

论著·基础研究

IL-12 和 IL-15 对外周血 CIK 细胞增殖和对 SMMC-7721 肝癌细胞杀瘤效果研究*

祝仲珍¹, 傅颖媛², 腾召纯³, 何丹⁴, 熊圆圆³, 王占科^{3△}, 詹丽英^{5▲}

(1. 中国人民解放军第九四医院疾病预防控制中心, 江西南昌 330002; 2. 南昌大学基础医学院免疫学教研室, 江西南昌 330006; 3. 中国人民解放军第九四医院检验科, 江西南昌 330002; 4. 江西省人民医院中心实验室, 江西南昌 330006; 5. 中国人民解放军第九四医院消化内科, 江西南昌 330002)

摘要:目的 观察常规培养条件下添加白细胞介素(IL)-12、IL-15对细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞增殖的影响,观察不同细胞因子组合培养的CIK细胞的杀瘤作用,为高效率、高质量体外制备肿瘤患者自体CIK细胞制剂提供新思路。**方法** 首先筛选出IL-2、IL-12、IL-15最佳添加水平;然后采集健康献血员外周血,分离出单个核细胞后,根据添加的细胞因子种类和组合类型进行分组:A组(IL-2常规培养组)、B组(IL-2+IL-12组)、C组(IL-2+IL-15组)、D组(IL-2+IL-12+IL-15组)、E组(细胞因子空白对照组);各组单个核细胞分别在培养第0、5、10、15、20天,采用全自动血球计数仪进行CIK细胞计数,锥虫蓝染法检测细胞活性,流式细胞技术检测细胞膜CD3、CD8、CD56阳性率,MTS法测定CIK细胞对肝癌SMMC-7721细胞的杀瘤效果。**结果** B、C、D组培养第10、15、20天后CIK细胞增殖倍数均明显高于A组($P < 0.05$);D组培养第10、15、20天CIK细胞增殖倍数均分别明显高于C组($P < 0.05$)。B、C、D组培养第15、20天CIK细胞膜CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺百分比均分别明显高于A组($P < 0.05$);D组培养第15、20天CIK细胞膜CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺百分比均分别明显高于B组($P < 0.05$)。在效靶比5:1时,各组培养第10、15、20天的CIK细胞对肝癌SMMC-7721细胞的杀伤率均明显高于A组($P < 0.05$);D、C组培养第10、15、20天CIK细胞对肝癌SMMC-7721细胞的杀伤率分别明显高于B组($P < 0.05$)。**结论** IL-12、IL-15均可促进CIK细胞增殖,IL-15在促进CIK细胞增殖的同时还能增强CIK细胞杀伤肝癌SMMC-7721细胞的活性。

关键词:细胞因子诱导的杀伤细胞; 白细胞介素12; 白细胞介素15; 细胞增殖; 杀瘤活性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.05.003

中图法分类号:R735.7;R73-36

文章编号:1673-4130(2018)05-0521-05

文献标识码:A

Study on the effect of IL-12 and IL-15 on the proliferation of CIK cells from of peripheral blood and the activity of killing SMMC-7721 hepatoma cell line in vitro*

ZHU Zhongzhen¹, FU Yingyuan², TENG Zhaochun³, HE Dan⁴,
XIONG Yuanyuan³, WANG Zhanke^{3△}, ZHAN Liying^{5▲}

(1. Department of Disease Prevention and Control, No. 94 Hospital of PLA, Nanchang, Jiangxi 330002, China; 2. Department of Immunology, Medical College of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 3. Department of Clinical Laboratory, No. 94 Hospital of PLA, Nanchang, Jiangxi 330002, China; 4. Department of Central Laboratory, People's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 5. Department of Gastroenterology, No. 94 Hospital of PLA, Nanchang, Jiangxi 330002, China)

Abstract: Objective To observe the influence of IL-12, IL-15 on CIK cell in the normal culture; to observe the anti-tumor effect in the circumstance of different combination of cytokines, and to provide a new insight for preparing high effective and qualified CIK cell in vitro. **Methods** The optimal concentrations of IL-2, IL-12 and IL-15 were determined, respectively. After the peripheral blood from healthy blood donors was collected, monocytes were selected and co-cultured with different cytokines into different groups, as group A (IL-2 normal culture group), group B (IL-2 and IL-12 group), group C (IL-2 and IL-15 group), group D (IL-2, IL-12 and

* 基金项目:江西省科技支撑项目(2014ZBBG70004)。

作者简介:祝仲珍,女,副主任技师,主要从事抗感染免疫研究。△ 通信作者,E-mail:wangzhanke@sina.com。▲ 共同通信作者,E-mail:zly@foxmail.com。

本文引用格式:祝仲珍,傅颖媛,腾召纯,等. IL-12 和 IL-15 对外周血 CIK 细胞增殖和对 SMMC-7721 肝癌细胞杀瘤效果研究[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(5):521-525.

IL-15 group), and group E (cytokine control group). The monocytes in different groups were calculated by globulimeter, the activity of cells was detected by Trypan blue staining, positive ratio of CD3, CD8, CD56 on the cellular membrane was detected by flow cytometry, and the anti-tumor effect of CIK to SMMC-7721 was detected by MTS method, in the day of 0, 5, 10, 15, 20 after the culture. **Results** Statistical analysis indicated that, the proliferation multiplication of CIK cells was significantly higher in group B, group C and group D after 10, 15 and 20 days of culture than those in group A ($P < 0.05$); and group D had higher proliferation multiplication than that of group C ($P < 0.05$). The percentage of $CD3^+ CD8^+$, $CD3^+ CD56^+$ in CIK cell membrane in group B, C, D was significantly higher than that in group A after 15 and 20 days of culture ($P < 0.05$). The percentage of $CD3^+ CD8^+$, $CD3^+ CD56^+$ in CIK cell membrane in group D was significantly higher than that in group B after 15 and 20 days of culture ($P < 0.05$). The killing rate of CIK cells for liver cancer in each group at 10, 15, 20 days of culture was significantly higher than that of group A when the target target ratio was 5 : 1 ($P < 0.05$). The killing rate of CIK cells for liver cancer in group D, C at 10, 15, 20 days of culture was significantly higher than that of group B ($P < 0.05$). **Conclusion** IL-12 and IL-15 could improve the proliferation of CIK cells, and IL-15 also has the effect of enhancing CIK cells the tumor-killing to SMMC-7721 activity.

Key words: CIK cells; IL-12; IL-15; cell proliferation ratio; tumor-killing activity

细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞是在体外将多种细胞因子如白细胞介素(IL)-2 等加入人外周血单个核细胞培养液中,共同培养一段时间后获得的一群异质细胞群。其主要效应细胞为 $CD3^+$ 、 $CD56^+$ 表型细胞,所以兼有自然杀伤(NK)细胞非主要组织相容性复合体(MHC)限制性杀瘤和 T 细胞抗瘤活性的特点。CIK 细胞的抗瘤活性高于淋巴细胞激活的杀伤细胞^[1], CIK 细胞介导的免疫治疗在提高患者治愈率、减少肿瘤复发、改善患者生活质量、延长生存时间方面可起重要的作用,具有良好的应用前景^[2-3]。提高 CIK 细胞培养效率,提升 CIK 细胞中的效应细胞含量、增强 CIK 细胞杀瘤活性成为当前研究所急需解决的问题。本研究通过在常规培养基中单独和联合添加 IL-12、IL-15 两种细胞因子,探讨 IL-12、IL-15 对 CIK 细胞增殖和杀瘤活性的影响,以期确定和建立一种 CIK 细胞体外培养的高效、快速的优化条件,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 淋巴细胞分离液 Ficoll Plus、注射用重组人 IL-2、GT-T551 H2 培养基购自北京四环生物有限公司; HUMAN IL-12、HUMAN IL-15 购自美国 Peprotech 公司; 肿瘤坏死因子(TNF)- α 、集落刺激因子(GM-CSF)、CD3 单克隆抗体、重组人干扰素(IFN)- γ 、IL-1 γ 均由江苏万华生物有限公司提供; SV3009.01 BFS 胎牛血清 Hyclone (SH40003-1) 由赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司提供; 流式试剂 CD3-PC5、CD8-PE、CD56-FITC 购自美国 Beckman 公司。6 孔 \times 5 mL 培养板(无锡耐思生物科技有限公司); 超净工作台(浙江苏净), 电动移液器(美国 Labnet), 台式离心机(日本久保田), CO_2 培养箱(美国赛默飞), 血细胞计数仪(深圳迈瑞), 光学显微镜(Olympus), 流式细胞仪(美国 Beckman 公司), 酶标分析仪(北京普郎)。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞培养液制备 抽取健康成年人外周血,在 GMP 洁净细胞实验室内,用淋巴细胞分离液密度梯度离心分离单个核细胞,用 GT-T551 培养基重悬细胞,并调整细胞浓度为 1×10^6 /mL, $37^\circ C$, 5% CO_2 培养箱培养 24 h,加入 IFN- γ (1 000 U/mL)、CD3 单抗(50 μ g/mL)、GM-CSF(75 μ g/支)各 1 支,摇匀,继续培养 24 h。补加 GT-T551 培养基至 100 mL(控制细胞密度在 2.0×10^6 /mL),并加入 10% 自体血浆。

1.2.2 CIK 细胞分组培养 根据添加的细胞因子组合不同,分为 4 组,每组平行培养 3 孔。常规添加 IL-2 组为 A 组,添加 IL-2+IL-12 组为 B 组;添加 IL-2+IL-15 组为 C 组;添加 IL-2+IL-12+IL-15 组为 D 组;细胞因子空白组为 E 组。以上各组每隔 2 d 补加 1 次 GT-T551 培养基和相应的细胞因子,每 6 d 半量换液 1 次,并补加相应的细胞因子。E 组为不加任何细胞因子的外周血单个核细胞培养组,培养 20 d。各组均添加 IL-2,终浓度为 500 U/mL。B 组在添加 IL-2 基础上,再添加 IL-12,C 组在添加 IL-2 基础上添加 IL-15,D 组在添加 IL-2 基础上同时添加 IL-12 和 IL-15。IL-12 和 IL-15 添加终浓度分别为 10 ng/mL 和 20 ng/mL。

1.2.3 CIK 细胞扩增分析 于培养第 5、10、15、20 天分别收取培养的 CIK 细胞制成细胞悬液,用全自动血球计数仪进行 CIK 细胞计数,用锥虫蓝拒染法计数活细胞,求出扩增倍数。

1.2.4 CIK 细胞表型分析 在第 0、5、10、15、20 天收集细胞,取适量调整细胞数为 1×10^6 /mL,用 PBS 洗涤细胞 2 次,以 100 μ L 生理盐水重悬细胞,再分别加入标记荧光抗体 CD3-PC5、CD8-PE、CD56-FITC 各 1 μ L,孵育 20 min。另有一管不加抗体,作为阴性对照。流式细胞仪获取检测细胞 5 000~10 000 个,

存入待分析,采用 CELLQuest 软件,分析出 CIK 细胞表型。

1.2.5 抑瘤试验 将肺癌 SMMC-7721 细胞株培养至对数生长期,用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基配成细胞悬液,细胞浓度控制在 1×10^5 /mL,接种到 96 孔培养板中,每孔 100 μ L,共接种 10 孔,再将优选的 CIK 细胞调整成浓度为 5×10^5 /mL 的细胞悬液,上述各孔各加入 100 μ L,并设培养基空白对照孔,在微孔振荡器上混匀,即置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。每孔加入 MTS 溶液 20 μ L,继续于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养 4 h。选择 490 nm 波长,在酶联免疫比色仪上测定各孔吸光度(A)值,计算细胞生长抑制率,抑制率(%)=[1-(效靶细胞作用孔平均 A 值/培养基空白孔平均 A 值)] \times 100%。

1.3 统计学处理 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数数据采用率表示,采用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析或 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 CIK 细胞增殖能力 设定各组外周血 CIK 细胞培养第 0 天的细胞倍数为 1.0,培养第 5、10、15、20 天各组 CIK 细胞扩增倍数有不同程度的增加。从第 5 天开始,B、D 组细胞增殖倍数与 A 组比较差异有统计学意义,C 组从第 10 天开始细胞增殖倍数与 A 组差异有统计学意义($P < 0.05$);培养第 15 天时,A 组扩增达最大值,培养第 20 天时,增殖呈下降趋势;D 组细胞增殖倍数,从第 10 天开始,明显高于 C 组($P < 0.05$);各组 CIK 细胞增殖倍数从大到小依次为 D、B、C、A 组。见表 1。

表 1 各组 CIK 细胞增殖倍数比较($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	第 0 天	第 5 天	第 10 天	第 15 天	第 20 天
A 组	1.0	2.15 \pm 0.25	14.64 \pm 2.87	51.39 \pm 2.09	31.40 \pm 3.13
B 组	1.0	5.13 \pm 1.41 ^a	31.57 \pm 2.26 ^a	70.82 \pm 1.18 ^a	92.00 \pm 4.96 ^a
C 组	1.0	2.59 \pm 1.48	19.13 \pm 1.83 ^a	61.01 \pm 3.40 ^a	63.24 \pm 3.87 ^a
D 组	1.0	5.31 \pm 1.77 ^a	32.36 \pm 2.20 ^{ab}	72.65 \pm 4.20 ^{ab}	107.87 \pm 3.62 ^{ab}

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$

表 2 各组 CIK 细胞中 CD3⁺CD56⁺ 表达百分比($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	第 0 天	第 5 天	第 10 天	第 15 天	第 20 天
A 组	1.1 \pm 0.06	20.6 \pm 0.87	25.9 \pm 1.13	37.5 \pm 2.23	39.1 \pm 2.2
B 组	1.1 \pm 0.06	22.2 \pm 1.57	26.6 \pm 1.17	36.7 \pm 1.45 ^a	46.6 \pm 2.78 ^a
C 组	1.1 \pm 0.06	25.6 \pm 1.24	38.4 \pm 1.79	45.5 \pm 2.20 ^a	51.1 \pm 2.90 ^a
D 组	1.1 \pm 0.06	26.6 \pm 1.28	38.6 \pm 1.13	50.8 \pm 2.19 ^{ab}	52.7 \pm 2.59 ^{ab}

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$

2.2 各组 CIK 细胞培养期间细胞表型的变化 各组 CIK 细胞分别加入标记荧光抗体后,经用流式细胞仪检测,A、B、C、D 组随着培养时间的延长,CIK 细胞群中的 CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞百分比呈上升趋势。培养第 15、20 天,B、C、D 组 CD3⁺CD56⁺、CD3⁺

CD8⁺ 细胞百分比均高于 A 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),D 组 CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞百分比比 B 组高,且差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2、3、图 1、2。

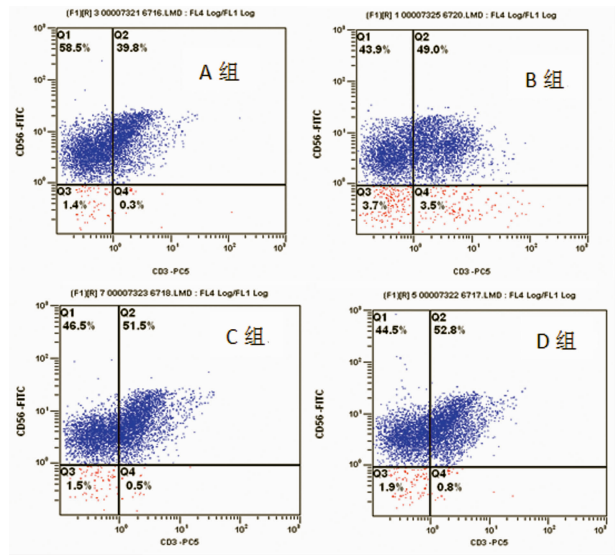


图 1 培养第 20 天各组 CIK 细胞 CD3⁺CD56⁺ 表达率分布图

表 3 各组 CIK 细胞中 CD3⁺CD8⁺ 表达百分比($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	第 0 天	第 5 天	第 10 天	第 15 天	第 20 天
A 组	13.9 \pm 1.53	14.6 \pm 0.87	15.9 \pm 1.60	16.5 \pm 2.54	16.9 \pm 1.8
B 组	13.9 \pm 1.53	15.2 \pm 1.13	17.6 \pm 1.08	17.7 \pm 1.45 ^a	18.6 \pm 1.53 ^a
C 组	13.9 \pm 1.53	15.7 \pm 1.14	18.4 \pm 1.70	20.5 \pm 1.20 ^a	24.1 \pm 2.30 ^a
D 组	13.9 \pm 1.53	16.6 \pm 1.28	19.6 \pm 2.26	21.8 \pm 1.57 ^{ab}	25.4 \pm 1.56 ^{ab}

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$

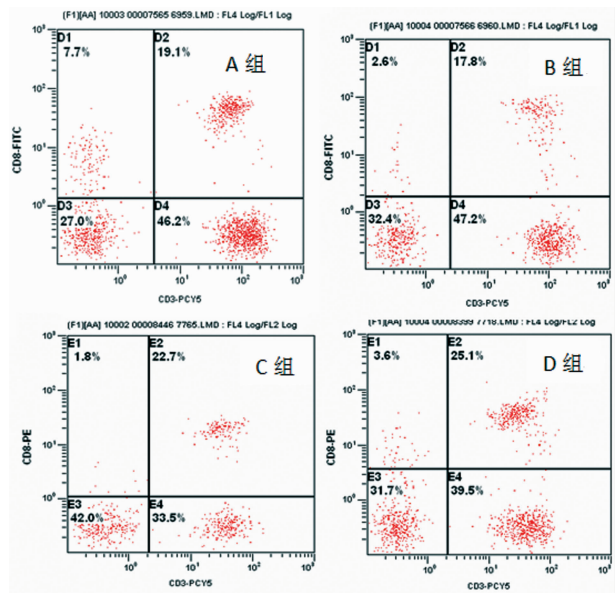


图 2 培养第 20 天各组 CIK 细胞 CD3⁺CD8⁺ 表达率分布图

2.3 体外杀瘤实验 A、B、C、D 组培养 5 d 后 CIK 细胞对肝癌 SMMC-7721 细胞生长有明显杀伤作用;B、C、D 组培养第 10、15 和 20 天 CIK 细胞对肝癌

SMMC-7721 细胞杀伤率均明显高于 A 组 ($P < 0.05$); C、D 组培养第 10、15、20 天 CIK 细胞对肝癌 SMMC-7721 细胞的杀伤率明显高于 B 组 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 各组 CIK 细胞体外杀瘤效果比较 ($\bar{x} \pm s, \%, n=15$)

组别	第 0 天	第 5 天	第 10 天	第 15 天
A 组	12.5 ± 2.3	13.0 ± 2.3	20.3 ± 3.7	21.3 ± 3.4
B 组	14.1 ± 2.3	15.9 ± 2.6 ^a	28.9 ± 5.0 ^a	32.1 ± 6.1 ^a
C 组	14.9 ± 3.0	21.5 ± 3.4 ^{ab}	46.3 ± 6.8 ^{ab}	58.6 ± 8.3 ^{ab}
D 组	15.3 ± 4.5	23.4 ± 4.6 ^{ab}	50.0 ± 9.1 ^{ab}	62.3 ± 10.4 ^{ab}

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$

3 讨 论

CIK 细胞又称为 NK 样 T 淋巴细胞 (NKT), NKT 细胞是所有用细胞因子诱导的杀伤细胞中的主要效应细胞,比其他抗肿瘤效应细胞增殖快、杀瘤活性强、不良反应小,但是其在人体外周血中含量较低,正常人体外周血中 CIK 细胞仅占外周血淋巴细胞的 1%~5%。因此,能否获得足够数量的 CIK 细胞及 CIK 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性强弱与临床疗效密切相关。评价自体外周血 CIK 细胞制备效果主要包括培养时间和 CIK 细胞增殖的数量,CIK 细胞群中具有杀伤肿瘤细胞的免疫细胞百分比及杀伤肿瘤的体内外效果等。

经多种细胞因子诱导后的 CIK 细胞群增殖能力强,杀伤肿瘤细胞的主要效应细胞 ($CD3^+ CD56^+$) 可大量增殖,杀伤肿瘤活力强,远优于传统的 LAK 细胞和单纯的细胞因子(如 IFN- γ 、IL-2 等)。CIK 细胞群中的 $CD3^+ CD56^+$ NKT 细胞可持续杀伤肿瘤,而自己不会凋亡,杀伤肿瘤细胞谱广泛,且不受 MHC 限制,具有杀伤病毒或病毒感染的细胞作用,很多肿瘤与病毒感染有关,对多重耐药肿瘤细胞仍敏感,杀瘤活性不受环孢素 A 和 FK506 等免疫抑制剂的影响,能抵抗肿瘤细胞引发的效应细胞 Fas-FasL 凋亡,回输反应小,发热率低,不良反应少。因此,已经成为肿瘤患者的绿色治疗方式,对于其他治疗均无效的肿瘤患者,通过提高机体免疫力的途径,无疑为肿瘤患者治疗提供了新的治疗方法^[4-5]。

自体外周血 CIK 培养制备效果取决于患者自体外周血中可培养的肿瘤杀伤免疫细胞的数量和质量^[6]、添加细胞因子的种类和剂量、培养基质量、培养的条件和环境及培养时间^[7-10]。本研究参照外周血单个核细胞常规培养条件,在细胞因子 IL-2 β 、IFN- γ 、anti-CD3 的共同诱导下,增加 IL-12、IL-15 两种细胞因子单独和联合诱导 CIK 细胞增殖,结果显示,IL-12、IL-15 均可促进 CIK 细胞增殖,但 IL-12 促进能力大于 IL-15。IL-2、IL-12、IL-15 联合应用既可促进 CIK 细胞增殖,又可使增殖维持较长时间。

有活性的 IL-12 有 3 种形式:p70 异二聚体、p40 2

同质二聚体和 p40 单体。IL-12 是新型的免疫刺激因子,能增强 NK 细胞和 $CD8^+$ 细胞的细胞毒活性,抑制 Treg 细胞的免疫抑制功能等^[11]。IL-12 还可以高效诱导生成 IFN- γ ,并且与其他的刺激因子有协同作用,如在少量 TNF 和 IL-1 存在的情况下,刺激 T 细胞和 NK 细胞产生大量的 IFN- γ ;IL-12 与 IL-2、IC 及靶细胞在 NK 细胞中可形成协同作用,在 T 细胞、IL-12 与 IL-2 的协同下,可刺激 TCR-CD3 复合物和 CD28 表达,诱导 IFN- γ 快速高效分泌^[12]。

IL-12 是一种体内重要的免疫细胞因子,可直接用于肿瘤患者的生物治疗,IL-12 可增强外周血单核细胞的细胞毒活性,其机制可能是降低 Treg 细胞的数量和抑制外周血单核细胞的凋亡,从而诱导外周血单核细胞的杀瘤活性^[13]。恶性肿瘤有多种逃避肿瘤治疗的机制,为了根治肿瘤并且防止复发,需要通过多种途径来攻击肿瘤细胞,联合用药是常用的手段。有文献报道,细胞因子的联合应用不仅能提高疗效,而且可减少大剂量使用单一细胞因子引起的毒副作用^[14]。IL-12 可与其他细胞因子一起共同诱导 CIK 细胞中的 NK 细胞活化和增殖,IL-12 用于外周血 CIK 细胞培养和应用,值得研究。

IL-15 是一种单核巨噬细胞系统分泌的一种由 114 个氨基酸残基构成的多肽分子,具有激活 T 细胞和 NK 细胞的生物学功能。IL-15 可以刺激外周血 T 细胞增殖与活化,诱导细胞毒 T 细胞的活性,使其可高表达 IFN- γ 和 IL-4,IL-15 能刺激记忆型 T 细胞及原始 $CD8^+$ 细胞增殖活化^[15],还能促进 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和淋巴因子激活的杀伤细胞的分化、活化和增殖,具有 T 细胞趋化作用,促进 LAK 细胞的溶细胞作用,能对 T 细胞和 NK 细胞的进化起特异性的支持作用^[16]。

CIK 细胞作为异质细胞群, $CD3^+ CD8^+$ 、 $CD3^+ CD56^+$ 细胞百分比明显升高^[17]。本研究在 CIK 细胞培养第 1、15、20 天运用流式细胞仪检测各组 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD56^+$ 阳性率,随着培养时间的延长,各组 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD56^+$ 细胞百分比呈上升趋势。本研究结果显示,单独或联合添加 IL-12 和 IL-15 培养第 15 天以后,CIK 细胞群中的 $CD3^+ CD56^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ 细胞百分比均高于传统方法培养,且 IL-12 和 IL-15 联合添加组 $CD3^+ CD56^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ 细胞百分比明显高于 A 组,提示 IL-12、IL-15 均可以促进 $CD3^+ CD56^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ 细胞增殖,且联合添加效果优于单独添加。

抗肿瘤化学药物治疗是临床治疗肿瘤的重要手段。有文献报道,肿瘤细胞发生耐药与肿瘤细胞超表达多耐药基因 (MDR-1) 有关,MDR-1 基因表达引起肿瘤细胞膜 P-糖蛋白增加。P-糖蛋白具有向细胞外泵出药物的作用,患者自体外周血 CIK/DC-CIK 具有识别肿瘤细胞膜 P-糖蛋白的功能,通过黏附分子结合

在肿瘤细胞上,对耐药肿瘤细胞发挥杀伤作用^[18-19]。因此,外周血 CIK 细胞治疗可能是化疗的补充治疗手段。有文献报道,CIK 细胞治疗肝癌术后患者,可提高其免疫功能^[20-21]。CIK 细胞免疫治疗对降低肿瘤化疗不良反应,减少肿瘤复发,改善患者生活质量等方面,可能具有一定作用^[22-23]。

为观察在常规培养液中单独或联合添加 IL-12 和 IL-15 对 CIK 细胞体外杀瘤作用,本研究选用 SMMC-7721 肝癌细胞株作为杀伤靶细胞,结果显示,IL-12 和 IL-15 联合添加培养的 CIK 细胞杀瘤效果明显优于单独添加,且添加 IL-15 杀瘤效果优于添加 IL-12,提示 IL-15 在促进 CIK 细胞杀瘤效果方面优于 IL-12,这可能与 IL-15 促进 CD3⁺ CD8⁺、CD3⁺ CD56⁺ 阳性细胞增殖有关,CIK 细胞群中的 CD3⁺ CD8⁺、CD3⁺ CD56⁺ 阳性细胞可能是杀伤肿瘤的主要效应细胞。

在只添加 IL-2 的常规 CIK 培养条件下添加 IL-12 和 IL-15,尽管会增加体外 CIK 细胞培养成本,但提高了细胞增殖速度和体外肿瘤杀伤作用。IL-12 促进 CIK 细胞增殖方面优于 IL-15,而 IL-15 在促进 CIK 细胞杀瘤作用方面优于 IL-12,联合添加 CIK 细胞增殖和杀瘤效果明显优于单独添加 IL-12 和 IL-15。IL-12 和 IL-15 分别作为重要细胞因子,联合添加 IL-12 和 IL-15 对缩短有效数量 CIK 细胞培养周期和增强其杀瘤效果,具有重要意义。IL-12 和 IL-15 促进 CIK 细胞体外培养速度及其杀瘤效果的详细机制,值得进一步研究。

参考文献

- [1] MATSUDA K, TSUNODA T, TANAKA H, et al. Enhancement of cytotoxic T lymphocyte responses in patients with gastrointestinal malignancies following vaccination with CEA peptide-pulsed dendritic cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(7): 609-616.
- [2] SHI M, ZHANG B, TANG Z R, et al. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(8): 1146-1151.
- [3] BAO F, XU Y, YIN F H. The clinical study of CIK cell adoptive immuno-therapy for malignant tumors[J]. *Liaoning Med J*, 2003, 17(4): 187-188.
- [4] 张彤,任国平,张蕊.紫杉醇、奥沙利铂、氟尿嘧啶方案联合自体 CIK 细胞输注治疗 IV 期胃癌的疗效与安全性研究[J]. *中国全科医学*, 2012, 15(21): 2418-2420.
- [5] 彭大为,李建旺,元建华,等.自体 DC-CIK 细胞联合培美曲塞治疗老年非小细胞肺癌的疗效与安全性[J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(7): 648-651.
- [6] 贺孟来. CIK 细胞制备方法的研究进展[J]. *中国医药指南*, 2011, 9(13): 208-209.
- [7] HELMS M W, PRESCHER J A, CAO Y A, et al. IL-12 enhances efficacy and shortens enrichment time in cytokine-induced killer cell immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(9): 1325-1334.
- [8] ZOLL B, LEFTEROVA P, EBERT O, et al. Modulation of cell surface markers on NK-like T lymphocytes by using IL-2, IL-7 or IL-12 in vitro stimulation[J]. *Cytokine*, 2000, 12(9): 1385-1390.
- [9] 刘军权,朱云,陈复兴,等.不同刺激因子对人 CIK 细胞功能影响[J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(4): 1021-1026.
- [10] 樊清波,马军,董海霞,等.白细胞介素-21 对人细胞因子诱导杀伤细胞的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(7): 1524-1526.
- [11] 胡萍,何丽,申焕君,等. IL-21 与疾病关系的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(9): 996-999.
- [12] 陈月,陈改良.白细胞介素 12 研究新进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(2): 261-263.
- [13] HELMS M W, PRESCHER J A, CAO Y A, et al. IL-12 enhances efficacy and shortens enrichment time in cytokine-induced killer cell immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(9): 1325-1334.
- [14] POPA O M, KRIEGOVA E, POPA L, et al. Association study in romanians confirms IL-23 A gene haplotype block rs2066808/rs11171806 as conferring risk to psoriatic arthritis[J]. *Cytokine*, 2013, 63(1): 67-73.
- [15] 周健,胡亮彬,郭坤元,等.白细胞介素 15 对外周血单个核细胞抗肿瘤活性和 T 细胞受体谱型的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2009, 44(2): 349-352.
- [16] 赵煜.白细胞介素 15 的研究进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(3): 414-416.
- [17] 曹建平,姜志明,张晓晨,等. CIK 在无血清培养体系中的增殖、表型变化和抗肿瘤活性[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(5): 583-586.
- [18] 李世俊,庞华.针对多药耐药肿瘤的潜在性治疗策略—CIK 细胞[J]. *山东医药*, 2012, 52(1): 104-106.
- [19] 张辉.晚期卵巢癌多药耐药的免疫逃逸机制以及 CIK 细胞实验性治疗的基础与临床研究[D]. 石家庄:河北医科大学, 2005.
- [20] 李蕊,方艳秋,杨丹,等. CIK 细胞疗法对肝癌患者免疫功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(3): 538-539.
- [21] HUI D, QIANG L, JIAN W, et al. A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Liver Dis*, 2009, 41(1): 36-41.
- [22] 张菁超,李明鑫. CIK 治疗肺癌的临床观察及相关因素分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(2): 230-231.
- [23] 陈冬波,张世强,王保庆,等.树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞免疫治疗对恶性肿瘤化疗后患者免疫功能的影响[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(5): 571-572.