论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1338-03

CIK细胞对裸鼠人肝癌转移预防和治疗

陈国林[1],胡怀东[2],袁 迪[1],李用国[1],任 红[2],马英骥[1]

(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院感染科,哈尔滨 150001;2. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨人细胞因子杀伤(Cytokine-induced killer,CIK)细胞对裸鼠人肝癌转移模型(LCI-D20)治疗作用。方法:用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞,加入细胞因子rh IFN-γ、人CD3 mAb和rhIL-2,诱导生成CIK细胞,经腹腔注射,同时应用PBS作为对照,研究其对LCI-D20肝癌治疗和预防转移作用。结果:CIK组和对照组肝癌肿块重量、血AFP含量、肝癌肝内转移率和生存期依次分别为(1.125±0.363) g和(2.682±0.526) g;(48.6±5.2) μg/L和(82.2±7.2) μg/L;16.7%和58.3%;(73.3±7.03) d和(52.3±5.24) d,与对照组比较均$P<0.01$。结论:CIK细胞可以预防LCI-D20模型肝癌发生转移,延长动物生存时间。

【关键词】细胞因子杀伤细胞;癌;肝细胞

【中国图书分类法分类号】R730 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-18

Effect of human cytokine-induced killer(CIK)cells on the model of human hepatocellular carcinoma in nude mice(LCI-D20)

CHEN Guo-lin, et al

(*Department of Infections, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the cure effect of human cytokine-induced killer (CIK) cells on the model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. *Methods*:Peripheral blood mononuclear cells(PBMC)were obtained from healthy volunteers by Ficoll gradient centrifugation and CIK cells were induced by culturing PBMC in the completed medium containing rhIFN-γ,rhIL-2 and mAb against CD3.By intraperitoneal injection of CIK cells in LCI-D20, the effect of prevention and therapy to HCC in LCI-D20 were assessed. *Results*:The weight of tumor in the CIK cells group and negative group was (1.125±0.363)gram and(2.682±0.526)gram respectively($t=6.06$, $P<0.01$). The amount of AFP in blood of the group of CIK cells was(48.6±5.2)μg/L as the amount in the negative group was(82.2±7.2)μg/L($t=22.07$, $P<0.01$). The metastasis rate in liver was 16.7% and 58.3% between two groups($\chi^2=4.44$, $P<0.01$). The survival time of model in the therapy group were(73.3±7.03) days in the CIK group as compared with (52.3±5.24)days in negative group,($t=17.54$, $P<0.01$). *Conclusion*:CIK cells may prevent metastasis in the model of LCI-D20 and prolong the survival time.

【Key words】 Cytokine-induced killer cells;Carcinoma;Hepatocellular

细胞因子杀伤(Cytokine-induced killer,CIK)细胞是将人体外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子刺激后获得的一群异质细胞群[1],具有增殖能力强、杀瘤活性高、杀瘤谱广等特点。细胞表面既有T细胞的表面标志(TCR-α/β,CD3),也有NK细胞的表面标志(CD56)[2],本试验通过体外制备CIK细胞,同时以PBS作为对照,应用裸鼠肝癌转移模型(LCI-D20),研究CIK细胞对裸鼠肝癌转移的预防和治疗作用。

作者介绍:陈国林(1975-),男,主治医师,博士,研究方向:肝癌发生机制及生物治疗。

通讯作者:任 红,男,教授,E-mail:renhong0531@vipsina.com.cn。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型

裸鼠人肝癌转移模型(LCI-D20)和人肝癌细胞株MHCC97-H购于上海中山医院。

1.2 主要试剂和仪器

rhIL-2、rhIFN-γ购于美国PeproTech公司。人CD3单克隆抗体购于美国ebioscience公司。异硫氰酸荧光素标记的鼠抗人单克隆抗体$CD3^+/CD56^+$购于美国Pharmingen公司。人淋巴细胞分离液购于中国医学科学院血液学研究所。流式细胞仪为美国BD公司生产。

1.3 CIK细胞的分离、培养和鉴定

本实验献血者均为健康成年人，既往半年内未应用免疫抑制剂。分离单个核细胞后加入含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养液培养，加入rh IFN-γ 1 000 U/ml，24 h后加入人CD3单克隆抗体50 ng/ml，rhIL-2 300 U/ml，以后每3 d半量换液1次，补加rhIL-2。培养14 d，即获得CIK细胞，通过流式细胞仪检测$CD36^+/CD56^+$表面标记物来鉴定。

1.4 CIK细胞杀伤实验

CIK细胞为效应细胞，取MHCC97-H、$HepG_2$和人胃癌细胞株SGC7901作为靶细胞，按20:1、40:1、60:1的效靶比加入效应细胞，设立单一靶细胞、单一效应细胞及空白对照，每组设3个复孔，进行四甲基偶氮唑盐法(MTT)实验。特异性细胞杀伤率(%)=[1-(实验组A值-效应细胞A值)/靶细胞A值]×100%。

1.5 动物实验

应用裸鼠人肝癌转移模型(LCI-D20)，动物为4~6周龄，雄性，24只，随机分2组，每组12只，分别为CIK组和对照组。动物接受肝癌移植手术1周内进行治疗。将培养好的CIK细胞用PBS洗涤后，以PBS悬浮，给予3×10^7个/只进行腹腔注射，对照组注射PBS，每周1次，连续注射3周。最后1次治疗后2周，每组随机取7只裸鼠，取血进行AFP放免检测，同时取肝癌组织称重，将肝脏和肺脏以10%福尔马林固定，连续切片进行病理检查。各组剩余5只动物观察生存周期。

1.6 统计学方法

应用SPSS10.0软件进行配对t检验，结果以$\bar{x}\pm s$表示，率的比较应用χ^2检验，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CIK表型的鉴定

体外将PBMC经rh IFN-γ、人CD3单克隆抗体和白细胞介素-2(rhIL-2)诱导培养14 d后，可见细胞成团簇状生长，经流式细胞仪检测表达CD3/CD56的细胞达42.2%±3.2%，表达CD3/CD8的细胞为45.9%±4.5%，而未经任何抗原刺激的T淋巴细胞表达CD3/CD56的细胞占6.4%±1.1%(与细胞因子诱导组比较t值为20.36，$P<0.01$)，表达CD3/CD8的细胞为43.3%±7.8%。

2.2 CIK细胞杀伤实验

在相同的效、靶细胞比例条件下，CIK对肝癌细胞株MHCC97-H、$HepG_2$和胃癌细胞株SGC7901等3种肿瘤细胞的杀伤率无显著差异，且随着效靶比的增加而上升，在60:1时杀伤效能最好，对MHCC97-H、$HepG_2$和SGC7901的杀伤率依次为80.22%±9.28%、82.85%±9.21%和77.22%±5.32%($P>0.05$)图1。

2.3 AFP的测定

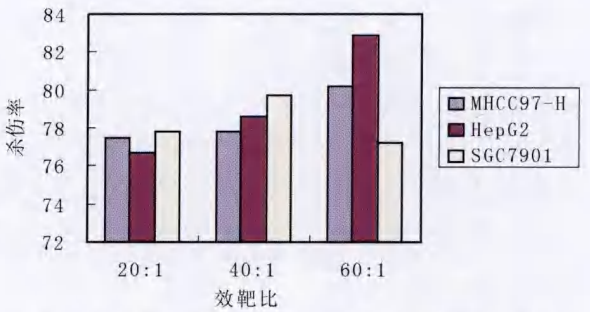


图 1 不同效靶比 CIK 细胞对不同肿瘤对杀伤作用

放免法检测血AFP，CIK组和对照组分别为(48.6±5.2) μg/L和(82.2±7.2) μg/L，两组比较有差异，t值为22.07，$P<0.01$。

2.4 动物肝癌组织湿重

CIK组和对照组分别为(1.125±0.363) g和(2.682±0.526) g，两组比较有差异，t值为6.06，$P<0.01$。

2.5 肝癌转移情况

治疗结束时CIK组动物有2例(16.7%)发生肝内转移，未发现肺转移；对照组有7例(58.3%)发生肝内转移(与治疗组比较，$\chi^2=4.44$，$P<0.05$)，3例(25%)发生肺转移(与治疗组比较，$\chi^2=3.43$，$P>0.05$)。

2.6 动物生存期比较

CIK组动物在接种肿瘤后第62 d开始有死亡，至80 d全部死亡；对照组动物从接种肿瘤后第45 d开始有死亡，至61 d全部死亡。CIK组和对照组动物生存期分别为(73.3±7.03) d和(52.3±5.24) d，两组比较有差异，t值为17.54，$P<0.01$。

3 讨 论

肝癌在我国是一种多发性肿瘤，且肝癌患者大多数合并严重肝硬变，易发生肝内播散和远处转移。试验动物模型为人肝癌高转移裸鼠模型(LCI-D20)，该动物模型在肝脏种植人肝癌细胞后21 d发生肺转移、肝内播散，很好的模拟了临床肝癌病程，在体内实验中表现出高转移特性，为研究肿瘤治疗和干预肿瘤转移提供了较好的动物模型。

CIK细胞是人外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子刺激后获得的一种异质细胞，具有增殖速度快、杀瘤活性高、杀瘤谱广特点[4,5]，CIK细胞可同时表达CD3和CD56两种膜蛋白分子，故又称为自然杀伤(Natural killer，NK)细胞样T淋巴细胞，兼有T淋巴细胞强大的抗瘤活性和NK细胞非主要组织相容性复合体限制性杀瘤特点[6,7]。对自体

与异体、同种与异种肿瘤细胞均具有杀伤作用[8]。

本试验效应细胞在培养14 d后，细胞形态发生明显变化，细胞体积变大，$CD3^+CD56^+$细胞的百分含量也明显增加，$CD3^+CD56^+$为CIK细胞的主要表型，CIK细胞的细胞毒作用主要存在于$CD3^+CD56^+$细胞中，同时表达CD3/CD8分子，提示CIK细胞具有NK细胞和T细胞的标志，且可以通过体外培养获得大量的CIK细胞，从而供临床应用。体外杀伤实验进一步证实CIK细胞在相同的效靶比下对三种肿瘤细胞株具有相同的杀伤作用，具有广泛的抗肿瘤效应，对肿瘤细胞的杀伤作用呈剂量效应关系。CIK细胞发挥抗肿瘤作用的机制很可能是通过粘附因子LFA/ICAM-1途径与肿瘤细胞相互结合后，能够分泌含有大量BLT脂酶(Benzyloxycarbonyl-1 lysine thiobenzyl ester，BLT esterase)的细胞质颗粒，这些颗粒能够直接穿透封闭的靶细胞膜进行胞吐，从而导致肿瘤细胞的裂解[9]。同时，CIK细胞自身还能分泌IL-2，IL-6，TNF-α、GM-CSF和IFN-γ等一些细胞因子，提高细胞毒作用[10,11]，或者调节肿瘤细胞对CIK细胞的敏感性[12]。

目前，肝癌的治疗一般采用手术、化疗及放疗手段，生物治疗可以作为一种有效的治疗手段来发挥重要作用。本实验中通过对治疗组动物应用CIK细胞治疗，显示了CIK细胞较好的抗肿瘤效应，对照组动物模型肝内转移率为58.3%，明显高于CIK细胞治疗组(16.7%)，对照组动物模型发生肺转移率为25.0%，而治疗组未发现肺转移，治疗组动物肝癌组织湿重为(1.125±0.363) g，亦明显小于对照组动物肝癌组织湿重(2.682±0.526) g，提示CIK细胞通过对裸鼠体内人肝癌细胞的非特异性杀伤使肿瘤细胞数量减少，减慢了肿瘤的生长速度，并有效的抑制了肿瘤生长，减少了肿瘤转移率，降低了外周血AFP的水平，最终延长了动物的生存期，CIK组平均生存期(73.3±7.03) d，而对照组为(52.3±5.24) d。总之，本试验证实了CIK细胞高效、广谱的抗肿瘤特点，且证实了CIK细胞在体内具有较强的抗肿瘤特性，通过对原位肝癌的杀伤作用，减慢了肝癌的生长，并有效抑制了肝癌在肝内外的转移。

参 考 文 献

[1] Schmidt-Wolf I G,Negrin R S,Kiem H P,et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity[J]. Exp Med,1991,174(1):139-149.

[2] 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(2):51-56.

[3] Sun F X,Tang Z Y,Liu K D,et al. Highly melastatic model of human hepatocellular carcinoma established in nude mice using orthotopic organ selection of metastatic variant from patient specimens[J]. Chin J Oncol,1996,18(2):109-112.

[4] Lu P H,Negrin R S. A novel population of expanded human $CD3^+CD56^+$ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency[J]. Immunol,1994,153(4):1687-1696.

[5] Leemhuis T,Wells S,Scheffold C,et al. A phase I trial of autologous cytokine -induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma[J]. Biol Blood Marrow Transplant,2005,11:181-187.

[6] Schmidt-Wolf I G,Lefterova P,Johnston V,et al. Propagation of large numbers of T cells with natural killer cell markers[J]. Br J Haematol,1994,87(3):453-458.

[7] Hoyle C,Bangs C D,Chang P,et al. Expansion of Philadelphia chromosome-negative $CD3^+CD56^+$ cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: in vitro and in vivo efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice[J]. Blood,1998,92(9):3318-3327.

[8] Chan J K,Hamilton C A,Cheung M K,et al. Enhanced killing of primary ovarian cancer by retargeting autologous cytokine -induced killer cells with bispecific antibodies: A preclinical study [J]. Clin Cancer Res,2006,12(6):1859-1867.

[9] Mehta B A,Schmidt-Wolf I G,Weissman I L,et al. Two pathways of exocytosis of cytoplasmic granule contents and target cell killing by cytokine-induced $CD3^+CD56^+$ killer cells[J]. Blood,1995,86(9):3493-3499.

[10] Yu Y Y,Si C W,Tian X L,et al. Effect of cytokines on liver necrosis[J]. World J Gastroentero,1998,4(4):311-313.

[11] Kornacker M,Moldenhauer G,Herbst M,et al. Cytokine -induced killer cells against autologous CLL:direct cytotoxic effects and induction of immune accessory molecules by interferon-gamma [J]. Int J Cancer,2006,119(6):1377-1382.

[12] Schmidt-Wolf I G,Lefterova P,Johnston V,et al.Sensitivity of multidrug-resistant tumor cell lines to immunologic effector cells[J]. Cell Immunol,1996,169(1):85-90.

(责任编辑：关蕴良)