

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.004

· 基础研究 ·

## $\alpha$ -半乳糖神经酰胺负载 DC 促进 CIK 细胞对肝癌细胞的杀伤效应

刘红彦<sup>1</sup>, 张颖<sup>2</sup>, 王晶波<sup>3</sup>, 陈莉<sup>4</sup>, 王惠<sup>4</sup>, 李栋<sup>4</sup>, 盖中涛<sup>5</sup> (1. 山东大学医学院, 山东 济南 250100; 2. 山东省千佛山医院重症医学科, 山东 济南 250014; 3. 济南市传染病医院三科, 山东 济南 250021; 4. 济南赛尔生物科技有限公司, 山东 济南 250101; 5. 山东大学齐鲁儿童医院, 山东 济南 250022)

**[摘要]** **目的:** 研究负载  $\alpha$ -半乳糖神经酰胺( $\alpha$ -galactosylceramide,  $\alpha$ -GalCer)的 DC 功能与成熟度的改变情况, 探讨  $\alpha$ -GalCer-DC 与 CIK 共培养对 CIK 细胞表型、增殖活性及杀伤肝癌细胞效率的影响。 **方法:** 采用密度梯度离心法从人外周血中分离出单个核细胞, 悬浮细胞诱导培养 CIK 细胞, 贴壁细胞诱导培养 DC; 流式细胞仪检测  $\alpha$ -GalCer 负载 DC 的表型, Real-time PCR 检测 DC 相关基因的 mRNA 表达改变。将  $\alpha$ -GalCer-DC 与 CIK 细胞共培养, 流式细胞仪检测 DC 与 CIK 细胞表面标志物; 锥虫蓝染色法检测 CIK 细胞的增殖倍数; Real-time PCR 检测 CIK 细胞功能相关基因的表达情况; CCK-8 试剂盒检测  $\alpha$ -GalCer-DC 对 CIK 杀伤 HepG2 细胞的影响。 **结果:** 经过多种细胞因子诱导, 可获得 CIK 细胞和成熟的 DC;  $\alpha$ -GalCer 负载可促进 DC 成熟, DC 表面标志物 CD80、CD86、CD83 和 CD11c 的阳性率均升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 表面趋化因子受体 CCR-7、IL-12、IL-10 的 mRNA 水平升高 ( $P < 0.05$ )。  $\alpha$ -GalCer-DC 与 CIK 共培养, 可显著提高 CIK 细胞 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 的表达和增殖活性 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 并显著提高 INF- $\gamma$ 、IL-12、穿孔素和颗粒酶 B 的 mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); CIK、DC-CIK、 $\alpha$ -GalCer-DC-CIK 细胞对 HepG2 细胞的杀伤作用随效靶比的升高而增强, 在同一效靶比时  $\alpha$ -GalCer-DC-CIK 细胞对靶细胞的杀伤作用最强 ( $P < 0.05$ )。 **结论:**  $\alpha$ -GalCer 负载可促进 DC 成熟,  $\alpha$ -GalCer-DC 与 CIK 共培养能促进后者增殖和成熟, 能显著增强其对肝癌细胞的杀伤活性, 为 DC-CIK 在肿瘤免疫治疗中的应用提供了实验依据。

**[关键词]** 树突状细胞; 细胞因子诱导的杀伤细胞;  $\alpha$ -GalCer; 肝癌; 增殖; 成熟; 肿瘤杀伤活性

**[中图分类号]** R735.7; R730.54

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2016)02-0175-07

## Cytotoxic effect of CIK cells promoted by alpha-galactosylceramide pulsed dendritic cells against hepatoma carcinoma cells

LIU Hongyan<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>2</sup>, WANG Jingbo<sup>3</sup>, CHEN Li<sup>4</sup>, WANG Hui<sup>4</sup>, LI Dong<sup>4</sup>, GAI Zhongtao<sup>5</sup> (1. College of Medicine, Shandong University, Jinan 250100, Shandong, China; 2. Department of Critical Care Medicine, Qianfoshan Hospital, Jinan 250014, Shandong, China; 3. the Third Department, Jinan Infectious Diseases Hospital, Jinan 250021, Shandong, China; 4. Jinan Cell Bio-Technology Co., Ltd., Jinan 250101, Shandong, China; 5. Qilu Children's Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250022, Shandong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate function and maturation of DCs pulsed by  $\alpha$ -GalCer and to explore influence of co-culture of CIK cells with  $\alpha$ -GalCer-DCs on phenotype, proliferation activity and efficiency of killing hepatic carcinoma of the CIK cells. **Methods:** DCs and CIK cells were induced from monocytes that separated from human peripheral blood by density gradient centrifugation. The suspension and adherent monocytes were cultured *ex vivo* to generate DC and CIK cells respectively. The phenotypes of DCs pulsed by  $\alpha$ -GalCer were detected by flow cytometry (FCM), and mRNA expression of related genes in DCs were detected by qRT-PCR. As co-culture of CIK cells with  $\alpha$ -GalCer-DCs, surface markers on the DC and the CIK cells were detected by FCM. Proliferation multiple of the CIK cells was examined with

**[基金项目]** 山东省科技发展计划资助项目(No. 2012GGA01219); 济南市科技发展计划资助项目(No. 201302032); 济南市 2012 年度科技型中小企业技术创新基金资助。Project supported by the Science and Technology Development Plan of Shandong Province (No. 2012GGA01219), the Science and Technology Development Plan of Jinan City (No. 201302032), and the 2012 Innovation Foundation for Technology Based Firms of Jinan City

**[作者简介]** 刘红彦(1990-), 女, 山东省聊城市人, 硕士生, 主要从事肝癌生物免疫治疗的相关研究, E-mail: 15066131979@163.com

**[通信作者]** 盖中涛(GAI Zhongtao, corresponding author), E-mail: gaizhongtao@sina.com

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160331.2008.008.html>

trypan blue staining; expression levels of genes related with function of the CIK cells were measured by Real-time PCR; and effect of  $\alpha$ -GalCer-DCs on killing HepG2 cells by the CIK cells was tested with CCK-8 kit. **Results:** CIK cells and mature DCs could be obtained from induction of multiple cytokines; Excitation of  $\alpha$ -GalCer could promote DCs maturation, increase the positive expressions of CD80, CD86, CD83 and CD11c ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) and mRNA levels of surface chemokine receptors CCR-7, IL-12, and IL-10 in the DCs ( $P < 0.05$ ). Co-culture of the CIK cells with  $\alpha$ -GalCer could significantly increase expression of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> and proliferation activity of the CIK cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and mRNA expression levels of INF- $\gamma$ , IL-12, perforin and particle enzyme B ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); Killing effects of the CIK, the DC-CIK and the  $\alpha$ -GalCer-DC-CIK cells on HepG2 cells were enhanced with increase of effector-target ratio. At the same effector-target ratio,  $\alpha$ -GalCer-DC-CIK cells had the highest cytotoxicity effect on HepG2 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Pulse of  $\alpha$ -GalCer could promote the maturation of DCs. Co-culture of the  $\alpha$ -GalCer-DC with CIK cells could enhance proliferation and maturation of CIK cells, and enhance its activity to kill hepatic carcinoma cells. Therefore, the works might provide experimental and theoretical basis for application of the DC-CIK in immunotherapy of carcinoma.

[ **Key words** ] dendritic cell ( DC ); cytokine induced killer ( CIK ) cell;  $\alpha$ -galactosylceramide (  $\alpha$ -GalCer ); hepatoma carcinoma; proliferation; maturation; tumor cytotoxic effect

[ Chin J Cancer Biother, 2016, 23( 2 ): 175-181. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.004 ]

CIK 细胞和 DC 是目前应用较多的过继免疫治疗的有效方法,目前很多研究者将能够识别抗原、激活免疫系统的 DC 与 CIK 细胞联合培养应用于肿瘤治疗,为肿瘤的免疫治疗开辟新思路<sup>[1-3]</sup>。 $\alpha$ -半乳糖神经酰胺(  $\alpha$ -galactosylceramide,  $\alpha$ -GalCer )是最初发现于海绵组织的糖脂,目前在临床试验中作为一种抗癌剂,治疗多种实体瘤具有显著疗效<sup>[4,5]</sup>。给患者注射  $\alpha$ -GalCer 负载的 DC 比单独注射  $\alpha$ -GalCer 呈现出更强的抗肿瘤活性<sup>[6]</sup>。 $\alpha$ -GalCer 和它的人工合成等价物能够与小鼠和人类的 APC 上的 CD1d 分子结合,激活 iNKT 细胞,产生大量的细胞因子参与免疫调节。将荷载  $\alpha$ -GalCer 的成熟 DC 静脉注射到肿瘤患者体内,可将患者的 iNKT 水平提升 100 倍以上,并且可以持续 6 个月。但荷载  $\alpha$ -GalCer 的成熟 DC 对 CIK 细胞的功能活化尚未见研究。本研究探讨  $\alpha$ -GalCer 负载对 DC 功能与成熟度的影响,以及  $\alpha$ -GalCer 负载的 DC 与 CIK 共培养对 CIK 细胞表型、增殖活性及杀伤肝癌细胞效应的影响,为 DC-CIK 在肿瘤免疫治疗中的应用提供实验和理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料和仪器

人肝癌 HepG2 细胞由山东大学医学院高成江教授惠赠,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下,用含 12% 胎牛血清( fetal bovine serum, FBS )和抗生素( 100 U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素 )的 RPMI 1640 完全培养液培养。

$\alpha$ -GalCer 由山东大学生命科学学院王鹏教授惠赠,胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素、链霉素、TRIzol 试剂和 RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司,重组人

IL-4、GM-CSF、TNF- $\alpha$  和 CD3 单克隆抗体购自美国 R&D Systems 公司,IL-1 $\beta$ 、IL-2 和 IFN- $\gamma$  购自美国 Peprotech 公司,淋巴细胞分离液( 相对密度为 1.077 g/L )购自美国 MP 公司,抗 CD3-FITC、CD4-PE、CD8-PE、CD56-PE、CD14-PE、CD80-PE、CD83-PE、CD86-PE、CD11c-PE 及同型对照抗体均购自美国 BD 公司,qRT-PCR 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司,引物购自上海生工科技有限公司,CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,细胞培养板、细胞培养瓶购自美国 Corning 公司。Guava EasyCyte 6HT 流式细胞仪购自美国 Millipore 公司,ELX-808 酶标仪购自美国 BIO-TEK 公司,Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System 购自美国 ABI 公司。

### 1.2 CIK 细胞培养

无菌抽取健康供者外周血 50 ml,密度梯度离心分离单个核细胞。生理盐水洗两次,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养基将细胞密度调整为  $5 \times 10^6$  /ml,加入 6 孔板,每孔 2 ml,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 2 h。留下贴壁细胞用于培养 DC;吸出悬浮细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  /ml,当天加入 IFN- $\gamma$  ( 1 000 U/ml ),置于培养箱培养,第 2 天加入 IL-2 ( 1 000 U/ml )、IL-1 $\beta$  ( 200 U/ml )、抗 CD3 单克隆抗体 ( 50 ng/ml ),第 3 天补加含等量因子的培养基;以后每 2 ~ 3 d 更换新鲜培养基,补加等量因子,第 8 天收获 CIK 细胞。

### 1.3 DC 培养及 $\alpha$ -GalCer 负载

将步骤 1.2 中的贴壁细胞加入含 IL-4 ( 500 U/ml )和 GM-CSF ( 1 000 U/ml )的含 10% FBS RPMI 1640 完全培养基继续培养。每隔 2 ~ 3 d 更换新鲜培养基,并添加等量的 IL-4 和 GM-CSF。第 6 天更

换培养基,加入 50 ng/ml 的 TNF- $\alpha$  刺激 DC 成熟。第 7 天加入 100 ng/ml  $\alpha$ -GalCer 负载,与 DC 共孵育 24 h,第 8 天收获负载  $\alpha$ -GalCer 的 DC。同时设置不加  $\alpha$ -GalCer 的 DC 为对照组。

#### 1.4 DC 与 CIK 混合培养

第 8 天,将成熟的 DC、 $\alpha$ -GalCer-DC 分别与 CIK 细胞按 1:5 混合培养,设单纯 CIK 细胞为对照组。共培养当日起锥虫蓝染色法记数细胞,动态观察各组细胞的增殖活性和倍数,第 14 天取出少量细胞进行流式术检测。

#### 1.5 流式细胞术检测 DC 和 CIK 细胞表型

收集 DC 和 CIK 细胞悬液,PBS 洗两遍,离心,弃上清液,重悬细胞于 EP 管中,每管  $2 \times 10^5$  个细胞/100  $\mu$ l。CIK 细胞加入 1  $\mu$ l 抗 CD3-FITC、CD4-PE、CD8-PE、CD56-PE 及同型对照,DC 加入 1  $\mu$ l 抗 CD14-PE、CD80-PE、CD83-PE、CD86-PE、CD11c-PE

及同型对照,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,PBS 洗涤细胞 2 次,将细胞重悬于 0.2 ml PBS 中,流式细胞仪检测细胞表型。采用 Guava Incyte( GuavaSoft V2.7, Millipore )分析软件分析实验结果。

#### 1.6 Real-time PCR 检测 DC 和 CIK 功能相关基因

收获 DC 和 CIK 细胞,用 TRIzol 试剂盒抽提细胞总 RNA 并测定浓度。各实验组以相同 RNA 量进行逆转录合成 cDNA,SYBR Green 法 PCR 扩增检测 DC 相关基因和 CIK 杀伤功能相关基因的表达情况,引物序列见表 1。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各基因在细胞中的相对表达量,以  $\beta$ -actin 为内参。反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94  $^{\circ}$ C 20 s,60  $^{\circ}$ C 57 s,循环 45 次。采用 ABI 7500 Real-Time PCR System 检测目的基因扩增水平,并将 3 次独立实验所获数据使用 Sequence Detection Software 1.4 软件( Applied Biosystems )分析。

表 1 DC 和 CIK 细胞功能相关基因 Real-time PCR 引物序列

Tab. 1 Real-time PCR primer sequences of DC and CIK function related genes

Gene	Primer Sequence ( 5'-3' )	Product ( bp )
<i>IL-12</i>	F: GCGGTACCACCATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTC R: TTGCGGCCGCGGAAGCATTTCAGATAGCTCATCACTC	180
<i>CCR-7</i>	F: GCGGAATTCATGGACCTGGGGAAACCAA R: GTAGTCGACCTATGGGGAGAAGGTGGTGGTG	120
<i>IL-10</i>	F: GCCTTGTCTGAGATGATCCAGTT R: TCACATGCGCCTTGATGTCT	85
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	F: TCACCGGAGTTGTGCGGCAG R: CGGCCGGTAGTGAACCCGTT	130
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	F: CCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAG R: GCTGGCGACAGTTCAGCCATCA	180
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	F: GATCGGCCCCAGAGGGAAGAG R: CCATTGGCCAGGAGGGCATTGG	183
<i>IL-6</i>	F: GCAAAGAGGCACTGGCAGAA R: GGCAAGTCTCCTCATGAATCC	93
<i>Perforin</i>	F: CGGCCATCACACCTCCATTA R: GGTGTAGTCCACCAGGCCA	112
<i>Particle enzyme B</i>	F: GATGCAGGGAGATCATCGG R: CACCGCACCTCTTCAGAGAC	103
<i><math>\beta</math>-actin</i>	F: GGACATCCGCAAAGACCTGT R: GCATCCTGTCCGCAATGC	80

#### 1.7 混合淋巴细胞实验检测负载 $\alpha$ -GalCer 对 DC-CIK 细胞杀伤 HepG2 细胞能力的影响

取培养第 14 天的 CIK、DC-CIK、 $\alpha$ -GalCer 负载的 DC-CIK 作为效应细胞,对数生长期的 HepG2 细

胞作为靶细胞,于 96 孔细胞培养板按照效靶比 20:1、10:1、5:1 加入各组细胞,每组设 5 个复孔,同时设单独效应细胞组和单独靶细胞组。置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h,每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 试

剂, 孵育 1 ~ 4 h。用酶标仪检测 450 nm 处光密度 ( $D$ ) 值, 计算杀伤活性。杀伤率 (%) =  $[1 - (D_{E+T} - D_E) / D_T] \times 100\%$  ( $D_{E+T}$  为效应细胞 + HepG2 细胞组的  $D$  值,  $D_E$  为效应细胞对照组的  $D$  值,  $D_T$  为 HepG2 细胞对照组的  $D$  值)。

### 1.8 统计学处理

应用 SPSS10.0 软件进行分析, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异性采用  $t$  检验分析, 以  $P < 0.05$  为具有统计学差异,  $P < 0.01$  为具有显著统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 DC 和 CIK 细胞的培养与观察

倒置显微镜下观察贴壁细胞, 呈圆形, 均匀分布。加入细胞因子诱导 4 d 后可见细胞体积变大, 第 7 天细胞体积明显增大, 形态不规则, 可看典型的毛刺状或树状突起, 呈现典型的 DC 形态(图 1)。

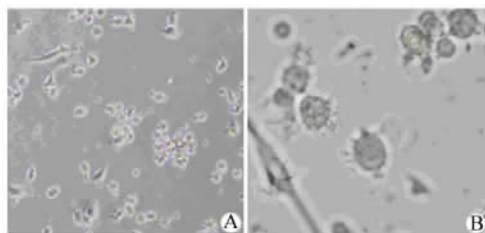


图 1 DC 培养第 8 天的细胞形态

Fig. 1 Cell morphology of mature DCs on Day 8

A:  $\times 100$ ; B:  $\times 400$

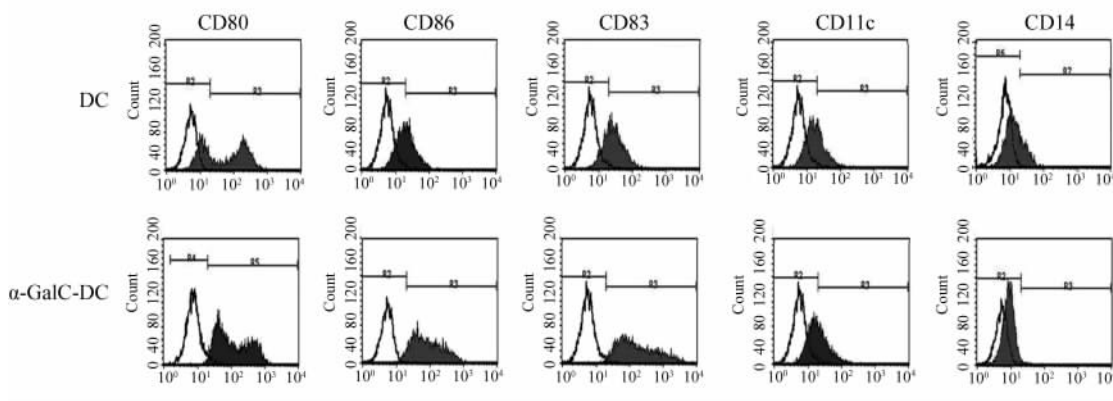


图 3 DC 和  $\alpha$ -GalCer-DC 培养第 8 天的免疫表型

Fig. 3 Immune phenotypes of DC and

$\alpha$ -GalCer-DC cells on Day 8

### 2.3 $\alpha$ -GalCer 负载对 DC 功能相关基因表达的影响

Real-time PCR 结果(图 4)显示,  $\alpha$ -GalCer 可促进 DC 功能相关基因  $IL-12$ 、 $IL-10$ 、 $CCR-7$  的 mRNA

外周血 PBMC 加入各因子培养第 1 天, 细胞数较少, 呈圆形, 第 3 天开始增殖, 镜下可见少量的细胞团, 第 5 天开始倍增, 细胞集落增多(图 2)。此后细胞快速增殖, 至第 14 天进入对数生长期, 出现大量的集落。

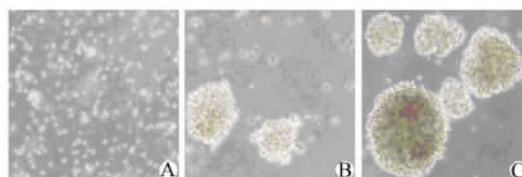


图 2 CIK 培养第 1, 3, 5 天时的细胞形态 ( $\times 100$ )

Fig. 2 Cell morphology of CIK cells on the first, third, fifth day ( $\times 100$ )

A: Day 1; B: Day 3; C: Day 5

### 2.2 $\alpha$ -GalCer 负载对 DC 表型的影响

诱导第 8 天, 流式细胞仪检测 DC 表型(图 3, 表 2), 其特异性的标志 CD80、CD86 和 CD83 均有较高表达, 单核细胞标志分子 CD14 的阳性率为  $(9.27 \pm 0.88)\%$ , 说明 DC 已经成熟。加入  $\alpha$ -GalCer 与 DC 共孵育 24 h, 其各项表面标志物的阳性率均较单纯 DC 升高, 其中 CD83、CD11c(均  $P < 0.05$ ) 和 CD86 ( $P < 0.01$ ) 的阳性率差异有统计学意义, 结果表明  $\alpha$ -GalCer 可显著促进 DC 的成熟。

水平升高, 与 DC 组相比差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。而两组 TGF- $\beta$  的表达水平无显著差异( $P > 0.05$ )。

表 2 DC 和  $\alpha$ -GalCer-DC 培养第 8 天的免疫表型 ( $n=5, \bar{x} \pm s, \%$ )  
 Tab. 2 Immune phenotypes of DC and  $\alpha$ -GalCer-DC on Day 8 ( $n=5, \bar{x} \pm s, \%$ )

Group	CD80	CD86	CD83	CD11c	CD14
DC	73.62 $\pm$ 6.41	76.98 $\pm$ 7.23	67.35 $\pm$ 2.91	56.64 $\pm$ 4.75	9.27 $\pm$ 0.88
$\alpha$ -GalCer-DC	82.04 $\pm$ 6.79	88.57 $\pm$ 8.19**	84.36 $\pm$ 8.22*	70.16 $\pm$ 5.28*	8.04 $\pm$ 0.56

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs DC group

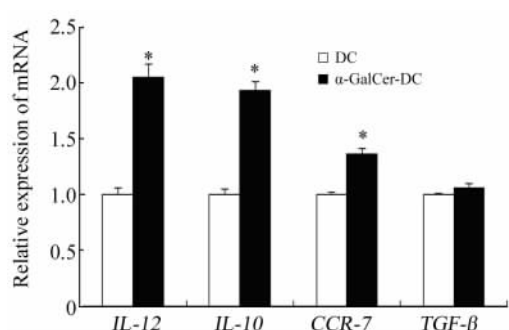


图 4  $\alpha$ -GalCer 负载对 DC 相关基因 mRNA 表达水平的影响 ( $n=9, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 4 Effect of  $\alpha$ -GalCer pulse on the relative mRNA expression levels of DCs ( $n=9, \bar{x} \pm s$ )

\*  $P < 0.05$  vs DC group

#### 2.4 $\alpha$ -GalCer-DC 与 CIK 共培养后的细胞表型

流式细胞术检测结果(表 3)显示,经过 14 d 的诱导培养,成熟的 CIK 细胞高表达  $CD3^+ CD8^+$  双阳性细胞和  $CD3^+ CD56^+$  双阳性细胞。与 DC 共培养后,CIK 细胞表面的  $CD3^+ CD8^+$  和  $CD3^+ CD56^+$  阳性率较 CIK 组升高 ( $P < 0.01$ ); $\alpha$ -GalCer-DC-CIK 组的  $CD3^+ CD8^+$  和  $CD3^+ CD56^+$  阳性率最高,  $CD3^+ CD4^+$  阳性率最低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。

#### 2.5 $\alpha$ -GalCer-DC 对 CIK 细胞增殖的影响

锥虫蓝染色结果(表 4)显示,CIK、DC-CIK 和  $\alpha$ -GalCer-DC-CIK 细胞在混合培养前 3 d,体积无明显

显变化;混合培养第 5 天,细胞明显增生,可见细胞集落,但 3 组增殖倍数无明显差异;第 7 天,3 组 CIK 细胞进入快速增殖期,细胞集落增多,DC-CIK 组细胞增殖倍数较 CIK 组无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),而  $\alpha$ -GalCer-DC-CIK 组细胞增殖倍数较 CIK 组和 DC-CIK 组显著升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。

表 3 共培养第 14 天后 CIK、DC-CIK 和  $\alpha$ -GalCer-DC-CIK 细胞免疫表型 ( $n=5, \bar{x} \pm s, \%$ )

Tab. 3 Immune phenotypes of CIK, DC-CIK and  $\alpha$ -GalCer-DC-CIK cells on Day 14 ( $n=5, \bar{x} \pm s, \%$ )

Group	$CD3^+ CD4^+$	$CD3^+ CD8^+$	$CD3^+ CD56^+$
CIK	26.8 $\pm$ 3.3	55.1 $\pm$ 4.8	20.5 $\pm$ 2.3
DC-CIK	21.9 $\pm$ 1.9*	67.9 $\pm$ 5.3**	43.3 $\pm$ 3.6**
$\alpha$ -GalCer-DC-CIK	17.8 $\pm$ 1.3*** $\Delta$	72.7 $\pm$ 5.1*** $\Delta$	49.7 $\pm$ 5.6***

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs CIK group;  $\Delta P < 0.05$  vs DC-CIK group

#### 2.6 $\alpha$ -GalCer-DC 促进 CIK 细胞杀伤相关基因的表达

Real-time PCR 检测结果(图 5)显示,DC-CIK 组和  $\alpha$ -GalCer-DC-CIK 组  $INF-\gamma$ 、穿孔素、IL-12 和颗粒酶 B 的表达水平与 CIK 组比较均显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); $\alpha$ -GalCer-DC-CIK 组与 DC-CIK 组相比, $INF-\gamma$  和 IL-12 表达水平更高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

表 4 CIK、DC-CIK 和  $\alpha$ -GalCer-DC-CIK 细胞增殖倍数比较 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 Proliferation comparisons of CIK, DC-CIK and  $\alpha$ -GalCer-DC-CIK cells ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Group	Proliferation multiple (7 d)	Proliferation multiple (14 d)	Proliferation multiple (21 d)
CIK	23.08 $\pm$ 3.44	45.67 $\pm$ 5.11	122.35 $\pm$ 10.77
DC-CIK	28.17 $\pm$ 3.65	60.38 $\pm$ 6.74*	189.14 $\pm$ 18.35*
$\alpha$ -GalCer-DC-CIK	41.33 $\pm$ 4.82*** $\Delta$	87.75 $\pm$ 8.91*** $\Delta$	257.26 $\pm$ 30.09*** $\Delta$

\*  $P < 0.05$  vs CIK group;  $\Delta P < 0.05$  vs DC-CIK group

### 2.7 α-GalCer 负载的 DC 对 CIK 细胞杀伤活性的影响

CCK-8 法检测结果(表 5)显示, CIK 细胞对 HepG2 细胞有明显的细胞毒作用, 其抑制率随着效靶比的增高而增高 ( $P < 0.05$ ), 而 DC 与 CIK 细胞混合培养可显著增强 CIK 细胞的杀伤活性 ( $P < 0.05$ )。在同一效靶比时, α-GalCer-DC-CIK 细胞组对靶细胞的杀伤作用最强, 明显高于 CIK、DC-CIK 细胞组 ( $P < 0.05$ )。

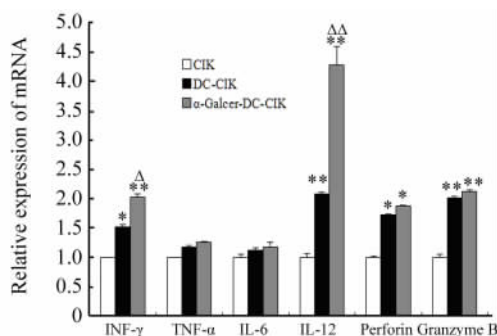


图 5 α-GalCer-DC 对 CIK 细胞杀伤功能基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Fig. 5 Effect of α-GalCer-DC on the expressions of cytotoxicity genes of CIK cells ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs CIK group;  
 Δ  $P < 0.05$ , ΔΔ  $P < 0.01$  vs DC-CIK group

表 5 CIK、DC-CIK 和 α-GalCer-DC-CIK

细胞对 HepG2 细胞的直接杀伤作用 ( $n = 5, \bar{x} \pm s, \%$ )

Tab. 5 Direct killing effect of CIK, DC-CIK and α-GalCer-DC-CIK cells against HepG2 cells ( $n = 5, \bar{x} \pm s, \%$ )

Group	Effector-target ratio		
	5:1	10:1	20:1
CIK	20.18 ± 2.51	28.58 ± 1.27	43.75 ± 2.84 <sup>Δ</sup>
DC-CIK	23.96 ± 1.82	35.64 ± 3.49 <sup>Δ</sup>	49.23 ± 3.86 <sup>Δ</sup>
α-GalCer-DC-CIK	30.27 ± 4.14 <sup>*</sup>	46.16 ± 2.72 <sup>*Δ</sup>	59.17 ± 4.35 <sup>*Δ</sup>

\*  $P < 0.05$  vs CIK group at the same condition; <sup>Δ</sup>  $P < 0.05$  vs different condition at the same group

### 3 讨论

DC-CIK 细胞治疗已成为肿瘤生物治疗的一种常规方法<sup>[7]</sup>, 对多种肿瘤<sup>[8-9]</sup> 都有显著治疗作用。但在肿瘤微环境中, DC 数量有限、肿瘤细胞分泌抑制 DC 功能的细胞因子等原因, 都导致 DC 的抗原提呈能力有限<sup>[10]</sup>。α-GalCer 和它的人工合成等价物

能够与小鼠和人类的 APC 上的 CD1d 分子结合, 激活 iNKT 细胞, 产生大量的细胞因子参与免疫调节<sup>[6]</sup>。因此, 本研究采用 α-GalCer 负载 DC 以提高其抗原提呈的能力, 结果显示 α-GalCer 负载可促进 DC 成熟, 其表面标志物 CD80、CD83、CD86、CD11c 的阳性率均升高。

趋化因子受体 7 (chemokine receptor 7, CCR7) 表达于成熟 DC 的表面, 最主要的作用是趋化作用, 并且在 DC 成熟和迁移过程中逐渐增多<sup>[11]</sup>。本研究发现, α-GalCer 负载可促进 DC 的 CCR-7 mRNA 表达水平升高。除此之外, 激活的 DC 可分泌高水平的 IL-10、IL-12 以及 TGF-β 等细胞因子, 进而对 CIK 细胞的增殖和杀伤活性有促进作用<sup>[12-13]</sup>, 这对肿瘤的临床治疗有重要意义。上述结果表明 α-GalCer 负载可以全面活化 DC, 无论是表面共刺激分子还是相关细胞因子的分泌水平均有所上调。同时, α-GalCer 负载的 DC 还可以促进 CIK 细胞增殖和成熟, 并提高 CIK 细胞对 HepG2 细胞的杀伤活性, 可能是通过提高 CIK 细胞杀伤功能相关基因的表达水平发挥作用。CIK 细胞发挥抗肿瘤作用主要是通过 CIK 表面配体 LFA 和 ICAM-1 途径与肿瘤细胞结合, 通过分泌穿孔素和颗粒酶 B 等直接杀伤肿瘤细胞<sup>[14]</sup>; 另外, CIK 细胞可分泌大量的 IL-12、IL-6、IFN-γ、TNF-α 等细胞因子, 提高细胞毒作用<sup>[15]</sup>, 与本研究结果一致。

免疫过继疗法已经成为继手术和放化疗之后抗肿瘤治疗的主要手段, 在临床实践中已经逐渐得到了广大医护人员认可, 但其治疗有效率尚待进一步提高。本研究发现 α-GalCer 可有效活化 DC, 提高 CIK 细胞的增殖、因子分泌和杀瘤能力, 可为肿瘤的细胞免疫治疗提供一个重要的思路。本课题组将进一步研究其具体的激活机制及杀伤机制, 并通过临床试验验证该方法的安全性和有效性。

### [参考文献]

[1] JIANG J T, WU C P, LU B F. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity [J/OL]. J Transl Med, 2013, 11(1): 83 [2015-11-15]. <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-11-.83>. DOI: 10.1186/1479-5876-11-83.

[2] 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. DOI: 10.1517/14712598.2012.675323.

[3] MA Y, ZHANG Z, TANG L, et al. Cytokine-induced killer cells in the treatment of patients with solid carcinomas: a systematic re-

- view and pooled analysis [ J ]. *Cytotherapy*, 2012, 14( 4 ): 483-493. DOI: 10.1016/j.clim.2010.11.010.
- [ 4 ] Schneiders F L, Scheper R J, Von Blomberg B M E, et al. Clinical experience with  $\alpha$ -galactosylceramide ( KRN7000 ) in patients with advanced cancer and chronic hepatitis B/C infection [ J ]. *Clin Immunol*, 2011, 140( 2 ): 130-141. DOI: 10.1016/j.clim.2010.11.010.
- [ 5 ] MOTOHASHI S, NAGATO K, KUNII N, et al. A phase I-II study alpha-galactosylceramide pulsed IL-2/GM-CSF cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer [ J ]. *J Immunol*, 2009, 182( 4 ): 2492-2501. DOI: 10.4049/jimmunol.0800126.
- [ 6 ] VAN DER VLIET H J, MOLLING J W, VON BLOMBERG B M E, et al. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease [ J ]. *Clin Immunol*, 2004, 112( 1 ): 8-23. DOI: 10.1016/j.clim.2004.03.003.
- [ 7 ] SHAN C C, SHI L R, DING M Q, et al. Cytokine-induced killer cells co-cultured with dendritic cells loaded with the protein lysate produced by radiofrequency ablation induce a specific antitumor response [ J ]. *Oncol Lett*, 2015, 9( 4 ): 1549-1556. DOI: 10.3892/ol.2015.2977.
- [ 8 ] WANG Y F, KUNDA P E, LIN J W, et al. Cytokine-induced killer cells co-cultured with complete tumor antigen-loaded dendritic cells, have enhanced selective cytotoxicity on carboplatin-resistant retinoblastoma cells [ J ]. *Oncol Rep*, 2013, 29( 5 ): 1841-1850. DOI: 10.3892/ol.2015.2977.
- [ 9 ] 艾丽梅, 宋盈盈, 苏荣英. DC-CIK 细胞体外抗白血病 K562 细胞的免疫效应 [ J ]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24( 10 ): 1168-1170.
- [ 10 ] LI R M, WANG C L, LIU L, et al. Autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy in lung cancer: a phase II clinical study [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61( 11 ): 2125-2133. DOI: 10.1007/s00262-012-1260-2.
- [ 11 ] MUKAE S, OKAZAKI Y, TSUDA H, et al. Detection of fascin and CCR-7 positive mature dendritic cells in oral lichen planus [ J ]. *J Oral Pathol Med*, 2009, 38( 4 ): 334-342. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2008.00741.x.
- [ 12 ] 李云霞, 远洋, 王雪峰. SOCS1 siRNA 和 IL-12 基因共同修饰树突状细胞体外抗喉癌的免疫反应 [ J ]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2012, 26( 19 ): 890-896.
- [ 13 ] JIN Y, WI H J, CHOI M H, et al. Regulation of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  in mouse dendritic cells through treatment with *Clonorchis sinensis* crude antigen [ J/OL ]. *Exp Mol Med*, 2014, 46( 1 ): e74 [ 2015-07-15 ]. <http://www.nature.com/emmm/journal/v46/n1/full/emmm2013144a.html>. DOI: 10.1038/emmm.2013.144.
- [ 14 ] 杨威, 徐铭宝. CIK 细胞治疗恶性肿瘤研究进展 [ J ]. *中国实用医药*, 2009, 4( 29 ): 217-219. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7555.2009.29.178.
- [ 15 ] 刘军权, 朱云, 陈复兴, 等. 不同刺激因子对人 CIK 细胞功能影响 [ J ]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21( 4 ): 1021-1026.
- [ 收稿日期 ] 2015 - 11 - 20 [ 修回日期 ] 2016 - 02 - 24  
[ 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,为中国精品科技期刊、RCCSE 中国权威学术期刊、中国中文核心期刊、中国科学引文数据库核心源期刊、中国科技核心期刊、中国人民解放军优秀医学期刊,为同行专家评审期刊;获 2015 - 2017 年度中国科协精品科技期刊工程项目资助。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,国内外公开发行。

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 15 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 10 个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》每册定价 15.00 元,全年定价 90.00 元。邮发代号: 4 - 576,请通过当地邮局订阅。若错过,可从本刊编辑部补订,请将 90.00 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 黄静怡

联系电话: 021 - 55620605 × 22, 021 - 81871002 × 22

传 真: 021 - 81871007; 网 址: [www.biother.org](http://www.biother.org); 电子邮箱: [cjcb@biother.org](mailto:cjcb@biother.org)