

【基础研究】

细胞免疫在肿瘤免疫中具有重要的作用,其中,自然杀伤(natural killer,NK)细胞是体内主要的免疫细胞。NK细胞是一类无主要组织相容性复合体限制性,可有效杀伤多种肿瘤细胞的主要效应细

胞^[1]。成熟的 NK 细胞主要来源于人体外周血,但 NK 细胞在外周血单个核细胞中的比例仅为 10% ~ 20%^[2,4]。肿瘤晚期患者自身免疫低下,NK 细胞含量较少,活性较低。脐带血中富含造血干细胞,可以在体内和体外分化为 NK 细胞。本研究选取外周血和脐带血,在相同的条件下用同样的方法进行体外大体系扩增,对 NK 细胞扩增及 CD3⁺CD16⁺CD56⁺表型的 NK 细胞所占比例进行比较,为临床实验提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 无血清培养基(GT-T561)购自日本 TaKaRa 公司,基因改造 K562 细胞购自深圳蓓赛尔细胞科技有限公司,白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)购自美国 PeproTech 公司,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记 CD3 抗体及同型对照 IgG1, PE 标记的 CD16、CD56 抗体及同型对照 IgG1 均购自美国 BD 公司,硫酸庆大霉素购自河南辅仁药业有限公司,Ficoll 分离液购自美景生物科技有限公司。

1.2 NK 细胞扩增 征集健康志愿者 9 名,男 6 名,女 3 名,年龄 23 ~ 36 岁,平均(28.35 ± 4.57)岁,采集肘部静脉外周血 30 mL。经孕产妇及家属同意,由新乡医学院第一附属医院妇产科护士无菌采集 9 份脐带静脉血 30 mL。采集的外周血和脐带血 2 000 r · min⁻¹离心 10 min 得到血浆,血浆 56 °C 水浴 45 min 灭活补体,灭活后再次离心取上层血浆,4 °C 冷藏备用。沉淀细胞用生理盐水稀释后采用 Ficoll 法^[5]分离得到单个核细胞,生理盐水洗涤离心 3 次。将得到的单个核细胞按照 1.5 × 10⁹ L⁻¹ 的浓度,接种于 75 cm² 培养瓶中,每瓶完全培养基(无血清培养基中含 200 × 10³ U · L⁻¹ IL-2、体积分数 5% 自体血清、80 × 10³ U · L⁻¹ 硫酸庆大霉素) 20 mL,2 支经照射的 K562 细胞(离心去除冻存保护剂),置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中进行培养;第 2 天,添加完全培养基 10 mL;第 3 天,将培养的细胞按 1 000 r · min⁻¹离心 8 min,弃上清,用新鲜的完全培养基悬浮细胞,并调整细胞密度为 1.5 × 10⁹ L⁻¹;第 5 天,补加完全培养基,调整细胞密度为 1.5 × 10⁹ L⁻¹;第 7 天,将培养瓶中的细胞转移至 1.8 L 的培养袋中,添加完全培养基和 5 支经照射的 K562 细胞(离心去除冻存保护剂)。连续培养至第 15 天,每 2 d 补加完全培养基。

1.3 细胞计数 分别收集第 0、5、10、15 天的细胞于离心管中,按 1 000 r · min⁻¹离心 8 min,弃上清,生理盐水重悬细胞,质量分数 0.2% 台盼蓝与细胞

悬液 1 : 1 混匀,染色 2 min 后,Countstar 全自动细胞计数仪(美国 Inno-Alliance Biotech 公司)进行细胞计数,每个样本计数 3 次,取平均值。

1.4 流式细胞术检测细胞免疫表型 分别收集第 0、5、10、15 天的细胞,用生理盐水洗涤 2 次,调整细胞浓度至 1.0 × 10⁹ ~ 1.5 × 10⁹ L⁻¹,以 FITC-CD3、PE-CD16、PE-CD56 标记 NK 细胞,同时标记 FITC-IgG1、PE-IgG1 作为对照,取细胞 50 μL 加抗体 10 μL,混匀后 4 °C 避光 30 min,加入 2 mL 红细胞裂解液,10 min 后以 1 000 r · min⁻¹离心 10 min,去上清,用磷酸盐缓冲液洗涤 1 次,加 0.5 mL 磷酸盐缓冲液上机进行细胞免疫表型检测。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NK 细胞扩增情况 结果见图 1。NK 细胞自第 5 天开始出现快速扩增,细胞体积逐渐增大,同时出现大量细胞集落。培养第 15 天时,细胞扩增倍数达高峰,随着培养时间的延长,细胞扩增倍数呈下降趋势,细胞老化;外周血、脐带血扩增倍数分别为 187.87 ± 7.57 和 165.8 ± 9.24,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

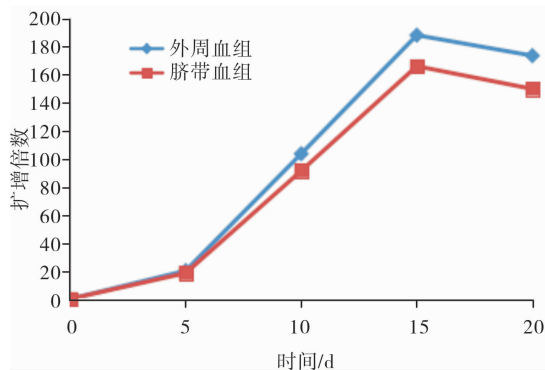


图 1 NK 细胞生长曲线

Fig.1 Growth curve of NK cells

2.2 NK 细胞免疫表型分析 结果见图 2。培养前,外周血、脐带血不同来源单个核细胞中 CD3⁺CD16⁺CD56⁺表型的 NK 细胞所占比例分别为 (18.37 ± 3.16)% 和 (13.29 ± 2.41)%,差异无统计学意义(*P* > 0.05);诱导培养 15 d 后,外周血、脐带血不同来源单个核细胞 CD3⁺CD16⁺CD56⁺表型的 NK 细胞所占比例分别为 (91.32 ± 5.38)% 和 (84.26 ± 4.11)%,较诱导前均显著升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05);外周血来源 CD3⁺CD16⁺CD56⁺表型 NK 细胞所占比例稍高于脐带血来源,但差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

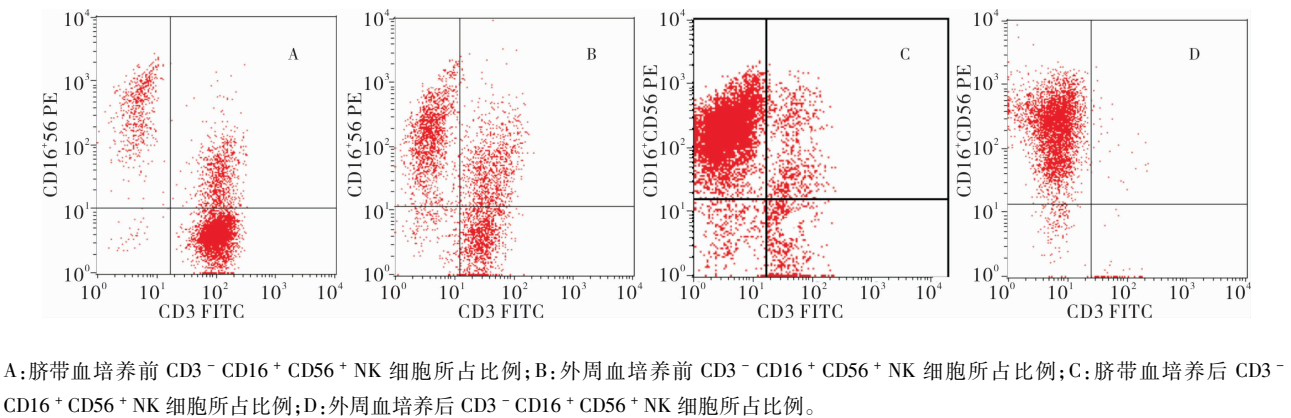


图2 流式细胞术检测 CD 分子结果

Fig.2 Detection results of CD molecules by flow cytometry

3 讨论

肿瘤生物治疗是继3大传统治疗手段(放射治疗、化学治疗、手术治疗)之后出现的一种新兴肿瘤治疗模式,在肿瘤治疗中发挥了重要作用^[6-7]。晚期肿瘤患者各项生理指标均较差,不宜进行手术,放射治疗、化学治疗会给患者带来较大的不良反应,增加患者痛苦。肿瘤生物治疗作为常规肿瘤治疗手段的补充,为晚期肿瘤患者提供了更好的治疗选择。外周血是NK细胞最主要的来源,在过去的10a,已有较为有效的方法从外周血和外周血干细胞中纯化扩增足够量的NK细胞用于过继性免疫治疗^[8-9],但是受困于患者自身情况的影响,部分患者不适宜抽取外周血进行NK细胞体外扩增,因此,寻找新的NK细胞体外扩增来源成为发展所需。

目前的研究热点为脐带血来源干细胞,虽然许多研究结果显示脐带血特异性的杀伤性T细胞(cytotoxic T cell,CTL)的杀伤活性较成人外周血CTL低^[10],但脐带血T细胞前体和辅助T细胞前体的含量受抗原刺激的增殖反应强,仍然可作为过继免疫治疗的来源^[11]。因此,脐带血T淋巴细胞有望成为肿瘤过继免疫治疗的主要替代细胞来源,并且脐带血来源丰富,获取方便,含有丰富的造血干细胞和免疫细胞,脐带血造血干细胞具有多向分化潜能,在造血因子的作用下可以分化扩增^[12-13]。目前的技术已能长时间储存脐带血^[14],低温长期储存的脐带血经过多种细胞因子组合诱导分化,可产生大量免疫细胞,如细胞因子诱导的杀伤细胞和NK细胞^[15],可用于肿瘤过继免疫治疗。

本研究将外周血、脐带血不同来源的单个核细胞在相同条件下体外诱导进行大规模扩增,结果显示,不同来源的NK细胞在体外增殖能力各不相同。外周血来源的NK细胞较脐带血增殖能力稍强,

CD3⁻CD16⁺CD56⁺表型NK细胞比例稍高,其原因尚不明确,可能与细胞发育有关。生物治疗的疗效取决于能否获得足够数量且具有高效杀伤活性的免疫效应细胞。本实验中脐带血来源的NK细胞增殖速度及相关表型细胞比例稍低于外周血来源,但是脐带血来源的单个核细胞在体外也获得了大量扩增,同时,相关表型细胞比例也相比诱导前有较高增长。所以,在患者自身免疫低下,不适宜提供细胞种子来源的情况下,脐带血来源成为了首选。本研究下一步将对脐带血来源的不同诱导方法做进一步的探讨,对于不同诱导方法对脐带血来源NK细胞体外大规模扩增是否有不同的影响,有待于下一步研究的结果来证明。

参考文献:

[1] BALSAMO M,PIETRA G,VERMI W,et al. Melanoma immunoediting by NK cells[J]. *Oncoimmunology*,2012,1(9):1607-1609.

[2] ZAMAI L,PONTI C,MIRANDOLA P,et al. NK cells and cancer [J]. *Immunol*,2007,178(7):4011-4016.

[3] RABINOWICH H,SEDLMAIR P,HERBERMAN R B,et al. Increased proliferation lytic activity and purity of human natural killer cells cocultured with mitogen-activated feeder cells[J]. *Cell Immunol*,1991,135:454-470.

[4] NIEMEYER C M,SIAFF C A,SMITH B R,et al. Hematopoiesis in vitro coexists with natural killer lymphocytes[J]. *Blood*,1989,74(7):2376-2382.

[5] SO E C,SALLIN M A,ZHANG X,et al. A high throughput method for enrichment of natural killer cells and lymphocytes and assessment of in vitro cytotoxicity[J]. *Immunol Meth*,2013,394(1/2):40-48.

[6] MURPHY W J,PARHAM P,MILLER J S. NK cells-from bench to clinic[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*,2012,18(Suppl 1):S2-S7.

[7] 郑颖娟,胡焕焕. 不同来源的细胞因子诱导的杀伤细胞对肝癌细胞的杀伤效应比较[J]. 新乡医学院学报,2013,30(10):801-803.

本研究通过对 PKC 4 种亚型的研究发现,各亚型在肿瘤细胞的增殖、分化和转移过程中起着不同的调节作用:黏液腺癌组织中 PKC α 、 β II 的阳性表达率显著低于管状腺癌组织,而 PKC ϵ 的阳性表达率则显著高于管状腺癌组织,但 2 种癌组织中 PKC ζ 的阳性表达率比较差异无统计学意义,提示 PKC α 、 β II、 ϵ 表达可能与病理类型有关,而 PKC ϵ 在黏液腺癌中的高表达可能与黏液分泌有关;原发性结肠腺癌患者中无淋巴结转移者癌组织中 PKC α 的阳性表达率显著高于有淋巴结转移者,而 PKC β II、 ϵ 、 ζ 的阳性表达率与有淋巴结转移者比较差异无统计学意义,提示 PKC α 可能在结肠腺癌的浸润、转移中起重要作用;52 例不同病理分化程度的结肠管状腺癌中,PKC α 、 β II、 ζ 3 个亚型的阳性表达率在高、中、低各分化组之间比较差异无统计学意义,而 PKC ϵ 亚型在高分化组的阳性表达率显著低于低分化组,提示 PKC ϵ 可能与分化程度有关。

综上所述,本研究提示,PKC ϵ 在结肠管状腺癌中的表达与分化有关;PKC ϵ 可能参与了黏液腺癌中黏液的分泌;而 PKC α 、 β II 可能与结肠管状腺癌中的细胞增殖有关;PKC α 表达与结肠腺癌淋巴结转移有关。PKC 各亚型在结肠腺癌发生、浸润和转移中的作用不一样,它们是如何被启动以及如何影响下游信号的改变,是本课题下一步研究的方向。

参考文献:

[1] STEINBERG S F. Structural basis of protein kinase C isoform function[J]. *Physiol Rev*,2008,88(4):1341-1378.

[2] 许中良,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判定标准[J]. 中国癌症杂志,1996,6(4):229-231.

[3] GWAK J,JUNG S J,KANG D I,et al. Stimulation of protein kinase C-alpha suppresses colon cancer cell proliferation by down-regulation of beta-catenin[J]. *Cell Mol Med*,2009,13(8B):2171-2180.

[4] MURRAY N R,WEEMS J,BRAUN U,et al. Protein kinase C be-

taII and PKC δ /lambda: collaborating partners in colon cancer promotion and progression[J]. *Cancer Res*,2009,69(2):656-662.

[5] GÖKMEN-POLAR Y,MURRAY N R,VELASCO M A,et al. Elevated protein kinase C beta II is an early promotive event in colon carcinogenesis[J]. *Cancer Res*,2001,61(4):1375-1381.

[6] JAIN K,BASU A. The multifunctional protein kinase C ϵ in cancer development and progression[J]. *Cancers*,2014,6(2):860-878.

[7] TOTON E,IGNATOWICZ E,SKRZECZKOWAKA K,et al. Protein kinase C ϵ as a cancer marker and target for anticancer therapy[J]. *Pharmacol Rep*,2011,63(1):19-29.

[8] HONG D,PETROVICS G,ANDERSON W,et al. Induction of mucin gene expression in human colonic cell lines by PMA is dependent on PKC-epsilon[J]. *Am J Physiol*,1999,277(5):1041-1047.

[9] 唐广义,韩涛,殷东风,等. 益气健脾抗癌对结肠癌组织 PKC 及亚型 PKC δ 、PKC ϵ 蛋白表达的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2016,23(3):366-368.

[10] UMAR S,SELLIN J H,MORRIS A P. Increased nuclear translocation of catalytically active PKC-zeta during mouse colonocyte hyperproliferation[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2000,279(1):G223-G237.

[11] HERNÁNDEZ-MAQUEDA J G,LUNA-ULLOA L B,SANTOYO-RAMOS P,et al. Protein kinase C delta negatively modulates canonical Wnt pathway and cell proliferation in colon tumor cell lines[J]. *PLoS One*,2013,8(3):e58540.

[12] 于波,李世拥,安萍,等. 大肠癌细胞膜磷脂变化与蛋白激酶 C 同工酶表达对肝转移的影响[J]. 中国现代医学杂志,2003,13(16):1-3.

[13] 姜盼,何巍,于安石,等. 结肠癌组织中 P16、CyclinD1 和 PKC α 的表达及意义[J]. 沈阳医学院学报,2015,17(4):215-217.

[14] CHAKRABARTY S,RAJAGOPAL S,MOSKAL T L. Protein kinase alpha controls the adhesion but not the antiproliferative response of human colon carcinoma cells to transforming growth factor beta1: identification of two distinct branches of post-protein kinase alpha adhesion signal pathway[J]. *Lab Invest*,1998,78(4):413-421.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)

(上接第 179 页)

[8] LEUNG W. Use of NK cell activity in cure by transplant[J]. *Br Haematol*,2011,155(1):14-29.

[9] LEUNG S O,GAO K,WANG G Y,et al. Surrogate target cellsexpressing surface anti-idiotyp antibody for the clinical evaluationof an internalizing CD22-specific antibody[J]. *MABS*,2015,7(1):66-76.

[10] 明奕,张海燕,王哲,等. 脐血源 MHC 限制性杀伤 T 细胞的扩增及功能研究[J]. 中国实验血液学杂志,2015,23(1):195-201.

[11] LIU R B,ENGELS B,ARINA A,et al. Densely granulated murine NK cells eradicate large solid tumors[J]. *Cancer Res*,2012,72(8):1964-1974.

[12] 邢雪琨,武红艳. 血清对脐带间充质干细胞体外培养的影响[J]. 新乡医学院学报,2012,29(12):896-899.

[13] 白瑞樱,张艳,朱涵. 人骨髓间充质干细胞分离培养及其向神经细胞分化的研究[J]. 新乡医学院学报,2014,31(2):104-106.

[14] BROXMEYER H E,LEE M R,HANGOC G,et al. Hematopoietic stem/progenitor cells, generation of induced pluripotent stem cells, and isolation of endothelial progenitors from 21 to 23,5-year cryopreserved cord blood[J]. *Blood*,2011,117(18):4773-4777.

[15] LI Y,SCHMIDT G H,WU Y F,et al. Optimized protocols for generation of cord blood-derived cytokine-induced killer/natural killer cells[J]. *Anticancer Res*,2010,30(9):3493-3499.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟 月)