

人外周血淋巴细胞体外诱导培养前后细胞表型与细胞毒活性相关性研究

刘运洪 孟明耀 解燕华 刘莹 魏传钰 侯宗柳*

(昆明医学院附属延安医院中心实验室, 昆明 650051)

摘要 为了分析体外细胞因子诱导培养CIK细胞过程中细胞表型的变化与其杀瘤活性的相关性及为临床过继免疫治疗提供实验依据, 本研究采用体外诱导方法扩增培养正常人外周血淋巴细胞及单个核细胞, 应用流式细胞术测定培养前、培养第7天和第14天的CD3⁺等15种不同表型细胞百分率的变化, 用CCK-8试剂检测第7天和第14天的细胞毒活性。结果显示, 扩增培养后T细胞活化表型的表达和细胞毒活性在第7天最强, 与其细胞表型CD3⁺CD25⁺、CD3⁺CD28⁺、CD3⁺CD25⁺CD28⁺、CD3⁺CD4⁺呈正相关($P < 0.05$), 与CD3⁺CD45RA⁺CD45RO⁺呈负相关($P < 0.05$)。本研究表明测定培养细胞活化相关表型可以间接监测其杀瘤能力, 为临床CIK细胞过继免疫治疗的应用提供实验依据。

关键词 体外诱导; 细胞表型; 细胞毒活性; CIK

近年来, 国内外应用抗人CD3抗体、IL-2等主要刺激因子扩增了多种淋巴细胞, 用于过继免疫治疗, 其中CIK是体外由外周血淋巴细胞在多种细胞因子(IFN- γ 、CD3单克隆抗体、IL-2、IL-1)诱导下大量增殖成为的肿瘤杀伤细胞, 由Hontscha等^[1]首次报道, 其同时表达CD3、CD56两种细胞表型, 是一种新型、高效非MHC限制的免疫活性细胞, 临床试验结果显示具有较好的应用前景。但是对于体外扩增培养后细胞杀瘤机制比如表型与细胞毒活性的相关性研究却并不详细和全面。本研究在应用流式细胞术测定扩增前后15种细胞表型变化的基础上, 用CCK-8试剂检测其杀瘤活性, 分析其相关性, 为临床过继免疫治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 RPMI1640购自美国GIBCO公司; 鼠抗人CD3单克隆抗体购自北京市晶美基因谷科技有限公司; IL-2购自江苏金丝利有限公司; IFN- γ 购自上海克隆生物高新技术有限公司; 检测细胞表型的各种抗体均购自美国BD公司; 胎牛血清购自Hy-Clone公司; 淋巴细胞分离液购自天津瑞灏生物制品科技有限责任公司; 用于细胞增殖实验和细胞毒性实验

的细胞计数试剂盒Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自日本DOJINDO(同仁化学)公司。

1.1.2 淋巴细胞 培养用外周血淋巴细胞来自20名健康志愿者, 年龄结构25~36岁18名, 50~55岁2名, 均男女各半。

1.1.3 肿瘤细胞 肿瘤细胞株SPC-A-1和BGC-823购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。

1.1.4 仪器 流式细胞仪为美国BD公司BD Calibur™FACS, 所采用分析软件有CellQuest、FACSCOMP。酶标比色仪为美国BIO-RAD Model-680。

1.2 方法

1.2.1 外周血淋巴细胞体外扩增 采用孟明耀等^[2]所用的改良RP-MI1640培养基外周血淋巴细胞体外扩增培养方法。

1.2.2 淋巴细胞表型的检测 培养前(0天)取EDTA-Na₂抗凝外周血25 μ l, 分别加入荧光标记抗体10 μ l, 振荡混匀后25 $^{\circ}$ C避光20 min, 加入1 ml溶血素, 振荡混匀, 溶血10 min, 2 000 r/min离心5 min, 去

收稿日期: 2010-12-22 接受日期: 2011-02-21

昆明市科技局重点项目(No.08S090203)和昆明医学院研究生创新基金(No.2009J10)资助项目

*通讯作者。Tel: 0871-3211157, E-mail: hzl579@163.com

上清, 再加入500 μl 的PBS使细胞重悬, 上机检测; 培养后的细胞悬液取50 μl ($1\sim 5\times 10^5/50\ \mu\text{l}$), 分别加入荧光标记抗体10 μl , 振荡混匀后25 $^{\circ}\text{C}$ 避光20 min, 2 000 r/min离心5 min, 去上清, 再加入500 μl 的PBS使细胞重悬, 1 h内上机检测。上机前以标准微球和FACSCOMP软件校正流式细胞仪, 再利用CellQuest软件进行双参数数据获取和分析, 激光光源为15 mW的氩离子激光, 波长为488 nm, 计数 5×10^3 个细胞, 每个标本用同型抗体作阴性对照, 检测各细胞表型的阳性表达率。

1.2.3 细胞毒活性的测定 CIK细胞培养至7天、14天, 取培养细胞检测其对SPC-A-1和BGC-823肿瘤细胞的细胞毒活性。调整肿瘤细胞浓度为 2×10^4 /孔, 96孔板, 每孔100 μl , 按1:5、1:10、1:20的比例与CIK细胞混合, 各浓度均设3个复孔, 同时设单独靶细胞(肿瘤细胞)对照、单独效应细胞(CIK细胞)对照、1640培养基空白对照、CIK培养基空白对照、单独CCK-8溶液阴性对照。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养48 h后, 每孔加入10 μl 的CCK-8溶液, 再培养4 h, 于酶标仪450/630 nm双波长处测定吸光度(OD)值, 按下式计算杀瘤率^[3,4]:

$$\text{杀瘤率}(\%) = [1 - (\text{实验组OD值} - \text{单独效应细胞组OD值}) / (\text{单独靶细胞组OD值})] \times 100\%$$

式中的各OD值均为减去单独CCK-8溶液阴性对照和各自培养基空白对照的值, 其中实验组OD值的培养基空白对照为1640培养基和CIK培养基空白对照的平均值。

1.2.4 统计学处理 使用SPSS11.5统计软件包进行分析, 描述性统计采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$), 成组比较采用 t 检验和方差分析(F 检验), 在方差分析的基础上进行SNK- q 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著意义, 相关性分析采用Spearman分析。

2 结果

2.1 培养不同时间细胞表型变化结果

根据不同细胞表型的作用和意义将其分为: 淋巴细胞经典表型、NK和CIK细胞表型、细胞记忆表型、细胞活化表型四大类分别进行结果表述, 除文中已经说明的, 其他所有变化差异均有显著意义($P < 0.05$)。

2.1.1 培养不同时间淋巴细胞经典表型的变化 外周血淋巴细胞经体外扩增培养后, CD40^+ 细胞从培养

前的(14.57 ± 3.98)%明显下降至第7天的(1.54 ± 0.30)%, 到第14天时下降到很低(0.31 ± 0.22)%; CD3^+ 细胞比例培养第7天就多达(95.53 ± 2.00)%, 基本达到峰值, 而后平稳维持较高水平至第14天高达(99.05 ± 0.37)%, 后7天的变化无显著意义($P > 0.05$); $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ 细胞比例逐渐升高, 在整个培养的前7天和后7天比例增加速率几乎相同, 从培养前的(28.51 ± 7.02)%至第14天时达到(76.10 ± 8.03)%; $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ 细胞先略有升高然后明显降低一半水平, 即从(30.51 ± 6.00)%升到(38.14 ± 8.66)%再降低至(17.17 ± 4.73)%; $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 细胞在培养中一直呈减少趋势, 从(2.71 ± 3.97)%降到第7天的(1.75 ± 0.80)%再降至第14天的(0.96 ± 0.49)%, 培养初末期的降低速率也几乎相同; 另外, 培养过程中始终存在约6%的 $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 细胞, 其变化趋势是先略有降低再略有升高, 其百分率第14天的与培养前的比较无显著意义($P > 0.05$)(图1)。

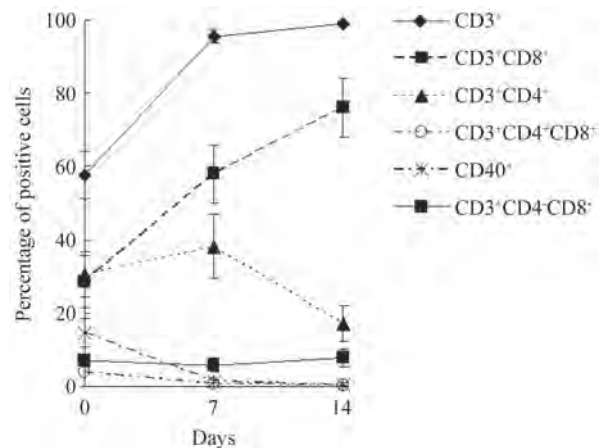


图1 培养不同时间淋巴细胞经典表型的变化

Fig.1 The change of lymphocyte classic phenotypes in different culture time ($\bar{x}\pm s\%$, $n=20$)

2.1.2 培养不同时间NK和CIK细胞表型的变化 经体外扩增培养后, NK细胞($\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$)比例前7天明显降低, 后7天缓慢降低, 即从培养前的(10.60 ± 2.25)%降到(1.84 ± 0.87)%再降低至(0.87 ± 0.25)%, 而CIK细胞($\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$)的比例缓慢升高, 从培养前的(4.67 ± 2.10)%到(5.72 ± 1.79)%再至(27.08 ± 10.86)%(图2)。

2.1.3 培养不同时间细胞记忆表型的变化 经体外扩增培养后, 记忆性T细胞($\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$)的比例在培养开始7天从(29.38 ± 6.23)%明显升至(93.85 ± 2.65)%, 而后平稳维持较高水平, 第14天所占比例

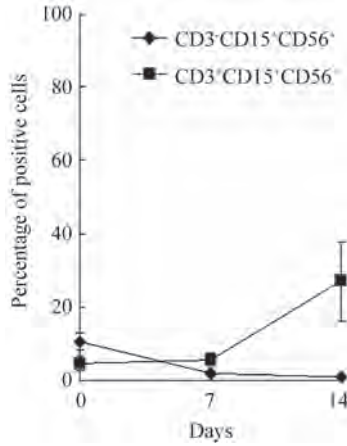


图2 培养不同时间NK和CIK细胞表型的变化

Fig.2 The change of CIK and NK phenotypes in different culture time ($\bar{x}\pm s\%$, $n=20$)

为(94.64±1.73)%, 后7天的变化无显著意义($P>0.05$); 原始T细胞(CD3⁺CD45RA⁺)细胞的比例在培养开始7天明显降低, 后7天略有升高, 即从(68.13±5.29)%降到(46.68±4.12)%再略升至(50.78±4.03)%; 双阳性细胞CD3⁺CD45RA⁺CD45RO⁺细胞培养过程一直缓慢升高, 从培养前的(35.40±3.82)%升到第7天的

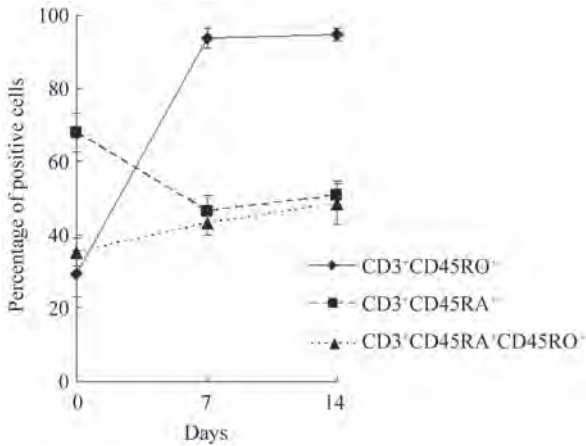


图3 培养不同时间细胞记忆表型的变化

Fig.3 The change of memory cell phenotypes in different culture time ($\bar{x}\pm s\%$, $n=20$)

(43.21±3.36)%再升至第14天的(48.43±5.59)%(图3)。

2.1.4 培养不同时间细胞活化表型的变化 经体外扩增培养后, CD3⁺CD28⁺细胞、CD3⁺CD25⁺细胞、CD3⁺CD25⁺CD28⁺细胞的比例均在培养开始前7天明显升高, 后7天明显降低; CD3⁺HLA-DR⁺细胞的比例在培养开始前7天明显升高, 后7天缓慢升高, 即从(3.08±1.82)%明显升到(74.11±4.92)%再略升至(96.05±2.13)%; CD3⁺CD69⁺细胞也是前7天明显升高, 后7天缓慢升高, 即培养前的(3.51±1.27)%升到第7天(34.94±9.27)%再略升至第14天的(46.67±7.54)%(图4)。

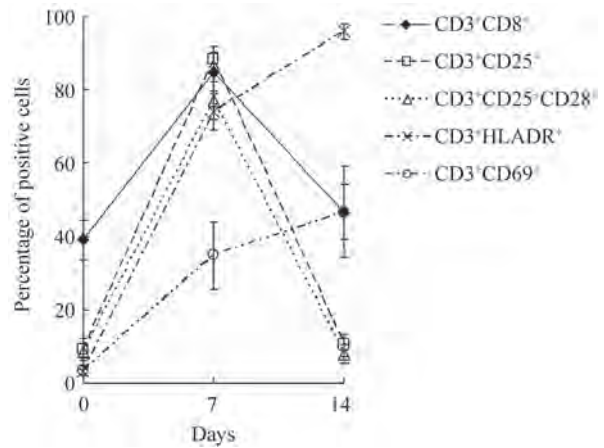


图4 培养不同时间细胞活化表型的变化

Fig.4 The change of active cell phenotypes in different culture time ($\bar{x}\pm s\%$, $n=20$)

2.2 培养不同时间的细胞对肿瘤细胞的杀伤活性

用CCK-8法检测效应细胞在不同培养时间(7天、14天)对SPC-A-1细胞和BGC-823细胞均有杀伤能力, 其中7天的杀伤率明显高于14天($P<0.05$); 对BGC-823细胞的杀伤活性又明显高于对SPC-A-1细胞杀伤活性($P<0.05$), 且随着效靶比的增高, 效应细胞的细胞毒作用明显增强, 在不同效靶比中各组细胞的细胞作用均有差异($P<0.05$)(表1)。

表1 培养不同时间的细胞对肿瘤细胞的杀伤活性

Table 1 Cytotoxic activity of CIK cells against tumor cells in different culture time ($\bar{x}\pm s\%$, $n=8$)

培养时间(天)	CIK对SPC-A-1肿瘤细胞的效靶比			CIK对BGC-823肿瘤细胞的效靶比		
Culture time(d)	E:T ratio of CIK to SPC-A-1			E:T ratio of CIK to BGC-823		
	5:1	10:1	20:1	5:1	10:1	20:1
7	-	68.28±13.82	81.98±11.59	-	75.45±18.65	85.10±14.45
14	15.10±9.38	39.41±8.90	-	13.93±6.21	42.98±17.71	-

2.3 细胞表型与杀瘤活性相关性分析结果

用SPSS11.5软件分析在效靶比1:10时,将SPC-A-1细胞和BGC-823细胞杀瘤率与细胞表型变化进行Spearman相关性分析,结果显示对两种肿瘤的杀伤率都与CD3⁺CD25⁺、CD3⁺CD28⁺、CD3⁺CD25⁺CD28⁺、CD3⁺CD4⁺呈正相关($P<0.05$),与CD3⁺CD45RA⁺CD45RO⁺呈负相关($P<0.05$),其中对SPC-A-1细胞杀伤率与CD3⁺CD25⁺、CD3⁺CD25⁺CD28⁺、CD3⁺CD4⁺呈强正相关($P<0.01$),与CD3⁺CD45RA⁺CD45RO⁺呈强负相关($P<0.01$)(表2)。

表2 细胞表型与杀瘤活性相关性分析

Table 2 The Spearman correlation between CIK phenotypes and cytotoxic activity ($n=8$)

细胞表型 Cell phenotypes	Spearman相关性分析/P值 Spearman correlation/Sig.(2-tailed)	
	对SPC-A-1 肿瘤细胞 to SPC-A-1	对BGC-823 肿瘤细胞 to BGC-823
CD3 ⁺ CD28 ⁺	0.762/0.028	0.738/0.037
CD3 ⁺ CD25 ⁺	0.786/0.021	0.762/0.028
CD3 ⁺ CD25 ⁺ CD28 ⁺	0.762/0.028	0.738/0.037
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	-0.667/0.071	-0.690/0.058
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	-0.595/0.120	-0.548/0.160
CD3 ⁺ CD4 ⁺	0.833/0.010	0.857/0.007
CD3 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	-0.905/0.002	-0.929/0.001

3 讨论

CD3⁺、CD19⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺是淋巴细胞亚群分析的经典,也是目前众多淋巴细胞亚群分析的基础,为了弄清抗原提呈细胞(APC)在体外培养的变化,本实验用抗CD40代替抗CD19检测B细胞,CD40⁺主要表达于成熟B细胞、部分单核细胞等APC细胞,是B细胞表面重要的共刺激分子之一,该分子与T细胞表面CD40L相互作用,对T细胞依赖性的B细胞激活以及阻止B细胞凋亡有重要意义,本研究结果显示,外周血淋巴细胞经体外扩增培养后,CD40⁺细胞比例在培养至第7天时便下降到很低,到第14天时几乎没有,即体液免疫效应细胞减少,而外周血中APC以B细胞为主,因而培养过程中,抗原提呈细胞减少最后基本消失,与张国庆等^[5]报道的CD19⁺变化结果相符;经体外扩增培养后,整个细胞群基本上都是CD3⁺,培养基中的抗CD3抗体和IFN- γ

可促进Tc(T cytotoxic)即CD3⁺CD8⁺细胞的增殖和辅助性T细胞CD3⁺CD4⁺中的Th1细胞增值,IL-2则可同时引起Th1和Th2细胞即CD3⁺CD4⁺细胞增值,本实验CD3⁺CD8⁺细胞比例在整个培养期间增值速率几乎相同,在增多的CD3⁺CD8⁺细胞中,效应性T细胞并未明显增加,但记忆性T细胞却显著增多^[5],这也支持为什么增加的CD3⁺CD8⁺细胞并未导致第14天杀瘤率的比第7天增加,在后续试验中将对效益性CD3⁺CD8⁺细胞和分析。CD3⁺CD4⁺细胞先升高少许然后明显降低,培养前7天整个淋巴细胞群都在快速增值,CD3⁺CD4⁺细胞也在增加,后7天中,CD3⁺CD4⁺细胞可能也在缓慢增加,但是CD3⁺CD8⁺细胞比例继续明显增加导致CD3⁺CD4⁺细胞比例相对减少,也可能是后期某些未知条件导致该细胞群缓慢减少,培养基中的抗CD3抗体和IFN- γ 促进Th1增加,Th1分泌IFN- γ 、IL-2、IL-12,协助Tc对肿瘤细胞进行杀伤,比单独Tc杀瘤能力更强,这可能支持第7天Th1较第14天高,杀瘤相关性分析显示CD3⁺CD4⁺比例与杀瘤率呈正相关,与此相符,也与曹水等^[6]报道相符。另外,培养过程中始终存在约5%的CD3⁺CD4⁺CD8⁺细胞(DNT),该细胞群是在小鼠器官移植模型中被发现,其表型为 $\alpha\beta$ TCR⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD25⁺D28⁺CD30⁺CD44⁺,该亚群细胞能诱导CD8⁺T细胞凋亡发挥抑制性调节作用^[7],在本实验相关性分析显示无明显相关,其具体作用有待后续研究。

经体外扩增培养后,NK细胞比例缓慢降低,而CIK细胞的比例在培养初期缓慢升高,培养后期明显升高,说明本培养体系培养出来的CIK细胞主要在后期增长,以往报道CIK细胞为主要效应细胞,来源于CD3⁺CD8⁺细胞^[8,9],主要作用是通过启动细胞裂解和细胞凋亡两种机制直接杀伤靶细胞^[10,11],本实验中相关性分析却显示CIK细胞的比例与杀瘤率呈无显著相关性,理论上应该有相关性,其原因分析将在后面论述。

培养后,CD3⁺CD45RA⁺细胞比例降低,CD3⁺CD45RO⁺细胞比例则明显升高,实质是从原始T细胞向记忆性T细胞或效应性T细胞转变的过程。因为效应性细胞寿命较记忆性T细胞短,随着时间推移而部分凋亡,而记忆性T细胞在抗原刺激较少的环境中大部分不能迅速活化成效应性T细胞,故后7天慢慢剩下的多数是记忆性T细胞,实验中杀瘤活性在第7天高于第14天与此相符,前7天主要是向

效应细胞转变, 后7天向记忆T细胞转变。另外, 培养细胞中的CD3⁺CD45RA⁺CD45RO⁺双阳性细胞一般是活化的T细胞, 其可能是一种转换的中间状态^[12], 本实验中相关性分析却显示其比例与杀瘤率呈强负相关($P < 0.01$), 目前其具体功能尚不明确。在外周血中CD45RA⁺T细胞接触抗原后CD45RA的表达是可逆的, CD45RA可以在细胞表面再次表达^[13], 本实验CD3⁺CD45RA⁺在培养后期又略有升高估计是此原因。根据本实验相关细胞表型变化推测, 在培养后期, 记忆性细胞是以CD8⁺记忆性细胞为主, 以CD8⁺CD45RO⁺细胞和CD8⁺CD28⁻细胞增加为主^[5], 本实验中CD3⁺CD8⁺细胞比例一直在增加, 而CD3⁺CD28⁺细胞比例先增加后减少, 可以推测本实验中CD8⁺CD28⁻细胞的增加是在培养后期, 与张国庆等^[5]相符。CD28是由二条相同肽链组成的同源二聚体, 表达于90% CD4⁺T细胞和50% CD8⁺T细胞^[14], 因为CD28是协同活化的重要分子, 本实验将其放在细胞活化系列组, 便于分析比较, 实验中CD3⁺CD28⁺细胞培养初期显著增加, 后期又显著降低, 这个变化间接支持前面所述培养初期CD3⁺CD4⁺细胞增加, 后期CD3⁺CD4⁺减少的现象。CD28是协同刺激分子B7的受体, 与B7分子结合产生的协同刺激信号在T细胞活化中发挥重要作用, 该信号可促进T细胞增殖和IL-2的生成, 作用机制包括诱导T细胞表达抗细胞凋亡蛋白(Bcl-x)、刺激T细胞合成IL-2及其他细胞因子, 并促进T细胞的增殖和分化, CD28⁺的高表达对提高效应细胞杀瘤活性有促进作用^[15], 相关性统计分析CD3⁺CD28⁺细胞的变化与此相应。

T淋巴细胞在活化过程中, 会表达一些特殊的分子, 如CD69(较早期)、CD71(早期)、CD25(晚期)、HLA-DR(较晚期)以及黏附分子CD62L和CD44等^[16]。本实验中选用CD69、CD25、HLA-DR来监测效应细胞的活化状态。其中, Radstake等^[17]的研究提示CD69可能通过介导TGF- β 的合成来调节细胞的凋亡, 目前尚未有抗CD69单抗对其它表达CD69的细胞(如T或B淋巴细胞)诱导凋亡的报道, 但很可能是其诱导凋亡的路径尚未发现^[18]。CD25是白细胞介素2受体(IL-2R)的 α 链, 是T淋巴细胞活化和免疫反应启动的重要标志, 在抗原的刺激下, 活化的T淋巴细胞分泌IL-2作用于自身的IL-2R, 通过自分泌作用促进活化细胞的增殖, 对CD25的表达抑制可以抑制T细胞的细胞免疫功能, 抗CD25抗体已被用于移植

手术后的免疫治疗^[19]。HLA-DR是MHC-II类分子的主要抗原之一, 在抗原提呈中起着第一信号作用, HLA-DR在静息的T细胞上表达很弱, T细胞激活时, 其表达显著升高, 与CD69抗原不同, HLA-DR激活标志在T细胞激活晚期表达且表达时间最长。

本实验统计数据结果显示, 在这些细胞活化表型当中, 效应细胞杀伤率与CD3⁺CD25⁺、CD3⁺CD25⁺、CD3⁺CD25⁺CD28⁺呈强正相关($P < 0.05$), 说明本实验结果与以上文献相符, CD28⁺间接反映活化T辅助细胞的数量, CD25⁺的表达反映细胞增殖潜能, 说明效应细胞在其增殖旺盛状态和一定比例活化T辅助细胞存在情况下杀伤能力更强, 而与CIK细胞(CD3⁺CD16⁺CD56⁺)变化关系没有显著相关性, 我们从以下几个方面考虑: 首先, 因为CIK细胞(CD3⁺CD16⁺CD56⁺)来源于CD3⁺CD16⁺的T淋巴细胞, 主要是CD8⁺的T淋巴细胞^[20], 故在培养CIK细胞(CD3⁺CD16⁺CD56⁺)未达到总的培养细胞100%之前, 本体系中效应细胞应该可以分为两种细胞, 一是CD3⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁺即CIK细胞, 二是还未分化成CIK细胞的T细胞, 主要为CD3⁺CD8⁺细胞, 在培养第7天时, CD3⁺CD8⁺细胞占主要比例, 执行效应功能也主要为CD3⁺CD8⁺细胞, CD3⁺CD8⁺被大量激活, 发挥细胞毒活性, 在第7天时, 细胞毒活性最大, 然后细胞的免疫负反馈调节功能发挥作用, 可能的因素包括CTLA-4表达^[21], 抑制性细胞出现, 如CD8⁺Treg细胞^[22], 免疫抑制因子的分泌如IL-10、TGF- β ^[14], CD69的持续表达^[18], 均从一定程度上使“有实际杀伤力的效应细胞”在第7天达到高峰后开始相对减少, 另外, 体外培养的细胞缺少持续的抗原刺激APC细胞减少, 以及辅助细胞如CD4⁺的减少也, 均可导致培养后期细胞毒活性的降低, 这也是DC-CIK共同培养细胞毒活性比单CIK要强的原因^[23,24]。综合以上这些因素, 就能解释为什么杀瘤实验结果表明培养后效应细胞毒活性在第7天最高, 而且, 这与Kuci等^[25]的报道相符, 但本实验检测表型和细胞因子尚还不够具体化, 接下来我们将对具体的某类细胞及相关细胞因子进行具体检测, 以进一步揭示外周血淋巴细胞经体外扩增的变化规律及其杀瘤机制。

综上所述, 20例志愿者外周血淋巴细胞经体外扩增培养后, 所得细胞主要是以CD3⁺细胞为主, CIK细胞比例培养后期明显增多。在细胞培养的14天内

影响杀瘤率的细胞主要是未分化成CIK细胞的T细胞,杀瘤率与其细胞活化状态相关,CIK细胞因细胞比例较低而占次要地位,这与以往认为CIK细胞起主要杀瘤作用的观念不同。此外,在临床实验中不仅要考虑效应细胞的数量,还要实时检测其活化状态,才能达到最佳的治疗效果。

参考文献(References)

- Hontscha C, Borck Y, Zhou H, Messmer D, Schmidt-Wolf IG. Clinical trials on CIK cells: first report of the international registry on CIK cells (IRCC). *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137(2): 305-10.
- 孟明耀, 解燕华, 刘红伟, 刘运洪, 侯宗柳. 改良RPMI1640培养基对CIK细胞增殖的影响. *中国生物制品学杂志* 2010; 23(8): 843-4, 851.
- Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamoto A, Suyama K, Ida S, *et al.* Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. *J Cell Biol* 2008, 181(7): 1065-72.
- 易 屏, 陆付耳, 陈 广, 徐丽君, 王开富. NF- κ B p65在高糖诱导3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗中的作用. *细胞生物学杂志* 2007; 29(6): 875-9.
- 张国庆. 人外周血淋巴细胞体外扩增培养后细胞表型变化及生物学活性的研究. *军医进修学院学报* 2008; 121(5): 12-4.
- 曹 水, 于津浦, 任宝秀, 刘 虹, 张 澎, 郝希山. CD4⁺T细胞在抗肿瘤过继性免疫治疗中作用的研究. *中国肿瘤临床* 2005; 32(14): 795-7.
- Margenthaler JA, Flye MW. The immunologic function of 1B2+ double negative (CD4CD8⁻) T cells in the 2C transgenic mouse. *J Surg Res* 2005; 126(2): 160-6.
- Hara M, Matsuzaki Y, Shimizu T, Tomita M, Ayabe T, Enomoto Y, *et al.* Preoperative peripheral naive/memory ratio and prognosis of nonsmall-cell lung cancer patients. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 13(6): 384-90.
- Wang QJ, Wang H, Pan K, Li YQ, Huang LX, Chen SP, *et al.* Comparative study on anti-tumor immune response of autologous cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells-CIK (DC-CIK), and semi-allogeneic DC-CIK. *Chin J Cancer* 2010; 29(7): 641-8.
- Gritzapis AD, Dimitroulopoulos D, Paraskevas E, Baxevasis CN, Papamichail M. Large-scale expansion of CD3⁺CD56⁺ lymphocytes capable of lysing autologous tumor cells with cytokine-rich supernatants. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51(8): 440-8.
- Zoll B, Lefterova P, Csipai M, Finke S, Trojanek B, Ebert O, *et al.* Generation of cytokine-induced killer cells using exogenous interleukin-2, -7 or -12. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 47(4): 221-6.
- Fujii Y, Okumura M, Inada K, Nakahara K, Matsuda H. CD45 isoform expression during T cell development in the thymus. *Eur J Immunol* 1992; 22(7): 1843-50.
- Beverley PC. Functional analysis of human T cell subsets defined by CD45 isoform expression. *Semin Immunol* 1992; 4(1): 35-41.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*, 6th ed. London: Harcourt Publishers Limited, 2001, 125-7.
- Boomer JS, Green JM. An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(8): a2436.
- Zola H. Markers of cell lineage, differentiation and activation. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000; 14(3): 218-9.
- Radstake TR, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, *et al.* Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGF β expression. *PLoS One* 2009, 4(6): e5981.
- Foerster M, Haefner D, Kroegel C. Bcl-2-mediated regulation of CD69-induced apoptosis of human eosinophils: identification and characterization of a novel receptor-induced mechanism and relationship to CD95-transduced signaling. *Scand J Immunol* 2002; 56(4): 417-28.
- Sageshima J, Ciancio G, Gaynor JJ, Chen L, Guerra G, Kupin W, *et al.* Addition of anti-CD25 to thymoglobulin for induction therapy: delayed return of peripheral blood CD25-positive population. *Clin Transplant* 2010; doi: 10.1111/j.1399-0012.2010.01360.x.
- Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, *et al.* Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol* 1993; 21(13): 1673-9.
- Vahlenkamp TW, Bull ME, Dow JL, Collisson EW, Winslow BJ, Phadke AP, *et al.* B7⁺CTLA4⁺ T cells engage in T-T cell interactions that mediate apoptosis: a model for lentivirus-induced T cell depletion. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 98(3-4): 203-14.
- Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA, Herold KC. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺ Tregs. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2904-13.
- Wang QJ, Wang H, Pan K, Li YQ, Huang LX, Chen SP, *et al.* Comparative study on anti-tumor immune response of autologous cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells-CIK (DC-CIK), and semi-allogeneic DC-CIK. *Chin J Cancer* 2010; 29(7): 641-8.
- 魏绪仓, 翟欣辉, 韩秀蕊, 杨娣娣, 赵文理. DC-CIK细胞的生物学活性及体外抗白血病作用的研究. *中国实验血液学杂志* 2008; 16(5): 1150-3.
- Kuci S, Rettinger E, Voss B, Weber G, Stais M, Kreyenberg H, *et al.* Efficient lysis of rhabdomyosarcoma cells by cytokine-induced killer cells: implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2010; 95(9): 1579-86.

The Correlation Between Phenotypes of Human Peripheral Blood Lymphocytes Induce-cultured *in vitro* and Cytotoxic Activity

Yun-Hong Liu, Ming-Yao Meng, Yan-Hua Xie, Ying Liu, Chuan-Yu Wei, Zong-Liu Hou*

(Key Lab of Kunming Medical College Affiliated Yan'an Hospital, Kunming 650051, China)

Abstract In order to analyze the correlation between the phenotypes of *in vitro* cultured CIK cells and the cytotoxic activity, normal human peripheral blood lymphocytes and mononuclear cells were cultured and the cell percentage variation of 15 different phenotypes was measured by flow cytometry at the culture time points 0, 7 and 14 days. In addition, the cytotoxic activity was tested with CCK-8 reagent. The results indicated that the expression of T cell active phenotypes after amplification and its cytotoxic activity peaked at the 7th day. there is positive correlation ($P<0.05$) with cell phenotype $CD3^+CD25^+$, $CD3^+CD28^+$, $CD3^+CD25^+CD28^+$, $CD3^+CD4^+$ and negative correlation ($P<0.05$) with $CD3^+CD45RA^+CD45RO^+$. Thus, our study shows that determination of related phenotype of activated cells can indirectly monitor their cytotoxic activity to tumor, providing experimental basis for clinical application of adoptive immunotherapy with CIK cells.

Key words cytokine-induced-culture; phenotype; cytotoxic activity; CIK

Received: December 22, 2010 Accepted: February 21, 2011

This work was supported by Key Project of Kunming Science and Technology Bureau (No.08S090203) and Graduate Innovation Fund of Kunming Medical College (No.2009J10)

*Corresponding author. Tel: 86-871-3211157, E-mail: hzl579@163.com