

CIK细胞对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用

孙利兵, 杨光

孙利兵, 杨光, 南京医科大学附属苏州医院肿瘤内科 江苏省苏州市 215001

苏州科技局基金资助项目, No. SS0524

作者贡献分布: 此课题由杨光设计; 研究过程由孙利兵操作完成; 本论文写作由孙利兵与杨光共同完成。

通讯作者: 杨光, 主任医师, 215001, 江苏省苏州市白塔西路16号, 南京医科大学附属苏州医院肿瘤内科。

libingmoma@gmail.com

电话: 0512-62364381

收稿日期: 2009-11-09 修回日期: 2009-11-30

接受日期: 2009-12-07 在线出版日期: 2009-12-18

Inhibitory effects of cytokine-induced killer cells on the growth of human gastric cancer xenografts in nude mice

Li-Bing Sun, Guang Yang

Li-Bing Sun, Guang Yang, Department of Oncology, the Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Foundation of Suzhou Science and Technology Bureau, No. SS0524

Correspondence to: Guang Yang, Department of Oncology, the Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, 16 Baita West Road, Suzhou 215001, Jiangsu Province, China. libingmoma@gmail.com

Received: 2009-11-09 Revised: 2009-11-30

Accepted: 2009-12-07 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of human cytokine-induced killer (CIK) cells on the growth of human gastric cancer xenografts in nude mice.

METHODS: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from healthy volunteers by Ficoll gradient centrifugation. CIK cells were induced by culturing PBMCs in complete medium containing recombinant human interferon- γ (rhIFN- γ), anti-CD3 monoclonal antibody (CD3 mcAb), recombinant human interleukin-2 (rhIL-2), and rhIL-1. Balb/c nude mice were subcutaneously inoculated with human gastric cancer SGC-7901 cells in the logarithmic growth phase. Ten days after inoculation, 40 model mice were randomly divided into two groups: those injected with CIK cells for five days (experimen-

tal group) and those injected with NaCl solution for the same duration (control group).

RESULTS: Significant differences were noted in the weight of tumor and the survival time of mice between the experimental group and the control group (1.21 ± 0.34 g vs 2.73 ± 0.45 g, and 65.8 ± 6.2 d vs 44.3 ± 4.8 d, respectively; both $P < 0.01$). The reduced rate of tumor growth was significantly higher in the experimental group (47.6%) than in the control group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: CIK cells have a strong inhibitory effect on the growth of human gastric cancer xenografts in nude mice and can prolong the survival time of tumor-bearing nude mice.

Key Words: Cytokine-induced killer cells; Gastric cancer; Nude Mice

Sun LB, Yang G. Inhibitory effects of cytokine-induced killer cells on the growth of human gastric cancer xenografts in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3627-3629

摘要

目的: 探讨CIK细胞对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用。

方法: 用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞, 给予多种细胞因子(rhIFN- γ 、CD3 mcAb、rhIL-2、rhIL-1), 诱导生成CIK细胞。培养人胃癌细胞株SGC-7901, 接种至40只裸鼠右腋下, 10 d后随机分2组, 每组20只, 分别为CIK组和对照组。连续5 d在接种肿瘤细胞部位处给予CIK细胞和生理盐水注射治疗, 观察CIK细胞对胃癌移植瘤模型的抗肿瘤疗效。

结果: CIK组胃癌肿块质量和生存期与对照组相比, 均具有显著性差异(1.21 ± 0.34 g vs 2.73 ± 0.45 g, 65.8 ± 6.2 d vs 44.3 ± 4.8 d, 均 $P < 0.01$)。裸鼠体内实验表明, CIK细胞能够显著抑制胃癌细胞的生长, 其抑瘤率可达47.6%, 明显高于对照组($P < 0.01$)。

结论: CIK细胞在裸鼠体内对人胃癌移植瘤有

背景资料

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 传统手术根治及化疗对进展期胃癌的疗效仍不理想。CIK其杀伤肿瘤细胞效应是非MHC限制性的, 具有强大的抗肿瘤活性, 而成为临床应用的一种理想效应细胞。本文应用裸鼠人胃癌模型研究CIK细胞对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用, 旨在为胃癌的生物治疗提供实验依据。

同行评议者

吕宾, 教授, 浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

创新盘点
虽然CIK细胞治疗恶性肿瘤具有广阔的前景,但疗效并没有达到预期的效果,改善肿瘤治疗的免疫微环境如抑制或调节共刺激信号的水平,可能是提高CIK治疗恶性肿瘤疗效的一个新策略。

应用要点
文章重点对CIK对胃癌动物模型的抗癌作用进行研究,可以为临床开展CIK生物治疗提供更多实验依据。

特异性抑瘤作用,并可以延长裸鼠生存时间。

关键词: 细胞因子杀伤细胞; 胃癌; 裸鼠

孙利兵, 杨光. CIK细胞对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3627-3629
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3627.asp>

0 引言

胃癌是威胁人类健康和生命的主要恶性肿瘤之一,在东亚、南美及中欧胃癌的发病率极高^[1]。最新调查报告显示,我国目前胃癌的死亡率位列所有恶性肿瘤之首^[2]。临床早期发现胃癌的比例不足15%,85%为进展期胃癌,此时癌组织已经浸润达到肌层或浆膜层,5年生存率仅为20%左右。尽管治疗手段水平不断提高,但治疗效果尚不理想^[3]。研究发现细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞对肾癌、乳腺癌、胃癌、大肠癌、卵巢癌等有明显的杀伤效应^[4-5]。本研究观察了CIK细胞体外扩增过程中表型特征的变化,应用裸鼠人胃癌模型研究CIK细胞对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用,旨在为胃癌的生物治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c裸鼠40只,♀,周龄6-8 wk,体重15-20 g,由苏州大学动物实验中心提供,于无菌恒温、恒湿屏障系统内饲养,饮水均经灭菌处理。人胃癌细胞株SGC-7901购于中国科学院细胞库。CD3McAb、rhINF- γ 、rhIL-1购于美国PeproTech公司, rhIL-2购于北京四环药业有限公司,无血清培养基AIM-V购于北京天润善达公司, Ficoll淋巴细胞分离液购于瑞典Amersham Biosciences公司,鼠抗人CD3/CD56购于美国Coulter公司。

1.2 方法

1.2.1 CIK细胞的分离、培养和鉴定: 将健康献血者抗凝外周血(苏州市中心血站提供)经Ficoll淋巴分离液梯度离心取界面层单个核细胞, PBS洗涤3次后,将细胞置于无血清培养基中,调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/L$,加入rhINF- γ 1000 kU/L,置于37℃、50 mL/L CO₂中培养。24 h后加入CD3McAb 100 $\mu g/L$, rhIL-2 500 kU/L, rhIL-1 100 kU/L,以后每3 d半量换液1次,补加rhIL-2 500 kU/L。参照卫生部2003-03颁布的“人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则”。细胞培养到第10天,取部分细胞进行细菌、霉菌的

检测。培养14 d后,台盼蓝计数,收集培养的CIK细胞,通过流式细胞仪检测其表面标志物。

1.2.2 动物实验: 将40只Balb/c裸鼠右腋皮下接种0.2 mL $1 \times 10^9/L$ SGC-7901胃癌细胞后,再随机分成2组: CIK组和对照组。10 d后CIK组的每只裸鼠在接种肿瘤细胞部位处注射0.2 mL $1 \times 10^{10}/L$ 的CIK细胞,对照组裸鼠注射0.2 mL生理盐水,连续注射5 d。14 d后每组随机取12只裸鼠颈椎脱臼处死,剥离肿瘤块并称质量,计算抑瘤率,公式为: 抑瘤率 = (对照组瘤质量-实验组瘤质量)/对照组瘤质量 $\times 100\%$ 。各组剩余8只动物观察生存期。

统计学处理 所有数据均使用SPSS11.0软件包进行统计学分析。计量资料用mean \pm SD表示。各组间采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 CIK表型的鉴定 体外将PBMC经rhINF- γ 、CD3McAb、rhIL-2、rhIL-1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CIK细胞中CD3⁺、CD56⁺双阳性细胞(CD3⁺/CD56⁺)数量随培养时间的延长而增加。第0天表达CD3⁺/CD56⁺的细胞占0.6% \pm 0.1%,而经细胞因子刺激的T淋巴细胞第6、10、14天表达CD3⁺/CD56⁺的细胞分别占19.4% \pm 3.1%、33.8% \pm 1.7%、40.1% \pm 2.3%($P < 0.01$)。

2.2 干预后14 d各组肿瘤生长情况及抑瘤率 全部实验裸鼠在接种第7天时在接种部位均有肿瘤形成,直径为0.5-1 cm。在CIK组,裸鼠在干预后14 d内肿瘤有所缩小,对照组所有裸鼠的肿块均增大。解剖时发现与对照组相比,CIK组的肿瘤块较小且局限,对照组的肿瘤块大,且有肿瘤局部浸现象。CIK组和对照组裸鼠胃癌组织湿质量分别为1.21 \pm 0.34 g和2.73 \pm 0.45 g,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。CIK细胞对胃癌移植瘤生长的抑制作用明显,抑瘤率可达47.6%($P < 0.01$)。

2.3 裸鼠生存期比较 CIK组动物在接种肿瘤后第60天开始有死亡,至75 d全部死亡;对照组动物从接种肿瘤后第41天开始有死亡,至52 d全部死亡。CIK组和对照组裸鼠生存期分别为65.8 \pm 6.2 d和44.3 \pm 4.8 d,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

CIK细胞是人外周血单个核细胞在多种细胞因子的诱导下产生的,兼有T淋巴细胞强大的抗癌活性和自然杀伤(natural killer, NK)细胞的非

MHC限制性杀瘤优点,被认为是新一代抗肿瘤过继细胞免疫治疗的首选方案,而成为临床应用的一种理想效应细胞^[6]. CIK细胞的效应细胞是CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ T细胞为主的异质细胞群,其功能特点:选择性地杀伤肿瘤细胞、体外增殖快、杀伤活性高、抗瘤谱广、不良反应小^[7-9]. CIK细胞对靶细胞的杀伤原理可能有如下几种:(1)对肿瘤细胞的直接杀伤,主要通过两条途径发挥作用:(经淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)识别结构激活导致胞质毒颗粒依赖性的溶细胞作用;通过CIK细胞表面的CD3受体激活产生胞质毒性颗粒介导的溶细胞作用).(2)活化后产生的大量炎性细胞因子的抑瘤杀瘤作用.大量实验证明,培养的CIK细胞可以分泌多种细胞因子,能对肿瘤细胞有直接抑制作用,还可通过调节机体免疫系统反应性间接杀伤肿瘤细胞.

本实验研究发现在细胞培养过程中,随着培养时间的延长,细胞体积变大,CD3⁺/CD56⁺细胞的百分含量也明显增加,第14天表达CD3⁺/CD56⁺的细胞占40.1%±2.3%,与第0天相比差异具有统计学意义($P<0.01$). 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. CD3⁺/CD56⁺这种自身CIK细胞对自身及异基因肿瘤细胞均有杀伤作用,因此有潜在的临床研究与应用价值.我们的研究表明,CIK细胞可有效抑制胃癌细胞的生长,延长裸鼠的生存期,这表明CIK细胞适用于胃癌的过继免

疫治疗,对胃癌的临床治疗具有重要意义.在当前对肿瘤特异性抗原了解相对较少的情况下,应用CIK细胞作为胃癌手术、放疗、化疗后的辅助治疗,可能有一定的临床应用意义.

4 参考文献

- 1 Varadhachary G, Ajani JA. Gastric cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2005; 3: 118-124
- 2 Archie V, Kauh J, Jones DV Jr, Cruz V, Karpeh MS Jr, Thomas CR Jr. Gastric cancer: standards for the 21st century. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57: 123-131
- 3 陈凇,李涛.胃癌综合治疗现状与进展.世界华人消化杂志 2008; 16: 571-574
- 4 束永前,张锦英,黄普文,卢凯华,朱陵君,刘平,殷咏梅,穆庆霞.细胞因子诱导的杀伤细胞与树突细胞联合治疗晚期实体肿瘤40例临床分析.南京医科大学学报 2005; 25: 747-749
- 5 蒋敬庭,吴昌平, Peter Nilsson-Ehle,邓海峰,陆明洋,李敏. CIK细胞治疗老年人中晚期胃癌的副反应分析.肿瘤 2006; 26: 950-952
- 6 Lu PH, Negrin RS. 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: 1687-1696
- 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 Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, Edinger M, Negrin RS. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 181-187
- 9 秦斌,张筱茵.胃癌分子免疫学研究进展.世界华人消化杂志 2009; 17: 115-119

同行评价
CIK细胞在肿瘤中的作用,近年有大量的文献报道,其抑制肿瘤细胞生长的作用将可能成为免疫治疗的重要方法,是肿瘤免疫研究的热点之一.因此,该文的选题有重要的意义.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库.此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求.

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录.《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊.《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive>(WJG编辑部主任:程剑侠 2009-12-18)