短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0854-02

免疫编辑前后细胞因子诱导的杀伤细胞分泌细胞因子水平及细胞毒活性的比较

刘季芳[1],刘 枫[2],祁岩超[1],杨 波[1],卢敏莹[1],潘东晓[1] (510095 广州,广州医学院附属肿瘤医院:实验中心[1],ECT室[2])

[摘要] **目的** 探讨免疫编辑前后细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)分泌细胞因子水平及细胞杀伤活性的变化。**方法** 采用Ficoll密度梯度法提取脐血单个核细胞,定向诱导成CIK细胞,即免疫编辑前CIK细胞。Transwell小室共培养CIK细胞与人肺癌A549细胞,分离纯化CIK细胞即免疫编辑后CIK细胞。通过ELISA和MTT法分别检测免疫编辑前后CIK细胞分泌细胞因子水平及细胞毒活性的变化。**结果** CIK细胞与A549细胞共培养后,其分泌细胞因子IFN-γ和TNF-α的含量较共培养前CIK细胞显著下降($P<0.05$),IL-2则略有降低。共培养后CIK细胞杀伤活性明显减弱($P<0.05$)。**结论** CIK细胞与人肺癌A549细胞间存在免疫编辑作用,编辑后的CIK细胞分泌细胞因子水平及杀伤活性均下降。

[关键词] 免疫编辑;细胞因子诱导的杀伤细胞;细胞因子;细胞毒活性

[中图法分类号] R392-33;R392.1;R392.3 **[文献标志码]** A

细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)经大量体外扩增后具有强大的杀伤肿瘤活性,是至今最新、疗效最好的过继性肿瘤免疫治疗效应细胞[1]。但目前肿瘤患者CIK细胞的临床疗效不尽人意,平均有效率不到12%,究其原因可能是"肿瘤免疫编辑(tumor immunoediting)"所致[2]。该理论认为,机体免疫系统在杀伤肿瘤的同时,也促进了肿瘤的恶性发展。本研究采用脐血CIK细胞作为效应细胞,人肺癌A549细胞作为靶细胞,初步探讨免疫编辑前后CIK细胞分泌杀伤性细胞因子水平及对A549细胞杀伤活性的变化,为提高CIK细胞临床疗效提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

脐血由广州市荔湾区人民医院妇产科提供,系健康产妇分娩正常足月胎儿后,在无菌条件下采集,肝素钠抗凝(已取得产妇知情同意)。人肺癌A549细胞由本室常规保存,Transwell培养板由Corning公司提供。0.25%胰酶、胎牛血清和RPMI1640培养液购自美国Gibco公司,人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限公司,MTT、二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司,ELISA试剂盒为晶美公司产品。

1.2 方法

1.2.1 CIK细胞诱导及鉴定 常规无菌采集新鲜脐带血,采用密度梯度离心法分离出脐血中的单个核细胞(PBMC),培养2 h时后,吸取悬浮细胞,加入1 000 U/ml的IFN-γ在含完全培养基培养24 h后,再加入IL-1 100 U/ml、CD3单抗50 ng/ml、IL-2 1 000 U/ml诱导CIK细胞,单独培养细胞(即编辑前CIK细胞)。用光镜观察CIK形态,流式细胞仪检测CIK表面标志。

1.2.2 CIK细胞与A549细胞共同培养及分离 常规培养人肺癌A549细胞,取处于指数生长期的细胞备用。于培养的第10天,将一部分编辑前CIK细胞与A549细胞以10∶1的比例加入滤膜孔径为0.4 μm的Transwell 24孔培养皿的上室和下室,共培养48 h后,取培养皿上室CIK细胞,生理盐水洗涤1~2次,1 000 r/min离心5 min,转移至24孔培养板,加入含10% FBS RPMI1640培养基,置37 ℃、5% CO_2培养箱中继续培养,即编辑后CIK细胞。

1.2.3 CIK细胞分泌细胞因子的检测 于培养的第14天,分别取编辑前后CIK细胞,充分洗涤,调整细胞数为2×10^6/ml,培养24 h后,收集上清,用ELISA法定量测定细胞培养上清中IL-2、IFN-γ和TNF-α,设3个平行孔,实验操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 CIK细胞杀伤活性测定 收集培养14 d的编辑前后CIK细胞,调整细胞数为2×10^6/ml。另外,将培养至对数生长期的A549细胞用RPMI1640培养液调整至1×10^5/ml。将编辑前后CIK细胞分别与A549细胞混合后,按20∶1的效靶细胞比加入96孔板中,每组均设3个平行孔,置37 ℃、5% CO_2培养箱内培养24 h后,每孔加入150 μl MTT(5 mg/ml)继续培养18 h。离心弃上清,每孔加入150 μl DMSO,充分混匀溶解结晶后,在酶标仪上测定各组在波长570 nm处光密度值[D(570)],并计算CIK细胞的杀伤率。

杀伤率=|靶细胞D(570)值-[实验细胞D(570)值-效应细胞D(570)值]|/靶细胞D(570)值×100%

1.2.5 统计学分析 采用SPSS 12.0统计软件分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,行t检验。

2 结果

2.1 CIK细胞形态及表型分析

刚分离出的脐带血单个核细胞呈悬浮生长,大小均匀,加入细胞因子诱导培养至第10天时,细胞体积逐渐增大,细胞质增多,细胞膜光滑,细胞呈圆形或椭圆形。取培养10 d的细胞

[基金项目] 广州市卫生局资助项目(2009-YB-169)

[通信作者] 刘季芳,电话:(020)83595032-3068,E-mail:jifangliu@hotmail.com

用流式细胞仪进行细胞表型的检测,结果显示 $CD3^+$、$CD56^+$ 细胞明显增多,而 $CD3^+$、$CD56^+$ 细胞是 CIK 细胞的主要效应细胞,表明所诱导的细胞为 CIK 细胞。

2.2 免疫编辑前后 CIK 细胞分泌细胞因子水平比较

编辑前 CIK 细胞分泌 IL-2、IFN-γ 和 TNF-α 分别为(185.46 ± 10.23)、(196.12 ± 8.15) ng/L 和(215.37 ± 12.64) ng/L;编辑后 CIK 细胞分泌 IL-2[(162.08 ± 9.45) ng/L]略有降低,而 IFN-γ [(91.34 ± 7.18) ng/L]和 TNF-α[(103.27 ± 8.03) ng/L]细胞因子水平则显著下调,分别约为编辑前的 46.4% 和 47.9%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 免疫编辑前后 CIK 细胞毒活性比较

MTT 实验结果表明,编辑前 CIK 细胞对靶细胞 A549 的杀伤率明显高于编辑后 CIK 细胞[(46.11 ± 3.97)% *vs* (21.03 ± 1.53)%],差异有统计学意义($P<0.05$)。当编辑后 CIK 细胞再与 A549 共培养时,其杀伤活性则显著下降,约为编辑前 CIK 细胞杀伤活性的 45.6%。

3 讨论

目前,肿瘤的生物治疗已被公认为肿瘤治疗的第四大常规治疗方法。受到广泛关注的是细胞因子活化的杀伤细胞,也称 CIK 细胞。应用 CIK 细胞对人胃癌[3]等肿瘤的临床试验都显示:CIK 细胞能有效地抑制和杀灭肿瘤细胞,防止癌的扩散和复发,提高患者自身抗瘤能力。但 CIK 细胞的临床疗效仍然较低,这除了与输入的 CIK 细胞数量、质量等因素有关外,可能还与患者体内大量的肿瘤细胞对回输体内的免疫细胞的抑制和免疫逃逸有关。Dunn 等[2]称这种现象为“肿瘤免疫编辑”,它分为 3 个阶段,即免疫清除、免疫对抗和免疫逃逸。清除阶段,是指机体免疫系统识别肿瘤组织,并且通过多种途径杀伤肿瘤组织的过程。对抗期,即经过免疫清除后,存活下来的弱免疫原性肿瘤细胞和免疫系统之间可以动态平衡的状态共处。而免疫逃逸则是指一些肿瘤突变体经过免疫清除和免疫对抗后,能够适应机体的生存环境而存活下来,进入免疫逃逸阶段。大量的研究表明:免疫系统和肿瘤细胞间的相互编辑是客观存在的[4,5]。如 Zhou 等[6]通过动物实验证实肿瘤特异性 $CD4^+$ T 细胞和肿瘤细胞之间存在免疫编辑作用。Coudert 等[7]通过体外实验表明,NK 细胞与表达 NKG2D 配体的肿瘤细胞持续接触后,其表面 NKG2D 表达下调,对靶细胞杀伤活性降低。

本研究初步显示,CIK 细胞与 A549 细胞接触后,两者相互编辑,编辑后的 CIK 细胞分泌细胞因子如 IFN-γ、IL-2、TNF-α 等下降。研究表明:细胞因子在体内外抗肿瘤的过程中发挥重要的作用[8]。例如在抗肿瘤的免疫应答中,IFN-γ 能促使 $CD4^+$ Th1 细胞和细胞毒性 T 细胞的产生。同时,IFN-γ 还能增强肿瘤细胞的免疫原性,诱导其表达细胞周期抑制剂及 Fas 配体促进肿瘤细胞的凋亡[9]。IL-2 是 T 细胞生长因子,可刺激 T 细胞增殖和分化,增强 T 细胞的杀伤活性等。TNF-α 具有免疫调节作用,能够激活 $CD8^+$ T 细胞、NK 细胞及 LAK 细胞等释放穿孔素和 IFN-γ,从而对肿瘤细胞发挥毒性作用,促使肿瘤的消退[10]。可见,CIK 细胞对肿瘤细胞具有较强的杀伤作用,可能与其分泌细胞因子有关。这些细胞因子不仅可以直接杀伤肿瘤细胞,还可以通过调节肿瘤细胞对 CIK 细胞的敏感性间接杀伤肿瘤细胞。编辑后的 CIK 细胞由于受到肿瘤细胞的反作用,分泌杀伤性细胞因子减少,从而其细胞毒活性也随之降低。肿瘤免疫编辑学说是一个系统、连续而又复杂的过程[11],CIK 细胞与肿瘤细胞间的相互作用有待进一步研究,这将为提高 CIK 细胞临床疗效提供重要的理论和实验依据。

参考文献:

[1] Linn Y C, Hui K M. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytotolytic specificity against leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2003, 44(9): 1457-1462.

[2] Dunn G P, Bruce A T, Ikeda H, *et al*. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape[J]. Nat Immunol, 2002, 3(11): 991-998.

[3] Jiang J, Xu N, Wu C, *et al*. Treatment of advanced gastric cancer by chemotherapy combined with autologous cytokine-induced killer cells [J]. Anticancer Res, 2006, 26(3B): 2237-2242.

[4] Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape[J]. Immunology, 2007, 121(1): 1-14.

[5] 郭坤元, 梅家转, 姚开泰. 人鼻咽癌细胞株 CNE2 对 NK 细胞 KIR/NKG2D 受体的免疫编辑作用及其对 NK 细胞杀伤功能的影响[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(3): 247-249.

[6] Zhou G, Lu Z, McCadden J D, *et al*. Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression [J]. J Exp Med, 2004, 200(12): 1581-1592.

[7] Coudert J D, Zimmer J, Tomasello E, *et al*. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells[J]. Blood, 2005, 106(5): 1711-1717.

[8] Gritzapis A D, Dimitroulopoulos D, Paraskevas E, *et al*. Large-scale expansion of CD3(+)CD56(+) lymphocytes capable of lysing autologous tumor cells with cytokine-rich supernatants[J]. Cancer Immunol Immunother, 2002, 51(8): 440-448.

[9] Chawla-Sarkar M, Lindner D J, Liu Y F, *et al*. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis[J]. Apoptosis, 2003, 8(3): 237-249.

[10] Baxevanis C N, Voutsas I F, Tsitsilonis O E, *et al*. Compromised anti-tumor responses in tumor necrosis factor-alpha knockout mice[J]. Eur J Immunol, 2000, 30(7): 1957-1966.

[11] 刘季芳, 祁岩超. 肿瘤免疫编辑研究进展[J]. 广东医学, 2009, 30(10): 1579-1581.

(**收稿**:2009-12-15;**修回**:2010-01-14)

(编辑 张 维)