%$, 比朱秋娟等^[14]所用方法增殖效率更高。另有研究表明, 脐血来源的 CIK 细胞较肿瘤患者的自体 CIK 细胞增殖速度快^[15]、激活表面标志物表达水平高、抑制型表面标志物表达水平低^[16-17]、表达高耐药基因 ABCG2^[18]。本研究发现 3 组不同来源的单个核细胞均可扩增成 CIK 细胞, 且对 K562 细胞均有一定杀伤效应。但脐血来源的 CIK 细胞杀伤活性显著高于合并乙型肝炎病毒感染患者的 CIK 细胞。

综上所述, 脐血来源的 CIK 细胞体外增殖快, 杀伤活性强, 且脐血具有来源方便、免疫原性弱、单个核细胞提取率高、输注时移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)发生率低等优点, 对于合并慢性乙型肝炎的肝癌患者可以优先考虑使用。

【参考文献】

[1] 罗瑞虹, 赵志新, 周旭毓, 等. 中国人群 HBV 感染与原发性肝癌关系病例对照研究的 Meta 分析 [J]. 热带医学杂志, 2005, 5(4): 419-423.

[2] Tavakoli S, Mederacke I, Herzog-Hauff S, et al. Peripheral blood dendritic cells, are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus infection [J]. Clin Exp Immunol, 2008, 151(1): 61-70.

[3] 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协作委员会, 中华医学会肝病学会分会肝癌学组. 原发性肝癌规

范化诊治专家共识 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(3): 259-269.

- [4] 王福生, 张纪元. 将慢性乙型肝炎抗病毒治疗进行到底? [J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(3): 164-166.
- [5] 杨好, 杨新辉, 周光华. 恶性肿瘤患者外周血 CIK 细胞体外增殖能力及其杀伤活性 [J]. 医学临床研究, 2012, 29(1): 27-29.
- [6] 赵明, 吴沛宏, 曾益新, 等. 经肝动脉栓塞化疗序贯联合射频消融和细胞因子诱导的杀伤细胞治疗肝细胞癌的随机研究 [J]. 中华医学杂志, 2006, 86(26): 1823-1828.
- [7] 钱其军, 吴孟超. 肿瘤过继细胞治疗——老故事新演绎 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(1): 1-6.
- [8] Shi M, Fu J, Shi F. et al. Transfusion of autologous cytokine-induced killer cells inhibits viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Clin Immunol, 2009, 132(1): 43-54.
- [9] Toomey PG, Vohra NA, Ghansah T, et al. Immunotherapy for gastrointestinal malignancies [J]. Cancer Control, 2013, 20(1): 32-42.
- [10] Gunturu KS, Rossi GR, Saif MW, et al. Immunotherapy updates in pancreatic cancer: Are we there yet? [J]. Ther Adv Med Oncol, 2013, 5(1): 81-89.
- [11] Shi L, Zhou Q, Wu J, et al. Efficacy of adjuvant immunotherapy with cytokine-induced killer cells in patients with locally advanced gastric cancer [J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(12): 2251-2259.
- [12] Jiang JT, Wu CP, Lu BF. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity [J]. J Transl Med, 2013, 11: 83.
- [13] Pievani A, Borleri G, Pende D, et al. Dual-functional capability of CD3⁺CD56⁺ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity [J]. Blood, 2011, 118(12): 3301-3310.
- [14] 朱秋娟, 乔振华, 姜波, 等. 脐血 CIK 细胞的体外扩增特性研究 [J]. 肿瘤研究, 2005, 17(5): 324-326.
- [15] Zhang Q, Wang L, Luo C, et al. Phenotypic and functional characterization of cytokine-induced killer cells derived from preterm and term infant cord blood [J]. Oncol Rep, 2014, 32(5): 2244-2252.
- [16] Durrieu L, Lemieux W, Dieng MM, et al. Implication of different effector mechanisms by cord blood-derived and peripheral blood-derived cytokine-induced killer cells to kill precursor B acute lymphoblastic leukemia cell lines [J]. Cytotherapy, 2014, 16(6): 845-856.
- [17] Meng JX, Zhao MF, Chai X, et al. IL-21 enhances anti-leukemia effect by acting on both CD3⁺CD56⁺ CIK cells and regulatory T cells derived from umbilical cord blood in vitro [J]. Blood, 2013, 15(2): 1222-1229.
- [18] 张震, 赵先兰, 王丽萍, 等. 脐血来源的 CIK 细胞高表达激活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): 91-96.

【收稿日期】 2014-05-25

【修回日期】 2014-10-15

【本文编辑】 黄静怡