

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00474

## 具有肿瘤杀伤活性粒细胞的筛选及其体外抑瘤效应观察

郭慧军, 赵树铭\*

第三军医大学西南医院输血科, 重庆 400038

**[摘要]** **目的** 探索具有肿瘤杀伤活性(CKA)粒细胞的筛选方法,并对其体外抑瘤效应进行初步研究。**方法** (1)收集健康志愿者外周抗凝全血 21 份,分离粒细胞,与人肺癌 A549 细胞共培养,通过检测肿瘤细胞增殖活性筛选出 CKA 粒细胞。(2)将筛选得到的 CKA 粒细胞作用于不同种类的肿瘤细胞,采用 CCK-8 法检测肿瘤细胞活性,双染法检测肿瘤细胞凋亡发生情况。(3)分别采用直接接触、Transwell 共培养、条件培养液等共培养细胞方式,观察不同处理方式对 CKA 粒细胞抑制肿瘤细胞活性的影响。**结果** (1)有 6 株粒细胞克隆对 A549 细胞活性具有明显的抑制作用,将其中作用最显著的克隆 3 标记为 CKA 粒细胞。(2)CKA 粒细胞不仅对人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 HepG2 和人宫颈癌细胞 HeLa 生长活性有明显抑制作用,且能促进这 3 种细胞的凋亡。(3)3 种处理方式的抑制效率比较:直接接触>Transwell>条件培养。**结论** CKA 粒细胞对某些类型的肿瘤细胞活性具有明显的抑制作用;CKA 粒细胞对肿瘤的杀伤作用可能与其与肿瘤的接触方式有关。

**[关键词]** 肿瘤杀伤活性;粒细胞;筛选;肿瘤治疗**[中图分类号]** R 73-36**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)05-0474-05

### Screening of granulocytes with cancer killing activity and their *in vitro* anti-tumor effects

GUO Hui-jun, ZHAO Shu-ming\*

Department of Blood Transfusion, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the screening method for granulocytes with cancer killing activity (CKA) and to observe their *in vitro* anti-tumor effects. **Methods** (1) Anti-coagulated peripheral whole blood samples were collected from 21 healthy volunteers and were co-cultured with human lung cancer cell line A549. The proliferation activity of cancer cells was observed to screen granulocytes with CKA. (2) The screened granulocytes with CKA was used to treat various tumor cells, CCK-8 method was used to examine the vitality of tumor cells, and the cell apoptosis was detected by Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II. (3) The cancer cells were co-cultured using direct contact, Transwell and conditioned medium, and the effects of the three methods on the anti-tumor effect of CKA granulocytes were observed. **Results** (1) Six granulocyte clones showed noticeable inhibitory effect against A549 cells, and clone 3 had the most potent effect and was marked as CKA granulocyte. (2) The screened CKA granulocytes not only had noticeable inhibitory effects against A549, HepG2 and HeLa cells, but also promoted their apoptosis. (3) The order of the inhibitory efficiencies for the three culture methods from strong to weak was: direct contact > Transwell > conditioned medium. **Conclusion** CKA granulocytes have noticeable inhibitory effect against some cancer cells, which might be associated with their contact mode with the cancer cells.

**[Key words]** cancer killing activity; granulocytes; screening; oncotherapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(5):474-478]

以往粒细胞被认为是抵御微生物进攻的固有免疫系统的组成细胞之一,在肿瘤的治疗中作用不大。近年来 Cui 等<sup>[1]</sup>报道其所在的实验室在制备小鼠肉瘤细胞 S180 转移瘤动物模型时,发现有一雄性 BALB/c 小鼠对肿瘤完全抵抗;经进一步研究发现该小鼠固有的粒细胞具有很强的抗肿瘤活性,提示粒细胞作为抗肿瘤新靶点的可能。但是能否将动物

模型中的发现运用于临床,在健康人群中筛选出具有肿瘤杀伤活性(cancer killer activity, CKA)的粒细胞,并对其免疫活性和抗肿瘤效果进行评价,是一个有待探讨的关键问题。为此,我们从 21 名健康志愿者的全血中分离粒细胞,探索 CKA 粒细胞的筛选方法,并对其体外抑瘤效应进行初步研究,以期临床肿瘤的细胞治疗提供新思路。

[收稿日期] 2012-04-24

[接受日期] 2012-05-04

[作者简介] 郭慧军,硕士生,主管技师. E-mail: guohuijuns@hotmail.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-68765475, E-mail: shumingzhao@yahoo.com

## 1 材料和方法

1.1 标本收集 收集健康志愿者外周抗凝全血 21 份(10 ml/份),来自 21 名无肿瘤家族史的健康志愿者,其中男性 13 名,女性 8 名;平均年龄(34.3 ± 13.6)岁。

1.2 材料 人粒细胞分离液购自天津 TBD 灏洋公司;正常细胞株(人正常胚肺成纤维细胞 MRC-5)与肿瘤细胞株(人肺腺癌细胞 A549、人肝癌细胞 HepG2、人宫颈癌细胞 HeLa、低分化人胃腺癌细胞 BGC-823、人结肠癌细胞 LoVo、人乳腺癌细胞 MDA-MB-453)均来自中国科学院细胞库;培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶均为美国 Invitrogen 公司产品;主要检测试剂:CCK-8 试剂盒(cell count kit 8,日本同仁化学研究所),凋亡检测试剂盒(美国 BD Biosciences 公司);Transwell 培养板(美国 Corning 公司)。

1.3 粒细胞分离 采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法<sup>[2-4]</sup>:将 5 ml 粒细胞分离液加入离心管中,再加 5 ml 新鲜抗凝全血至分离液的上层;室温,500 × g 离心 30 min;待血液出现分层(自上而下依次为血浆、单核细胞层、分离液、中性粒细胞、其余的分离液、红细胞沉淀层)后,用吸管小心移去上面的三层;吸取中性粒细胞层和其下面的分离液层,转移至一干净的离心管中;加入 10 ml 无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的 Hank 平衡液溶液(HBSS),上下颠倒数次,悬浮细胞;室温,350 × g 离心 10 min,管底部会出现红色沉淀,弃上清;在管底加入 2 ml 红细胞裂解液裂解残余的红细胞;低速涡旋震荡重悬沉淀;室温,250 × g 离心 10 min,弃上清;加入 500 μl 含 2% 人血清白蛋白(HAS)的 HBSS,锥虫蓝染色,使用血细胞计数板进行活细胞计数;4℃短暂保存备用。

### 1.4 CKA 粒细胞的筛选

1.4.1 人肺癌细胞与粒细胞的共培养 先取人肺癌 A549 细胞系,用含 10% FBS 的 F12 培养液培养,将细胞密度为 5 × 10<sup>5</sup> 个/ml 的 A549 细胞接种于培养瓶中,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。取对数生长期的 A549 细胞,采用胰酶消化法制备细胞悬液,与按 1.3 步骤分离得到的粒细胞按照 200 : 1 的比例,接种至 96 孔细胞培养板,加入含 10% FBS 的 F12 培养液,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内进行细胞混合培养。

1.4.2 细胞增殖活性检测 分别于混合培养后不

同时间点(24、48 h)检测 A549 细胞的增殖活性,按 CCK-8 试剂盒操作说明进行。检测前,使用 Dulbecco 磷酸盐缓冲液(D-PBS)清洗肿瘤细胞表面残留的粒细胞,每孔添加 90 μl 无血清培养液,加入 10 μl 的 CCK-8 溶液,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育 4 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度值并记录结果。筛选出其中对 A549 细胞的生长抑制作用较明显者,标记为 CKA 粒细胞,并用于后续实验。

### 1.5 CKA 粒细胞体外抗肿瘤活性检测

1.5.1 人成纤维细胞和人肿瘤细胞的培养 人成纤维细胞 MRC-5,人肿瘤细胞 HepG2、HeLa、BGC-823 采用 MEM + 10% FBS 培养液;人肿瘤细胞 A549 细胞采用 F12 + 10% FBS 培养液,LoVo 细胞采用 RPMI 1640 + 10% FBS 培养液,MDA-MB-453 细胞采用 L-15 + 10% FBS 培养液。上述细胞分别以 5 × 10<sup>5</sup> 个/ml 的细胞密度接种于培养瓶中,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

1.5.2 成纤维细胞或肿瘤细胞与 CKA 粒细胞的共培养 取对数生长期的成纤维细胞 MRC-5 或不同的肿瘤细胞,采用胰酶消化法制备细胞悬液,与 1.4 步骤筛选得到的 CKA 粒细胞按不同比例(0 : 1、100 : 1、200 : 1 和 500 : 1)混合,接种至 96 孔细胞培养板,加入 1.5.1 步骤中对应的培养液,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内进行细胞混合培养。细胞共培养后 48 h,分别进行细胞增殖活性和细胞凋亡检测。

1.5.3 细胞增殖活性检测 采用 CCK-8 试剂盒分别对成纤维细胞和肿瘤细胞增殖活性进行检测,方法同 1.4.2。

1.5.4 细胞凋亡检测 实验采用双染试剂盒(Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II),用 D-PBS 洗涤细胞 2 次(2 000 × g 离心 5 min),收集细胞沉淀;加入 500 μl 的结合缓冲液重悬细胞沉淀;加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀,在室温下避光反应 10 min;加入 5 μl 碘化丙啶混匀,在室温下避光反应 5 min 后,立即上流式细胞仪进行检测。

1.6 不同处理方式对 CKA 粒细胞作用的影响 使用 3 种不同的方式处理、培养肿瘤细胞,分别为:(1)直接接触,CKA 粒细胞与肿瘤细胞直接共同培养;(2)Transwell,上层培养 CKA 粒细胞,下层培养肿瘤细胞;(3)条件培养液,CKA 粒细胞培养 24 h,收集上清,添加至肿瘤细胞培养液中。3 种处理方式 CKA 粒细胞与肿瘤细胞比例均为 500 : 1。细胞培

养 6、12、24 和 48 h 后,采用 CCK-8 试剂盒检测肿瘤细胞增殖活性(方法同 1.4.2),比较不同处理方式对 CK A 粒细胞抑制肿瘤细胞活性的影响。

1.7 统计学处理 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  形式表示,使用 SPSS 14.0 统计软件,两组间比较采用 *t* 检验。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 CK A 粒细胞的筛选 粒细胞与 A549 细胞按照不同比例共培养 24 和 48 h 后,使用 CCK-8 检测细胞增殖活性。检测结果(表 1)显示,编号为 3、4、9、11、13、17 的粒细胞对 A549 细胞生长活性具有明显的抑制作用,其中第 3 组粒细胞对 A549 的生长抑制作用较明显( $P < 0.01$ ),将其标记为 CK A 粒细胞并用于后续实验。

表 1 CCK-8 筛选 CK A 粒细胞

Tab 1 CCK-8 screening of CK A granulocytes

$n=3, \bar{x} \pm s, D_{450}$

Cell	Culture time	
	24 h	48 h
A549	0.847 ± 0.159	1.545 ± 0.160
Granulocyte 1-A549	0.811 ± 0.100	1.486 ± 0.117
Granulocyte 2-A549	0.612 ± 0.101	1.330 ± 0.207
Granulocyte 3-A549	0.563 ± 0.056 *	0.901 ± 0.110 * *
Granulocyte 4-A549	0.626 ± 0.089	1.032 ± 0.212 *
Granulocyte 5-A549	0.725 ± 0.101	1.275 ± 0.172
Granulocyte 6-A549	0.678 ± 0.150	1.375 ± 0.166
Granulocyte 7-A549	0.748 ± 0.134	1.290 ± 0.155
Granulocyte 8-A549	0.648 ± 0.077	1.479 ± 0.113
Granulocyte 9-A549	0.522 ± 0.077 *	1.120 ± 0.204 *
Granulocyte 10-A549	0.687 ± 0.082	1.358 ± 0.177
Granulocyte 11-A549	0.506 ± 0.094 *	0.897 ± 0.166 * *
Granulocyte 12-A549	0.748 ± 0.072	1.357 ± 0.174
Granulocyte 13-A549	0.647 ± 0.091	1.081 ± 0.176 *
Granulocyte 14-A549	0.740 ± 0.109	1.301 ± 0.162
Granulocyte 15-A549	0.710 ± 0.097	1.525 ± 0.107
Granulocyte 16-A549	0.649 ± 0.140	1.440 ± 0.198
Granulocyte 17-A549	0.543 ± 0.081 *	0.780 ± 0.184 * *
Granulocyte 18-A549	0.729 ± 0.101	1.359 ± 0.209
Granulocyte 19-A549	0.645 ± 0.130	1.547 ± 0.082
Granulocyte 20-A549	0.587 ± 0.112	1.397 ± 0.218
Granulocyte 21-A549	0.730 ± 0.143	1.414 ± 0.123

\*  $P < 0.05$ , \* \*  $P < 0.01$  vs A549 cells cultured alone at the same time point

### 2.2 CK A 粒细胞体外抗肿瘤活性检测

2.2.1 CK A 粒细胞抑制不同肿瘤细胞活性检测 选用第 3 组 CK A 粒细胞,按照不同的比例分别与正

常细胞或不同来源的 6 种肿瘤细胞共培养 48 h, CCK-8 检测细胞增殖活性。检测结果(表 2)显示:当 CK A 粒细胞与靶细胞比例为 500 : 1、共培养 48 h,CK A 粒细胞对正常细胞 MRC-5 生长活性无明显抑制作用;对肿瘤细胞 A549、HepG2 及 HeLa 生长活性有明显抑制作用( $P < 0.05$ ),且抑制作用与 CK A 粒细胞比例呈依赖关系;对肿瘤细胞 BGC-823、LoVo 和 MDA-MB-453 生长活性无明显抑制作用( $P > 0.05$ )。

2.2.2 CK A 粒细胞对肿瘤细胞凋亡影响检测 选用第 3 组 CK A 粒细胞,按照不同的比例,分别与 A549、HepG2 及 HeLa 细胞共培养 48 h,双染法检测细胞凋亡。检测结果(图 1)显示:CK A 粒细胞能够促进肿瘤细胞 A549(图 1A)、HepG2(图 1B)及 HeLa(图 1C)的凋亡;其中 CK A 粒细胞与肿瘤细胞按照 500 : 1 的比例共培养 48 h,肿瘤细胞的凋亡率分别为 47.94%、22.33%和 23.24%,与肿瘤细胞单独培养组(7.20%、7.46%和 7.54%)相比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且其促进肿瘤细胞的凋亡作用与 CK A 粒细胞和肿瘤细胞比例正相关。

2.3 CK A 粒细胞对肿瘤细胞作用方式的检测 选用第 3 组 CK A 粒细胞,分别按照直接接触、Transwell 和条件培养液 3 种方式处理肿瘤细胞,培养不同时间后检测细胞增殖活性。检测结果(图 2)显示:CK A 粒细胞对肿瘤细胞 A549(图 2A)、HepG2(图 2B)及 HeLa(图 2C)生长活性有明显抑制作用;3 种处理的抑制效率相比较,直接接触 > Transwell > 条件培养。

## 3 讨论

肿瘤是危害人类生命和健康的一大疾病,目前位列人群疾病死亡病因的第二位。肿瘤的治疗方法主要是手术、放疗和化疗。其中,外科手术治疗只适用于早期肿瘤,而放、化疗毒副作用较大。因此,开发安全、有效的新一代抗肿瘤生物疗法有着极其重要的意义。

近年来的研究发现<sup>[5-7]</sup>,在小鼠肿瘤模型中出现抗肿瘤小鼠,对其进一步研究发现,抗肿瘤小鼠的基因发生突变,突变的粒细胞能够将肿瘤细胞发出的信号转变为进攻信号,有助于提高其抗肿瘤功能;而在非抗肿瘤小鼠体内,粒细胞受到肿瘤细胞发出的自卫信号(self-defensive signals)的抑制,不能对肿瘤细胞发起进攻。抗肿瘤小鼠的粒细胞杀死肿瘤细

胞需要经过 3 个步骤: 首先, 粒细胞在识别肿瘤细胞后, 迁移到肿瘤细胞所在地点; 接着, 粒细胞识别肿瘤细胞表面特征, 紧密围绕在肿瘤细胞周围; 最后, 粒细胞向肿瘤细胞释放致命剂量的杀肿瘤复合物,

成分随粒细胞类型而定。而非抗肿瘤小鼠缺乏前两个步骤。在抗肿瘤小鼠血液中提取粒细胞并注射到普通小鼠身上, 非抗肿瘤小鼠也具有了抗肿瘤能力。

表 2 CCK-8 检测 CKA 粒细胞抑制不同细胞活性

Tab 2 CCK-8 detection of suppression effect of CKA granulocytes against different tumor cells

Cell	Ratio of CKA granulocytes and target cells			
	0 : 1	100 : 1	200 : 1	500 : 1
MRC-5	1.518 ± 0.387	1.385 ± 0.194	1.369 ± 0.243	1.323 ± 0.169
A549	2.124 ± 0.269	1.520 ± 0.103 *	1.239 ± 0.262 *	1.051 ± 0.277 * *
HepG2	1.811 ± 0.120	1.333 ± 0.271 *	1.247 ± 0.185 *	1.210 ± 0.245 *
HeLa	2.305 ± 0.303	1.485 ± 0.199 *	1.511 ± 0.147 *	1.445 ± 0.103 * *
BGC-823	1.547 ± 0.083	1.341 ± 0.189	1.585 ± 0.258	1.507 ± 0.256
LoVo	1.577 ± 0.108	1.549 ± 0.212	1.471 ± 0.281	1.543 ± 0.215
MDA-MB-453	1.844 ± 0.171	1.695 ± 0.212	1.747 ± 0.095	1.681 ± 0.063

$n=3, \bar{x} \pm s, D_{450}$

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs target cells cultured alone (0 : 1)

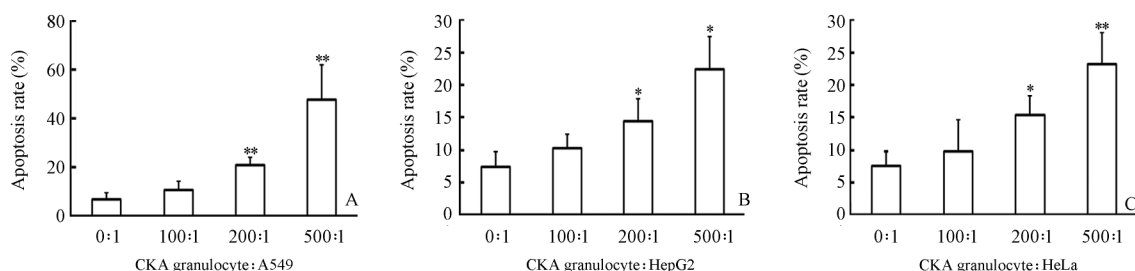


图 1 流式细胞术检测 CKA 粒细胞对肿瘤细胞凋亡的影响

Fig 1 Influence of CKA granulocytes on tumor cell apoptosis by flow cytometry

A: A549; B: HepG2; C: HeLa. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs tumor cells cultured alone (0 : 1).  $n=3, \bar{x} \pm s$

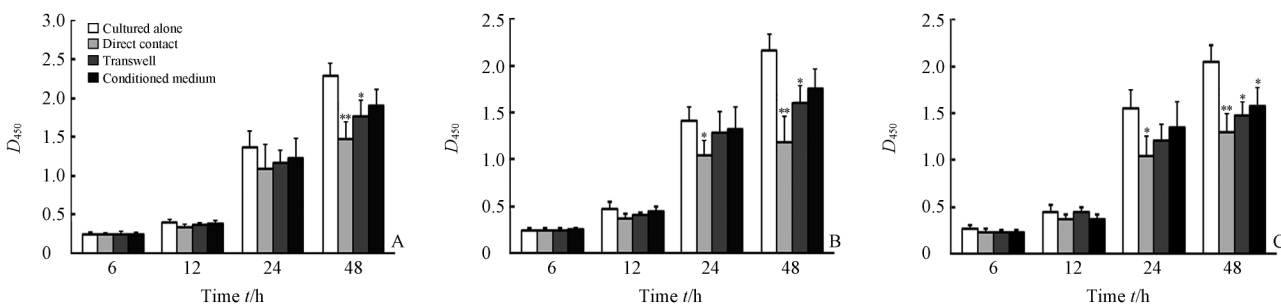


图 2 CCK-8 检测 3 种处理方式下 CKA 粒细胞对肿瘤细胞增殖的影响

Fig 2 CCK-8 detection of influence of CKA granulocytes on tumor cells treated by three ways

A: A549; B: HepG2; C: HeLa. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs tumor cells cultured alone group.  $n=3, \bar{x} \pm s$

我们从 21 名健康志愿者的全血中分离获得 CKA 粒细胞, 初步研究结果表明 CCK-8 可作为 CKA 粒细胞筛选的备选方法, 这与高艳红等<sup>[8]</sup>的报道一致。由此我们推测人体内确实存在着 CKA 粒细胞, 监视并调控细胞突变。CCK-8 检测结果显示,

CKA 粒细胞对正常细胞 MRC-5 生长活性无明显抑制作用; 对肿瘤细胞 A549、HepG2 及 HeLa 细胞生长活性有明显抑制作用 ( $P < 0.05$ ); 对肿瘤细胞 BGC-823、LoVo 和 MDA-MB-453 生长活性无明显抑制作用 ( $P > 0.05$ )。比较 CKA 粒细胞对人正常

细胞及不同来源的人肿瘤细胞的杀伤作用可发现,几者之间有较明显的差异,提示CKA粒细胞对不同来源的人肿瘤细胞的杀伤作用可能具有特异选择性。凋亡检测结果显示,CKA粒细胞能够促进肿瘤细胞A549、HepG2及HeLa的凋亡,且其促凋亡作用与CKA粒细胞和肿瘤细胞比例正相关。由此我们推测CKA粒细胞可作为临床肿瘤细胞治疗的一条新思路,增加肿瘤微环境中的CKA粒细胞的数量和活性的方法有可能成为肿瘤治疗的一种新途径。通过采用三种不同的培养方式,我们发现运用直接接触方法进行培养所获得的CKA粒细胞活性最高,而通过条件培养所获得的细胞活性相对是较低的。由此我们推测CKA粒细胞对肿瘤细胞的杀伤作用可能与其对肿瘤细胞的趋化、黏附作用有关,有待于进一步实验验证。

目前一般所指的细胞治疗(cellular therapy or cell-based therapy)是利用某些具有特定功能的细胞的特性,采用生物工程方法获取和(或)通过体外扩增、培养等处理后,使这些细胞具有增强免疫、杀灭病原体和肿瘤细胞、促进组织器官再生和机体康复等治疗功效,从而达到治疗疾病的目的<sup>[9]</sup>。实际上,输血作为一种广泛应用于临床的治疗手段,其本身就是一种广义上的“细胞治疗”,尤其是成分输血的推广和应用,使人们认识到针对性输注某一特定血液细胞或成分能够更好地达到治疗的目的。我们设想由健康人体内提取CKA粒细胞,并进一步鉴定出其抗肿瘤能力,由此筛选出“抗肿瘤人群”,然后用血细胞分离机进行成分采血,分离后获得CKA粒细胞,对肿瘤患者进行输血式治疗,以达到治疗肿瘤的效果。

#### 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] Cui Z, Willingham M C, Hicks A M, Alexander-Miller M A, Howard T D, Hawkins G A et al. Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:6682-6687.
- [2] 刘文超, 刘智广, 张晓楠, 田俊士, 胡家露, 张学庸. 外周血中性粒细胞的分离方法[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 1996, 12: 64-66.
- [3] 李金凤, 刘文礼, 史小娟, 刘伟, 汉建忠, 万静, 等. 四种常用的人中性粒细胞分离方法的比较[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2008, 8: 277-281.
- [4] 罗琼, 蔡春青, 谢翠华, 楚心唯, 武清宜, 孟晓静, 等. 全血中性粒细胞分离方法对fMLP诱导极性的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30: 1514-1517.
- [5] Hicks A M, Riedlinger G, Willingham M C, Alexander-Miller M A, Von Kap-Herr C, Pettenati M J, et al. Transferable anti-cancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 7753-7758.
- [6] Cui Z, Willingham M C. The effect of aging on cellular immunity against cancer in SR/CR mice[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53: 473-478.
- [7] Hicks A M, Willingham M C, Du W, Pang C S, Old L J, Cui Z. Effector mechanisms of the anti-cancer immune responses of macrophages in SR/CR mice[J]. *Cancer Immunol*, 2006, 6: 11.
- [8] 高艳红, 董矜, 田亚平. 具有抗肿瘤特性的中性粒细胞的筛选技术[J]. *标记免疫分析与临床*, 2009, 10: 298-300.
- [9] Areman E M, Loper K. Cellular therapy: principles, methods, and regulations[M]. Bethesda: AABB, 2009: 203-394; 427-472.

[本文编辑] 周燕娟, 邓晓群