

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.29.001

热休克人羊膜间充质干细胞提取物与杀伤细胞共培养及抑瘤效应评价*

李培义, 李 宁, 王 雪, 张川骏, 李 菲, 罗 清[△]
(遵义医学院附属医院胸部肿瘤科, 贵州遵义 563000)

[摘要] **目的** 将热休克人羊膜间充质干细胞(hAMSCs)提取物与细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)共培养,以期提高早期 CIK 的增殖、分泌细胞因子及体外杀伤等能力,为得到高质量 CIK 提供研究基础。**方法** (1)从外周血单个核细胞中常规诱导培养 CIK;(2)热休克处理 hAMSCs(42 °C, 1 h),48 h 后收集上清液及胞内物质,将提取物与第 10 天 CIK(370 μg : 2×10⁶ 个)共培养;(3)计数第 12、14、17 天 CIK 细胞数,绘制生长曲线;(4)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞因子白细胞介素(IL)-2、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、干扰素 γ(IFN-γ)的分泌量;(5)MTT 法检测 CIK 对 A549 的体外杀伤活性。**结果** (1)加入 hAMSCs 提取物的实验组增殖速度明显高于对照组,第 12、14、17 天 CIK 细胞数分别为[(5.26±0.01)×10⁵/mL vs. (5.60±0.00)×10⁵/mL]、[(6.26±0.23)×10⁵/mL vs. (9.37±0.15)×10⁵/mL]、[(8.10±0.75)×10⁵/mL vs. (11.00±1.67)×10⁵/mL],差异有统计学意义($P<0.05$);(2)ELISA 结果表明,hAMSCs 提取物对早期 CIK 细胞分泌细胞因子有一定促进作用,两组第 14 天 IL-2、TNF-α、IFN-γ 量(pg/mL)分别为(13.49±0.78 vs. 15.49±3.47)、(53.52±5.52 vs. 33.83±15.61)、(60.68±19.39 vs. 50.24±18.89),差异无统计学意义($P>0.05$);(3)MTT 结果:对照组与实验组 IC₅₀ 分别为(38.60±18.63 vs. 25.62±8.39),差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 成功将热休克 hAMSCs 提取物与 CIK 共培养;共培养后显著促进了早期 CIK 的增殖活性。

[关键词] 杀伤细胞;人羊膜间充质干细胞;A549 肺腺癌细胞;热休克**[中图分类号]** R736.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)29-4033-03

The co-culture of CIK cells with heat-shock hAMSCs' extract and the evaluation of anti-tumor effectation*

Li Peiyi, Li Ning, Wang Xue, Zhang Chuanqin, Li Fei, Luo Qing[△]

(Department of Thoracic Oncology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective** To improve the proliferation, secretion of cytokines and in vitro killing of CIK cells, and to provide the basis for the study of high quality CIK cells, heat shock hAMSCs extract and CIK cells were co-cultured. **Methods** (1) Conventional induction culture CIK cells from peripheral blood mononuclear. (2) Processed hAMSCs by heat shock in 42 °C water bath for 1 h, then collected supernate and extracted of hAMSCs after a 48 h incubation in 37 °C, 5% CO₂, co-cultured the heat shock hAMSCs' extract with CIK cells (in a proportion of 370 μg : 2×10⁶). (3) the CIK cells number of 12, 14, 17 d were counted, the growth curve drawn. (4) The secretion levels (pg/mL) of IL-2, TNF-α and IFN-γ were tested by ELISA method. (5) The CIK's cytolytic activity to A549 cells were tested by MTT assay. **Results** (1) The experimental group joined the proliferation rate of hAMSCs extract was significantly higher than the control group, control group and experimental group 12, 14, 17 d of cell were[(5.26±0.01)×10⁵/mL vs. (5.6±0.00)×10⁵/mL], [(6.26±0.23)×10⁵/mL vs. (9.37±0.15)×10⁵/mL] and [(8.10±0.75)×10⁵/mL vs. (11.00±1.67)×10⁵/mL], respectively($P<0.05$). (2) The results of ELISA showed that hAMSCs extract on early stage of CIK cells secrete cytokines could promote ability, the secretion levels (pg/mL) of IL-2, TNF-α and IFN-γ were (13.49±0.78 vs. 15.49±3.47), (53.52±5.52 vs. 33.83±15.61) and (60.68±19.39 vs. 50.24±18.89), respectively ($P>0.05$). (3) The results of MTT showed that, IC₅₀ in control group and experimental group were 38.60±18.63 and 25.62±8.39, respectively ($P>0.05$). **Conclusion** We co-culture the CIK cells with heat-shock hAMSCs' extract successfully; and the new method promoted the plication capacity of CIK.

[Key words] cytokine induced killer cells; human amniotic mesenchymal stem cells; A549 lung adenocarcinoma cells; heat shock

肿瘤的形成是多个因素共同促进的复杂过程,其中免疫功能的缺陷是肿瘤发生、发展的必要条件;改善肿瘤患者的机体免疫系统是其治疗的关键,细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cells, CIK)治疗作为一种细胞过继免疫疗法,间

接改善肿瘤患者的免疫环境,通过免疫细胞直接杀伤肿瘤,不良反应低,适用范围广,在抗肿瘤治疗中显示了一定的优势^[1-3]。它是将人外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子诱导并大量扩增的一群异质细胞。CIK 抗肿瘤治疗的关键在于

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260397);贵州省科技厅科学技术基金资助项目(黔科合 J 字[2013]2331 号);遵义市科技局省市联合项目基金资助项目[遵科合人(2014)9 号];贵州省教育厅高校优秀科技创新人才支持计划基金资助项目(黔教合 KY 字[2015]495);遵义医学院博士启动基金资助项目[0060616]F-616]。作者简介:李培义(1988-),医师,硕士,现工作于贵阳中医学院第一附属医院特检科,主要从事胸部肿瘤诊疗的研究。△ 通讯作者, Tel: (0851)28608074; E-mail: luqing730@126.com。

如何培养获得持久增殖能力、高杀伤力的 CIK 细胞。目前,关于 CIK 的培养方法有很多,迄今国内对 CIK 培养技术还没有统一的规范,各家都有不同的报道:有利用肿瘤抗原负载 DC 活化 CIK,选取不同来源的 CIK,采取不同分离方式提取 CIK,加入外源性刺激物提高 CIK 抗瘤效应^[4-9]。笔者期望在 CIK 传统培养过程中加入一外源性刺激物,改进早期 CIK 的增殖能力、分泌细胞因子量(间接途径)、直接杀瘤效应、促凋亡能力等方面的能力。目前,研究较热门的是人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs),它是一种具有多分化潜能的干细胞,能分泌多种细胞因子,具有免疫调节作用,细胞增殖能力强,来源广泛,取材方便,无伦理限制等优势;hAMSCs 在多个领域都显示出了可观的价值^[10-12],笔者期望将 hAMSCs 与 CIK 共培养获得更优质的 CIK 细胞。

1 材料与与方法

1.1 材料 A549 人肺腺癌细胞株来源于中科院肿瘤细胞库;hAMSCs 由遵义医学院细胞工程实验室提供;RPMI Medium 1640、DMEM 购自美国 gibco 公司;细胞因子 rhIL-1 β 、rhIL-2、PegIFN- α 2a 均购自英国 Peprotech 公司;LEAFTMPurified anti-human CD3 购自美国 BioLegend 公司;细胞因子酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自深圳达科为生物工程有限公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物。

1.2 方法

1.2.1 CIK 的提取与培养 取人外周血 30 mL 于离心管中,加入等量的磷酸盐缓冲液(PBS)37 °C 预热混匀后,加入含人外周血淋巴分离液的离心管中(血液和淋巴分离液的比为 1:2),2 000 r/min 离心 25 min,自然下降减速,离心后吸取第 2 层环状云雾状白色淋巴细胞, PBS 洗涤收集。以 1640 完全培养基,密度(4~6) $\times 10^6$ /mL, 孵箱中静置 2 h,收集非贴壁细胞,调整细胞浓度为(1~2) $\times 10^6$ /mL,同时加入 PegIFN- α 2a (1 000 U/mL),第 2 天加入白细胞介素(IL)-1(100 U/mL)、

IL-2(1 000 U/mL)、CD3 单抗(50 ng/mL),隔天添加新鲜 1640 完全培养基,每隔 3 d 补加 IL-2(1 000 U/mL),倒置显微镜下观察细胞形态及生长情况。

1.2.2 热休克处理 hAMSCs 取第 4 代 hAMSCs, 42 °C 热休克 1 h 后,孵箱静置 48 h,收集上清液 0.22 μ mol/L 滤膜过滤,-20 °C 保存,备用;反复冻融法提取热休克后 hAMSCs 内含物,0.22 μ mol/L 滤膜过滤除菌,-20 °C 保存备用。

1.2.3 CIK 与热休克 hAMSCs 提取物共培养 在培养第 10 天的 CIK 上清液中加入热休克 hAMSCs 提取物(CIK:热休克 hAMSCs 提取物为 2×10^6 个:370 μ g),常规培养,设为实验组。

1.2.4 CIK 扩增速度比较 分别计数第 12、14、17 天对照组(CIK)、实验组(热休克 hAMSCs+CIK)细胞数,并绘制生长曲线,对增殖情况进行统计和比较。

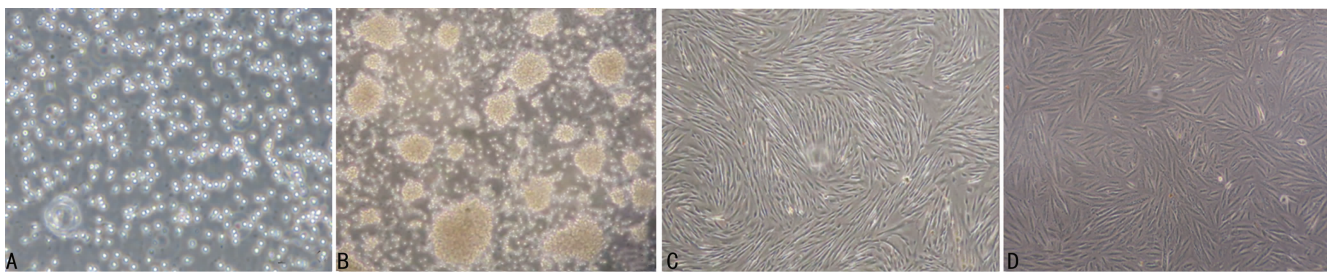
1.2.5 CIK 分泌细胞因子比较 收集第 14 天 CIK 上清液,按 ELISA 试剂盒说明书检测 CIK 上清液细胞因子 IL-2、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)水平。

1.2.6 CIK 杀伤活性比较 取第 14 天的 CIK 与对数生长期的 A549,按 CIK:A549 效靶比 5:1、10:1、20:1 共培养 24 h 后,MTT 法计算 CIK 对 A549 的杀伤率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,每组实验均重复 3 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异的比较用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 镜下观察 CIK、hAMSCs 及 A549 肺腺癌细胞形态 CIK 在镜下呈圆形,胞质饱满透亮,悬浮,集落样生长,黏附性强(图 1A、B);第 4 代 hAMSCs,细胞均贴壁生长,细胞间排列紧密,胞体拉伸,呈梭形,单层放射状或漩涡状生长(图 1C);A549 细胞贴壁生长,多呈梭形,伴伪足伸出(图 1D)。



A:2 d CIK($\times 100$);B:10 d CIK($\times 4$);C:hAMSCs($\times 100$);D:A549($\times 100$)。

图 1 CIK、hAMSCs、A549 细胞形态

2.2 热休克 hAMSCs 提取物促进 CIK 增殖 第 12、14、17 天对照组及实验组 CIK 细胞数均随培养时间的推移呈明显的扩增趋势,实验组 CIK 增殖速度明显高于对照组,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、图 2。

表 1 两组不同时间点 CIK 细胞数($\bar{x} \pm s, n=3, \times 10^5$ /mL)

时间(d)	对照组	实验组	P
12	5.26 \pm 0.01	5.60 \pm 0.00	0.18
14	6.26 \pm 0.23	9.37 \pm 0.15	0.00
17	8.10 \pm 0.75	11.00 \pm 1.67	0.03

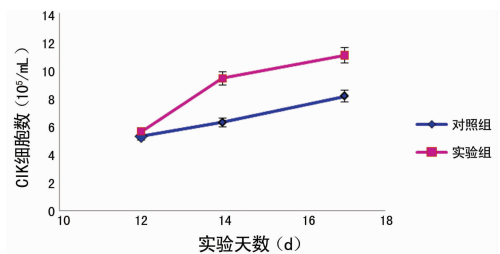


图 2 两组 CIK 增殖曲线

2.3 热休克 hAMSCs 提取物对 CIK 分泌细胞因子 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 的影响 第 14 天对照组及实验组上清液中分

泌的细胞因子 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 水平比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 2。

表 2 两组 CIK 分泌的细胞因子水平 ($\bar{x}\pm s, n=3, \text{pg/mL}$)

细胞因子	对照组	实验组	P
IL-2	13.49 \pm 0.78	15.49 \pm 3.47	0.193
IFN- γ	53.52 \pm 5.52	33.83 \pm 15.61	0.108
TNF- α	60.68 \pm 19.39	50.24 \pm 18.89	0.271

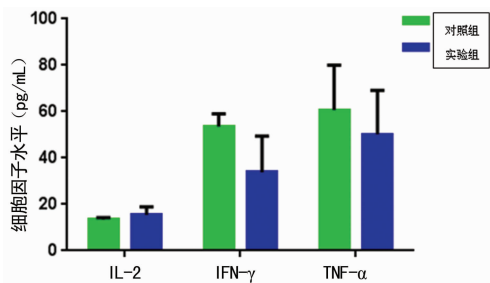


图 3 两组 CIK 分泌的细胞因子水平

2.4 MTT 法检测 CIK 对 A549 肺腺癌细胞的杀瘤活性 将第 14 天对照组及实验组 CIK 与 A549 肺腺癌细胞按 5 : 1、10 : 1、20 : 1 效靶比共培养 24 h, CIK 对 A549 的抑制率 (%) 分别为 (9.86 \pm 2.55 vs. 12.64 \pm 3.00)、(27.25 \pm 9.34 vs. 30.81 \pm 8.22)、(37.17 \pm 4.59 vs. 25.62 \pm 8.39), 从结果可以看出在相同效靶比下实验组 CIK 对 A549 的抑制作用均高于对照组, 且随着效靶比的增高, CIK 的杀伤效应也在增加, IC₅₀ (38.60 \pm 18.63 vs. 25.62 \pm 8.39), 两组差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

表 3 CIK 对 A549 肺腺癌细胞的抑瘤作用 ($\bar{x}\pm s, n=3, \%$)

CIK : A549	杀伤活性		P
	CIK	CIK + 热休克 hAMSCs	
5 : 1	9.86 \pm 2.55	12.64 \pm 3.00	0.144
10 : 1	27.25 \pm 9.34	30.81 \pm 8.22	0.323
20 : 1	37.17 \pm 4.59	45.15 \pm 5.77	0.067

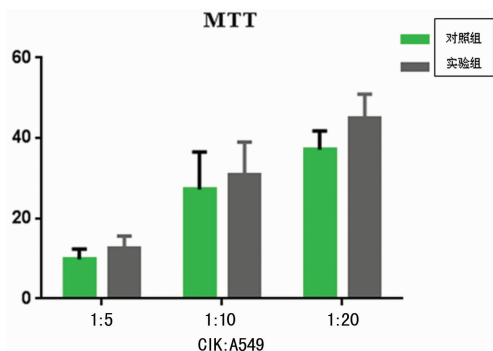


图 4 MTT 检测两组 CIK 对 A549 的抑制率

3 讨论

笔者对培养第 10 天的 CIK 进行了新方法的处理, 在第 14 天对其进行增殖能力、分泌细胞因子水平、体外杀伤活性、诱导凋亡能力的检测, 评估新方法(加入热休克 hAMSCs 提取物)是否提高了早期 CIK 的上述功能。为了使 hAMSCs 对淋巴细

胞发挥促进作用, 笔者将 CIK 与低剂量的热休克 hAMSCs 提取物共培养, 同时为获得最大量的热休克蛋白, 作者参照了 Moloney 等^[13]对 hAMSCs 热休克的研究, 将 hAMSCs 热休克处理, 该研究显示间充质干细胞进行非致死性 42 °C 热休克处理 60 min 后, 37 °C 孵箱静止 48 h 后 Hsp70、Hsp27 等热休克蛋白达到最大表达量。

采用新方法处理 CIK 后, 热休克 hAMSCs 提取物处理后的 CIK 增殖趋势明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。说明热休克 hAMSCs 提取物能促进 CIK 的增殖。这一结果符合笔者的预期, 间充质干细胞能修复和促进外周血单个核细胞的增殖能力, 也能改善状态较差的淋巴细胞活性^[14-15]; hAMSCs 热休克后分泌的热休克蛋白, 能促进抗原特异性 CD4⁺ 细胞增殖; 另外, Li 等^[15]在研究中提到 hAMSCs 对淋巴细胞既有抑制作用也有促进作用, 发挥何种作用取决于 T 细胞与 hAMSCs 的数集比和一氧化氮(NO)、indoleamine 2,3-dioxygenase(iDO)的水平, 低数集比及 NO、iNOS 受抑制时 hAMSCs 对 T 淋巴细胞表现为免疫促进作用。因此, 采用热休克处理 hAMSCs, 改变了其胞内环境, 阻断了 hAMSCs 中 NO 和 iDO 的作用, 进而能提高免疫细胞的增殖活性, 在 NO 和 iDO 被阻断的条件下, 也就增强了 T 淋巴细胞的活性及机体的免疫反应。这一发现, 为临床上更早期的获得一定数量的 CIK 打下了重要的实验基础。

此外, 在本研究中, 笔者还检测此方法下对于 CIK 体外杀伤活性及 CIK 诱导凋亡能力的影响。结果显示, 实验组的杀瘤效应优于对照组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 在 CIK 分泌细胞因子水平的实验中, 两组的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。针对这一结果, 笔者考虑存在以下几点可能: (1) 选取第 14 天的 CIK 作为检测的时间点太早, 未达到 CIK 对肿瘤细胞的最大杀伤效应及分泌细胞因子的最优时间, 可在今后的实验考虑延长 CIK 的培养时间, 检测多个时间点下 CIK 的杀瘤能力及促细胞因子分泌能力; (2) 热休克 hAMSCs 提取物中 NO 和 iDO 对淋巴细胞存在一定的抑制作用, 热休克 hAMSCs 提取物与 CIK 共培养比例在后续工作中还将继续深入探索, 设置多个热休克 hAMSCs 提取物与 CIK 的数集比, 或加入 NO 和 iDO 阻断剂, 减少其对淋巴细胞的抑制作用。

综上所述, 笔者采用热休克 hAMSCs 提取物与早期 CIK 细胞进行共培养, 明显刺激了早期 CIK(第 10 天)的增殖活性, 此方法为继续获得数量更多、杀伤活性更强、不良反应更小的 CIK 提供了重要的实现途径。笔者还将继续优化此方法, 持续深入探索和改进 CIK 的制备工艺。

参考文献

[1] Martin PJ. CIK: A path to GVL without GVHD[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2011, 17(11): 1571-1572.

[2] Niam M, Linn YC, et al. Clinical scale expansion of cytokine-induced killer cells is feasible from healthy donors and patients with acute and chronic myeloid leukemia at various stages of therapy[J]. Exp Hematol, 2011, 39(9): 897-903.

[3] Schmeel LC, Schmeel FC, Coch C, et al. Cytokine-induced killer(CIK) cells in cancer immunotherapy: Report of the International Registry on CIK cells (IRCC)[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(5): 839-849. (下转第 4040 页)

- 1684.
- [3] Liu HT, Huang P, Ma P, et al. Chitosan oligosaccharides suppress LPS-induced IL-8 expression in human umbilical vein endothelial cells through blockade of p38 and Akt protein kinases[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(4): 478-486.
- [4] Wang H, Brown J, Gu Z, et al. Convergence of the mammalian target of rapamycin complex 1- and glycogen synthase kinase 3-beta-signaling pathways regulates the innate inflammatory response[J]. *J Immunol*, 2011, 186(9): 5217-5226.
- [5] Sarelius IH, Glading AJ. Control of vascular permeability by adhesion molecules[J]. *Tissue Barriers*, 2015, 3(1/2): e985954.
- [6] Qiu HN, Wong CK, Chu IM, et al. Muramyl dipeptide mediated activation of human bronchial epithelial cells interacting with basophils: a novel mechanism of airway inflammation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 172(1): 81-94.
- [7] Fruman DA, Bismuth G. Fine tuning the immune response with PI3K[J]. *Immunol Rev*, 2009, 228(1): 253-272.
- [8] Nandan D, Camargo de Oliveira C, Moenrezakhanlou A, et al. Myeloid cell IL-10 production in response to leishmania involves inactivation of glycogen synthase kinase 3beta downstream of phosphatidylinositol-3 kinase[J]. *J Immunol*, 2012, 188(1): 367-378.
- [9] Kim MG, Yang JH, Kim KM, et al. Regulation of Toll-like receptor-mediated Sestrin2 induction by AP-1, Nrf2, and the ubiquitin-proteasome system in macrophages[J]. *Toxicol Sci*, 2015, 144(2): 425-435.
- [10] Mako V, Czucz J, Weiszhar Z, et al. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS[J]. *Cytometry A*, 2010, 77(10): 962-970.
- [11] Park SY, Park DAJ, Kim YH, et al. Schisandra chinensis alpha-iso-cubebenol induces heme oxygenase-1 expression through PI3K/Akt and Nrf2 signaling and has anti-inflammatory activity in porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(11): 1907-1915.
- [12] Mino T, Takeuchi O. Post-transcriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2013, 29(1): 49-60.
- [13] Van Arensbergen J, Van Steensel B, Bussemaker HJ. In search of the determinants of enhancer-promoter interaction specificity[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(11): 695-702.
- [14] Hu W, Collier J. What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function[J]. *Cell Res*, 2012, 22(9): 1322-1324.
- [15] Komnenov D, Scipione CA, Bazzi ZA, et al. Pro-inflammatory cytokines reduce human TAFI expression via tristetraprolin-mediated mRNA destabilisation and decreased binding of HuR[J]. *Thromb Haemost*, 2015, 114(2): 337-349.

(收稿日期: 2016-03-14 修回日期: 2016-05-18)

(上接第 4035 页)

- [4] 庞冲, 张腾月, 王长利. 肿瘤干细胞来源的 DC-CIK 对同源肿瘤细胞的杀伤作用[J]. *天津医药*, 2014, 10(10): 972-976.
- [5] Zhang Z, Zhao X, Zhang T, et al. Phenotypic characterization and anti-tumor effects of cytokine-induced killer cells derived from cord blood[J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(1): 86-97.
- [6] 刘涛, 张旒娟, 何凤, 等. 脐血 CIK 细胞抗肿瘤研究及临床应用进展[J]. *现代生物医学进展*, 2014(2): 368-371.
- [7] Liu H, Li J, Wang F, et al. Comparative study of different procedures for the separation of peripheral blood mononuclear cells in cytokine-induced killer cell immunotherapy for hepatocarcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4): 2299-2307.
- [8] Zhang Z, Wang LP, Zhao XL, et al. Pseudomonas aeruginosa injection enhanced antitumor cytotoxicity of cytokine-induced killer cells derived from cord blood[J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(8): 1057-1063.
- [9] 付庆国, 应可明, 朱林波. 肿瘤 HSP70 活化的 CIK 细胞杀伤作用研究[J]. *肿瘤学杂志*, 2012, 18(7): 512-515.
- [10] He Q, Zhang H, Wang Y, et al. Purified anti-CD3×anti-HER2 bispecific antibody potentiates cytokine-induced killer cells of poor spontaneous cytotoxicity against breast cancer cells[J]. *Cell Biosci*, 2014, 4: 70.
- [11] Wang L, Deng Q, Wang J, et al. Effect of CIK on multi-drug-resistance reversal and increasing the sensitivity of ADR in K562/ADR cells[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4): 1778-1782.
- [12] Burris HA. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71(4): 829-842.
- [13] Moloney TC, Hoban DB, Barry FP, et al. Kinetics of thermally induced heat shock protein 27 and 70 expression by bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Protein Sci*, 2012, 21(6): 904-909.
- [14] 江小霞, 张毅, 李秀森, 等. 间充质干细胞对 T 淋巴细胞转化的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2005, 30(2): 130-132.
- [15] Li W, Ren G, Huang Y, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(9): 1505-1513.

(收稿日期: 2016-03-12 修回日期: 2016-05-16)