

文章编号 : 1005- 8982(2007)21- 2605- 04

· 论著 ·

细胞因子诱导的杀伤细胞对 Lewis 肺癌细胞的抑瘤作用及抑瘤机制的研究*

李淑艳¹ 张春晶¹ 王淑英¹ 吴琦¹ 赵守琪¹ 裴春颖²
(1. 齐齐哈尔医学院 生化教研室 黑龙江 齐齐哈尔 161042 ;
2. 哈尔滨医科大学 免疫教研室 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 :目的 观察细胞因子诱导的杀伤 (cytokine induced killer, CIK) 细胞对 Lewis 肺癌细胞增殖和 Lewis 肺癌移植瘤生长的抑制作用 ,探讨其抑瘤机制。方法 常规方法培养 CIK 细胞 ,以 CIK 细胞为效应细胞 ,Lewis 肺癌细胞为靶细胞 ,以不同效靶比共同培养 ,MTT 法检测细胞增殖情况 ,同时电镜观察 Lewis 肺癌细胞形态特征改变 ,流式细胞仪检测 Lewis 肺癌细胞的凋亡 ,免疫细胞化学法检测并比较 FasL 在单个核细胞和 CIK 细胞表面的表达 ;用 MTT 法检测抗 FasL 单克隆抗体对 CIK 细胞杀伤 Lewis 肺癌细胞的影响 ;用 ELISA 方法检测 Lewis 肺癌荷瘤小鼠脾细胞上清液中 IL- 2、IL- 4、IFN- γ 和 TNF- α 浓度。结果 电镜观察 :CIK 细胞能促进 Lewis 肺癌细胞凋亡超微结构的改变 ,流式细胞仪检测 :CIK 细胞组凋亡率明显高于对照组 ,FasL 在 CIK 细胞表达增加 ,抗 Fas 单抗可抑制 CIK 杀伤 Lewis 肺癌细胞的活性 ,CIK 细胞治疗的 Lewis 肺癌小鼠脾细胞培养上清液中细胞因子水平明显高于对照组。**结论** CIK 细胞可在体内及体外抑制 Lewis 肺癌细胞增殖 ,诱导肿瘤细胞凋亡 ,Fas/FasL 途径在其中发挥一定作用 ,同时 CIK 细胞抗肿瘤作用可能与淋巴细胞活化和分泌细胞因子有关。

关键词 : CIK 细胞 ;Lewis 肺癌 ;细胞凋亡 ;Fas/FasL ;细胞因子

中图分类号 : R734.2 ;R- 332

文献标示码 : A

Study of inhibitory effects of CIK on Lewis lung carcinoma*

LI Shu-yan¹, ZHANG Chun-jing¹, WANG Shu-ying¹, WU Qi¹, ZHAO Shou-qi¹, PEI Chun-ying²
(1. Department of Biochemistry, Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161042, P.R.China;
2. Department of Immunology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150080, P.R.China)

Abstract : **Objective** To investigate the inhibitory effects of CIK on the proliferation of Lewis lung carcinoma cell line and the growth of transplanted Lewis lung carcinoma in C57BL/6N mice in vivo. **Methods** CIK cells were induced by culturing PBMC with regular method. The proliferation of Lewis lung carcinoma cells was measured by MTT assay. Ultramicrostructure of Lewis lung carcinoma cells was observed under a transmission electron microscope. Flowcytometric analysis was used to detect cell apoptosis. ultrastructural observation expression of FasL were individually determined by MTT and immunocytochemistry (ICC) analysis. IL- 2, IL- 4, IFN- γ and TNF- α were tested by ELISA. **Results** Electron microscopic observations showed that CIK cells could induce the lung carcinoma cells to apoptosis. Flow cytometric analysis demonstrated that apoptosis cells of Lewis lung carcinoma increased in CIK group compared with those in the control group. FasL expression on CIK increased. Cytotoxicity was blocked after addition of anti- FasAb. Level of cytokine in CIK therapy group was higher than that of the control group. **Conclusions** CIK has inhibitory effect on Lewis lung carcinoma cells both in vitro and in vivo. CIK cells can induce the apoptosis of Lewis lung carcinoma cells, and Fas/FasL pathway plays an important role in apoptosis of Lewis lung carcinoma cells by CIK. The CIK therapy is possibly correlated with induction of the activation of the splenic lymphocytes secreting cytokine.

Key words : cytokine induced killer; lewis lung carcinoma; apoptosis; Fas/FasL; cytokine

收稿日期 2007- 05- 21

* 基金项目 : 黑龙江省卫生厅、教育厅基金项目 (No 2005- 335、11513116)

· 2605 ·

目前,在肿瘤生物治疗中,过继性细胞免疫疗法得到了广泛应用。细胞因子诱导的杀伤(cytokine induced killer, CIK)细胞是一种新型、高效的非主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制性的免疫活性细胞,它可以在没有损伤机体免疫功能的前提下,直接杀伤肿瘤细胞,并且增强机体的免疫功能,具有良好的抗肿瘤作用。但有关 CIK 细胞抗肿瘤的机制尚不明确。本文以 Lewis 肺癌为靶细胞,探讨 CIK 细胞杀伤肿瘤细胞的机制及 Fas/FasL 在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

基因重组人 IL-2(美国 Pepro Tech 公司),CD₃ 单抗、基因重组人 IL-1、基因重组人 γ -IFN(北京邦定生物医学公司),RPMI 1640 培养液和新生牛血清(美国 Hyclone 公司),淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品有限公司),Lewis 肺癌细胞(中科院上海生物研究所提供),C57BL/6N 小鼠及 Lewis 肺癌小鼠模型(北京维通利华实验动物技术有限公司提供)。

1.2 实验方法

1.2.1 CIK 细胞的制备及细胞培养 CIK 细胞的制备及细胞培养见文献^[1]。

1.2.2 CIK 细胞对 Lewis 肺癌移植瘤的抑制作用

取 36 只 C57BL/6N 小鼠随机分为 3 组:正常对照组,CIK 细胞尾静脉注射组,生理盐水尾静脉注射组。将 Lewis 肺癌模型小鼠断颈处死后放入 75%酒精中浸泡消毒,在超净工作台上分离瘤体,剪成 1 mm³ 小块接种到 3 组 C57 小鼠右腋下,每只小鼠接种 2 块,使其成为荷瘤鼠。在接种后的第 3 天、第 7 天、第 10 天和第 15 天分别给 3 组每只小鼠尾静脉注射 CIK 细胞 1×10^7 个/0.2 mL,同时给 3 组每只小鼠尾静脉注射 0.2 mL 生理盐水,正常对照组为无接种亦无任何治疗。治疗结束后 5 d,各组小鼠断颈取脾,并测各组瘤重,计算抑瘤率。同时进行脾细胞培养,于 24 h 收集脾上清液测定 TNF- α 的含量,于 48 h 收集上清液测定 IL-2、IL-4 的含量,于 72 h 收集上清液测定 IFN- γ 的含量。

1.2.3 C57 小鼠脾细胞上清液中细胞因子含量的检测 采用 ABC-ELISA 方法分别检测:正常对照组、CIK 细胞尾静脉注射组、生理盐水尾静脉注射组的 C57 小鼠脾上清液中 IL-2 的含量:用抗小鼠 IL-2

单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的 IL-2 与单抗结合,分别加入生物素化的抗小鼠 IL-2 抗体,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合,加入酶底物 OPD,在 495 nm 处测 OD 值,绘制标准曲线,测出样品中 IL-2 浓度。IL-4、IFN- γ 和 TNF- α 的测定方法同上。

1.2.4 透射电镜及流式细胞仪检测 Lewis 肺癌细胞周期及凋亡 取对数生长期的 Lewis 肺癌细胞,按每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,置于 37℃ 5%二氧化碳孵箱中培养,24 h 后细胞贴壁,CIK 细胞为效应细胞,以 Lewis 肺癌细胞为靶细胞,按 20:1 效靶比将效应细胞和靶细胞置于 37℃ 5%二氧化碳孵箱中共育 4 h 后收获 Lewis 肺癌细胞,另设单独 Lewis 肺癌细胞对照组,分别经戊二醛固定,透射电子显微镜超微结构观察。

Lewis 肺癌细胞接种 24 h 后,实验组加入 CIK 细胞,对照组为正常培养的 Lewis 肺癌细胞,于 37℃ 继续培养 72 h 后收集细胞,1500 r/min 离心,PBS 洗涤,20℃ 70%乙醇固定,加入含有 10 μ g/mL PI 和 0.1%RNaseA 的 PBS,避光保存 30 min 后取 1×10^5 个细胞上流式细胞仪检测凋亡率,每个样本至少重复 3 遍。

1.2.5 CIK 细胞 FasL 表达量的检测 二步法免疫组化检测试剂(PV-9000)和兔源多克隆抗 FasL 抗体为北京中山生物技术有限公司产品。取 CIK 和外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)涂片,经 4%多聚甲醛固定后,按试剂盒免疫染色步骤进行操作,用 PBS 代替一抗溶液作阴性对照,以细胞膜和细胞浆中呈现黄色为阳性细胞。每张爬片中观察 5 个高倍视野,随机计数 1000 个细胞中阳性细胞数,并计算 100 个细胞中阳性染色细胞,即标记指数。

1.2.6 抗 Fas 单克隆抗体(anti-FasAb)对 CIK 杀瘤活性的影响^[2] 用 MTT 法检测 anti-FasAb 对 CIK 杀伤 Lewis 肺癌细胞的影响。预先将 anti-FasAb (100 μ mol/L)与 Lewis 肺癌细胞加入 96 孔板中共育 2 h,再以不同效靶比(20:1、15:1、10:1)加入 CIK 细胞。同时设无 anti-FasAb 对照组,每组 3 孔,37℃ 5%二氧化碳孵箱中培养 4 h,MTT 显色法检测 2 组中 CIK 细胞的杀瘤活性。

1.3 统计学处理

数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS10.0 软件进行 t 检验和分析相关直线。以 P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 CIK 细胞对 Lewis 肺癌细胞凋亡的影响

2.1.1 CIK 细胞对 Lewis 肺癌移植瘤的抑制作用

将 Lewis 肺癌细胞复苏后接种于 C57BL/6N 小鼠右腋皮下,接种 14 d 后可见直径约 0.5 cm 的移植瘤生长,接种第 20 天后 CIK 细胞尾静脉注射组的小鼠移植瘤瘤体重量为 (1.34± 1.05)g,对照组的瘤体重量为 (3.45± 1.65)g,生理盐水注射组的瘤体重量为 (3.65± 1.35)g,CIK 细胞组瘤体重量明显低于生理盐水注射组及对照组 (P < 0.01),生理盐水注射组与对照组相比差异无显著性 (P > 0.01)。透射电镜观察,可见对照组 Lewis 肺癌细胞核膜结构清晰、核大、畸形、胞质少、核质比例失调、胞质内有大量线粒体、游离核蛋白体丰富,见图 1A。CIK 实验组细胞体积变小,形态不规则,细胞核皱缩,胞膜完整,胞质浓缩,核异染色质边集、浓缩呈半月形,线粒体空泡化,可见大量凋亡瘤细胞,见图 1B。

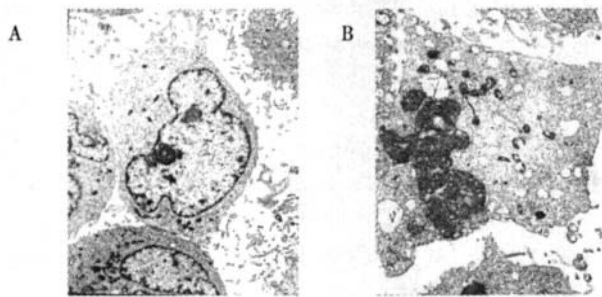


图 1 透射电镜观察 Lewis 肺癌细胞 (× 3 000)

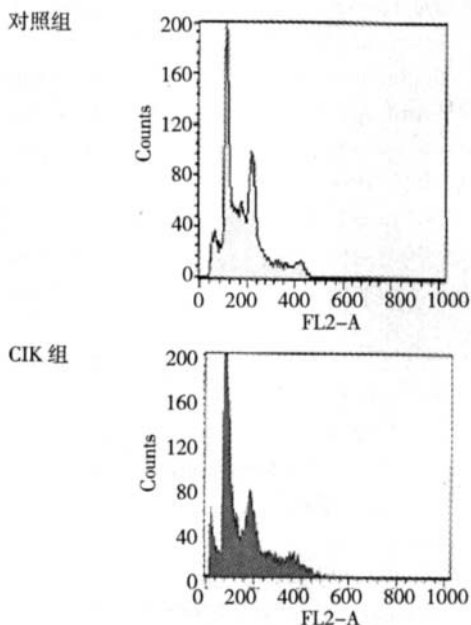


图 2 流式细胞术检测结果

2.1.2 流式细胞术结果 在流式细胞术 DNA 直方图上可见各实验组 G1 峰左侧出现明显的亚二倍体细胞群的峰型(凋亡峰),对照组未见凋亡峰,见图 2。

2.2 FasL 在凋亡中的作用

2.2.1 CIK 细胞 FasL 免疫酶染色 LI 计数 比较 PBMC 和 CIK 细胞 FasL 免疫酶染色 LI 计数。结果显示,CIK 细胞 LI 值明显高于 PBMC 的 LI 值 (P < 0.01),PBS 代替一抗溶液的阴性对照未见阳性染色细胞,见表 1。

表 1 CIK 细胞与单个核细胞 FasL 的标记指数的影响

组别	例数	标记指数 (%)
PBMC 组	6	1.55± 0.25
CIK 实验组	6	7.16± 1.65 [*]

注: *与对照组比较 P < 0.01

2.2.2 抗 Fas 单克隆抗体 (anti-FasAb) 对 CIK 细胞杀瘤活性的影响 利用 MTT 法检测抗 Fas 单克隆抗体 (anti-FasAb) 对 CIK 细胞杀伤 Lewis 肺癌细胞的影响。实验结果如表 2 所示,通过预先将 anti-FasAb 与 Lewis 肺癌细胞共育,阻断了 Fas/FasL 途径,CIK 细胞杀伤 Lewis 肺癌细胞的活性明显下降,见表 2。

表 2 抗 Fas 单克隆抗体对 CIK 细胞杀瘤活性的影响 %

组别	效靶比		
	10	15	20
CIK 组	17.2	25.3	29.5
(CIK+ anti-FasAb) 组	6.2	8.3	10.1

2.3 抗肿瘤治疗对荷瘤鼠脾细胞上清液中细胞因子含量的影响

采用 ABC-ELISA 方法分别检测:正常对照组、CIK 细胞尾静脉注射组、生理盐水尾静脉注射组的 C57 小鼠脾上清液中细胞因子的含量,结果见表 3。

表 3 各组细胞因子的含量 (pg/mL)

组别	IL-2	IL-4	IFN-	TNF-
正常组	10.50± 3.20	20.10± 7.80	29.14± 1.24	19.25± 2.21
CIK 组	21.63± 2.40	19.21± 1.12	35.14± 3.65	25.12± 3.55
生理盐水组	11.51± 1.86	21.12± 5.90	30.14± 6.25	18.21± 6.23

依据数据性质进行 t 检验,各组间两两比较:IL-4 的含量在各组间差异无显著性 (P > 0.05),其他细胞因子含量 CIK 组均高于正常组和生理盐水组 (P < 0.05),正常组和生理盐水组间差异无显著性 (P > 0.05)。

3 讨论

CIK 细胞是一类非主要组织相容性复合物 (MHC) 和非 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 限制性的免疫活性细胞^[3]。目前已经广泛开展了针对多种肿瘤细胞系和活体肿瘤组织应用 CIK 细胞的动物实验和临床前期试验, 并有一些相关报道。体外实验中 CIK 细胞对急、慢性髓系白血病的治疗效果得到肯定^[4]。

CIK 细胞是在体外条件下通过加入不同的细胞因子 (如 IFN- γ 、IL-1、IL-2、CD3McAb) 刺激外周血单个核细胞培养诱导而成, 其主要效应细胞为 CD³⁺CD⁵⁶⁺T 淋巴细胞。WOLF 和 LU^[5] 均发现 CD³⁺CD⁵⁶⁺ 的 CIK 细胞来源于 CD³⁺CD⁵⁶⁺T 细胞而非 CD³⁺CD⁵⁶⁺ 的 NK 细胞。有实验进一步证明 CIK 细胞来源于 CD⁴⁺CD⁸⁺T 淋巴细胞 (CTL), 主要作用是特异性直接杀伤靶细胞。因此, 笔者推测 CIK 杀伤靶细胞的机制与细胞毒 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) 杀伤靶细胞的机制有相似之处。CTL 启动细胞裂解和细胞凋亡 2 种机制杀伤靶细胞, 本文探讨 CIK 细胞是否通过诱导细胞凋亡机制杀伤靶细胞。

有细胞毒作用的 CIK 细胞, 其发挥抗肿瘤作用的机制一方面可能是通过黏附分子 LFA-1/ICAM-1 相互结合后, 分泌大量的 BLT 酯酶的细胞质颗粒, 进而直接穿透封闭的靶细胞膜进行胞吐作用, 导致肿瘤细胞裂解; 同时 CIK 细胞自身还能分泌 IL-2、IL-6、TNF- α 等细胞因子, 提高细胞毒作用^[7], IL-4 主要参与细胞的体液免疫作用。

凋亡是一个受基因调控并依赖 ATP 能量的细胞主动死亡过程。Fas/FasL 是许多细胞表面分子, FasL 是配体, Fas 是其受体。CTL 表面的 FasL 结合靶细胞表面的 Fas 时, 可引起靶细胞的凋亡。CTL-Fas/FasL 细胞凋亡是主要的细胞凋亡机制^[8]。

VERNERIS 等^[9] 认为, 某些肿瘤细胞 (如黑色素瘤、卵巢癌) 通过 FasL 介导 TIL、CTL 凋亡而逃脱免疫清除, 但对 CIK 细胞敏感, 这是因为在 CIK 细胞诱导的过程中, 由于 IFN- γ 等细胞因子的作用或 / 和活化诱导的细胞死亡 (ACID) 机制导致对 Fas 敏感的或已被活化的 T 细胞逐渐被选择性清除, 最后诱导获得的 CIK 细胞便对 Fas 耐受。此外由于细胞型 Fas 相关死亡区域蛋白样白介素 - 1 转换酶抑制蛋白 (cFLIP) 的存在及 Fas 死亡区结合蛋白

(FADD) 水平很低, 影响了死亡信号的传导^[6], 再加上 CIK 细胞高水平表达 Bcl-2、bcl-xL、DADI、survivin 等抗凋亡基因, 这些原因共同导致了 CIK 细胞可以耐受表达 FasL 的肿瘤细胞诱导的凋亡, 从而对其进行有效的杀伤。

总之, CIK 细胞杀伤靶细胞的途径是多方面的, 这些杀伤途径的重要性以及他们之间是否存在着相互联系等还有待于进一步的研究和探讨。

参 考 文 献 :

- [1] 任 欢, 邢淑贤, 徐红薇, 等. CIK 的体外增殖及体内抗肿瘤活性的实验研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6(1): 17-21.
- [2] REN H, XING SX, XU HW, et al. The proliferation profile in vitro and Anti-Tumor effects of CIK cells in vivo and in vitro[J]. Chin J Cancer Biother, 1999, 6(1): 17-21. Chinese
- [3] HISHII M, KURNICK JT, RAMIRAZ-MONTAGUT T, et al. Studies of the mechanism of cytotoxicity by tumour-infiltrating lymphocytes[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 116(3): 338-394.
- [4] HONGENG S, PETVISES S, WORAPONGPAIBOON S, et al. Generation of CD³⁺CD⁵⁶⁺ cytokine-induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells[J]. Int J Hematol, 2003, 77(2): 175-179.
- [5] FLIEGER D, KUFER P, BEIER I, et al. A bispecific diglycine chain antibody directed against EpCAM/CD3 in combination with the cytokines interferon alpha and interleukin-2 efficiently retargets T and CD³⁺CD⁵⁶⁺ natural killer-like T lymphocytes to EpCAM-expressing tumor cells[J]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 49(8): 441-448.
- [6] SCHMIDT-WOLF IG, 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] 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]. J Immunol, 1994, 153(4): 1687-1696.
- [8] MARTEN A, ZISKE C, SCHOTTKER B, et al. Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations[J]. J Immunother, 2001, 24(6): 502-510.
- [9] 徐淑芬, 欧英贤, 魏亚明, 等. 环孢菌素 A 治疗再生障碍性贫血对骨髓细胞凋亡的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(9): 87-89.
- [8] XU SF, OU YX, WEI YM. Fas antigen expression and apoptotic rates of bone marrow cells in aplastic anemia patients treated with cyclosporin A[J]. China Journal of Modern Medicine, 2004, 14(9): 87-89. Chinese
- [9] VERNERIS MR, KORNACKER M, MAILANDER V, et al. Resistance of ex vivo expanded CD³⁺CD⁵⁶⁺ T cells to Fas-mediated apoptosis[J]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 49(6): 335-345.

(张立芳 编辑)