

# 树突状细胞与 CIK 细胞共培养诱生的 DCCIK 细胞群对肿瘤的杀伤作用

庄捷 曹晖 刘祥麟<sup>1</sup> 张尚权<sup>2\*</sup>

(上海交通大学医学院附属仁济医院普外科, 上海 200001; <sup>1</sup> 中科英达生物技术有限公司, 上海 201318;

<sup>2</sup> 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

**摘要** 由树突状细胞(DC)与细胞因子诱导的同源杀伤细胞(CIK)的共培养诱生的细胞群(DCCIK)对肿瘤细胞的细胞毒活性的研究。DCCIK 细胞体外杀伤肿瘤靶细胞 A549(MTT 法), 效靶比为 10:1、5:1 时杀伤率分别为 61%、52%。DCCIK 细胞诱导培养 3 周后, 效靶比为 10:1、5:1 时杀伤率分别为 64% 和 56%。数据亦表明 DCCIK 细胞对靶细胞的杀伤优于 CIK 细胞。动物体内实验分荷瘤 A549、BEL7404 和 A375 三组, 每组分(A)DCCIK+化疗、(B)单用化疗。治疗 20 天、35 天后测量各组肿瘤消失率。结果显示: DCCIK+化疗的抑瘤效果明显好于单纯化疗。提示 DCCIK 细胞有临床应用前景。

**关键词** 树突状细胞; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 树突状细胞诱导的细胞因子杀伤细胞; 肿瘤免疫治疗

近年来研究表明, 细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞是重要的免疫效应细胞, 与树突状细胞(DC)进行共培养可以诱生以 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>(NKT)表型为主的 T 杀伤细胞群体(DCCIK)在肿瘤患者免疫治疗中显示了广谱的杀肿瘤细胞作用, 其功能与用外源肿瘤细胞裂介物、肿瘤相关抗原激活的 DC、CIK 细胞共培养的细胞不同, 它不受主要组织相容性复合体(MHC)限制, 且有较强的肿瘤免疫杀伤活性, 还能显著地降低肿瘤病人的免疫耐受性、下降 T 抑制细胞(Treg)的免疫抑制作用及有效地防止患者自身免疫性疾病的产生。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

Balb/c 裸鼠 60 只, 6~8 周龄, 由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所动物房提供, 按标准培养环境条件饲养。用于接种的人肝癌细胞株 BEL7404、人肺腺癌细胞株 A549 和人黑色素瘤细胞株 A375 由中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库提供。AIM-V 培养液购自 Gibco 有限公司; TNF- $\alpha$  购自上海赛达生物药业有限公司; rh-IL-4 购自 Amoytop Biotech。抗癌药物: 丝裂霉素 C、长春新碱酰胺和顺铂由上海交通大学医学院附属仁济医院提供。

### 1.2 方法

1.2.1 外周血单核细胞分离 正常人外周血, 经 Ficoll 分离获得单核细胞(PBMC), 分别诱导培养 DC 与 CIK 细胞。参照张嵩等<sup>[1]</sup>方法进行诱导培养和扩增。

1.2.2 DC 扫描电镜标本制备 取 DC 培养液 0.5 ml, 细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/ml, PBS 洗涤 2 次, 离心 1 000 r/min, 10 min; 以 0.25 ml PBS 重悬, 加样于多聚赖氨酸包被玻片, 室温下静置 10 min; 以 PBS 液缓慢流动轻洗玻片, 置入 3% 戊二醛 4 °C 固定 2 h; PBS 浸洗 2 次, 每次 10 min; 用预冷 1% 锇酸 4 °C 固定 1 h; 再次 PBS 浸洗 2 次, 每次 10 min; 梯度酒精脱水、临界干燥法干燥后镀膜, 电镜下观察。

1.2.3 DCCIK 细胞形态、表型分析 使用 Becton Dickinson 公司 CD3-FITC、CD56-PE 工作液, 分别加入 FACS 试管中, 再分别加  $1 \times 10^6$  个 DCCIK 细胞, 混匀 4 °C 30 min, 离心, 将细胞悬浮于 0.5 ml PBS 中, 进行流式细胞仪测试。

1.2.4 诱导培养 DCCIK 细胞 将分别诱导培养 7 天的 DC 与 CIK 细胞以 1:3 的比例混合, 培养液为 DCCIK 细胞培养液, 每 ml 无血清培养液(AIM-V)加 100 u IL-I, 300 u IL-II, 100 ng  $\alpha$ -Galcer, 10 ng 抗 CD3

收稿日期: 2006-05-29 接受日期: 2006-12-08

上海市科委重大科技攻关计划基金资助项目 (No.05D219311)

\* 通讯作者。Tel: 021-54921431, E-mail: quansz123@hotmail.com

单抗。

**1.2.5 效应细胞 DCCIK 体外杀伤活性分析(以同源 CIK 细胞作为对照), MTT 法** 将诱导培养的 DCCIK 细胞和 CIK 细胞分别加适量培养液, 计数调节细胞密度  $4 \times 10^6$  个/ml, 总量各不少于 22 ml; 经培养液倍比稀释后其密度各分别为:  $4 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^6$  和  $0.5 \times 10^6$  个/ml。靶细胞 A549 的准备: 贴壁生长细胞用胰蛋白酶消化液处理、离心后, 取悬浮细胞用 Hank's 液重复洗涤; 加适量 10% FCS RPMI 1640 悬浮细胞, 计数; 用 10% FCS RPMI 1640 调节细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/ml, 不少于 10 ml。细胞毒活性检测: 接种靶细胞 A549, 按每孔  $2 \times 10^4$  个/100  $\mu$ l, 于 96 孔平底细胞培养板中培养 4 h 上; 按效靶比 10:1、5:1、2.5:1 和 1.25:1 分别加入 96 孔板中, 每 6 孔为同一组效靶比。经效应细胞培养液培养后, 加入 MTT 液, 最后测  $A_{570}$  值。计算杀伤率: 杀伤率 =  $1 - [(ET - E)/(T - C)] \times 100\%$ , T 为靶细胞, E 为效应细胞, C 为空白。

**1.2.6 效应细胞 DCCIK 体内抑瘤实验** 分别接种 A549、BEL7404 和 A375  $1 \times 10^7$  个细胞, 11~15 天内 在接种部位肿瘤生长到 2~6 mm 左右时选取肿瘤生长大小相当, 直径为 2~5 mm 形状规则的裸鼠供治疗实验研究用。荷瘤 A549、BEL7404 和 A375 裸鼠各用 20 只, 实验分 A 和 B 两组: A 为化疗加 DCCIK 细胞组, 各 10 只。B 为单纯化疗药物治疗组, 各 10 只。选用抗肿瘤临床化疗方案腹腔注射给药。给药剂量: 按预试验结果即 1.5 mg/kg 丝裂霉素、0.2 mg/kg 长春新碱酰胺、4 mg/kg 顺铂。DCCIK 细胞免疫治疗的给药途径为腹腔注射。剂量: 每次  $2 \times 10^7$  个 DCCIK 细胞, 共 5 次。总剂量:  $1 \times 10^8$  个细胞。给药程序: 抗癌化疗药物一次性给药, 2 天后给予 DCCIK 细胞实施免疫治疗。每次腹腔注射  $2 \times 10^7$  个细胞, 隔天再次注射, 共 5 次。

**1.2.7 生物学统计** DCCIK 细胞免疫加化疗组和单纯化疗组用药后 20 天和 35 天的抑瘤效应作生物统计学处理, 实验数据使用 SPSS11.0 统计软件分析, 以  $t$  或  $F$  检验。率的比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 DC 形态

DC 扫描电镜制备标本在电镜下观察细胞表面呈绒毛突出层, 随诱导培养时间的延长突出状更为明显(图 1)。

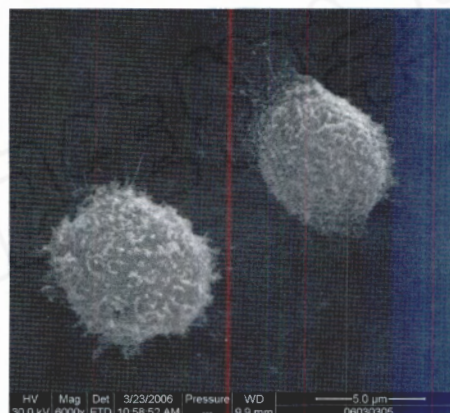


图 1 DC 扫描电镜下树突状细胞的形态



图 2 DCCIK 细胞在相差显微镜下的形态

### 2.2 DCCIK 细胞形态

将培养的 DCCIK 细胞直接置载玻片加盖玻片后在 Nikon 相差显微镜下观察, 细胞均匀透亮(图 2), 经流式细胞仪测试其细胞表型  $CD3^+$  为 97%,  $CD56^+$  为 70% 左右。

### 2.3 DCCIK 细胞、CIK 细胞体外肿瘤杀伤分析

从图 3 和图 4 可见, CIK 细胞和 DCCIK 细胞对 A549 肿瘤靶细胞的杀伤率表明, 培养 2~3 周的 DCCIK 细胞杀伤活性要稍强于同源 CIK 细胞。在效靶比 10:1 的条件下, DCCIK 细胞的杀伤活性均维持在 50% 以上。

### 2.4 DCCIK 细胞的体内抑瘤效应

DCCIK+ 化疗组与单纯化疗组分别于 15~35 天测量肿瘤块大小和缩小的程度, 比较两组的差异。以检测不出瘤块为治愈。计算消失率(表 1)。

### 2.5 用 DCCIK+ 化疗和单纯化疗不同天数后改善带癌裸鼠治疗效果的比较

荷瘤 A549、BEL7404 和 A375 裸鼠(DCCIK+ 化疗)实验组各 10 只, 每组对应对照化疗组各 10 只, 通过生物学统计, 选择饲养 20 天、30 天后计算其显著性差异, 结果分析表明这两种疗法都有一定疗效, 但

表1 DCCIK + 化疗和单纯化疗不同天数后改善带癌裸鼠治疗效果的比较

裸鼠荷瘤名称	组别	15天消失率	20天消失率	25天消失率	30天消失率	35天消失率
A549	A 化疗+DCCIK	30%	20%	25%	20%	20%
	B 化疗组	25%	5%	5%	0%	0%
BEL7404	A 化疗+DCCIK	40%	10%	10%	10%	10%
	B 化疗组	15%	5%	0%	0%	0%
A375	A 化疗+DCCIK	40%	25%	20%	20%	20%
	B 化疗组	20%	0%	0%	0%	0%

荷瘤裸鼠经化疗加 DCCIK, 单纯化疗组治疗按 20 和 35 天来计算与比较肿瘤的消失率。A549 分别为 20%、5%、20%、0%; BEL7404 分别为 10%、5%、10%、0%; A375 分别为 25%、0%、20%、0% 动物实验结果中 DCCIK+ 化疗组对 A549、BEL7404、A375 荷瘤鼠的抑瘤效果明显优于单纯化疗组。

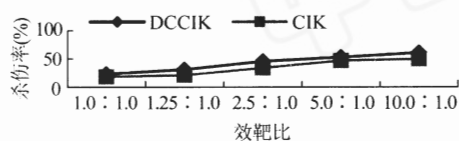


图3 诱导培养 2 周后的 DCCIK 细胞的同源 CIK 细胞分别对人体肺腺癌细胞 A549 杀伤率试验比较

DCCIK 细胞: 当效靶比 10 : 1、5 : 1 时杀伤率分别为 61%、52%;  
CIK 细胞: 当效靶比 10 : 1、5 : 1 时杀伤率分别为 50%、47%。

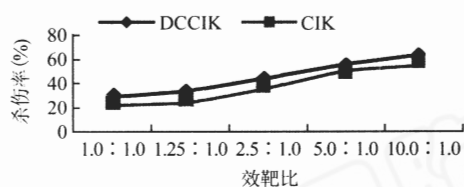


图4 诱导培养 3 周后的 DCCIK 细胞与同源 CIK 细胞分别对人体肺腺癌细胞 A549 杀伤率比较

DCCIK 细胞: 当效靶比 10 : 1、5 : 1 时杀伤率分别为 64%、56%。  
CIK 细胞: 当效靶比 10 : 1、5 : 1 时杀伤率分别为 55%、51%

DCCIK+ 化疗的效果要好于单纯化疗组。提示两者合用有协同抑瘤作用。这为临床的化疗和 DCCIK 的联合应用提供了实验依据(表 2)。

### 3 讨论

1986 年, Schmidt 等<sup>[2]</sup>和 Laner 等<sup>[3]</sup>先后报道用细胞因子从外周血单个核细胞中诱导出具 CD3<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup> 表型的 T 淋巴细胞。此后, Ortaldo 等<sup>[4]</sup>和 Lu 等<sup>[5]</sup>进一步对 CD3<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup> 细胞的特性和来源作了详细研究。后来许多文献称该种细胞表型 CD3<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup> 的 T 细胞为 NKT 细胞。NKT 细胞是细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)中的主要效应细胞。CIK 细胞的经典诱导程序首先由 Schmidt-Wolf 等于 1991 年提出<sup>[6]</sup>。由于 CIK 细胞的增殖活性和细胞毒活性均优于 LAK 细胞而引起肿瘤临床研究者的瞩目。

DC 是迄今发现的抗原加工提呈能力最强的抗原

表2 DCCIK 加化疗和单纯化疗在用药用后 20 天和 35 天后抑瘤效应比较的差异显著性统计

裸鼠荷瘤名称	给药后 20 天	给药后 35 天
BEL7404	$T=2.97$	$T=3.16$
	$P<0.05$	$P<0.05$
A549	$T=3.00$	$T=3.16$
	$P<0.05$	$P<0.05$
A375	$T=3.54$	$T=6.3$
	$P<0.01$	$P<0.01$

给药后 20 天和 35 天的  $P$  值显示: DCCIK 免疫治疗 + 化疗和单纯化疗组在 BEL7404、A549、A375 荷瘤裸鼠治疗中存在显著性差异。

提呈细胞(APC)。体内、外研究均表明 DC 能诱导肿瘤宿主对特异性抗原的免疫应答, 提高肿瘤宿主免疫效应细胞的细胞毒活性。已知 APC 细胞, (特别是 DC)与 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞之间相互作用所诱发的免疫应答是免疫抑瘤效应的中心环节。由于许多肿瘤宿主可能缺乏功能性 DC 而不能诱发抗原特异性 T 细胞应答, 故体外诱导功能性 DC 用于肿瘤的主动免疫治疗是当今肿瘤生物治疗的研究热点之一。

Marten 等<sup>[7,8]</sup>发现, DC 与 CIK 细胞共培养可导致 DC 成熟和 CIK 细胞激活。在共培养体系中, CIK 细胞导致 DC 高表达 DC 特异性 CD80、CD86 等共刺激分子和抗原提呈分子 MHC-I 和 MHC-II, 并促使 DC 大量分泌 IL-12。已知共刺激分子表达上调可增强抗肿瘤免疫应答<sup>[8]</sup>。而 IL-12 能诱导 CIK 细胞分泌 IFN- $\gamma$ , 进一步激活 NKT 细胞和诱导 Th1 型免疫应答<sup>[9]</sup>。

另一方面, Marten 等<sup>[7]</sup>发现在两者的共培养体系中, DC 可促进 CIK 细胞高表达 CD28 和 CD40 及其配体(CD40L), 这对介导 DCCIK 细胞的细胞毒活性具有重要意义。

Marten 等<sup>[8]</sup>用 CA-19-9 抗原肽负载成熟的 DC, 再与 CIK 细胞共培养, 把共培养细胞与同源同期的 CIK 细胞进行比较, 发现其对 CIK 耐受的胰腺癌细胞的杀伤活性有了非常显著的提高, 比未经抗原肽处理

的 DC 与 CIK 细胞共培养的细胞也有提高,提示有经共培养的 CIK 细胞中抗原特异性 CTL 亚群的存在。

Schmidt 等<sup>[10]</sup>通过实验证实 DC 与 CIK 细胞通过共培养可降低 CIK 细胞群中的免疫抑制 T 细胞(Treg 即 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞)而达到削弱 Treg 对抗肿瘤免疫细胞的抑制作用。

实验证实 DC 与 CIK 细胞共培养可使 CIK 细胞群中的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 表型 T 细胞下降(另文章发表)而共培体系中的 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞有所提高,使 DCCIK 细胞的增殖率得到提高,杀伤肿瘤细胞的活性亦明显上升。今已证实当肿瘤患者体内血液循环中存在肿瘤细胞脱落抗原时,DC 同样亦参与抗原提呈及 CIK 细胞激活,能起特异性的抗肿瘤作用。

在文献报告中,与 DC 共培养的 CIK 细胞的细胞毒活性明显大于 CIK 细胞。我们的结果提示,由于与 DC 共培养的 CIK 细胞比同源 CIK 细胞有较高的杀

伤活性和大得多的增殖能力,共培养使两者释放出更多的细胞因子和各种免疫活性物质。因而具有更高的杀瘤活性,这为肿瘤的过继免疫治疗提供了更多更具抑瘤活性的免疫效应细胞。我们认为 DC 与 CIK 共培养所诱生的 DCCIK 细胞制剂具有较高的肿瘤临床价值,可作为配合手术、放化疗治疗肿瘤的辅助手段,在防止肿瘤的转移和复发中发挥作用,并可进一步提高肿瘤患者的生存率,改善他们的生活质量。

### 参考文献 (References)

- [1] 张 嵩等. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27: 315
- [2] Schmidt RE *et al.* *J Exp Med*, 1986, 164: 351
- [3] Lanier LL *et al.* *J Immunol*, 1986, 136: 4480
- [4] Ortaldo JR *et al.* *Cell Immunol*, 1991, 136: 486
- [5] Lu PH *et al.* *J Immunol*, 1994, 153: 1687
- [6] Schmidt-Wolf IG *et al.* *J Exp Med*, 1991, 174: 139
- [7] Marten A *et al.* *J Immunother*, 2001, 24: 502
- [8] Marten A *et al.* *J Immunother*, 2000, 23: 464
- [9] Liebowitz DN *et al.* *Curr Opin Oncol*, 1998, 10: 533
- [10] Schmidt J *et al.* *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53: 1018

## The Immunotherapeutic Antitumor Effect of Dendritic Cells Co-cultured with Cytokine Induced Killer Cells

Jie Zhuang, Hui Cao, Xiang-Lin Liu<sup>1</sup>, Shang-Quan Zhang<sup>2\*</sup>

(General Surgical Department, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001, China;

<sup>1</sup>Shanghai Zhong Ke Biotech Co., Shanghai 201318, China; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China)

**Abstract** To investigate the antitumor effects of DCCIK which is from dendritic cells were co-cultured with the cytokine induced killer cells (CIK). MTT assays were used to compare the cytotoxicity between DCCIK and CIK cells *in vitro*. DCCIK cells showed better antitumor cytotoxic effects than the CIK cells. The anticancer effects of DCCIK combined with chemotherapy or chemotherapy alone which were evaluated by using of these cells to treat the Balb/c nude mice which were implanted the A549 lung cancer, BEL-7404 liver cancer and A375 melanoma cells. Measurement of tumor size after 20 and 35 days of treatment, the result indicated that immunotherapy of DCCIK cells plus chemotherapy had a better antitumor effect than the chemotherapy alone. And it also suggested the DCCIK cells has a potential clinic value.

**Key words** CIK cells; dendritic cells; DCCIK cells; antitumor immunotherapy

Received: May 29, 2006 Accepted: December 8, 2006

This work was supported by the Shanghai Municipal Science & Technology Commission (No.05D219311)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-54921431, E-mail: quansz123@hotmail.com