

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.08.012

抗原致敏的树突状细胞联合细胞因子诱导的杀伤细胞对
肝癌细胞杀伤活性的研究

周 兵, 张德重

(卫辉市新乡医学院第一附属医院普外二科, 卫辉 453100)

【摘 要】目的:观察肝癌细胞抗原致敏的树突状细胞(Dendritic cells, DC)与细胞因子诱导的杀伤细胞(Cytokine-induced killer cells, CIK)共培养后的细胞增殖活性、表型的变化及其对肝癌细胞 HepG2 的杀伤活性。方法:采集健康供者的外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMC),常规诱导 DC、CIK,用肝癌细胞 HepG2 抗原冲击 DC(Ag-DC),并将其与 CIK 共培养(Ag-DC-CIK),观察 CIK 和 Ag-DC-CIK 的细胞表型及增殖活性,并以肝癌细胞 HepG2 作为靶细胞,用 MTT 法检测 CIK 和 Ag-DC-CIK 的杀伤活性。结果:肝癌细胞抗原致敏的 DC 与 CIK 细胞共培养后,Ag-DC-CIK 细胞群增殖活性明显增强,且高表达 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺双阳性细胞,其增殖活性和杀伤活性较单纯的 CIK 细胞更高($P<0.05$)。结论:肿瘤抗原致敏的 DC 与 CIK 共培养获得的 Ag-DC-CIK 增殖活性和对肝癌细胞的杀伤活性显著高于 CIK 细胞。

【关键词】树突状细胞;细胞因子诱导的杀伤细胞;肝癌细胞

【中国图书分类法分类号】R329.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-09

Killing activity of antigen-pulsed dendritic cells combined with cytokine
induced killer cells against hepatocarcinoma cells

ZHOU Bing, ZHANG Dezhong

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Xinxiang Medical College)

【Abstract】Objective: To observe the proliferation activities, phenotype changes and killing activities of liver cell antigen-pulsed dendritic cells (Ag-DC) cultured with cytokine-induced killer (CIK) cells against HepG2 hepatocarcinoma cells. Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy donors, then DC and CIK cells were induced. The Ag-DC was co-cultured with CIK (Ag-DC-CIK) and the phenotype and proliferation of CIK and Ag-DC-CIK cells were observed. Their cytotoxicity activities against HepG2 hepatocarcinoma cells were detected by MTT assay. Results: The proliferation of Ag-DC-CIK cell group was significantly enhanced and high expressions of double positive cells of CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD56⁺ were observed. The proliferation and cytotoxic activity were higher in Ag-DC-CIK cells than in CIK cells ($P<0.05$). Conclusion: The proliferation and liver cancer cell-killing activity of Ag-DC-CIK cells which obtained from co-culturing of Ag-DC and CIK cells are significantly higher compared with those of CIK cells.

【Key words】dendritic cells; cytokine-induced killer cells; liver cancer cells

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,大多数患者确诊时已是中晚期,失去手术机会,放化疗效果亦不佳,因此,急需寻求一种新的更为有效的治疗方法,以改变原发性肝癌的治疗现状。近年来,随着肿瘤免疫学等基础学科的发展,在传统治疗模式上提出了增强患者免疫力的生物免疫治疗。树突状细胞(Dendritic cells, DC)是目前发现功能最强的专职抗原提呈细胞(Antigen presenting cells, APC),细胞因子诱导的杀伤细胞(Cytokine-induced killer

cells, CIK)是一种兼有 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关性复合物限制性杀瘤特点的细胞。DC 可以识别抗原,激活获得性免疫系统,CIK 能通过发挥自身细胞毒性和分泌细胞因子杀伤肿瘤细胞。DC 细胞与 CIK 细胞共培养时,两者能相互调节,CIK 细胞能促进 DC 的成熟,同时 DC 细胞能增强 CIK 细胞的增殖能力和杀伤活性^[1]。本实验通过肝癌细胞抗原致敏 DC 联合 CIK 对肝癌细胞的杀伤作用研究,为临床治疗提供理论与实验依据。

作者介绍:周 兵(1979-),男,主治医师,硕士,

研究方向:普外科。

1 材料与方法

1.1 主要制剂与仪器

①DC 和 CIK 细胞培养所需仪器与试剂:无血清培养基 AIMV(美国 Invitrogen 公司),DMEM、Ficoll 液、HEPES 液及 PBS(均为美国 Sigma 公司),流式细胞仪 FACS Calibur(美国 BD 公司),CO₂ 恒温培养箱(日本 SANYO 公司),相差显微镜(日本 Olympus 公司),FITC 标记的鼠抗人 CD3、CD4、HLA-DR 单克隆抗体(古巴分子免疫学中心产)。②流式细胞分析所需主要抗体及试剂:T 细胞亚群试剂盒、淋巴细胞分离液(美国 Sigma 公司),抗 CD3-PE、抗 CD4-PE、抗 CD16-PE、抗 56-PE、抗 CD8-FITC、抗 CD25-FITC 及同型对照 IgGα1(均为美国 BD 公司),破膜剂及固定剂(北京德博生物科技有限公司)。③外周血单个核细胞来源于 2 例成人供血者,供者无遗传病史,无血液系统疾病,无寄生虫病,艾滋病、乙肝、梅毒等传染病学检测均为阴性。人肝癌细胞株 HepG2,由中国科学院上海生科院细胞资源中心提供。

1.2 CIK 细胞的体外诱导和扩增

通过血细胞分离机采集健康供血者外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells,PBMNC),用 Ficoll 淋巴细胞分离液进一步分离纯化,用 AIMV 无血清培养基调整细胞浓度为 4×10^6 个/ml,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 2 h。收集非贴壁细胞,计数并用 RPMI1640 培养液调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml,第 1 天加入 1 000 U/ml 的 IFN-γ,24 h 后加入 100 ng/ml 的 CD3McAb 及 1 000 U/ml 的 IL-2,每隔 2~3 d 换液 1 次,并以台盼兰染色,于细胞计数板低倍镜下计数活细胞,被染成蓝色的细胞为已经死亡的细胞,未被染色的细胞为活细胞;每一样本重复计数 3 次,取平均值,然后将细胞总数与起始细胞相比,即得实际增殖倍数,同时计数每一样本的拒染率,对于拒染率小于 95% 的样本则弃去不用。计数细胞增殖倍数,并动态观察 CIK 细胞增殖情况。

1.3 DC 的体外诱导成熟

将分离纯化后的 PBMNC 培养 2 h 后,收集贴壁细胞,加入含 1 000 U/ml GM-CSF 和 1 000 U/ml IL-4 的 RPMI1640 培养液,每 2~3 d 换液 1 次并补充等量的 GM-CSF 和 IL-4,第 6 天加入 1 000 U/ml 的 TNF-α,并与肿瘤抗原(肝癌细胞 HepG2 冻融液)按 1:5 的比例混合(记做抗原负载的 DC,即 Ag-DC),继续培养,动态观察 DC 培养过程中的形态变化情况。参照张蒿等方法进行体外诱导和扩增^[2]。

1.4 DC 细胞和 CIK 细胞共培养

培养至第 8 天将 Ag-DC 和 CIK 以 1:5 的比例混合,继续培养 6 d。将效应细胞分作 2 组,分别记做:CIK 组和 Ag-DC-CIK 组。

1.5 MTT 比色法测定细胞杀伤试验

培养至 12 d 收获 CIK 和 Ag-DC-CIK,分别按 5:1、10:1、20:1 的效靶比使效应细胞与肝癌细胞 HepG2 混合,调整细胞至所需浓度,效应细胞和靶细胞各加 100 μl,每组重复 6 孔,置于 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 后,每孔加入四甲基偶氮唑蓝(MTT)20 μl,继续培养 4 h,平板离心机 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入二甲基亚砷(DMSO)100 μl,轻轻振荡 10 min,待结晶物充分溶解后于酶联免疫检测仪 λ=570 nm 测吸光度(Absorbance,A)值,杀伤率计算公式为:杀伤率(%)=[1-(实验孔 A 值-效应细胞孔 A 均值/靶细胞孔 A 均值)]×100%。实验重复 3 次。

1.6 CIK 和 Ag-DC-CIK 的细胞表型检测

将培养 0、14 d 的 CIK 和 Ag-DC-CIK 分别取样,然后于流式细胞仪上检测细胞表型。

1.7 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对重复测量数据先进行球形检验,满足球形假设,采用重复测量设计的单变量方差分析;不满足球形假设,校正后采用多变量方差分析。对两独立样本间定量资料的比较采用 *t* 检验。统计软件为 SPSS 13.0,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CIK 和 Ag-DC-CIK 的增殖及形态

CIK 和 Ag-DC-CIK 2 组培养细胞于第 3 天开始增殖,第 6、7 天时绝大部分细胞开始悬浮,细胞形态均一、透亮,瑞氏-姬姆萨染色细胞呈大淋巴样细胞,胞浆淡染、量少,核大深染(图 1),第 12 天后进入快速增殖期。该资料满足球形假设,对其进行重复测量资料的方差分析,个体内变异的方差分析显示:时间因素有统计学意义($F_1=34\ 344.577, P=0.000$),说明测量指标有随时间变化的趋势,进一步结合数据可以看出,为上升的趋势;时间与分组的交互作用也有统计学意义($F_2=14\ 792.488, P=0.000$),说明时间因素随着分组的不同而不同。个体间变异的计算结果显示不同组间差异有统计学意义($F_3=46\ 473.399, P=0.000$),进一步做两两比较,结果不同处理组各时间点间均有差异(*P*<0.05)(表 1)。

2.2 CIK 和 Ag-DC-CIK 细胞表型

流式细胞仪的结果分析采用重复测量设计的方差分析,结果显示:CIK 和 Ag-DC-CIK 2 组细胞均表达 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺双阳性细胞。2 组细胞间的双阳性细胞 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺差别有统计学意义($F=287.766, P=0.000$),且 Ag-DC-CIK 组高于 CIK 组;2 组细胞不同培养时间差别也具有统计学意义($F=2\ 522.346, P=0.000$)。两两对比的结果显示:

表 1 2 组细胞在不同天数的增殖倍数($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Multiplication of two groups of cells on different days ($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d
CIK 组	2.03 ± 2.14	11.24 ± 2.01	18.16 ± 1.43	42.01 ± 2.12	62.09 ± 5.30	112.06 ± 4.32	198.37 ± 1.42
Ag-DC-CIK 组	4.26 ± 1.57	18.16 ± 1.84	40.01 ± 2.45	170.73 ± 3.65	365.40 ± 6.08	570.45 ± 1.92	897.17 ± 4.42

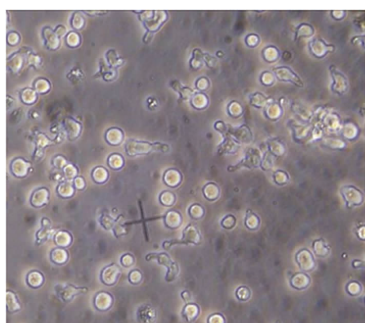


图 1 相差显微镜下观察 Ag-DC-CIK 细胞的形态

Fig.1 Ag-DC-CIK morphology observed under inverted phase contrast microscope

CIK 组的双阳性细胞 $CD3^+CD8^+$ 与 $CD3^+CD56^+$ 培养时间 14 d 均大于 0 d ($P<0.05$)。具体见表 2。

表 2 2 组细胞在不同天数细胞免疫表型的变化 ($\bar{x} \pm s, \%$)Tab.2 Cell phenotype changes of two groups of cells on different days ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	$CD3^+CD8^+$		$CD3^+CD56^+$	
	0 d	14 d	0 d	14 d
CIK 组	25.24 ± 2.10	60.12 ± 1.25	1.25 ± 4.01	19.10 ± 2.12
Ag-DC-CIK 组	25.24 ± 2.10	80.12 ± 2.31	1.25 ± 4.01	43.56 ± 1.26

2.3 细胞杀伤试验

用 MTT 比色法测定培养至 12 d 的 CIK 和 Ag-DC-CIK 对肝癌细胞 HepG2 的杀伤作用。结果显示:随着效靶比的增高,2 组细胞对肝癌细胞 HepG2 的杀伤作用逐渐增强;在相同效靶比时,Ag-DC-CIK 对肝癌细胞 HepG2 的杀伤作用较 CIK 强 ($P<0.05$);Ag-DC-CIK 在效靶比为 20:1 时对肝癌细胞 HepG2 的杀伤作用较其余组均强 ($P<0.05$) (表 3)。

表 3 不同效靶比时两组细胞对肝癌细胞 HepG2 的杀伤率 ($\bar{x} \pm s, \%$)Tab.3 Killing rate of two groups of cells against HepG2 at different effector-target ratios ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	效靶比		
	5:1	10:1	20:1
CIK 组	10.32 ± 1.43	17.90 ± 2.43	26.21 ± 2.23
Ag-DC-CIK 组	$27.15 \pm 3.06^*$	$34.17 \pm 0.32^{\#}$	$55.22 \pm 4.25^{\Delta}$

注:与 CIK 组比较:*, $t=2.01$, $P=0.046$;#, $t=2.34$, $P=0.036$;△, $t=2.62$, $P=0.028$

3 讨论

DC 是由美国学者 Steinman 等^[3]于 1973 年发现的,是目前所知的功能最强的 APC,被誉为机体的“天然佐剂”,因其成熟时伸出许多树突样或伪足样突起而得名,它能够直接摄取、加工和递呈抗原,刺激体内的初始型 T 细胞活化,是机体免疫应答的“启动者”。此外 DC 细胞还可以通过直接或间接方

式促进 B 细胞的增殖与活化,调控体液免疫应答;刺激记忆 T 细胞活化从而诱导再次免疫应答;与 NK 相互作用影响非特异性的、天然免疫应答^[4,5]。CIK 是目前研究较成熟、疗效确切的过继免疫细胞,于 1986 年由 Schmidt-Wolf 等^[6]从外周血单个核细胞中分离提取诱导产生,同时表达 CD3 和 CD56 2 种膜蛋白分子,具有 T 淋巴细胞的抗瘤活性和 NK 细胞的非主要组织相关性复合物限制性杀瘤特点,且其增殖速度快、杀瘤活性强、抗瘤谱广,对于促进患者免疫系统的重建、消除肿瘤术后及化疗后残余微小病变及净化骨髓均具有良好效果。但它对肿瘤细胞的杀伤率仍然不够,且不具有特异识别和杀伤肿瘤细胞的特性^[7]。

DC 与 CIK 是肿瘤免疫治疗的 2 个重要部分,DC 识别病原,激活获得性免疫系统;CIK 通过发挥自身细胞毒性和分泌细胞因子杀伤肿瘤细胞,同时可以识别成熟的 DC,成熟的 DC 可以诱导 CIK 分泌细胞因子^[8],两者联合应用治疗恶性肿瘤,将有望起到协同作用。DC-CIK 是 DC 与 CIK 共培养获得的效应细胞群,具有 DC 和 CIK 两者共同的抑瘤优点,除了增殖速度明显高于 CIK 外,DC 和 CIK 共培养后 $CD3^+CD8^+$ 和 $CD3^+CD56^+$ 双阳性效应细胞的数量显著增强^[9,10],同时还具有更强的肿瘤杀伤活性,杀瘤谱广,对肿瘤具有特异性杀伤能力,靶向专一性和杀伤效力均明显高于同样条件下的 CIK,从而弥补了 CIK 的不足。江凤翔等^[11]研究表明 DC 与 CIK 共培养后得到的细胞群高表达 $CD3^+CD56^+$,且有很强的增殖能力,对胃癌细胞株 MNK-45、MNK-28、SG-790 有杀伤作用,且杀伤活性随着效靶比的增加而增强。李可等^[12]研究发现肿瘤抗原致敏的 DC 可诱导特异性 CIK,DC-CIK 对肺腺癌原代细胞的杀伤作用明显高于 DC-LAK、CIK、LAK。

因肿瘤细胞裂解物具有模拟体内生长的肿瘤诱导免疫反应的生理过程、激发了广谱的针对肿瘤相关抗原的 T 细胞免疫、减少了肿瘤逃逸的可能性,并具有向 DC 提供激活细胞毒性淋巴细胞 (Cytotoxic lymphocyte, CTL) 和 T 辅助细胞所需的抗原表位及诱导强大的免疫反应的特点,因此,本研究将经肝癌细胞抗原致敏的 DC 与 CIK 共培养后获得 Ag-DC-CIK 并检测其对肝癌细胞 HepG2 的杀伤活性,结果显示在细胞培养过程中 Ag-DC-CIK 组的增殖速度明显快于 CIK 组 ($P<0.05$),且 Ag-DC-CIK 组中 $CD3^+CD8^+$ 、 $CD3^+CD56^+$ 双阳性细胞的含量明显

高于相同培养时间的 CIK 组 ($P < 0.05$), 这表明 DC 和 CIK 之间存在很重要的免疫调节关系, CIK 可以识别成熟的 DC 细胞, DC 可以促进 CIK 的增殖。同时结果显示: 经抗原致敏的 DC 可增强 CIK 的杀瘤活性, 与单独培养的 CIK 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在相同效靶比时, Ag-DC-CIK 对肝癌细胞 HepG2 的杀伤作用较 CIK 强 ($P < 0.05$), 表明抗原冲击能显著提高 DC-CIK 对肿瘤的杀伤活性。

DC 与 CIK 共培养后杀伤活性增强的机制可能为: DC 和 CIK 共培养后可同时活化 2 个培养群体, 使 IL-2、IFN- γ 分泌显著升高^[13,14], DC 与 CIK 均被进一步激活, 成熟的 DC 高表达 MHC I 类和 II 类分子、CD40、B7-1、B7-2 等共刺激因子和细胞黏附分子 ICAM-1、ICAM-3, 使之有利于递呈抗原, 并激活 T 细胞和 CIK, DC 分泌的多种细胞因子, 能促进 CIK 成熟, 从而获得杀瘤活性更强的 DC-CIK, CIK 中的 CD3⁺CD56⁺ T 细胞以 MHC 非限制机制杀伤肝癌细胞, CIK 中的 CD3⁺CD8⁺ T 细胞和 CD3⁺CD4⁺ T 细胞有部分可能为肝癌细胞特异性 CTL, 能特异性杀伤肝癌细胞^[15]。

研究表明, 经肝癌抗原致敏的 DC 和 CIK 共培养后能提高 CIK 对肝癌细胞的杀伤活性, 其杀瘤作用较单纯 CIK 更强, 这为 Ag-DC-CIK 应用于临床肝癌治疗提供了可靠的依据。可以预见, 随着 DC 和 CIK 治疗技术的不断改进和完善, 它将在肝癌治疗的道路上发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Pang J, Gao X, Liu X, et al. Enhanced antitumor effects by the co-culture of allotumor RNA-pulsed dendritic cells with autologous cytokine-induced killer cells on hormone-refractory prostate cancer[J]. Cancer Invest, 2007, 25(7): 527-534.
- [2] 张 嵩, 王恩忠, 白春学, 等. 共培养的树突状细胞与 CIK 细胞的体外增殖与杀瘤活性研究[J]. 实验生物学报, 2003, 36(5): 375-380.
- [3] Steinman R M, Cohn Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. morphology, quantitation, tissue distribution[J]. J Exp Med, 1973, 137(5): 1142-1162.
- [4] Larmonier N, Fraszczak J, Lakomy D, et al. Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy[J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(1): 1-11.
- [5] 邢利和, 王福生, 刘明旭, 等. 慢性乙型肝炎患者树突状细胞的培养鉴定和功能特点[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(6): 348-351.
- [6] Xing L H, Wang F S, Liu M X, et al. Property and implication of dendritic cells from peripheral blood monocytes in patients with persistent hepatitis B virus infection[J]. Chin J Infect Dis, 2001, 19(6): 348-351.
- [7] Schmidt-Wolf I G, Lefterova P, Mehta B A, et al. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells[J]. Exp Hematol, 1993, 21(13): 1673-1679.
- [8] Hui D, Qiang L, Jian W, et al. A randomized, controlled trial of post-operative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma[J]. Dig Liver Dis, 2009, 41(1): 36-41.
- [9] Marten A, Ziske C, Schottker B, et al. Interaction between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations[J]. J Immunother, 2001, 24(6): 502-510.
- [10] Wei X C, Zhai X H, Han X R, et al. Biological activity of DC-CIK cells and its effect against leukemia cells in vitro[J]. Journal of Experimental Hematology, 2008, 16(5): 1150-1153.
- [11] Yu X, Xia W, Zhang T, et al. Enhanced cytotoxicity of IL-24 gene-modified dendritic cells co-cultured with cytokine-induced killer cells to hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Hematol, 2010, 92(2): 276-282.
- [12] 江凤翔, 吴云林, 吴涤梵. 树突状细胞联合细胞因子诱导的杀伤细胞对胃癌细胞杀伤作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2007, 16(6): 594-597.
- [13] Jiang F X, Wu Y L, Wu D F. Dendritic cell with cytokine-induced killer cells on gastric cancer cells[J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2007, 16(6): 594-597.
- [14] 李 可, 吕章春, 陈海祥, 等. 抗原致敏 DC 诱导 CIK 细胞对肺腺癌细胞的杀伤作用[J]. 肿瘤学杂志, 2008, 14(4): 310-313.
- [15] Li K, Lv Z C, Chen H X, et al. Antigen sensitized DC induced CIK cells of lung adenocarcinoma cell killing effect[J]. Journal of Oncology, 2008, 14(4): 310-313.
- [16] Schmitz M, Zhao S, Deuse Y, et al. Tumoricidal potential of native blood dendritic cells: direct tumor cell killing and activation of NK cell-mediated cytotoxicity[J]. J Immunol, 2005, 174(7): 4127-4134.
- [17] 邓笑伟, 徐铭宝, 高 锦, 等. 不同来源 CIK 与 DC 细胞联合治疗中晚期肺癌的临床研究[J]. 科技导报, 2008, 26(11): 35-38.
- [18] Deng X W, Xu M B, Gao J, et al. Clinical studies on combined CIK and DCs from different tissues to treat patients of moderate and advanced stage lung cancer[J]. Sci Technol Rev, 2008, 26(11): 35-38.
- [19] Pang J, Gao X, Liu X, et al. Enhanced antitumor effects by the co-culture of allotumor RNA-pulsed dendritic cells with autologous cytokine-induced killer cells on hormone-refractory prostate cancer[J]. Cancer Invest, 2007, 25(7): 527-534.

(责任编辑: 冉明会)