

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00457

鼻咽癌患者自体细胞因子诱导的杀伤细胞体外增殖及杀瘤活性

杨 好, 杨新辉, 周光华*

解放军 163 医院肿瘤科, 长沙 410000

[关键词] 鼻咽肿瘤; 细胞增殖; 细胞毒性; 细胞因子诱导的杀伤细胞

[中图分类号] R 739.6 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2012)04-0457-03

Proliferation and *in vitro* cytotoxicity of cytokine-induced killer cells of patients with nasopharyngeal carcinoma

YANG Yu, YANG Xin-hui, ZHOU Guang-hua*

Department of Oncology, No. 163 Hospital of PLA, Changsha 410000, Hunan, China

[Key words] nasopharyngeal neoplasms; cell proliferation; cytotoxicity; cytokine-induced killer cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(4): 457-459]

鼻咽癌是中国南方地区的高发肿瘤,是目前放疗有效率较高的肿瘤之一,但复发和转移仍是导致鼻咽癌患者治疗失败的主要原因。如何完善鼻咽癌的综合治疗,提高其总体生存率是目前鼻咽癌治疗的重点。细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞过继免疫疗法已经成为肿瘤患者放、化疗后辅助治疗的重要手段之一,对于促进患者免疫系统的重建、消除残留病灶及骨髓保护等都有良好的效果^[1-2]。本研究观察了鼻咽癌患者自体 CIK 细胞的体外增殖能力及杀瘤活性,并与 CD3AK 和 LAK 细胞进行比较,旨在为鼻咽癌自体 CIK 细胞治疗应用于临床提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 临床资料 研究组外周血样本采集自在我科就诊的 24 例鼻咽癌患者,男性 16 例、女性 8 例,年龄 33~72 岁(中位年龄 52 岁)。全部患者均经病理学明确诊断为鼻咽鳞癌。其中临床 II 期 12 例、III 期 9 例、IV 期 3 例,均在未行放化疗前抽取血样。对照组外周血样本采集自 24 例健康成年人,男性 11 例、女性 13 例,年龄 33~72 岁(中位年龄 46 岁)。两组样本均不伴有免疫系统或造血系统疾病,不伴有感染。

1.2 实验材料 人淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque PLUS)购自 Amersham Biosciences 公司;抗 CD3 mAb 购自北京邦定生物医学公司;重组人白介素 2(interleukin-2, IL-2)购自山东泉港药业有限公司;重组人白介素 1(interleukin-1, IL-1)及重组人干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)购自 Pepro-Tech 公司。RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司,MTT 试剂购自上海研生生化试剂有限公司,ELISA 试剂盒购自上海博谷生物科技有限公司;酶标仪为 Bio-Rad 公司产品。人鼻咽癌细胞株

HONE1 购自中国科学院细胞库,在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中于 37°C、70% 湿度、5% CO₂ 条件下常规培养、传代。

1.3 CIK 细胞的体外诱导培养^[1] 用 COBE Spectra 6 血细胞分离机分离外周血单个核细胞,再用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞。用含血清培养液调整细胞密度为 1×10^6 /ml,在 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养,于培养当天加入 1×10^6 U/L IFN- γ , 24 h 后加入 IL-2、抗 CD3 mAb、IL-1,终浓度分别为 3×10^5 U/L、50 μ g/L、 1×10^5 U/L,继续培养、传代,定期补充抗 CD3 mAb 和 IL-2。

1.4 CD3AK 细胞和 LAK 细胞的诱导培养 将鼻咽癌患者外周血提取的单个核细胞密度调至 1×10^6 /ml,加入终浓度为 1 mg/L 的抗 CD3 mAb 和 3×10^5 U/L 的 IL-2, 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 d 添加新鲜培养液和 IL-2 即可培养 CD3AK 细胞。

将鼻咽癌患者外周血提取的单个核细胞密度调至 1×10^6 /ml,加入 IL-2,终浓度为 1×10^6 U/L,定期更换培养液和补充 IL-2 即可获得 LAK 细胞。

1.5 活细胞的计数 在诱导培养后第 0、4、8、12、16、20 天分别取培养的 CIK、CD3AK、LAK 细胞悬液,用锥虫蓝拒染法计数活细胞,动态观察 CIK 细胞的增殖能力。

1.6 细胞分泌 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 水平测定 于培养的第 0、4、8、12、16 天分别取健康人和鼻咽癌患者 CIK 细胞,充分洗涤,调整细胞密度为 2×10^6 /ml,培养 24 h 后,收集上清,用 ELISA 法定量测定 CIK 细胞培养上清中 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 变化情况。

1.7 体外细胞毒活性检测 分别以体外培养 15 d 的 CIK、

[收稿日期] 2011-09-14

[接受日期] 2012-02-21

[作者简介] 杨 好, 硕士生, 主治医师. E-mail: doctoryangyu@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0731-84184140, E-mail: zhoughuanghua@163.com

CD3AK、LAK 细胞为效应细胞,鼻咽癌细胞株 HONE1 为靶细胞,效靶比为 1 : 1,5 : 1,10 : 1,20 : 1,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 72 h,每孔加 10 μl MTT(终浓度 5 g/L),继续孵育 4 h,离心,去上清,每孔加入二甲基亚蓝 150 μl,用酶标仪测 490 nm 处的光密度(D)值,计算杀瘤率。杀瘤率(%)=[1-(实验组 D 值-单纯效应细胞组 D 值)/单纯靶细胞组 D 值]×100%。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料进行 *t* 检验或单因素方差分

析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 细胞体外扩增能力 CD3AK、LAK、CIK 细胞均随培养时间的延长,细胞数量逐渐增加,培养 20 d 时,CD3AK 和 LAK 细胞扩增倍数分别约为 42 倍和 25 倍,而正常人及鼻咽癌患者 CIK 细胞体外增殖倍数均为 120 倍左右,高于 CD3AK 和 LAK 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 各效应细胞连续培养 20 d 细胞增殖情况

$n=24, \bar{x} \pm s, \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$

细胞	培养天数 <i>t</i> /d					
	0	4	8	12	16	20
鼻咽癌患者						
CD3AK	1.03±0.21	2.99±1.33	10.73±4.81	19.32±6.42	30.71±7.39	42.43±2.56
LAK	1.13±0.03	3.44±1.53	7.55±2.24	11.47±5.73	19.23±7.21	25.33±5.64
CIK	1.04±0.11	4.33±1.23	18.02±4.05	38.81±10.32	82.62±8.61	116.22±10.45*
正常对照组						
CIK	1.07±0.12	4.29±1.26	17.17±4.33	40.22±9.36	75.56±10.43	120.65±9.32*

* $P < 0.05$ 与 CD3AK 和 LAK 细胞比较

2.2 CIK 细胞分泌细胞因子水平 在不同时间点,正常人和鼻咽癌患者体外 CIK 细胞分泌 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 水平从第 4 天开始均升高,其中 IL-2 在第 12 天左右达到分泌最高

峰,随后逐渐下降;TNF- α 和 IFN- γ 仍持续升高,见表 2。正常人外周血 CIK 细胞与鼻咽癌患者外周血 CIK 细胞分泌各种细胞因子的水平差异无统计学意义。

表 2 CIK 细胞不同培养时间分泌细胞因子水平

$n=24, \bar{x} \pm s, \rho_B/(\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$

细胞因子	培养天数 <i>t</i> /d				
	0	4	8	12	16
IL-2					
正常对照组	4.123±0.951	14.114±2.662	25.345±5.158	189.520±13.225	62.531±9.432
鼻咽癌患者	4.221±1.004	11.412±2.174	23.952±4.992	178.421±13.011	59.062±9.226
TNF- α					
正常对照组	4.573±1.212	8.372±1.347	12.483±2.223	100.783±10.262	274.652±19.367
鼻咽癌患者	5.229±1.104	7.937±1.225	13.167±2.462	104.892±10.336	277.202±21.458
IFN- γ					
正常对照组	7.093±1.332	10.211±1.476	17.463±2.368	97.483±9.337	140.274±16.117
鼻咽癌患者	5.347±0.982	9.336±1.216	16.491±2.025	101.268±10.123	129.231±14.533

2.3 各效应细胞对人鼻咽癌细胞杀瘤活性的检测 各效应细胞分别按效靶比 1 : 1,5 : 1,10 : 1,20 : 1 与 HONE1 靶细胞混合培养 72 h,可见不同效应细胞的杀瘤率均随效靶比的升高而升高,相同效靶比情况下,鼻咽癌患者的 CIK 细胞体外杀瘤活性强于 CD3AK 和 LAK 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$),而鼻咽癌患者和正常人来源的 CIK 细胞在体外杀瘤活性差异无统计学意义。见表 3。

3 讨论

生物免疫学中的过继免疫治疗因其对机体的正常组织、

细胞,特别是免疫结构与功能没有进行性损害作用,而且还有调节增强作用,越来越受到关注。以往的过继免疫疗法如 LAK 细胞、TIL 细胞和 CD3AK 细胞由于体外增殖能力弱、杀瘤活性低及体外抗肿瘤活性依赖外源性 IL-2 容易对机体造成损害等缺点,一直未能广泛应用于临床。CIK 细胞是 1991 年斯坦福大学 Schmidt-Wolf 等^[3]报道的一类由多种细胞因子诱导的杀伤细胞,是将人外周血单个核细胞在体外与多种细胞因子(抗 CD3 mAb、IL-1 等)共同培养一段时间后获得的一群异质细胞。由于该种细胞同时表达 CD3 和 CD56 两种膜蛋白分子,故又被称为自然杀伤细胞样 T 淋巴细胞,

兼具 T 淋巴细胞强大的抗肿瘤活性和自然杀伤细胞的非主要组织相容性复合物限制性杀瘤优点,应用 CIK 细胞被认为是新一代肿瘤过继免疫治疗的首选方案。目前认为 CIK 细胞的杀瘤机制主要为:(1)对肿瘤细胞的直接杀伤作用;(2)CIK 细胞表面的 CD3 或类似 CD3 受体被结合而激活 CIK 细胞产生胞质毒性颗粒介导的溶细胞作用;(3)CIK 细胞可以

释放大量的炎性细胞因子;(4)诱导细胞凋亡;(5)促进 T 细胞增殖活化等^[4]。本研究对鼻咽癌患者 CIK 细胞、LAK 细胞和 CD3AK 细胞的体外增殖能力、杀瘤活性进行了比较,证实鼻咽癌患者 CIK 细胞体外增殖能力和杀瘤活性明显强于 LAK 细胞和 CD3AK 细胞($P < 0.05$)。

表 3 不同效靶比时各效应细胞对人鼻咽癌细胞株 HONE1 的杀瘤率

$n=24, \bar{x} \pm s, \%$

细胞	效靶比			
	1 : 1	5 : 1	10 : 1	20 : 1
正常对照组				
CIK	5.03 ± 1.23	30.58 ± 3.92	52.19 ± 4.87	86.23 ± 5.39
鼻咽癌患者				
CIK	4.82 ± 1.12*	35.09 ± 3.22*	54.43 ± 2.37*	81.21 ± 4.85*
LAK	1.09 ± 0.77	10.87 ± 2.11	29.03 ± 2.11	45.37 ± 2.51
CD3AK	1.93 ± 0.68	15.16 ± 2.58	27.57 ± 2.49	42.82 ± 3.04

* $P < 0.05$ 与 CD3AK 和 LAK 细胞比较

本研究比较了体外培养的健康人和鼻咽癌患者外周血 CIK 细胞的体外增殖能力、分泌细胞因子水平、杀瘤活性的差别,结果发现健康对照组和鼻咽癌患者的 CIK 细胞的数量均随着培养时间的延长呈稳步增长的趋势,且都能产生大量 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等具有很强抗肿瘤活性的细胞因子,两组比较差异无统计学意义。同时还观察到健康对照组与鼻咽癌患者 CIK 细胞的体外杀瘤活性亦无明显差别,这与国内要跟东等^[5]的研究结论不同,在他们的研究中健康人的 CIK 细胞体外杀瘤活性明显高于鼻咽癌患者,考虑可能与本研究中健康对照组年龄范围较大(最大年龄 72 岁,60 岁以上 5 人)有关。年龄是影响免疫力的重要因素,年龄增大免疫力会下降,故本研究中健康对照组的体外杀瘤活性与鼻咽癌患者相当,而没有明显高于鼻咽癌患者。在今后的研究中将进一步就不同年龄段、不同性别患者的情况进行分析,并提高样本量。

理论上,患者自体 CIK 细胞体外扩增回输体内相对其他来源可以避免免疫排斥反应及交叉感染的发生,安全性得到明显提高,本研究为鼻咽癌的自体 CIK 细胞过继疗法提供了实验依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Wu C, Jiang J, Shi L, Xu N. Prospective study of chemotherapy in combination with cytokine-induced killer cells in patients suffering from advanced non-small cell lung cancer[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(6B): 3997-4002.
- [2] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors[J]. *J Cancer*, 2011, 2: 363-368.
- [3] Schmidt-Wolf G D, Negrin R S, Schmidt-Wolf I G. Activated T cells and cytokine-induced CD3⁺ CD56⁺ killer cells[J]. *Ann Hematol*, 1997, 74: 51-56.
- [4] Ren H, Hu H T, Liu G, Du N, Tian W, Deng Z P, et al. Study of multi-directional derivation of cord blood mononuclear cells and observation of killing activity to MGC-803 gastric cancer cell strain *in vitro*[J]. *Chin-German J Clin Oncol*, 2006, 5: 245-248.
- [5] 要跟东, 刘爱民, 霍红旗, 张 灿, 王海东. CIK 对三种鼻咽癌细胞株杀伤活性的研究[J]. *山东医药*, 2011, 51: 79-80.

[本文编辑] 孙 岩