文章编号:1000-5404(2011)23-2495-04

论著

DC-CIK细胞对人肝癌HEPG2细胞周期、凋亡的影响

项 颖,秦 波,田小利 (400030 重庆,重庆医科大学附属第一医院感染科)

[摘要] **目的** 探讨细胞因子从肝癌患者外周血贴壁单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)诱导的树突状细胞(dendritic cells,DCs)与杀伤细胞(cytokine induced killer,CIK)对人肝癌HEPG2细胞系周期、凋亡的影响。**方法** 用肝癌患者肝癌组织裂解物(肿瘤抗原)致敏经GM-CSF、TNF-α及IL-4等诱导该患者PBMC产生的DCs。用IFN-γ、IL-2和人CD3单克隆抗体(human CD3 monoclonal antibody,hCD3mAb)等诱导该PBMC的悬浮细胞产生CIK细胞。用Transwell培养小室将DC-CIK细胞与HEPG2细胞在同一培养体系内经该小室膜分隔培养24、48 h。流式细胞仪检测该HEPG2细胞的周期;Annexin V-PI双染法检测其凋亡。RT-PCR、Western blot分别检测凋亡相关基因Bax及其编码蛋白的表达。**结果** DC-CIK细胞可明显影响人HEPG2细胞生长周期,两者共培养,可将HEPG2细胞系阻滞于G_1期。DC-CIK细胞能显著诱导HEPG2细胞的凋亡,与对照相比,其凋亡诱导率差异显著($P<0.01$)。基因与蛋白水平检测表明,DC-CIK细胞可致HEPG2细胞系的凋亡相关基因Bax表达明显上调。**结论** 肝癌患者DC-CIK细胞可明显抑制肝癌HEPG2细胞系的生长,显著诱导该细胞凋亡,且该凋亡诱导具"时间-依赖"与"细胞数量-依赖"特性。

[关键词] DC-CIK细胞;肝癌HEPG2细胞;细胞周期;细胞凋亡
[中图法分类号] R73-35; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Effect of CIK cells combined with dendritic cells on cell cycle and apoptosis of human liver cancer cell line HEPG2

Xiang Ying, Qin Bo, Tian Xiaoli (Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of cytokine induced killer (CIK) cells and dendritic cells (DCs) from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with liver cancer on cell cycle and apoptosis of human liver cancer cell line HEPG2. **Methods** Adherent PBMCs were induced by GM-CSF, TNF-α and IL-4 to prepare DCs, which were sensitized with antigen of autologous tissue of liver cancer. CIK cells were obtained from suspended PBMCs induced by IFN-γ, IL-2 and human CD3 monoclonal antibody (hCD3mAb). DCs-CIK cells and HEPG2 cell line were cultured in a transwell chamber, and were cultured separately by the membrane of transwell chamber for 24 h and 48 h, respectively. Cell cycle of HEPG2 cell line that was cultured with DCs-CIK cells for 24 h and 48 h was detected by flow cytometry (FCM). Annexin V-PI staining was applied for analysis of HEPG2 cell line apoptosis. mRNA and protein expression of Bax was determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting, respectively. HEPG2 cell line that was cultured without DCs-CIK cells was set as control. **Results** DCs-CIK cells markedly affected the cell cycle of HEPG2 cell line, which was blocked at G_1 stage when they were cultured together. DCs-CIK cells significantly induced HEPG2 cell line apoptosis compared with the control ($P<0.01$). DCs-CIK cells significantly up-regulated mRNA and protein expression of Bax in HEPG2 cell line. **Conclusion** DCs-CIK cells of patient with liver cancer can apparently inhibit the growth of human cancer cell line HEPG2, and can induce cell apoptosis in a time-dependent and cell population-dependent manner.

[**Key words**] DCs-CIK cells; liver cancer; human HEPG2 cell line; cell cycle; cells apoptosis

Supported by the Project of Medical Science and Technology Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-301). Corresponding author: Qin Bo, E-mail: cqqinbo@126.com

[基金项目] 重庆市卫生局医学科学技术研究项目(2010-2-301)
[通信作者] 秦 波,E-mail:cqqinbo@126.com

近些年,自体细胞免疫治疗已成为治疗恶性肿瘤的重要辅助手段之一,并显示了一定的临床前景,但其疗效各异、机制不清。临床首选树突状细胞(dendritic cell,DC)与细胞因子诱导的杀伤(cytokine induced killer,CIK)细胞。DC是体内唯一能刺激初始型T淋巴细胞的功能强大之专职抗原递呈细胞[1],能始动机体免疫应答,诱导持久的特异性抗瘤免疫反应。CIK细胞是一组以$CD3^+CD56^+$ T细胞为主要效应的异质细胞群,兼具T淋巴细胞强大的抗瘤活性和NK细胞非MHC限制性杀瘤特性[2-4],是目前肿瘤生物治疗首选细胞之一,可通过非特异性免疫杀伤作用根治肿瘤患者体内微小残余病灶。DC与CIK细胞具有一定互补作用,二者联合可获"1+1>2"之疗效。为提高晚期实体瘤患者的生活质量并延长其生存期,我们将自身CIK细胞联合自身DC用于110例晚期恶性实体瘤患者,取得了较好的在体疗效[5]。本实验从离体水平研究细胞因子从肝癌患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)诱导的树突状细胞(dendritic cell,DC)与杀伤(cytokine induced killer,CIK)细胞对肝癌HEPG2细胞系周期、凋亡的影响,探讨DC与CIK细胞的离体杀瘤效应及其机制,为肿瘤的自体细胞免疫治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

重组人白细胞介素-2(rhIL-2)(北京四环生物),rhIL-4(上海创未生物技术有限公司),肿瘤坏死因子-α(TNF-α)(上海唯科),粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)(厦门特宝),人CD3单克隆抗体(human CD3 monoclonal antibody,hCD3mAb)(美国ebioscience),干扰素γ(IFN-γ)(上海克隆高科),CCK-8(日本DojinDo),Annexin V-PI双染试剂盒(北京碧云天),Transwell培养小室(美国Invitrogen),引物经上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤抗原的制备 按我们前期的方法[5]进行肿瘤抗原制备,备后续致敏DC细胞用。

1.2.2 CIK细胞的分离、培养 按我们前期的方法[5]进行CIK细胞的分离、培养,备后续实验用。

1.2.3 DCs细胞的分离、培养 按我们前期的方法[5]进行DCs细胞的分离、培养,备后续实验用。

1.2.4 DCs及CIK细胞的质量控制 按我们前期的方法[5]进行DCs及CIK细胞的质量控制。

1.2.5 DC-CIK细胞对人肝癌细胞凋亡的影响 以1×10^6/ml接种对数生长期HEPG2细胞于6孔板,相同密度及一半密度(5×10^5/ml)的DC-CIK细胞种植于与6孔板孔配套的Transwell培养小室,分别将2种密度的DC-CIK细胞放入6孔板与HEPG2细胞于5% CO_2,37 ℃饱和湿度分别共培养24、48 h,单独培养的HEPG2细胞作对照。收集细胞,用Annexin V-PI双染法处理,流式细胞仪检测HEPG2细胞凋亡情况。

1.2.6 DC-CIK细胞对人肝癌细胞生长周期的影响 细胞处理及分组同1.2.5。HEPG2细胞周期检测:收集细胞,添加适量4 ℃预冷PBS,混匀、1 000 r/min离心5 min,弃上清,12 mm×75 mm离心管中加0.5 ml PBS重悬细胞,细胞计数,每管加入4 ℃预冷70%乙醇4.5 ml固定细胞24~72 h。每管样品1×10^4~2×10^6细胞,常规PI染色,流式仪检测细胞周期变化,激发波长Ex=488 nm;发射波长Em=530 nm。结果用Multicycle software分析。

1.2.7 DC-CIK细胞对人肝癌细胞促凋亡基因的影响 分别根据人Bax与β-actin基因全长cDNA序列,自行设计其特异性扩增引物。Bax上游:5′-CAGGATGCGTCCACCAAGAA-3′,下游:5′-CCTCTCGGGGGGAGTCTGTG-3′;β-actin上游:5′-CATGTTCGAGACCTTCAAC-3′,下游:5′-CAGCTCGTAGCTCTTCTC-3′。采用RT-PCR法,以与DC-CIK细胞共培养的HEPG2细胞总RNA为模板扩增Bax基因cDNA,未处理的相应细胞总RNA为模板扩增的Bax基因cDNA作对照,同时扩增的β-actin基因cDNA作内参。反转录(RT)反应条件:30 ℃ 10 min;42 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃,5 min,1个循环。PCR反应条件:94 ℃ 1 min;94 ℃ 30 s,60.8 ℃ 1 min,72 ℃ 5 min,30个循环。反应结束后,取PCR反应液(5~10 μl)行0.8%琼脂糖凝胶电泳,GoldView™染色,确认PCR产物。

1.2.8 DC-CIK细胞对人肝癌细胞促凋亡蛋白的影响 采用Western blot技术,将与DC-CIK细胞共培养的HEPG2细胞总蛋白转移至硝酸纤维膜,浸泡于含Bax羊多抗(1∶300)封闭液,4 ℃过夜孵育,加辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗(1∶400),室温孵育1 h,25 ℃,与化学发光底物结合5~10 min,保存图片。以未处理的同种细胞的相应检测作对照,β-actin作内参。

1.3 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件行方差分析。用microsoft excel作图。

2 结果

2.1 DCs细胞形态观察

初始分离的PBMC呈圆形贴壁,均匀散在生长,3~4 d,形成大小不等的克隆,胞体变大,为圆形或不规则形,胞膜出现细小的树突状伪足。培养时间延长,胞体更大,表面出现不少枝状突起,呈典型树突状细胞(图1)。

2.2 CIK细胞的形态观察

培养前3 d,细胞少,第5天开始倍增,第12天胞体明显变大,呈不规则形,簇状生长(图2)。此后每3天增长2~3倍,至第12天,细胞数约为培养前的15倍左右,此时加入DCs共同培养,CIK增殖速度更快,至第12天其数约为未加DCs的3~4倍。

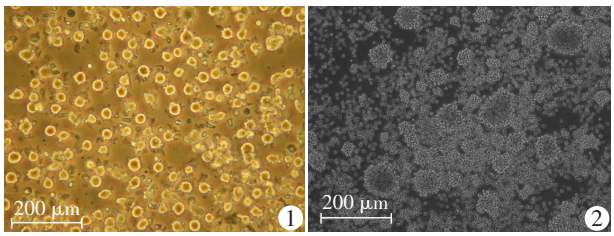
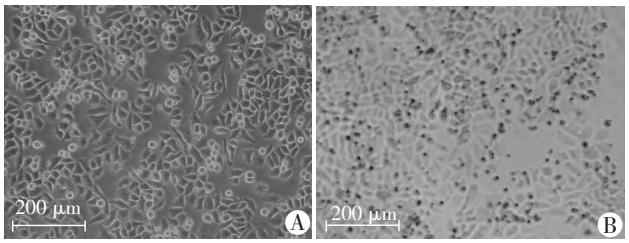


图1 倒置显微镜观察DCs细胞

图2 倒置显微镜观察培养第12天CIK细胞

2.3 DC-CIK 细胞对人肝癌细胞凋亡的影响

Annexin V-PI 双染,流式细胞仪检测显示,正常 HEPG2 细胞凋亡率为(1.10 ± 0.78)%。HEPG2 细胞与其一半密度的 DC-CIK 细胞共培养 24 h 和 48 h 的细胞凋亡率分别为(16.13 ± 1.85)%与(26.01 ± 2.08)%,两者相比,差异具统计学意义($P<0.01$)(图 3、4);HEPG2 细胞与其相同密度的 DC-CIK 细胞共培养 48 h 的细胞凋亡率为(28.79 ± 1.92)%,与 HEPG2 细胞与其一半密度的 DC-CIK 细胞共培养相同作用时间比较,差异也具统计学意义($P<0.05$)。提示 DC-CIK 细胞释放物能显著杀伤 HEPG2 细胞,能诱导 HEPG2 细胞的凋亡,且其凋亡率具"时间-依赖"与"细胞数量-依赖"特性。



A:正常 HEPG2 细胞;B:HEPG2 细胞与其一半密度的 DC-CIK 细胞共培养 48 h

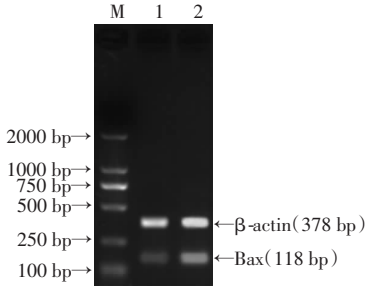
图 3 倒置显微镜观察肝癌 HEPG2 细胞形态

2.4 DC-CIK 细胞对人肝癌细胞生长周期的影响

流式细胞仪检测显示(图 5),肝癌 HEPG2 细胞系与相同密度及一半密度的 DC-CIK 细胞共培养 48 h,与正常对照相比,两者都使该细胞系的 G_1 期细胞增加 13.51%,G_2 期细胞降低 11.98%,S 期细胞降低 1.53%,HEPG2 细胞系被阻滞在 G_1 期。可见,DC-CIK 细胞能抑制肝癌细胞的生长。

2.5 DC-CIK 细胞对人肝癌细胞促凋亡基因的影响

以与 DC-CIK 细胞共培养的 HEPG2 细胞总 RNA 为模板可扩出 Bax 基因的较强 cDNA,以未共培养的相应细胞总 RNA 为模板扩出的 Bax 基因 cDNA 则较弱(图 6)。提示 DC-CIK 细胞与 HEPG2 细胞共培养可致 HEPG2 细胞凋亡。

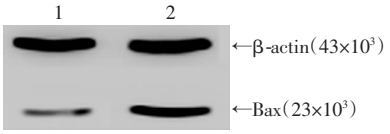


M:DNA 标准(DL 2000);1:对照;2:共培养的 HEPG2 细胞

图 6 与 DC-CIK 细胞共培养的 HEPG2 细胞 Bax 基因表达的电泳分析

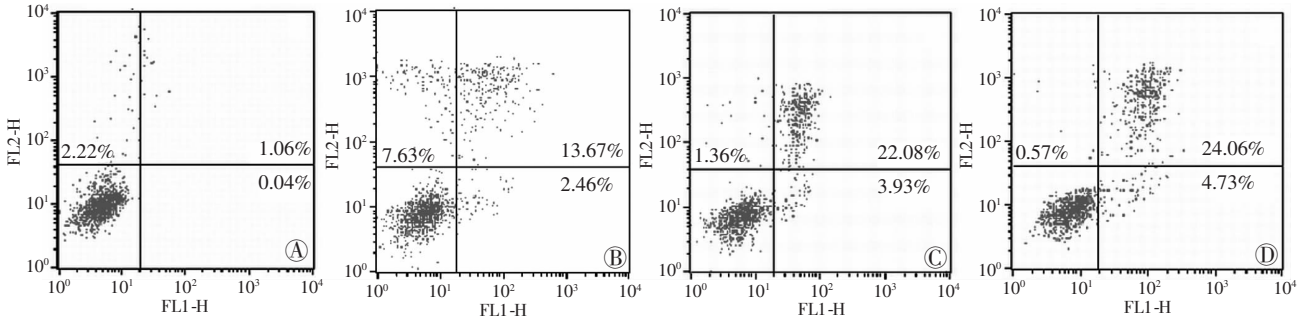
2.6 DC-CIK 细胞对人肝癌细胞促凋亡蛋白的影响

Western blot 结果显示,与 DC-CIK 细胞共培养的 HEPG2 细胞检测在约 23×10^3 处出现较强 Bax 抗原染色带,未共培养的相应细胞的该条带则较弱(图 7),提示 DC-CIK 细胞与 HEPG2 细胞共培养可致 HEPG2 细胞凋亡。



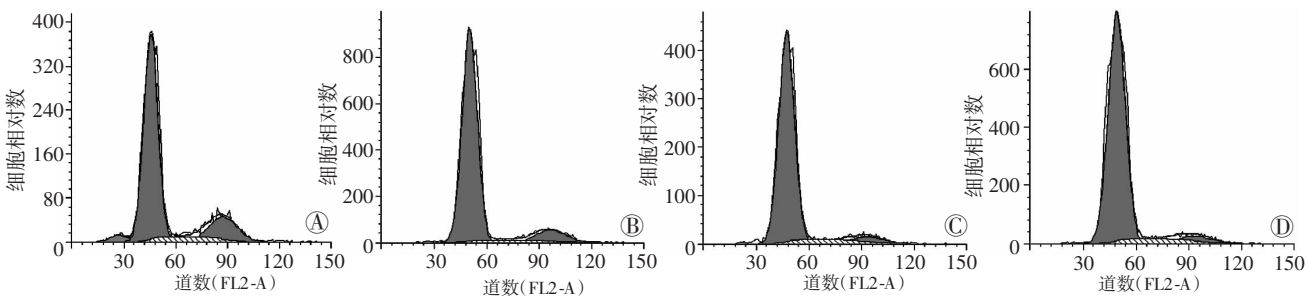
1:对照;2:与 DC-CIK 细胞共培养的 HEPG2 细胞

图 7 与 DC-CIK 细胞共培养的 HEPG2 细胞 Bax 蛋白表达



A:对照;B:HEPG2 细胞与其一半密度的 DC-CIK 细胞共培养 24 h;C:HEPG2 细胞与其一半密度的 DC-CIK 细胞共培养 48 h;D:HEPG2 细胞与其相同密度的 DC-CIK 细胞共培养 48 h

图 4 DC-CIK 细胞对人肝癌细胞凋亡的影响



A:对照;B:HEPG2 细胞与其一半密度的 DC-CIK 细胞共培养 24 h;C:HEPG2 细胞与其一半密度的 DC-CIK 细胞共培养 48 h;D:HEPG2 细胞与其相同密度的 DC-CIK 细胞共培养 48 h

图 5 DC-CIK 细胞对人肝癌细胞生长周期的影响

3 讨论

肝癌属极常见的恶性肿瘤,现代生物技术的迅猛发展为肝癌的治疗带来了新的希望。肿瘤生物治疗(免疫细胞、基因、分子靶向、内分泌及干细胞等治疗)已成为继手术、放疗、化疗后第4种治疗手段,并显示出良好的应用前景,受众多医学工作者的广泛关注与高度重视[6-8],其中免疫细胞治疗最广泛,亦最能体现生物治疗特色,包括淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞、肿瘤浸润淋巴(TIL)细胞与CD3单抗激活的杀伤(CD3AK)细胞等,体外均具有一定的杀瘤活性,但因细胞的扩增量少,细胞毒力不强,故其临床应用受限。

树突状细胞(DCs)最初由Steinman等分离发现于小鼠的脾组织,因其形态具伪足样突起或树突而得名,是启动、调控、维持免疫反应的中心环节。其具有激发T细胞增殖及抗原递呈能力,该能力为巨噬细胞和B细胞的100~1 000倍[9-12]。CIK细胞由多种细胞因子、CD3单抗与人外周血或骨髓单个核细胞在体外共同培养诱导而来,亦称自然杀伤(NK)细胞样T淋巴细胞[13],其在外周血淋巴细胞中之比例为1%~5%。肿瘤的CIK细胞治疗可克服过继免疫疗法的缺陷,如体外细胞增殖数量少、疗效低、需输注IL-2及副作用大等,已成为肿瘤生物治疗的新措施之一。CIK细胞能分泌多种细胞因子,强于LAK、TIL与CD3AK等细胞的杀瘤活性。但以往相关研究多以体外培养的单纯DC、CIK细胞进行肝癌的生物治疗,因缺乏对肿瘤细胞的特异性,其疗效不佳。可见,肿瘤细胞对诸如CIK细胞的免疫效应细胞发生抵抗,其原因可能与瘤患者功能性DCs细胞缺乏有关[14-15]。

因此,为提高其特异的抗瘤效应,我们将自身CIK细胞联合自身负载肿瘤抗原的DCs用于110例晚期恶性实体瘤患者,取得了较好在体疗效。本实验从离体水平研究细胞因子从肝癌患者PBMC诱导并负载肿瘤抗原的DCs与CIK细胞对肝癌HEPG2细胞系周期与凋亡的影响,探讨负载肿瘤抗原的DCs与CIK细胞的离体杀瘤效应及其机制。细胞凋亡的检测显示,HEPG2细胞与其一半密度的DC-CIK细胞共培养24 h和48 h的细胞凋亡率相比,差异具统计学意义($P<0.01$);HEPG2细胞与其相同密度的DC-CIK细胞共培养48 h的细胞凋亡率与HEPG2细胞与其一半密度的DC-CIK细胞共培养作用相同时间比较,差异也具统计学意义($P<0.05$)。提示DC-CIK细胞释放物能显著杀伤HEPG2细胞,能诱导HEPG2细胞的凋亡,且该凋亡具"时间-依赖"与"细胞数量-依赖"特性。细胞周期的检测显示,肝癌HEPG2细胞系与相同密度及一半密度的DC-CIK细胞共培养48 h,与正常对照相比,两者都使该细胞系的G_1期细胞增加13.51%,G_2期细胞降低11.98%,S期细胞降低1.53%,HEPG2细胞系被阻滞于G_1期。可见,DC-CIK细胞能抑制肝癌细胞的生长。基因与蛋白水平检测表明,DC-CIK细胞与HEPG2细胞共培养可显著致HEPG2细胞凋亡。

参考文献:

[1] Park H Y, Jin J O, Song M G, *et al*. Expression of dendritic cell markers on cultured neutrophils and its modulation by anti-apoptotic and pro-apoptotic compounds[J]. Exp Mol Med, 2007, 39(4): 439-449.

[2] Su X, Zhang L, Jin L, *et al*. Immunotherapy with cytokine-induced killer cells in metastatic renal cell carcinoma[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2010, 25(4): 465-470.

[3] 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.

[4] Sun J C, Pan K, Chen M S, *et al*. Dendritic cells-mediated CTLs targeting hepatocellular carcinoma stem cells[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(4): 368-375.

[5] 杨涛, 邵江河, 李启英, 等. 树突状细胞联合CIK细胞应用于晚期恶性实体瘤治疗的临床疗效观察[J]. 肿瘤, 2010, 30(8): 700-705.

[6] Miyazawa M, Iwahashi M, Ojima T, *et al*. Dendritic cells adenovirally-transduced with full-length mesothelin cDNA elicit mesothelin-specific cytotoxicity against pancreatic cancer cell lines *in vitro*[J]. Cancer Lett, 2011, 305(1): 32-39.

[7] Niu Q, Wang W, Li Y, *et al*. Cord blood-derived cytokine-induced killer cells biotherapy combined with second-line chemotherapy in the treatment of advanced solid malignancies[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(4): 449-456.

[8] Jin J, Joo K M, Lee S J, *et al*. Synergistic therapeutic effects of cytokine-induced killer cells and temozolomide against glioblastoma[J]. Oncol Rep, 2011, 25(1): 33-39.

[9] 匡志鹏, 梁安民. CIK细胞联合树突状细胞治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(2): 240-242.

[10] Marin V, Pizzitola I, Agostoni V, *et al*. Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors[J]. Haematologica, 2010, 95(12): 2144-2152.

[11] Motamedi M, Arab S, Moazzeni S M, *et al*. Improvement of a dendritic cell-based therapeutic cancer vaccine with components of Toxoplasma gondii[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(10): 1393-1398.

[12] Lin C C, Yu Y L, Shih C C, *et al*. A novel adjuvant Ling Zhi-8 enhances the efficacy of DNA cancer vaccine by activating dendritic cells[J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 60(7): 1019-1027.

[13] Gutgemann S, Frank S, Strehl J, *et al*. Cytokine-induced killer cells are type Ⅱ natural killer T cells[J]. Ger Med Sci, 2007, 5: Doc07.

[14] Lin J, Zhu H, Lu X, *et al*. Autologous cytokine-induced killer cells in the treatment of multiple myeloma concomitant with lung cancer and paraneoplastic dermatoses[J]. Intern Med, 2010, 49(21): 2341-2436.

[15] Sangiolo D, Mesiano G, Carnevale-Schianca F, *et al*. Cytokine induced killer cells as adoptive immunotherapy strategy to augment graft versus tumor after hematopoietic cell transplantation[J]. Expert Opin Biol Ther, 2009, 9(7): 831-840.

(**收稿**:2011-08-22;**修回**:2011-10-10)

(编辑 汪勤俭)