

【基础研究】

通信作者:李汉臣(1957-),男,河南新乡人,学士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:胸部肿瘤;E-mail:L2634@sohu.com.

食管癌是世界上发病率和病死率较高的癌症之一,在我国其病死率位居肿瘤第4位,2 a生存率不足15%,其中食管鳞状细胞癌(简称鳞癌)的5 a生存率仅15%^[1-3]。许多学者均尝试寻找新的治疗方法提高晚期食管癌的疗效。近期资料显示,过继性免疫治疗对于晚期肿瘤患者是一种安全、可行的治疗方法^[4]。

细胞因子诱导杀伤(cytokine induced killer, CIK)细胞是近年来发现的一种新型抗肿瘤细胞,其兼有T淋巴细胞强大的抗肿瘤活性和自然杀伤(nature killer, NK)细胞的非主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)限制性杀伤肿瘤细胞的特点^[5]。近年,CIK成为重要的过继性细胞免疫治疗手段之一。体外研究表明,CIK细胞对食管癌肿瘤细胞有较好的增殖抑制作用^[6]。p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)介导了机体细胞的生长、分化、分裂和死亡等过程。在树突状细胞中通过抑制p38 MAPK通路可激活肿瘤特异T淋巴细胞效应器,抑制T淋巴细胞的转变,阻止T淋巴细胞抑制剂对T淋巴细胞的抑制作用,增强T淋巴细胞的活性^[7-8]。本研究拟观察CIK细胞联合p38抑制剂SB203580对食管癌EC109细胞体外杀伤活性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 食管癌EC109细胞株由新乡医学院河南省神经病学研究所冻存,用含体积分数10%胎牛血清的高糖型达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)培养。胎牛血清购自美国Gibco公司,二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国Sigma公司,兔抗人p38、p-P38、还原型辅酶Ⅱ(nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt, NADPH)、Fas抗体及辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔抗体、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、抗CD3单抗、抗CD56单抗及Annexin V购自武汉博士德生物工程有限公司,淋巴细胞型干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、核糖核酸酶A(ribonuclease A from bovine pancreas, Rnase A)购自上海碧云天生物技术有限公司;CL31R型离心机购自美国Thermo Scientific公司;TS100-F型倒置显微镜购自日本Nikon公司。

1.2 食管癌EC109细胞的培养 采用实验室冻存细胞复苏。将冻存的食管癌细胞EC109置37℃水浴槽中,摇动细胞冻存管至冻存的细胞融化。体积分数75%乙醇消毒细胞冻存管后,小心打开盖子,吸出细胞悬液,置入盛有10 L含体积分数10%胎牛血清DMEM的离心管中,1 000 r·min⁻¹离心3 min,弃上清液,用含体积分数10%胎牛血清的DMEM重悬细胞,将细胞悬液转移至培养皿中,并加入适量培养液,置37℃、体积分数5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。质量分数0.125%胰蛋白酶-乙

二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)消化食管癌EC109细胞后,用含体积分数10%胎牛血清的DMEM重悬细胞,将重悬的细胞按2:4传代至4个培养皿中,分别编号为空白对照组、p38抑制剂组、CIK组及联合组。空白对照组不做处理,p38抑制剂组为食管癌EC109细胞加入p38抑制剂,CIK组为食管癌EC109细胞加入培养14 d的CIK细胞,联合组为食管癌EC109细胞加入p38抑制剂和培养14 d的CIK细胞。

1.3 CIK细胞培养及分离制备 无菌抽取健康体检者新鲜外周血10 mL,2 000 r·min⁻¹离心20 min,分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),经磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤后重悬于含体积分数10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中,细胞浓度调至1×10⁹ L⁻¹,置于37℃、体积分数5% CO₂细胞培养箱中培养,黏附约2 h后,转移悬浮细胞于新培养瓶中,培养当天加入淋巴细胞型IFN- γ 10⁶ U·L⁻¹,24 h后加抗CD3单抗50 mg·L⁻¹、IL-2 3×10⁵ U·L⁻¹,置37℃、体积分数5% CO₂培养箱中培养,每3 d更换新鲜培养液,并补加IL-2 3×10⁶ U·L⁻¹,调整细胞浓度至2×10⁸ L⁻¹,培养14 d收获CIK细胞备用。收集悬浮培养14 d的CIK细胞,调整细胞浓度为6×10⁹ L⁻¹,取100 μ L细胞悬液分装于若干个离心管中,每管加入10 μ L FITC-抗CD3抗体、PE-抗CD56抗体标记后,用流式细胞技术鉴定CIK细胞的免疫表型。

1.4 CIK细胞联合p38抑制剂对食管癌细胞抑制作用的检测 采用4 h乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放测定法,参照试剂盒说明书操作。抗体封闭试验效靶比30:1,p38抑制剂剂量100 μ mol·L⁻¹,先与CIK细胞室温孵育15 min,再加入EC109细胞测杀伤率。4 h后将上清液转移至新的96孔板加底物避光显色30 min后加终止液,490 nm测吸光度。CIK细胞杀伤活性(%)=(实验组吸光度平均值-靶细胞自然释放组吸光度平均值-效应细胞自然释放组吸光度平均值)/(靶细胞最大释放组吸光度平均值-靶细胞自然释放组吸光度平均值)×100%。实验重复3次。

1.5 流式细胞术检测4组方法对食管癌细胞EC109周期阻滞和凋亡的影响

1.5.1 凋亡检测步骤 收集细胞(1~5)×10⁶个,1 000 r·min⁻¹离心5 min,弃培养液,用3 mL PBS洗1次,离心去PBS,加入冰预冷的体积分数70%乙醇固定,4℃过夜,离心弃固定液,3 mL PBS重悬5 min,400目的筛网过滤1次,1 000 r·min⁻¹离心5 min,弃PBS,加1 mL碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液,4℃避光30 min。流式细胞仪检测:PI用氩离子激发荧光,激光光波波长为488 nm,发射光波波长大于630 nm,产生红色荧光,分析前散射光对侧散射光的散点图及PI荧光的直方图。

1.5.2 周期检测步骤 收集各组食管癌 EC109 细胞($1\sim5$) $\times10^6$ 个,1 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 5 min,收集细胞,PBS 洗涤 1 次,离心去 PBS,调整细胞密度为 10^9 L $^{-1}$ 。将细胞种至 6 孔板,每孔 2 mL 细胞,向每孔加入相应浓度药物,培养至不同时间点,1 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 5 min,收集细胞,PBS 洗涤 1 次,用 300 μ L PBS 重悬细胞,加入体积分数 70% 无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 固定 24 h 以上,1 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 5 min,收集细胞,PBS 洗涤 1 次,450 μ L PBS 重悬细胞,加入 2.5 g \cdot L $^{-1}$ Rnase A 50 μ L,使 Rnase A 浓度为 250 mg \cdot L $^{-1}$,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,取 50 μ L PI(1 g \cdot L $^{-1}$)加入上述细胞悬液中,使 PI 终浓度为 100 mg \cdot L $^{-1}$,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,1 h 内流式细胞仪分析细胞 DNA 分布,资料经 Modift 软件收集、储存和评价。

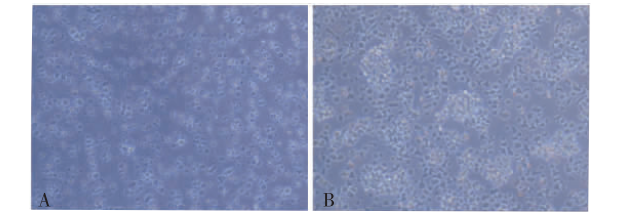
1.6 Western blot 检测相关信号通路 Western blot 法检测 EC109 细胞 p38 MAPK、p-p38 MAPK、NADPH 蛋白表达水平,具体步骤为:收集细胞,提取蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。各取 50 μ g 蛋白经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfonate polyacrylamide gelelectrophoresis,SDS-PAGE)电泳后转膜至聚偏氟乙烯(poly vinylidene fluoride,PVDF)膜上,用含 50 g \cdot L $^{-1}$ 脱脂奶粉的 PBS 封闭 6 h,分别加入兔抗人 p38MAPK(1:300)、p-p38MAPK(1:300)、Fas(1:500)、OX40(1:500)和 NADPH(1:300)多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h,加入 HRP 标记的山羊抗兔(1:3 000),孵育 2 h,底物电化学发光(electrochemiluminescence,ECL)显影。采用凝胶图像处理系统进行灰度值分析。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,率的比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CIK 细胞的形态学观察 人 PBMC 在体外经细胞因子诱导为 CIK 细胞,开始细胞呈悬浮生长,大小一致,经培养 14 d 后细胞逐渐呈集落状生长,

细胞膜光滑,细胞数目迅速增多(图 1)。比较单个核细胞的细胞表型以及培养 14 d 后 CIK 的细胞表型,结果显示:未经培养的 PBMC 中 CD3 $^{+}$ CD56 $^{+}$ 细胞比例为(0.65 \pm 0.08)%,经 14 d 培养后,CD3 $^{+}$ CD56 $^{+}$ 细胞比例达(48.56 \pm 1.52)%,其差异有统计学意义($P<0.05$)。

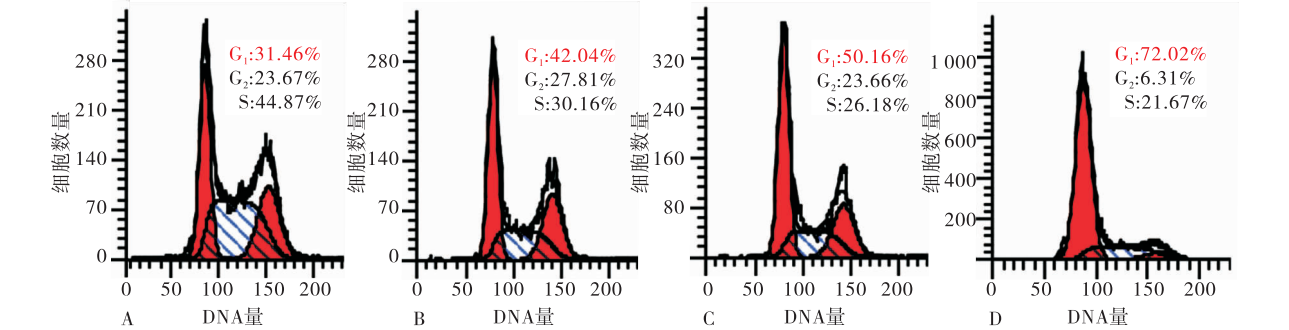


A:0 d;B:14 d。
图 1 体外培养 CIK 细胞形态学
Fig.1 Morphology of CIK cells cultured in vitro

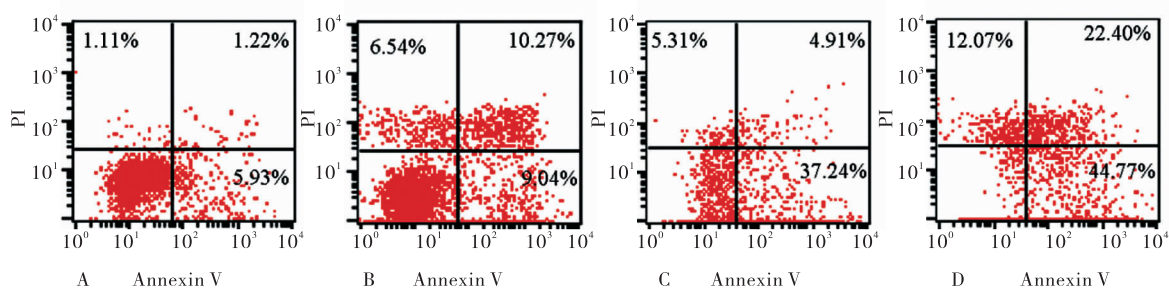
2.2 4 组方法对食管癌 EC109 细胞的抑制作用 经过不同方法处理后,LDH 测定法结果显示,空白对照组、p38 抑制剂组、CIK 组及联合组 EC109 细胞存活率分别为 100.00%、75.00%、50.00% 和 25.00%。其中 p38 抑制剂组、CIK 组及联合组 EC109 细胞存活率显著高于空白对照组($P<0.05$),联合组 EC109 细胞存活率显著高于 p38 抑制剂组和 CIK 组($P<0.05$)。

2.3 4 组方法对食管癌 EC109 细胞周期的阻滞 结果见图 2。采用流式细胞术检测空白对照组、p38 抑制剂组、CIK 组及联合组对食管癌细胞的周期阻滞作用,发现主要为 G $_1$ 期阻滞,其阻滞率分别为 31.46%、42.04%、50.16% 和 72.02%。其中 p38 抑制剂组、CIK 组及联合组阻滞率显著高于空白对照组($P<0.05$),联合组阻滞率显著高于 p38 抑制剂组和 CIK 组($P<0.05$)。

2.4 4 组方法对食管癌 EC109 细胞凋亡的作用 4 组食管癌 EC109 细胞经 PI 荧光染色后,流式细胞术检测结果见图 3。空白对照组、p38 抑制剂组、CIK 组及联合组细胞凋亡率分别为 7.15%、19.31%、42.15% 和 67.17%,其中 p38 抑制剂组、CIK 组及联合组细胞凋亡率显著高于空白对照组($P<0.05$),联合组细胞凋亡率显著高于 p38 抑制剂组和 CIK 组($P<0.05$)。



A:空白对照组;B:p38 抑制剂组;C:CIK 组 D:联合组。
图 2 各组食管癌 EC109 细胞周期
Fig.2 Esophageal cancer EC109 cell cycle in each group



A:空白对照组;B:p38 抑制剂组;C:CIK 组 D:联合组。

图 3 各组食管癌 EC109 细胞的凋亡

Fig.3 Apoptosis of esophageal cancer EC109 cell in each group

3 讨论

一直以来,国内对于食管癌治疗多采用食管癌术后辅助放射、化学治疗的方法,但会引起患者消化道反应、骨髓造血抑制、免疫力降低等诸多不良反应。免疫缺陷往往被认为是食管癌患者发生复发和转移的一个关键因素^[6]。国内外临床研究初步证实,肿瘤的免疫生物治疗能增强患者机体抗肿瘤能力,对抑制肿瘤生长、减少肿瘤复发、提高患者生活质量和延长生存期有较好作用。目前,肿瘤的生物治疗已成为继手术、放射、化学治疗后的第 4 种肿瘤治疗模式,有机地与常规肿瘤治疗方法相结合,将能取得更好的疗效。

用免疫活性细胞输注的过继免疫疗法是肿瘤生物治疗的研究热点之一^[9],为晚期不宜手术或无法耐受放射、化学治疗的患者开辟了新的治疗途径。CIK 是由单个核细胞在 CD3 单抗和多种细胞因子的作用下,在体外共同培养诱导获得的一群以 CD3⁺CD56⁺细胞为主要效应细胞的多克隆异质细胞群^[10],具有体外增殖数量大、对肿瘤杀伤活性强、抗肿瘤谱广及不良反应小等特点,逐渐受到人们的关注^[11]。CIK 的疗效取决于是否获得足够数量且具有高效杀伤活性的免疫效应细胞。CD3⁺CD56⁺是 CIK 群体中主要的效应细胞^[12]。本研究小组前期研究发现,CIK 细胞在体外培养 14 d 时,细胞增殖达高峰,CD3⁺CD56⁺T 细胞的比例也达最高值^[13]。

本研究结果显示,p38 抑制剂组、CIK 组及联合组 EC109 细胞存活率、对 G₁ 期的阻滞率、细胞凋亡率均显著高于空白对照组,联合组以上指标均显著高于 p38 抑制剂组和 CIK 组。提示 p38 MAPK 通路在食管癌细胞凋亡过程中起重要调控作用。p38 抑制剂联合 CIK 细胞能增强对食管癌 EC109 细胞的杀伤作用,对细胞凋亡、G₁ 期阻滞的影响增大。该发现为 CIK 细胞联合 p38 抑制剂治疗食管癌提供了实验依据。

综上所述,CIK 联合 p38 抑制剂可增强对食管癌细胞的杀伤作用,提示 CIK 过继免疫治疗联合 p38 抑制剂是一种有效的治疗手段。相信在不远的将来,CIK

细胞在肿瘤生物治疗方面将会获得更广泛的应用。

参考文献:

- [1] MAO W M,ZHENG W H,LING Z Q. Epidemiologic risk factors for esophageal cancer development[J]. *Asian Pac J Cancer*,2011, 12(10):2461-2466.
- [2] COMPAGNIN C,MOGNATO M,CELOTTI L,et al. Cellproliferation and cell cycle alterations in oesophageal p53-mutated cancer cells treated with cisplatin in combination with photodynamic therapy[J]. *Cell Prolif*,2010,43(3):262-274.
- [3] 齐博,赵宝生,李汉臣,等. 角化细胞生长因子在食管鳞状细胞癌中的表达[J]. *新乡医学院学报*,2015,32(5):401-403.
- [4] WENG D S,ZHNU J,ZHOU Q M,et al. Minimally invasive treatment combined with cytokineinduced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas[J]. *J Immunother*,2008,31(1):63-71.
- [5] KIM H M,LIM J,KANG J S,et al. Inhibition of human cervical carcinoma growth by cytokine-induced killer cells in nude mouse xenograft model[J]. *Int Immunopharmacol*,2009,9(3):375-380.
- [6] 姚文健,白玉,赵宝生,等. 3 种不同来源 CIK 对食管癌细胞杀伤作用的比较[J]. *重庆医学*,2013,42(1):43-45.
- [7] LU Y,ZHANG M,WANG S,et al. p38 MAPK-inhibited dendritic cells induce superior antitumor immune responses and overcome regulatory T-cell-mediated immunosuppression[J]. *Nat Commun*,2014,5:4229.
- [8] LANNA A,HENSON S M,ESCORS D,et al. The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells[J]. *Nat Immunol*,2014,15(10):965-972.
- [9] JIANG J T,SHEN Y P,WU C P,et al. Increasing the frequency of CIK cells adoptive immunotherapy may decrease risk of death in gastric cancer patients[J]. *World J Gastroenterol*,2010,16(48):6155-6162.
- [10] LINN Y C,LAU S K,LIU B H,et al. Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against myeloid leukaemia targetcell[J]. *Immunology*,2009,126(3):423-435.
- [11] THORNE S H,NEGRIN R S,CONTAG C H. Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy[J]. *Science*,2006,311(5768):1780-1784.
- [12] 牟青杰,王洁,崔为发,等. 三种来源 CIK 细胞体外增殖及杀伤活性比较[J]. *山东医药*,2010,50(11):7-9.
- [13] 刘霞,胡奇婵,王涛,等. CIK 细胞在荷瘤鼠体内的肿瘤靶向性与安全性[J]. *临床与实验病理学杂志*,2014,30(4):360-365.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)