

临床细胞生物学

肝癌肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)体外扩增及特性研究

江珊珊 唐艳 潘科 翁德胜 赵靖靖 何佳 夏建川*

(中山大学附属肿瘤医院生物治疗中心, 广州 510060)

摘要 探讨从原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者的术后肿瘤组织中分离肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL), 并进行体外大量扩增的方法。在该研究工作中, 组织标本来源于术后的肿瘤旁组织, 经过组织破碎、酶消化后, 采用不连续密度梯度离心分离其中淋巴细胞。分离的淋巴细胞先采用大剂量重组人白介素2(IL-2)(2 000 U/mL)进行引发, 然后采用同种异体的外周血单核细胞作为饲养细胞进行扩增。针对9例原发性肝癌术后标本, 所分离的TIL均能成功进行培养扩增, 扩增后细胞数为 $(1\sim 5.5)\times 10^9$ 。扩增倍数为111~572。扩增后的TIL, 表型检测发现CD3+细胞的比例为 $(90.3\pm 9.4)\%$, CD3+CD4+细胞的比例为 $(24.9\pm 14.1)\%$, CD3+CD8+细胞的比例为 $(56.4\pm 20.2)\%$, CD3+CD56+细胞的比例为 $(14.8\pm 12.6)\%$ 。杀伤检测结果显示, 肝癌TIL对非自体肿瘤细胞系HepG2和Bel-7402有较强的杀伤作用。因此, 采用该改良的方法, 原发性肝癌的TIL在体外可以成功进行培养扩增, 并具有较强抗肿瘤活性, 可以作为肝癌术后巩固性免疫治疗的一种手段。

关键词 肝癌; 肿瘤浸润性淋巴细胞; 免疫治疗; 体外扩增培养

In Vitro Culturing and Characteristics of Tumor-infiltrating Lymphocyte of Hepatocellular Carcinoma

Jiang Shanshan, Tang Yan, Pan Ke, Weng Desheng, Zhao Jingjing, He Jia, Xia Jianchuan*

(Department of Biotherapy Center, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

Abstract The aim was to investigate the methods of *ex vivo* expansion of tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) obtained from hepatocellular carcinoma (HCC) biopsy specimens with a rapid expansion protocol. In this study, the specimen of primary liver cancer came from adjacent carcinoma tissues. After crushing and enzymatic digestion, the lymphocytes in the single-cell slurry were separated by density centrifugation. The isolated lymphocytes were triggered with high dose of recombinant human interleukin 2 (IL-2) (2 000 U/mL), then were expanded in large-scale using peripheral blood allogeneic mononuclear cells as feeder cells. Nine primary HCC samples were used to try to isolate and culture the TIL *in vitro*. After two-step culturing, the number of TIL could achieve $(1.0\sim 5.5)\times 10^9$ cells, and the expansion fold was 111 to 572. After expansion, the ratio of CD3+ T cells was $(90.3\pm 9.4)\%$, the ratio of CD3+CD4+ T cells was $(24.9\pm 14.1)\%$, the ratio of CD3+CD8+ was $(56.4\pm 20.2)\%$, and the ratio of CD3+CD56+ was $(14.8\pm 12.6)\%$. Moreover, the TIL showed strong killing activity to HepG2 and Bel-

收稿日期: 2013-11-07 接受日期: 2014-03-18

广东省自然科学基金(批准号: 2011A030400004)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-87343404, E-mail: xiajch@mail.sysu.edu.cn;

Received: November 7, 2013 Accepted: March 18, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No.2011A030400004)

*Corresponding author. Tel: +86-20-87343404, E-mail: xiajch@mail.sysu.edu.cn

网络出版时间: 2014-07-01 16:21

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0367.html>

7402 cell lines *in vitro*. Taken together, the TIL from hepatocellular carcinoma can be successfully cultured and expanded *in vitro*, and with strong anti-tumor activity. It can be served as a means of the candidate immunotherapy for postoperative HCC patients.

Key words hepatocellular carcinoma; tumor-infiltrating lymphocyte; immunotherapy; *ex-vivo* expansion culture

原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一。根据最新统计,全世界每年新发肝癌患者约六十万,居恶性肿瘤的第五位。在我国,肝癌的发病率在十大恶性肿瘤中排名第三,是严重危害人们身心健康的重大疾病之一。肝癌的治疗方法包括手术治疗、介入治疗、化疗、靶向治疗等多种方式,对部分患者有一定疗效,但总体治疗效果并不理想。肝癌患者的生存率目前仍维持在较低水平,手术后五年生存率仅为15%~40%,两年内有62%~82%的患者复发,并最终因为疾病进展而死亡^[1]。因此,探索新的治疗肝癌的有效手段具有重要的临床意义。

免疫治疗是新兴的一种肿瘤治疗方式,已经被列为继手术、放疗、化疗后的第四种治疗方式,在肿瘤的综合治疗中逐渐发挥重要作用^[2]。2010年,美国FDA批准世界上第一个细胞免疫治疗产品Provenge上市,用于晚期前列腺癌的治疗,充分显示出细胞免疫治疗在肿瘤治疗中的价值^[3]。对于肝癌的治疗,一些初步的临床研究表明,细胞免疫治疗对于部分肝癌患者有一定的疗效。因此,在肝癌的综合治疗中,细胞免疫治疗也是一个很有发展潜力的方向。肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)是存在于肿瘤间质内的以淋巴细胞为主的异质性淋巴细胞群体,大多聚集在肿瘤周围或其间质呈套状围绕癌巢。其主要成分是存在于肿瘤间质内的T淋巴细胞,小部分为MHC非限制性的NK细胞,其共同特征为表达T细胞受体(T cell receptor, TCR)。TIL来自肿瘤组织区域,可特异识别自体肿瘤,具有特异的MHC限制性溶解肿瘤活性^[4]。美国NCI的Rosenberg等^[5]首次证实,从实体瘤组织分离的TIL在体外经IL-2激活并大量扩增后,可用于晚期黑色素瘤患者的治疗。其治疗效果远远高于之前发展的LAK(lymphokine activated killer cells)细胞治疗技术。近年来发表的多篇II期临床试验报道显示, TIL细胞免疫治疗可治愈20%~40%的晚期黑色素瘤患者,充分显示出TIL作为一种细胞免疫治疗手段在肿瘤治疗中的潜力^[6]。

目前,由于针对肝癌所鉴定的抗原非常少,因此

发展特异性免疫治疗受到很大限制。之前的研究明确显示,肝癌组织中存在TIL,并且其组成及含量与患者的预后显著相关^[7-8]。由于肝癌组织中的TIL已经接受了肝癌细胞抗原的刺激,具有一定的抗原特异性,因此从肝癌组织中分离TIL,并在体外进行活化及扩增后,可作为一种实用有效的针对肝癌患者的特异性免疫治疗手段。目前,关于肝癌TIL体外激活扩增的报道不多。在本研究中,我们将探讨从肝癌肿瘤组织中分离纯化TIL,并摸索体外大量扩增培养的方法,同时对扩增的TIL进行分子表型及抗肿瘤活性检测,为将来建立肝癌TIL细胞免疫治疗方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 肝癌组织标本和肝癌细胞系

取自外科手术切除的新鲜肝癌组织,选取毗邻肿瘤边界的癌旁组织,共9例,肿瘤组织均有明确的病理诊断。人肝癌细胞株HepG2和Bel-7402来自于中国科学院上海细胞库,采用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基进行传代培养。

1.2 试剂和仪器

X-VIVO-15培养基购自Lonza公司;磷酸缓冲液(PBS)、RPMI1640培养基、CD3单抗、CD28单抗购自Gibco公司;人AB型血清由广州市血液中心提供; rIL-2购自北京四环生物制药公司;胶原酶IV型购自Sigma公司;淋巴细胞分离液购自天津美德太平洋公司;鼠抗人PC5-CD3、PE-CD4、FITC-CD8、PC7-CD56、FITC-CD25等单克隆抗体购自美国BD Biosciences公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂购自美国Promega公司。12孔细胞培养板购自美国Costar公司;CO₂细胞培养箱购自美国Forma Scientific公司;倒置显微镜购自日本Olympas公司。

1.3 实验方法

1.3.1 TIL细胞的分离 取手术切除的无菌新鲜肿瘤癌旁组织浸泡于PBS中,剔除周围的血块、脂肪及坏死组织, PBS清洗一遍,剪成1 mm³大小,浸入

0.1 μg/mL的IV型胶原酶(Sigma-Aldrich)溶液中, 37 °C水浴消化2 h。消化完毕后用100 μm孔径的网筛过滤, 用PBS冲洗组织块, 收集滤液。细胞滤液在室温下离心, 1 500 r/min×5 min。弃上清, 加入1 mL的PBS制成少量细胞悬液后, 用淋巴细胞分离液作不连续密度梯度离心。离心结束后收取下层界面的淋巴细胞, 经PBS清洗后, 按 1×10^6 /mL的浓度悬浮于含10%人AB型血清和rIL-2(2 000 IU/mL)的X-VIVO-15培养基内, 接种于12孔板上, 3 mL/孔。置于37 °C、5% CO₂培养箱内培养, 每3~5 d换液一次。

1.3.2 TIL细胞的培养和扩增 当孔里的淋巴细胞生长至 1×10^7 时, 将其转入含有30 ng/mL的抗CD3单抗、30 ng/mL的抗CD28单抗和 1×10^8 同种异体的经辐照灭活的健康供者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的培养瓶内。健康供者PBMC的辐射剂量是180 Gy。刺激后的第2天加入IL-2, 并调整其在培养液中的浓度为4 000 IU/mL, 于CO₂培养箱中进行连续培养。培养过程中每隔2~3 d半量更换含同等浓度IL-2的新鲜培养基, 培养22~25 d后收获体外扩增的TIL。

1.3.3 流式细胞术检测TIL的免疫表型 取扩增后的TIL细胞, 约 1×10^6 , 经PBS洗涤2次, 200 μL的PBS悬浮, 分别加入4 μL荧光素标记的鼠抗人CD3、CD4、CD8、CD56、CD25及同型对照IgG1的单克隆抗体, 混匀后室温避光孵育20 min, PBS液洗2次, 最后加入4%的多聚甲醛固定, 于流式细胞仪上进行检测。

1.3.4 细胞毒检测 扩增后的TIL细胞和消化的肝癌细胞, 分别计数, 按效靶比30:1、10:1的比例进行混合, 于96孔圆底板内进行培养, 同时设置自发释放

孔和最大释放孔。培养时间约为18 h。取混合培养的细胞上清, 采用LDH检测试剂盒检测LDH释放水平。按照试剂盒说明书的方法计算杀伤活性。

2 结果

2.1 肝癌TIL的体外扩增培养情况

在活化阶段, 应用含有中等剂量IL-2(2 000 IU/mL)和10% AB血清的培养基培养后, 从9例肝癌组织标本中分离的TIL均能在体外适度扩增, 细胞数量达到 $10^6 \sim 10^7$ 数量级。在扩增阶段, 采用抗CD3、CD28单抗和灭活的健康供者的PBMC作为饲养细胞进行刺激培养后, 经过22~25 d的培养, 9例肝癌患者的TIL能快速增长到 $(1.0 \sim 5.5) \times 10^9$ 。在本研究中, TIL的扩增倍数大约为111~572。9例患者的TIL的扩增情况见表1。

2.2 大量扩增后肝癌TIL的免疫表型

9例经两步法扩增的TIL, 经流式细胞分析检测发现, CD3⁺细胞的比例为 $(90.3 \pm 9.4)\%$, CD3+CD4⁺细胞的比例为 $(24.9 \pm 14.1)\%$, CD3+CD8⁺细胞的比例为 $(56.4 \pm 20.2)\%$, CD3+CD56⁺细胞的比例为 $(14.8 \pm 12.6)\%$ (表1)。在TIL前期体外活化(IL-2: 2 000 IU/mL)的第12 d, CD4+CD25⁺的百分率是23.8%。在扩增阶段(IL-2: 4 000 IU/mL), 采用抗CD3、CD28单抗和灭活的健康供者的PBMC作为饲养细胞进行刺激培养后, 第17 d CD4+CD25⁺的百分率是78.3%, 第20 d CD4+CD25⁺的百分率是79.8%, 第24 d CD4+CD25⁺的百分率是67.8%(图1)。以CD4⁺为主的TIL扩增后的表型为, CD3+CD4⁺: 82.8%; CD3+CD8⁺: 11.8%; CD3+CD56⁺: 1.4%(图2)。以CD8⁺为主的TIL扩增后的表型为: CD3+CD4⁺:

表1 各例肝癌TIL的细胞数目、快速扩增倍数及细胞表型

Table 1 Cell number, rapid expansion and phenotype of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with hepatocellular carcinoma (HCC)

TIL编号 TIL No.	扩增倍数 Expansion fold	细胞数目($\times 10^6$) Cell number ($\times 10^6$)		细胞表型(占细胞总数的百分比) Cell phenotype (% of final cells)			
		Initial	Final	CD3	CD4	CD8	CD56
1	111	9	1 000	82.6	3.4	70.5	41.2
2	375	4	1 500	98.9	37.8	56.6	14.5
3	572	7	4 000	98.7	16.8	82	2.2
4	360	15	5 400	98.4	18	75.4	5.7
5	200	10	2 000	83.8	28	29.7	14.7
6	500	5.0	2 500	97	41.3	47.4	9.6
7	196	8.7	1 700	88.8	13.3	61.6	23.9
8	200	6.0	800	74	40.4	27.7	6.9
9	267	7.5	2 000	96	82.8	11.8	1.4

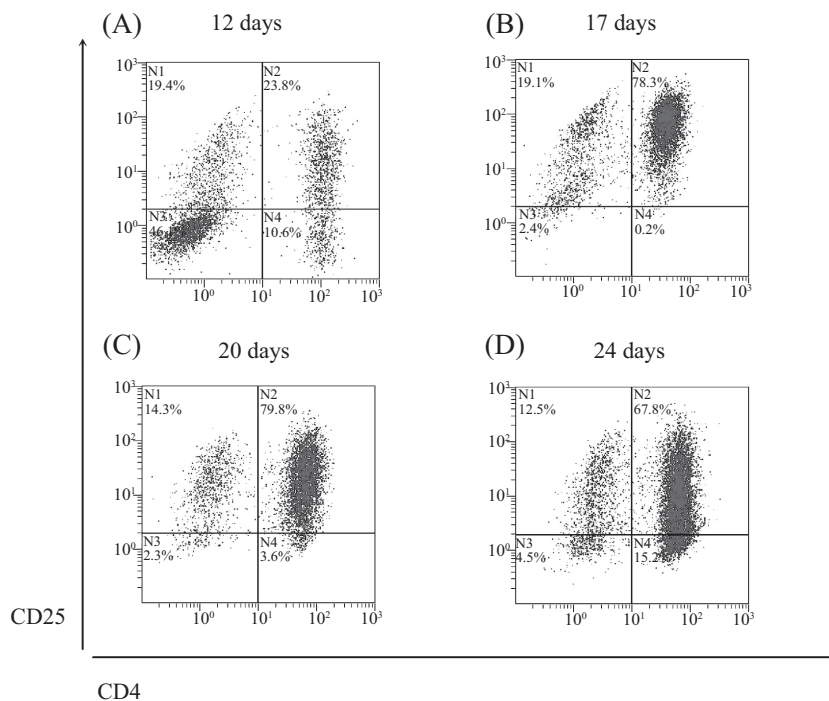
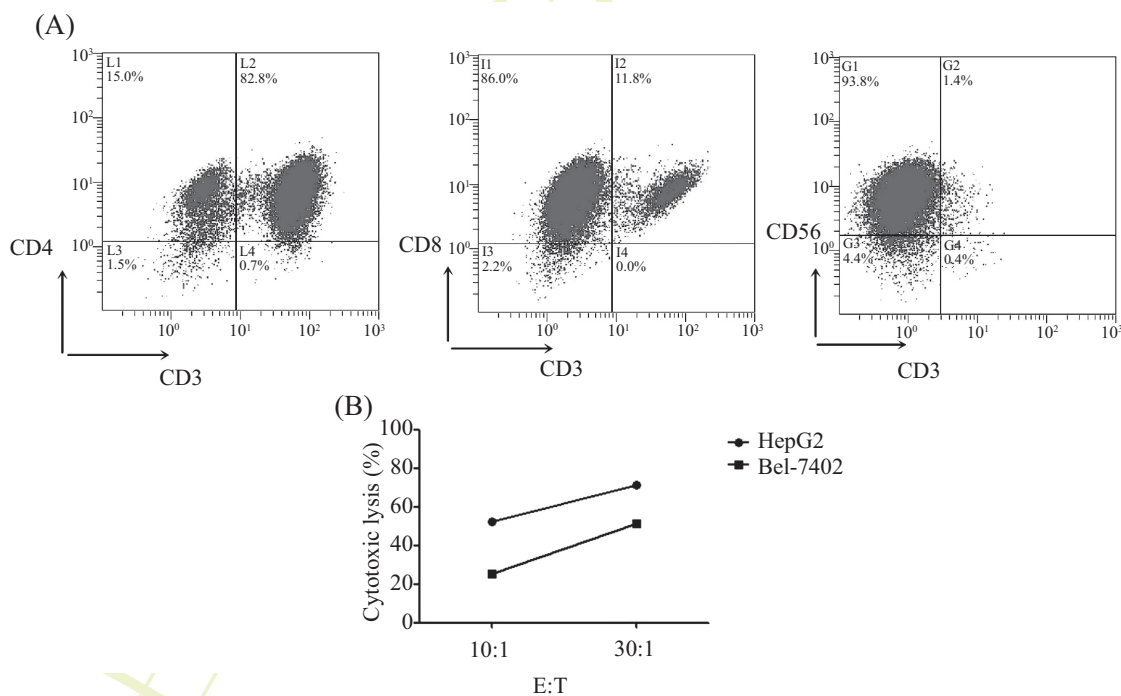
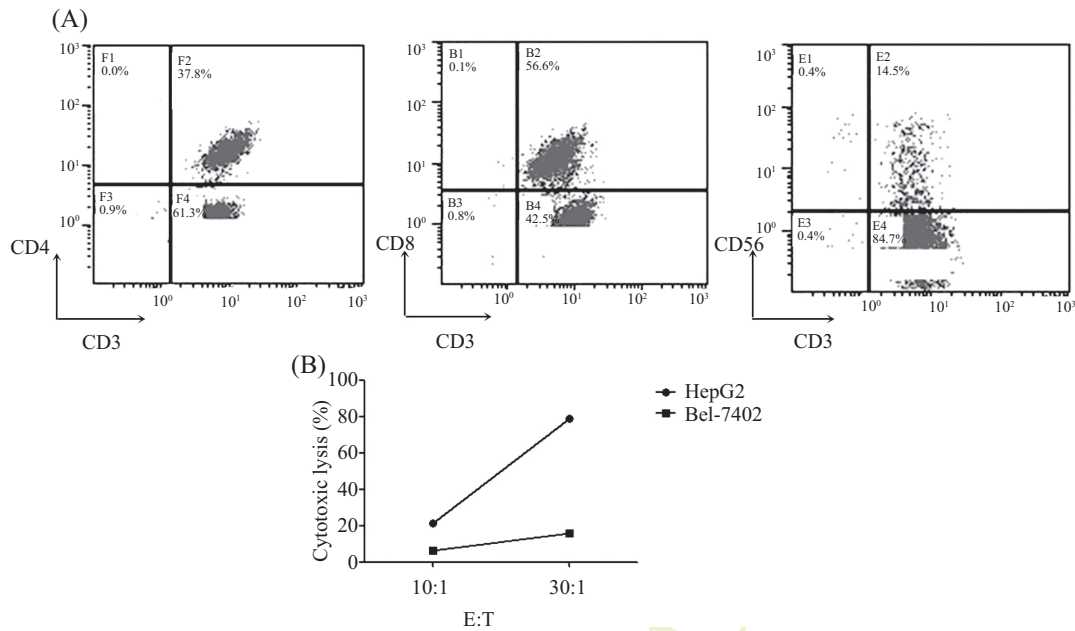


图1 肝癌患者不同天数不同IL-2剂量时TIL细胞中CD4+CD25+的百分率
 Fig.1 The percentage of CD4+CD25+ TIL varying with different days and doses of IL-2



A: 流式细胞仪检测以CD4+为主的TIL细胞的表面抗原CD3、CD4、CD8、CD56的表达; B: 以CD4+为主的TIL对肝癌细胞系的杀伤检测。以CD4+为主的TIL与肝癌细胞系Bel-7402和HepG2混合培养18 h, 用LDH 释放水平检测杀伤活性。
 A: the expressions of CD3, CD4, CD8 and CD56 of CD4+ TIL analyzed by flow cytometer; B: cytotoxic activity of CD4+ TIL to target HCC cell line. CD4+ TIL was incubated with HCC cells Bel-7402 and HepG2 as indicated for 18 h and used for cytotoxicity by LDH assay.

图2 以CD4+为主的TIL的细胞表型和对肝癌细胞系的杀伤检测
 Fig.2 Cell phenotype from CD4+ TIL and cytotoxic activity of TIL from a HCC patient to target HCC cell line



A: 流式细胞仪检测以CD8+为主的TIL细胞的表面抗原CD3、CD4、CD8、CD56的表达; B 以CD8+为主的TIL对肝癌细胞系的杀伤检测。以CD8+为主的TIL与肝癌细胞系Bel-7402和HepG2混合培养18 h,用LDH释放水平检测杀伤活性。

A: the expressions of CD3, CD4, CD8 and CD56 of CD8+ TIL analyzed by flow cytometer; B: cytotoxic activity of CD8+ TIL to target HCC cell line. CD8+ TIL was incubated with HCC cells BEL-7402 and HepG2 as indicated for 18 h and used for cytotoxicity by LDH assay.

图3 以CD8+为主的TIL的细胞表型和对肝癌细胞系的杀伤检测

Fig.3 Cell phenotype from CD8+ TIL and cytotoxic activity of TIL from a HCC patient to target HCC cell line

37.8%; CD3+CD8+: 56.6%; CD3+CD56+: 14.5%(图3)。

2.3 肝癌TIL对 HepG2、Bel-7402细胞株的杀伤作用

采用LDH释放法检测培养24 d的分别以CD4+和CD8+为主的肝癌TIL在效靶比例分别为10:1, 30:1时对肝癌细胞HepG2和Bel-7402的杀伤活性。如图2、图3所示, TIL对非自体瘤细胞也有较强的杀伤作用, 在以CD4+为主的TIL细胞中, 杀伤率在10:1和30:1时分别为52.45%、71.2%(HepG2)和25.3%、51.54%(Bel-7402); 而以CD8+为主的TIL细胞中, 杀伤率在10:1和30:1时分别为21.4%、78.6%(HepG2)和6.4%、15.8%(Bel-7402)。

3 讨论

肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)是继LAK细胞后发现的又一类具有抗癌活性的免疫效应细胞, 其细胞来源是肿瘤组织及癌旁组织中分离的浸润淋巴细胞。TIL的表型以CD4和CD8为主, 因此主要是T淋巴细胞。新鲜分离的TIL抗肿瘤活性低下, 而经过IL-2体外培养或体内激活, TIL的活性可明显增加。在体外IL-2

的刺激下, TIL细胞可快速增殖并可长期传代培养, 所扩增出的细胞80%~90%为成熟的T细胞^[9]。

在国内90年代初期, 宝建中等^[10]在《中华实验外科学杂志》发表的文章中介绍了其培养出肿瘤浸润淋巴细胞的方法, 使用这种方法可以成功地培养出TIL, 但培养出的TIL细胞数还远远不能满足于临床应用。Topalian等^[5]提出一种快速扩增法, 在TIL的培养过程中称为REP(rapid expansion protocol)。这种方法可以使TIL细胞在短期内达到 10^9 ~ 10^{10} 数量级。其主要是使用OKT3(anti-CD3)抗体、IL-2以及经过辐照灭活后的健康供者的单个核细胞作为饲养细胞进行刺激。这种方法可以使TIL的数量达到临床治疗的数量级, 目前在大多数晚期黑色素瘤治疗的临床试验中被采纳。

在本研究中, 我们通过两步法培养建立了一个新的体外大量扩增肝癌TIL的方法。主要是降低了IL-2的用量。有报道指出, 高剂量的IL-2(6 000 IU/mL)作用虽然能够有效地扩增TIL, 但是后续进行回输的时候也必须要辅助注射高剂量的IL-2来维持这些细胞在体内的活性。同时, 高剂量的IL-2容易扩增CD56+的抗原非特异性NK细胞, 而抗原特异性的CD8+的T

细胞含量会相对减少, 这可能不利于TIL在体内发挥更好的抗肿瘤作用。如果能够降低IL-2的用量, 这些问题能够得到一定的解决。我们采用改进的方法进行培养的TIL, 表型检测发现主要以CD3+CD4+细胞和CD3+CD8+细胞为主, 其中以CD8+细胞更甚, 表明我们的培养方法获得了更多抗原特异性的效应T细胞。在癌症患者免疫状况与预后的研究中, 有报道认为, 癌症组织内浸润的CD8+细胞的数量与患者预后呈正相关, 其数量越多, 预后就越好^[1]。Rosenberg等^[12]发现, 富集CD8+ T细胞可以提高TIL细胞杀伤黑色素瘤细胞的功能, 而这些结果提示了我们扩增出来的TIL有很好的抗肿瘤活性。

为了进一步研究肝癌TIL抗肿瘤免疫应答的作用, 我们进行了扩增后肝癌TIL对肝癌细胞株HepG2、Bel-7402的杀伤实验。结果显示, 通过二步法体外扩增出来的TIL不仅能够刺激以CD8+细胞为主的T细胞的大量扩增, 而且对异体肝癌细胞有一定的杀伤活性, 证实我们体外扩增培养的TIL是具有抗肿瘤活性的细胞。

TIL具有抗肿瘤作用强并有一定的靶细胞特异性等优点, 被誉为是继LAK细胞之后的第二代抗肿瘤效应细胞, 有着广阔的临床应用前景。我们后期将在此基础上, 进一步开展原发性肝癌患者术后TIL过继性免疫治疗的临床试验研究, 观察术后患者采用自体TIL进行巩固治疗后, 在预防复发、延长生存时间、改善生活质量等方面的作用, 从而为肝癌患者提供新的治疗手段。

参考文献 (References)

1 Zhu AX. Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: How hopeful should we be? *Oncologist* 2006; 11(7): 790-

800.

- 2 Lizée G, Overwijk WW, Radvanyi L, Gao J, Sharma P, Hwu P. Harnessing the power of the immune system to target cancer. *Annu Rev Med* 2013; 64: 71-90.
- 3 Schellhammer PF, Chodak G, Whitmore JB, Sims R, Frohlich MW, Kantoff PW. Lower baseline prostate-specific antigen is associated with a greater overall survival benefit from sipuleucel-T in the immunotherapy for prostate adenocarcinoma treatment (IMPACT) trial. *Urology* 2013; 81(6): 1297-302.
- 4 Halapi E. Oligoclonal T cells in human cancer. *Med Oncol* 1998; 15(4): 203-11.
- 5 Topalian SL, Muul LM, Solomon D, Rosenberg SA. Expansion of human tumor infiltrating lymphocytes for use in immunotherapy trials. *J Immunol Methods* 1987; 102(1): 127-41.
- 6 Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986; 233(4770): 1318-21.
- 7 Chew V, Tow C, Teo M, Wong HL, Chan J, Gehring A, *et al.* Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2010; 52(3): 370-9.
- 8 Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, *et al.* Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007; 25(18): 2586-93.
- 9 June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest* 2007; 117(6): 1466-76.
- 10 宝建中, 王 一, 詹 洲, 陈 汉, 吴孟超. 人肿瘤浸润淋巴细胞的体外抗瘤活性及其表型特征. *中华实验外科杂志* (Bao Jianzhong, Wang Yi, Zhan Zhou, Chen Han, Wu Mengchao. Research of cytotoxicity and phenotypic features of tumor-infiltrating lymphocytes from human hepatocarcinoma. *Chinese Journal of Experimental Surgery*) 1995; 12(3): 147-8.
- 11 Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(51): 18538-43.
- 12 Dudley ME, Gross CA, Langan MM, Garcia MR, Sherry RM, Yang JC, *et al.* CD8+ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16(24): 6122-31.