

顺铂结合CIK细胞对裸鼠人胃癌模型体内的抗肿瘤作用

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: 2009-12-18 修回日期: 2010-02-04

接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-04-28

Antitumor effects of cisplatin and CIK cells against human gastric cancer in nude mice

Li-Bing Sun, Guang Yang

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

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

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

Received: 2009-12-18 Revised: 2010-02-04

Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-04-28

Abstract

AIM: To investigate the antitumor effects of cisplatin and cytokine-induced killer (CIK) cells, alone and in combination, against human gastric cancer 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 the complete medium containing recombinant human interferon- γ (rhIFN- γ), anti-CD3 monoclonal antibody (mAb), recombinant human interleukin-2 (rhIL-2), and recombinant human interleukin-1 (rhIL-1). Eighty Balb/c nude mice were subcutaneously transplanted with gastric cancer cells (SGC-7901) in the exponential growth phase. Ten days later, these mice were randomly divided into four groups: control group, cisplatin group, CIK cell group and cisplatin plus CIK cell group, which were given normal saline, cisplatin, CIK cells, and cisplatin plus CIK cells for five days,

respectively.

RESULTS: Compared with normal saline, cisplatin and CIK cells, alone and in combination, extended the survival time of nude mice bearing tumors and decreased tumor weight (all $P < 0.01$). The reduced rate of tumor growth was significantly higher in the cisplatin plus CIK cell group (57.8%) than in the control group ($P < 0.01$). The levels of erythrocyte C3b receptor significantly increased, and those of erythrocyte immune complex receptors significantly decreased in all treatment groups when compared to the control group (all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Cisplatin and CIK cells in combination is better than alone in inhibiting the growth of human gastric cancer in nude mice.

Key Words: Cytokine-induced killer cell; Cisplatin; Gastric cancer; Nude mouse

Sun LB, Yang G. Antitumor effects of cisplatin and CIK cells against human gastric cancer in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(12): 1261-1263

摘要

目的: 探讨顺铂、CIK细胞以及顺铂联合CIK对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用, 为临床上联合应用顺铂和CIK细胞治疗胃癌提供实验依据。

方法: 应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 mAb、rhIL-1、rhIL-2), 诱导生成CIK细胞; 培养人胃癌细胞株SGC-7901, 接种至80只裸鼠右腋下, 10 d后取移植瘤直径基本一致的裸鼠随机分4组: NS对照组、顺铂组、CIK细胞组和顺铂+CIK细胞组, 每组16只。连续5 d在接种肿瘤细胞部位处给予相应注射治疗, 观察其对胃癌移植瘤模型的抗肿瘤疗效。

结果: 与NS对照组相比, 顺铂组、CIK细胞组、顺铂+CIK细胞组裸鼠人胃癌移植瘤模型治疗后肿块质量均减轻, 生存期均明显延长, 尤以顺铂+CIK组效果显著($P < 0.01$)。裸鼠体内

■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。顺铂是目前应用最广泛的抗肿瘤药物之一。本研究进一步探讨顺铂与CIK细胞联合应用后对胃癌细胞体内生长的抑制作用, 为进一步临床应用化疗联合CIK细胞治疗胃癌提供实验依据。

■同行评议者

许文燮, 教授, 上海交通大学医学院生物医学工程系

■研究前沿

顺铂与CIK细胞联合应用成为肿瘤免疫治疗与化疗研究的新领域。

实验表明,顺铂+CIK细胞联合应用能够显著抑制胃癌细胞的生长,其抑瘤率可达57.8%,明显高于NS对照组($P<0.01$)。免疫功能检测显示红细胞C3b反应受体明显升高,红细胞免疫复合物受体明显降低($P<0.01$)。

结论: 顺铂联合CIK细胞对人胃癌移植瘤生长的抑制作用大于单独应用顺铂或CIK细胞。

关键词: 细胞因子诱导的杀伤细胞; 顺铂; 胃癌; 裸鼠

孙利兵, 杨光. 顺铂结合CIK细胞对裸鼠人胃癌模型体内的抗肿瘤作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(12): 1261-1263
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1261.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,在东亚的日本、韩国、中国、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。生物治疗是继手术、化疗、放疗后肿瘤治疗的第4种模式,适用于手术及放、化疗后的患者,可望消除亚临床病灶及残留的肿瘤细胞。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIK)由人外周血单个核细胞在多种细胞因子的诱导下产生,具有强大的抗肿瘤活性,其杀伤肿瘤细胞效应是非主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制性的,成为临床应用上一种理想效应细胞^[3]。顺铂是目前应用最广泛的抗肿瘤药物之一,适用于治疗卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌、头颈部癌、肺癌、食管癌、肾癌、黑色素瘤、恶性淋巴瘤等^[4]。顺铂是通过损伤细胞DNA,从而抑制细胞生长^[5]。本研究进一步探讨顺铂与CIK细胞联合应用后对胃癌细胞体内生长的抑制作用,为进一步临床应用化疗联合CIK细胞治疗胃癌提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c裸鼠40只,♂,6-8周龄,体质量15-20 g(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购于上海中国科学院细胞库;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;顺铂购于山东齐鲁制药厂。

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淋巴细胞分离液梯度离心,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 $1 \times 10^6/\text{mL}$,加入rhIFN- γ 1 000 U/mL,置于37℃、50 mL/L CO₂中培养。24 h后加入CD3McAb 100 $\mu\text{g/L}$, rhIL-2 500 U/mL, rhIL-1 100 U/mL,以后每3 d半量换液1次,补加rhIL-2 500 U/mL。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80只Balb/c裸鼠右腋下接种0.2 mL $1 \times 10^6/\text{mL}$ SGC-7901胃癌细胞后,10 d后取移植瘤直径基本一致的裸鼠随机分4组: NS对照组、顺铂组、CIK细胞组和顺铂+CIK细胞组,每组16只。连续5 d在接种肿瘤细胞部位处给予相应注射治疗,每次0.2 mL。14 d后每组随机取8只裸鼠眼眶取血,进行免疫功能检测,颈椎脱臼处死剥离肿瘤块并称质量,计算抑瘤率: 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rhIFN- γ 、CD3 mcAb、rhIL-2、rhIL-1诱导培养14 d后,可见细胞成团簇状生长,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0.5% \pm 0.2%,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: 18.1% \pm 2.9%、35.2% \pm 1.3%、44.7% \pm 2.8% ($P<0.01$)。

2.2 干预后14 d各组肿瘤生长情况及、抑瘤率及生存期 全部实验裸鼠于接种第7天时接种部位均有肿瘤形成,10 d后肿瘤直径为0.5-1.0 cm。在顺铂组、CIK细胞组和顺铂+CIK细胞组,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。NS对照组相比,各组肿瘤湿质

■应用要点

文章重点对顺铂与CIK细胞联合应用后对胃癌动物模型的抗癌作用进行研究,可以为临床应用化疗联合CIK细胞治疗提供更多的实验依据。

表 1 干预后14 d各组肿瘤湿质量、抑瘤率及生存周期 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	肿瘤湿质量(g)	抑瘤率(%)	生存期(d)
NS对照组	2.36 \pm 0.27	0	34 \pm 3.2
顺铂组	1.15 \pm 0.26 ^b	47.4 ^b	55 \pm 1.6 ^b
CIK细胞组	1.23 \pm 0.37 ^b	43.5 ^b	51 \pm 2.1 ^b
顺铂+CIK细胞组	1.03 \pm 0.18 ^b	57.8 ^b	60 \pm 0.0 ^b

^b $P < 0.01$ vs NS对照组.表 2 各组对人胃癌裸鼠移植瘤模型免疫功能的影响 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	剂量	红细胞C3b 反应受体(%)	红细胞免疫 复合物受体(%)
NS对照组	0.2 mL	5.08 \pm 2.70	19.04 \pm 3.12
顺铂组	2.5 mg/kg	8.32 \pm 1.03 ^b	12.70 \pm 1.46 ^b
CIK细胞组	0.2 mL	7.85 \pm 0.48 ^b	13.80 \pm 2.92 ^b
顺铂+CIK细胞组	0.2+0.2 mL	11.50 \pm 1.34 ^b	9.82 \pm 2.41 ^b

^b $P < 0.01$ vs NS对照组.

量有不同程度下降, 顺铂+CIK细胞组尤为显著 ($P < 0.01$, 表1). 与NS对照组相比, 顺铂+CIK细胞组对胃癌移植瘤生长的抑制作用明显, 抑瘤率可达57.8% ($P < 0.01$). 以接种瘤细胞后生存60 d为治愈标准, 观察各组裸鼠的生存期(表1).

2.3 各组对人胃癌裸鼠移植瘤模型免疫功能的影响 与NS对照组比较, 各组红细胞C3b反应受体明显升高, 红细胞免疫复合物受体明显降低, 顺铂+CIK细胞组各项指标明显改善 ($P < 0.01$, 表2).

3 讨论

CIK细胞被认为是新一代抗肿瘤过继细胞免疫治疗的首选, 成为临床应用上一种理想效应细胞. 他是以CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ T细胞为主的异质细胞群, 其功能特点是: 选择性地杀伤肿瘤细胞、体外增殖快、杀伤活性高、抗癌谱广、不良反应少^[6-8]. 顺铂是目前治疗实体瘤最常见、有效的抗肿瘤药物, 属于细胞周期非特异性药物, 可抑制癌细胞的DNA复制过程, 并损伤其细胞膜结构, 有较强的广谱抗癌作用, 并且与多种抗肿瘤药有协同作用, 且无交叉耐药等

特点, 为当前联合化疗中最常用的药物之一^[9]. 红细胞具有多种非特异性免疫受体和物质, 由于数量巨大, 他在机体非特异性免疫反应中及指导T淋巴细胞、B淋巴细胞特异免疫反应中都占有重要的地位^[10].

胃癌需进行综合治疗, 临床上以手术和化疗为主. 我们的实验结果表明, 顺铂联合CIK细胞具有明显抗肿瘤作用. 与NS对照组相比, 其余各组裸鼠的生存期明显延长, 肿瘤湿质量明显减轻, 红细胞C3b反应受体明显升高, 红细胞免疫复合物受体明显降低, 顺铂+CIK细胞组尤为显著 ($P < 0.01$).

总之, 本实验说明CIK细胞联合顺铂显著抑制肿瘤细胞的生长, 延长裸鼠生存期, 增强裸鼠免疫功能, 其抗肿瘤作用比单独化疗或单独应用CIK细胞的作用更强. 这为临床上应用顺铂联合CIK细胞以提高抗癌效果提供了依据.

4 参考文献

- Varadhachary G, Ajani JA. Gastric cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2005; 3: 118-124
- 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
- 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
- 潘洪明, 费洪新, 杜静平, 陈正华, 张涛. 人胃癌顺铂耐药细胞系的建立过程. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2009-2013
- 孙俊. 铂类抗肿瘤药物及其临床研究进展. *中国药业* 2008; 17: 1-3
- 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
- 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
- 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
- 卢业才, 李启信, 束庆兵, 郭峰, 王光庆, 孙功平, 朱长进, 邱伟华. 丹参酮 II A磺酸钠联合顺铂腹腔化疗对胃癌生长的影响. *肿瘤基础与临床* 2009; 22: 121-124
- 马庆海, 索翠萍, 孙涛. 肝脏疾病患者红细胞免疫功能变化的临床研究. *医学检验与临床* 2007; 18: 74-76

编辑 李瑞敏 电编 何基才

■同行评价

本文的结果对临床顺铂和CIK细胞联合治疗胃癌的保守治疗、术后巩固治疗方面提供理论和实验依据.