

与先前的报道基本一致^[8];而SW620、HT-29的FLIP mRNA含量较高, Colo205居中, Lovo则几乎呈阴性. 这说明, 不同的大肠癌细胞可能存在不同的凋亡抵抗机制: SW620和Colo205很可能通过下调Fas和上调FLIP 2种方式来降低凋亡敏感性;而对于HT-29来说, FLIP的高水平表达可能起到更为重要的作用;至于Lovo, 由于二者的低表达, 以及Fas/FasL表达率与凋亡率之间无明显关联, 提示其很可能不是通过Fas通路发生凋亡的^[9]. Nita *et al*^[10]发现与其他大肠癌细胞相比, Lovo高表达Bcl-2和Bcl-XL, 且伴随着Bax的表达下降, 这提示对于Lovo来说, 线粒体凋亡途径似乎起到更为重要的作用.

此外, Krueger *et al*^[11]发现2种形式的FLIP均可阻断Caspase-8激活的蛋白水解反应. 在BJAB细胞中, 当FLIP_L过表达时, Caspase-8的第一步水解作用仍可实现, 第二步酶切水解受到抑制; FLIP_S过表达时, 胞质中检测不到Caspase-8任何的酶切水解成分. 而在我们的实验中, 对于任何一个FLIP mRNA表达阳性的细胞, 均存在着FLIP_L表达明显高于FLIP_S的现象. 这种mRNA水平的差异是否与蛋白水平相一致以及究竟哪一种蛋白类型起到更为重要的凋亡抑制作用仍需进一步的探讨.

4 参考文献

- 1 von Reyher U, Strater J, Kittstein W, Gschwendt M, Krammer PH, Moller P. Colon carcinoma cells use different mechanism to escape CD95-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1998;58:526-534
- 2 Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschoep J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-195
- 3 Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Rosen A, Thompson C, Loeffler L, Parker T, Danning C, Rochon PJ, Gillespie J, Plotz P. The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells. *J Immunol* 2000;164:5459-5465
- 4 夏成青, 刑长虹, 唐小奈. 结肠癌组织中Fas表达的定量分析. 临床与实验病理学杂志 2002;18:307-309
- 5 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365
- 6 Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993;5:625-630
- 7 Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:1541-1548
- 8 Moller P, Koretz K, Leithauser F, Bruderlein S, Henne C, Quentmeier A, Krammer PH. Expression of APO-1(CD 95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 1994;57:371-377
- 9 彭志海, 邢同海, 裘国强, 唐华美. 结肠腺癌细胞株Fas/FasL的表达与凋亡的关系. 中国癌症杂志 2001;11:25-28
- 10 Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, Fu CG, Takenoue T, Tsuruo T, Muto T. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer* 1998;78:986-992
- 11 Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2001;276:20633-20640

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

多种细胞因子联合诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为CIK细胞的免疫表型

撒亚莲, 华映坤, 宋建新, 严新民, 贾玲, 董虹, 沈涛

撒亚莲, 华映坤, 严新民, 董虹, 沈涛, 云南省第一人民医院临床基础医学研究所 云南省昆明市 650032
宋建新, 云南省第一人民医院临床检验中心 云南省昆明市 650032
贾玲, 云南省第一人民医院肿瘤科 云南省昆明市 650032
通讯作者: 撒亚莲, 650032, 云南省昆明市金碧路 157#, 云南省第一人民医院. sa_yi@yahoo.com.cn
电话: 0871-3638454 传真: 0871-3619076
收稿日期: 2005-04-07 接受日期: 2005-04-09

摘要

目的: 用多种细胞因子联合诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细

胞, 并了解其在体外的增殖能力及免疫表型的变化.

方法: 用 Ficoll Hypaque 淋巴细胞分离液分离获取 10 例大肠癌患者外周血单个核细胞, rhIFN- γ , rhIL-2, Anti-CD3mAb 共孵育. 分别在第 0, 4, 7, 10, 13 d 计细胞数, 并通过流式细胞术检测细胞免疫表型.

结果: 大肠癌患者外周血单个核细胞与 IFN- γ , IL-2, Anti-CD3mAb 共孵育 4, 7, 10, 13 d, 细胞数分别增加 2.69 ± 0.9 , 14.1 ± 3.7 , 23.0 ± 5.0 和 31.2 ± 3.0 倍. CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺

和 $CD3^+CD16^+CD56^+$ 细胞在培养第 13 d 分别从 $(62.8 \pm 7.6)\%$, $(31.5 \pm 5.8)\%$, $(44.9 \pm 8.2)\%$ 和 $(1.9 \pm 0.9)\%$ 增加到 $(90.6 \pm 9.0)\%$, $(48.0 \pm 6.3)\%$, $(57.3 \pm 9.0)\%$ 和 $(41.0 \pm 12.7)\%$.

结论: rhIFN- γ , rhIL-2 和 Anti-CD3mAb 能诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为 CIK 细胞, 体外增殖力强, 是以 $CD3^+CD16^+CD56^+$ 为主的异质细胞群.

撒亚莲, 华映坤, 宋建新, 严新民, 贾玲, 董虹, 沈海. 多种细胞因子联合诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为 CIK 细胞的免疫表型. 世界华人消化杂志 2005; 13(13): 1592-1594

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1592.asp>

0 引言

Schmidt Wolf 于 1991 年首次报道外周血单个核细胞在多种细胞因子刺激下活化为细胞因子诱导杀伤细胞 (cytokine-induced killer cells, CIK 细胞)^[1]. 近年的研究表明 CIK 细胞是介导细胞毒活性最强的免疫效应细胞, 兼有 T 淋巴细胞强大的杀瘤活性和 NK 细胞的主要组织相容性复合物 (MHC) 限制的杀瘤效应, 故又称为 NKT 细胞^[2]. 大肠癌是最常见的肿瘤之一, 也是最常见的肿瘤死亡原因之一. 直到现在, 手术仍然是其主要的治疗方式, 大约 50% 的术后患者在 5 a 内出现转移^[3]. 免疫效应细胞能够识别并清除肿瘤细胞, 据报道在肿瘤术后常规治疗赋予细胞过继免疫治疗能降低复发率^[4]. 在 CIK 免疫效应细胞用于临床治疗之前, 我们需要证实来源于大肠癌患者外周血单个核细胞的 CIK 细胞在体外的增殖能力和免疫表型的变化, 为 CIK 细胞过继免疫治疗提供可靠的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 10 例大肠癌患者均为云南省第一人民医院 2003-09/2004-10 住院经手术后病检确诊病例, 其中男性 9 例, 女性 1 例, 年龄为 49-73 岁, 平均年龄为 65.8 岁. RPMI-1640 从 Invitrogen (GIBCO, 美国) 公司购买. 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 从 Hyclone (美国) 公司购买. 重组人干扰素 γ (recombinant human interferon γ , rhIFN- γ) 购自上海生物制品研究所 (中国). 重组人白介素 2 (recombinant human interleukin-2, rhIL-2) 购自深圳科兴生物制品有限公司 (中国). 鼠抗人 CD3 单克隆抗体 (monoclonal antibody CD3, Anti-CD3mAb) 购自 Beckman 公司 (法国).

1.2 方法

1.2.1 CIK 细胞的分离和培养 取大肠癌患者外周静脉血 12-15 mL, 用 Ficoll Hypaque 淋巴细胞分离液分离, 收集界面层的单个核细胞, 洗涤 2 次后, 将细胞按 $1 \times 10^6/L$ 数量悬浮于含 100 mL/L FBS 的 RPMI-1640 完全培养基中, 添加终浓度为 $3 \times 10^6 U/L$ rhIFN- γ , 置 37°C, 50 mL/L CO₂ 培养箱 (Forma Therapeutics Inc.,

USA) 中培养. 24 h 后添加终浓度为 20 $\mu g/L$ Anti-CD3mAb 和 $1.5 \times 10^6 U/L$ rhIL-2. 每 3 d 更换培养液一次, 并补充上述细胞因子. 在培养 0, 4, 7, 10, 13 d 时, 对细胞进行计数.

1.2.2 CIK 细胞的免疫表型 在培养第 13 d 收集 CIK 细胞, 用平衡液洗细胞后, 用 FITC 或 PE 标记的 CD3, CD4, CD8, CD16/CD56 孵育细胞, 30 min, 4°C. 洗去多余的抗体, 用流式细胞仪 (Coulter Epics-XL, Beckman-coulter Epics-XL3, Immuno-PREP, USA) 检测阳性细胞数.

统计学处理 数据以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示.

2 结果

2.1 CIK 细胞在倒置显微镜下的形态特点 CIK 细胞形态似外周血淋巴细胞, 但体积稍大. 在培养 3 d 后, 细胞增殖, 呈团, 可观察到不规则形的细胞. 细胞体积增大, 胞质少, 胞核大、圆. 有时可观察到细胞分裂相. 在培养 5-7 d, 细胞团更大, 并悬浮在培养液中 (图 1).

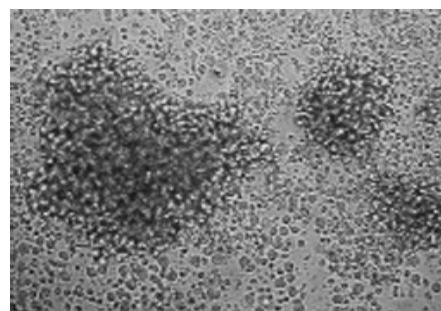


图1 培养第 13 d 的 CIK 细胞, $\times 200$.

2.2 CIK 细胞体外扩增情况 在培养第 1-3 d 细胞没有明显增殖. 4-5 d 可观察到细胞呈团、集落样生长, 数量明显增多. 在培养 4, 7, 10, 13 d 细胞数量分别增加 2.7 ± 0.9 , 14.1 ± 3.7 , 23.0 ± 5.0 和 31.2 ± 3.0 倍.

2.3 CIK 细胞的免疫表型 在培养第 13 d, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ 和 $CD3^+CD16^+CD56^+$ 细胞分别从 $(62.8 \pm 7.6)\%$, $(31.5 \pm 5.8)\%$, $(44.9 \pm 8.2)\%$ 和 $(1.9 \pm 0.9)\%$ 增加到 $(90.6 \pm 9.0)\%$, $(48.0 \pm 6.3)\%$, $(57.3 \pm 9.0)\%$ 和 $(41.0 \pm 12.7)\%$ (图 2).

3 讨论

CIK 细胞是一组非 MHC 和非 T 细胞受体限制性的免疫活性细胞, 其主要效应细胞是以 $CD3^+CD16^+CD56^+$ 为主的异质细胞群^[5-6]. CIK 细胞是目前认识到的细胞毒活性最强的免疫效应细胞, 回输体内后达到杀灭癌细胞、抑制肿瘤生长及清除残留微小病灶的作用^[7-8]. 由于 CIK 细胞对正常人体细胞、免疫系统没有任何毒副作用, 而且对多重耐药的肿瘤敏感. 因此, CIK 细胞过继免疫治疗被公认为继手术、放疗、化疗之后的第四种新型肿瘤治疗模式之一. 我们在体外通过 rhIFN- γ , rhIL-2 和 Anti-CD3mAb 联合诱导

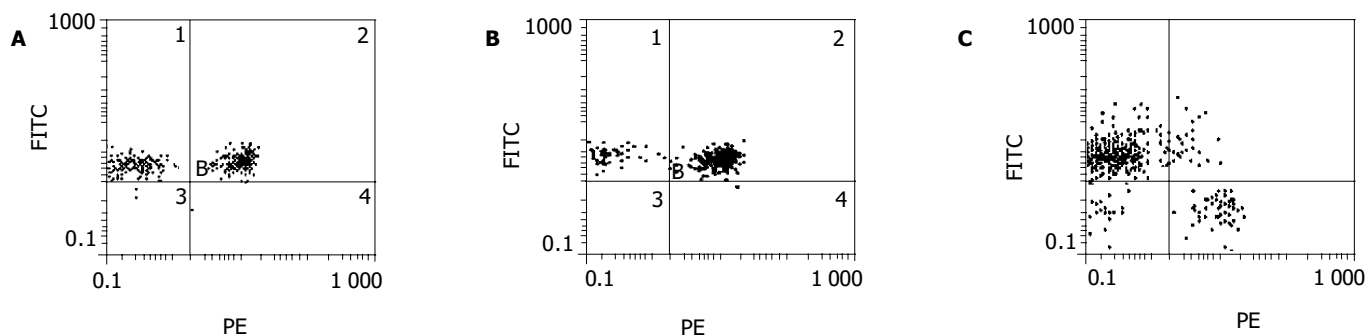


图2 培养13 d的CIK细胞免疫表型. A: CD3⁺/CD4⁺; B: CD3⁺/CD8⁺; C: CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺.

活化大肠癌患者外周血单个核细胞为CIK细胞,探讨了其增殖能力以及免疫表型的变化,为临床肿瘤患者过继免疫治疗提供理论依据.

在培养第1 d加入rhIFN- γ ,预诱导细胞表达IL-2受体、促进细胞增殖及分泌细胞因子.次日加入rhIL-2和Anti-CD3mAb联合诱导促进T淋巴细胞增殖并加强T淋巴细胞的细胞毒作用.健康状况下,外周血CIK细胞大约为1-5%,而我们的研究表明,大肠癌患者外周血单个核细胞在rhIFN- γ , rhIL-2和Anti-CD3mAb联合作用下培养13 d,细胞数量增加31.2倍,CD3⁺CD16⁺CD56⁺T细胞扩增近23倍.可以看出,CIK细胞是一种增殖活力强的免疫效应细胞.据报道,其他细胞因子IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15等^[9-10]的不同组合也可诱导单个核细胞为CIK细胞.但我们的操作方法简便,且细胞因子rhIFN- γ , rhIL-2为上市药品.总之,本文联合应用多种细胞因子活化大肠癌患者外周血单个核细胞为CIK细胞,其体外增殖力强,是以CD3⁺CD16⁺CD56⁺为主的异质细胞群.该研究为临床开展大肠癌患者CIK细胞过继免疫治疗奠定理论基础.

4 参考文献

- 1 Peeters M, Haller DG. Therapy for early-stage colorectal cancer. *Oncology* 1999;13:307-315
- 2 Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treat-

- ment for the masses. *Science* 2004;305:200-205
- 3 Yamaguchi Y, Ohshita A, Kawabuchi Y, Ohta K, Shimizu K, Minami K, Hihara J, Miyahara E, Toge T. Adoptive immunotherapy of cancer using activated autologous lymphocytes-current status and new strategies. *Hum Cell* 2003;16:183-189
- 4 Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor or cell activity. *J Exp Med* 1991;174:139-149
- 5 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2002;8:464-468
- 6 Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1457-1462
- 7 Hongeng S, Petvises S, Worapongpaiboon S, Rerkamnuaychoke B, Pakakasama S, Jootar S. Generation of CD3⁺ CD56⁺ cytokine-induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells. *Int J Hematol* 2003;77:175-179
- 8 Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, Weissman IL, Negrin RS. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol* 1993;21:1673-1679
- 9 Zoll B, Lefterova P, Csipai M, Finke S, Trojanek B, Ebert O, Micka B, Roigk K, Fehlinger M, Schmidt-Wolf GD, Huhn D, Schmidt-Wolf IG. Generation of cytokine-induced killer cells using exogenous interleukin-2, -7 or -12. *Cancer Immunol Immunother* 1998;47:221-226
- 10 Li Y, Huang SL, Wu YF, Wei J, Bao R, Zhou DH. Expansion of CIK/NK cells from cord blood by using different combinations of stem cell factor, FLT3 ligand and interleukin 2, 7, 15 in vitro. *Zhongguo Shiyen Xueyexue Zazhi* 2004;12:350-354

编辑 张海宁