

【基础研究】

本文引用:刘懿萱,胡焕焕,姬国杰,等.大体系冻存对细胞因子诱导的杀伤细胞免疫表型及细胞杀伤活性的影响[J].新乡医学院学报,2017,34(8):667-670. DOI:10.7683/xyxyxb.2017.08.001.

# 大体系冻存对细胞因子诱导的杀伤细胞免疫表型及细胞杀伤活性的影响

刘懿萱<sup>1</sup>, 胡焕焕<sup>2</sup>, 姬国杰<sup>2</sup>, 赵青<sup>3</sup>, 石晓卫<sup>2</sup>, 刘瑞<sup>2</sup>, 丰慧根<sup>4</sup>

(1. 新乡医学院国际教育学院, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院三全学院生命科学技术学院, 河南 新乡 453003; 3. 商丘市中心血站, 河南 商丘 476000; 4. 新乡医学院研究生院, 河南 新乡 453003)

**摘要:** **目的** 探讨大体系(50 mL)冻存对细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞免疫表型及细胞杀伤活性的影响。**方法** 采集6例健康志愿者的外周血,采用Ficoll法分离得到单个核细胞,用细胞因子诱导培养CIK细胞。收集冻存1个月后复苏的CIK细胞,采用流式细胞术检测其冻存前后的细胞活率和免疫表型;通过与乳腺癌细胞共培养(效靶比10:1和40:1)的方法测定其杀伤活性,与新鲜未冻存的细胞杀伤活性进行比较,同时对不同效靶比冻存前后的细胞杀伤活性进行比较。**结果** CIK细胞大体系冻存前平均细胞活率(97.79±1.92)%,显著高于复苏后的(83.61±3.42)%( $P<0.05$ )。复苏后CIK细胞中CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>表型CIK细胞所占比例虽较冻存前稍有降低,但差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。效靶比10:1、40:1时冻存前细胞和复苏后细胞杀伤率比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ );效靶比40:1时冻存前细胞和复苏后细胞杀伤率均显著高于效靶比10:1时( $P<0.05$ )。**结论** 大体系(50 mL)冻存对于CIK细胞活率虽有影响,但对免疫表型和细胞活性均未影响。

**关键词:** 细胞因子诱导的杀伤细胞;细胞冻存;杀伤活性;细胞活率;肿瘤生物治疗

**中图分类号:** R392.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)08-0667-04

## Effect of large system cryopreservation on immunophenotype and killing activities of cytokine induced killer cells

LIU Yi-xuan<sup>1</sup>, HU Huan-huan<sup>2</sup>, JI Guo-jie<sup>2</sup>, ZHAO Qing<sup>3</sup>, SHI Xiao-wei<sup>2</sup>, LIU Rui<sup>2</sup>, FENG Hui-gen<sup>4</sup>

(1. School of International Education of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 3. Shangqiu Center Blood Station, Shangqiu 476000, Henan Province, China; 4. Graduate School, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** Effect of large system (50 mL) cryopreservation on immunophenotype and killing activities of cytokine induced killer (CIK) cells. **Methods** Peripheral blood samples were collected from 6 healthy volunteers and then the mononuclear cell were isolated by Ficoll method and were induced to CIK cells. The CIK cells were reanimated at 1 month after cryopreservation and collected. The cell survival rate and immunophenotype was detected by flow cytometry before and after cryopreservation. The killing activity of CIK cells was detected by culturing with breast cancer cells (target ratio 10:1 and 40:1) and compared with fresh cell; and the killing activity of CIK cells under different target ratio was compared between before and after cryopreservation. **Results** The average cell survival rate of CIK cells before cryopreservation was (97.79±1.92)%, which was significantly higher than that after reanimation (83.61±3.42)%( $P<0.05$ ). The proportion of CIK with CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> phenotype after reanimation was slightly lower than that before cryopreservation, but the difference was not statistically significant( $P>0.05$ ). There was no significant difference in the cell killing rate of CIK cells before cryopreservation and after reanimation when the target ratio was 10:1 and 40:1( $P>0.05$ ); the cell killing rates of CIK cells before cryopreservation and after reanimation when the target ratio was 40:1 were significantly higher than those when the target ratio was 10:1( $P<0.05$ ). **Conclusion** The large system (50 mL) cryopreservation can effect the survival rate of CIK cells, but has no effect on the immune phenotype and cell activity.

**Key words:** cytokine induced killer cells; cryopreservation; killing activities; cell viability; tumour biotherapy

细胞因子诱导的杀伤细胞是将人脐带血或外周

血的单个核细胞在体外用多种细胞因子,如白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ )及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)等诱导培养后获得的一群异质性免疫细胞<sup>[1]</sup>。细胞因子诱导的杀伤(cytokine induced killer, CIK)细胞

DOI:10.7683/xyxyxb.2017.08.001

收稿日期:2017-04-15

基金项目:国家自然科学基金联合基金项目(编号:U1604179)。

作者简介:刘懿萱(1996-),女,河南焦作人,新乡医学院2014级医学检验技术专业在校大学生。

通信作者:丰慧根(1963-),男,河南新乡人,硕士,教授,研究方向:生物制药;E-mail:fenghui-gen@xxmu.edu.cn。

能同时表达 CD3<sup>+</sup> 和 CD56<sup>+</sup> 2 种膜蛋白,兼具 T 淋巴细胞杀瘤活性和自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞的非主要组织相容性复合体限制的杀瘤效应,故又称为 NK T 细胞<sup>[2]</sup>。CIK 细胞体外增殖速度快,杀瘤谱广,杀伤活性高,已是目前成熟的生物免疫治疗方法<sup>[3-4]</sup>。冻存是最常用的细胞贮藏手段,大多数肿瘤细胞经冻存复苏后仍然保持原有特性。而 CIK 这一类人工诱导培养的异质性细胞,冻存时间和体系都会对其免疫表型及杀伤活性产生一定影响<sup>[5-7]</sup>。本研究一方面采用健康人外周血,分离出单个核细胞并诱导为 CIK 细胞,观察不同体系冻存 1 个月后细胞免疫表型、活率及其对人乳腺癌细胞 MCF-7 的杀伤活性,为 CIK 细胞的临床应用及存储体系提供试验数据和思路;另一方面参照目前最常用的小体系 (1~2 mL) CIK 细胞冻存在超低温冰箱或液氮中的参数和方法,对大体系 (50 mL) 冻存技术和方法进行了探索,为保证患者在放射治疗和化学治疗后能够回输足量的 CIK 细胞提供途径。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 无血清培养基 (GT-T561) 购自日本 TaKaRa 公司;改良型 RPMI-1640 培养基购自美国 HyClone 公司;乳腺癌细胞购自深圳蓓赛尔细胞科技有限公司,为本实验室保存;IL-2、INF- $\gamma$ 、CD3 单克隆抗体均购自美国 PeproTech 公司;Ficoll 分离液购自天津灏洋生物科技有限公司;红细胞裂解液购自北京索莱宝科技有限公司。

**1.2 CIK 细胞扩增** 外周血来源于河南省商丘市中心血站征集的健康志愿者,男 4 名,女 2 名,年龄 18~30 岁,平均 (26.82  $\pm$  6.39) 岁。采集肘静脉外周血 50 mL,肝素钠抗凝。1 800 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min 获取血浆,血浆 56  $^{\circ}$ C 水浴 45 min 灭活补体,灭活后再次离心去除沉淀,4  $^{\circ}$ C 冰箱冷藏备用<sup>[8]</sup>;沉淀细胞用生理盐水稀释后采用 Ficoll 法分离得到单个核细胞,生理盐水洗涤离心 3 次。将获取的单个核细胞按照 2  $\times$  10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup> 的浓度接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,加入完全培养基 (无血清培养基中含:1  $\times$  10<sup>6</sup> U  $\cdot$  L<sup>-1</sup> IL-2、1  $\times$  10<sup>6</sup> U  $\cdot$  L<sup>-1</sup> INF- $\gamma$ 、50  $\times$  10<sup>3</sup> ng  $\cdot$  L<sup>-1</sup> CD3 单克隆抗体、5  $\times$  10<sup>3</sup>  $\mu$ L  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 自体血清) 50 mL,置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。每 3 d 分瓶 1 次,补充等量完全培养基,连续培养至 15 d。取新鲜 CIK 细胞进行活率、表面标记检测,然后直接进行杀伤实验,其余细胞经冻存、复苏后再进行检测和杀伤实验。

**1.3 CIK 细胞冻存、复苏** 冻存:取诱导成熟的 CIK 细胞,1 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min,弃上清液,加入适量无血清培养基重悬细胞,取样计数,并测定细胞活率。调整细胞浓度为 4  $\times$  10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup>,加入等量冻存液 (体积比为:无血清培养基:自体血清:二甲亚砜 = 5:4:1),混匀后将 50 mL 细胞悬液装入

200 mL 细胞转移袋中,于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中平铺放置 2 h,然后 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中放置 4 h,再转至 -80  $^{\circ}$ C 低温冰箱冻存 1 个月。

复苏:从 -80  $^{\circ}$ C 低温冰箱中取出冻存的 CIK 细胞,迅速放入 37  $^{\circ}$ C 水浴锅内融化,用生理盐水洗 1 次,重悬于完全培养基中,取样测定细胞活率,调整细胞浓度置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中活化 4 h。

**1.4 细胞活率测定** 2 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 锥虫蓝染液分别与冻存前和复苏后的 CIK 细胞悬液 1:1 混匀,染色 2 min 后,采用 Countstar 全自动细胞计数仪 (美国 Inno-Alliance Biotech 公司) 进行细胞活率测定,每个样本计数 3 次,取平均值。

**1.5 流式细胞术检测细胞免疫表型** 分别收集冻存前和复苏后的 CIK 细胞,用生理盐水洗涤 2 次,调整细胞浓度至 (1.0~1.5)  $\times$  10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>,以异硫氰基荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)-CD3、聚乙烯 (polyethylene, PE)-CD4、PE-CD8、PE-CD56 标记 CIK 细胞,同时标记 FITC-IgG1、PE-Ig1 作为对照,细胞 50  $\mu$ L 加抗体 10  $\mu$ L,混匀后 4  $^{\circ}$ C 避光 30 min,加入 2 mL 红细胞裂解液,10 min 后以 1 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min,去上清,用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 1 次,加 0.5 mL PBS 上机,检测细胞免疫表型。

**1.6 杀伤活性测定** 采用实时无标记细胞分析系统 (real time cellular analysis, RTCA) 评估 CIK 细胞的杀伤活性。其原理为加入靶细胞后,靶细胞通过细胞和微电极之间的相互作用产生电信号。加入 CIK 细胞后,CIK 细胞作用于靶细胞导致细胞形态、黏附能力等状态发生综合变化。RTCA 系统监测实时变化,以电信号的形式反映出来。如果 CIK 细胞最终导致靶细胞死亡,信号降低至零;反之,对信号没有影响。具体操作过程:加入 CIK 细胞前 1 d,靶细胞 (乳腺癌细胞) 按照 1  $\times$  10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup> 的密度接种于 6 孔培养板;按效靶比 10:1 和 40:1,将 CIK 细胞加入培养孔。基线扫描、设定细胞检测程序、设定实验孔靶细胞和效应细胞名称及数目,共培养 1 d 后,收集实验数据,计算细胞杀伤活率。CIK 细胞杀伤活率 = [靶细胞对照组吸光度值 - (靶细胞实验组吸光度值 - 效应细胞对照组吸光度值)] / 靶细胞对照组吸光度值  $\times$  100%。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CIK 细胞活率** 结果见图 1。结果显示,6 个不同标本来源的 CIK 细胞大体系冻存前细胞活率均在 95% 以上,平均为 (97.79  $\pm$  1.92)%;复苏后细胞碎片增多,细胞活率明显降低,均低于 88%,平均为 (83.61  $\pm$  3.42)% ,冻存前 CIK 细胞活率显著高

于复苏后,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

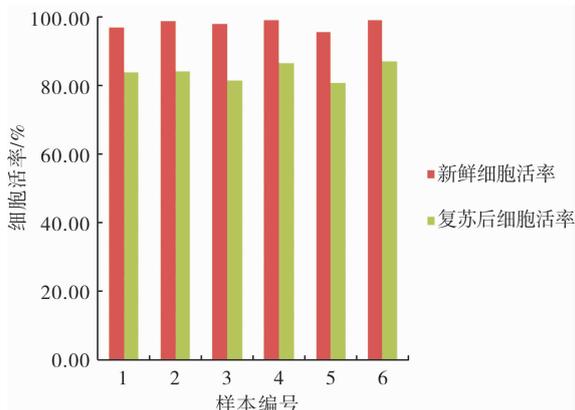


图 1 冻存前和复苏后 CIK 细胞活率  
Fig.1 Cell survival rate of CIK cells before cryopreservation and after reanimation

**2.2 细胞免疫表型分析** 结果见图 2。结果表明,冻存前 CIK 细胞中  $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 、 $CD3^+CD56^+$  表型 CIK 细胞所占比例分别为  $(96.06 \pm 1.93)\%$ 、 $(66.45 \pm 10.92)\%$ 、 $(54.45 \pm 6.83)\%$  和  $(22.38 \pm 4.16)\%$ ;复苏后 CIK 细胞中  $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 、 $CD3^+CD56^+$  表型 CIK 细胞所占比例分别为  $(94.93 \pm 1.35)\%$ 、 $(64.68 \pm 9.24)\%$ 、 $(53.93 \pm 6.59)\%$  和  $(22.05 \pm 2.94)\%$ ,复苏后 CIK 细胞中  $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 、 $CD3^+CD56^+$  表型 CIK 细胞所占比例虽较冻存前稍有降低,但差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

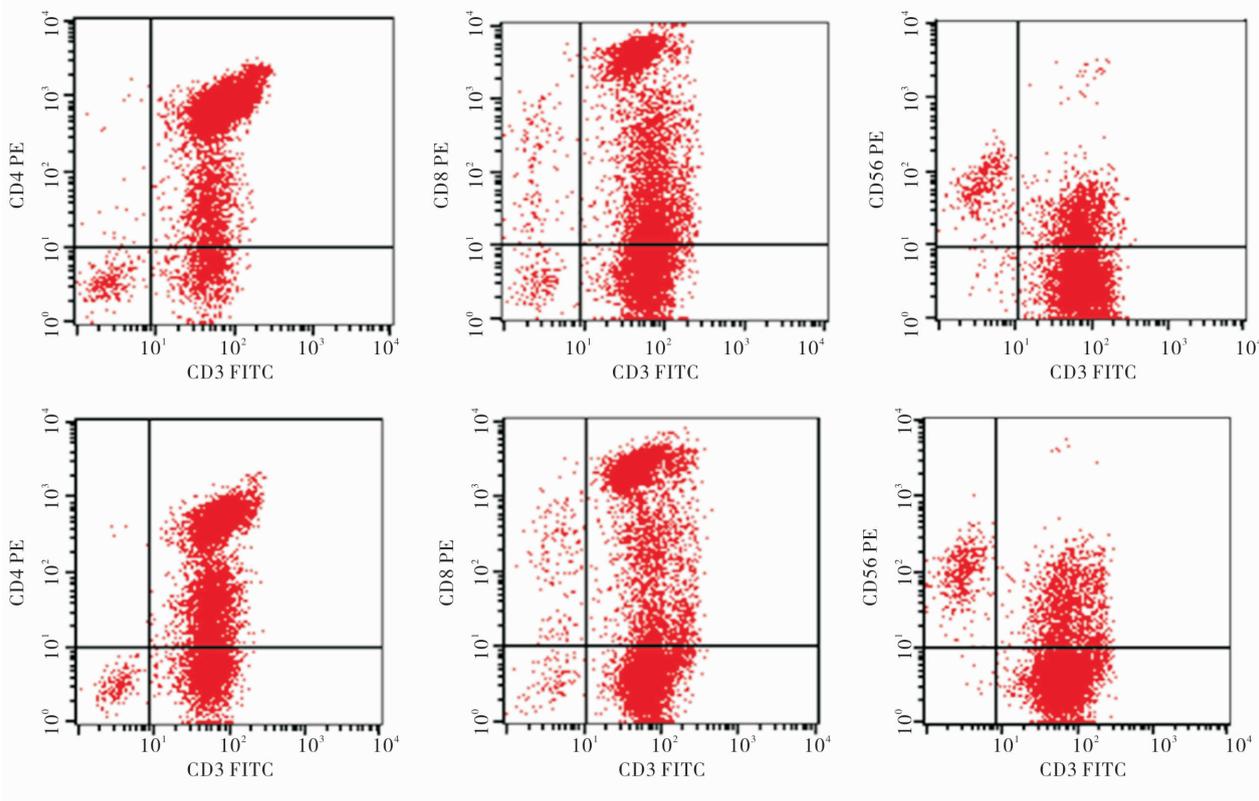


图 2 流式细胞术检查部分 CD 分子结果  
Fig.2 CD molecules results detected by flow cytometry

**2.3 细胞杀伤活性** 结果见图 3。结果显示,效靶比 10 : 1 时,冻存前细胞和复苏后细胞杀伤率分别为  $(57.77 \pm 8.95)\%$ 、 $(56.55 \pm 9.38)\%$ ,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );效靶比 40 : 1 时冻存前细胞和复苏后细胞杀伤率分别为  $(76.74 \pm 5.79)\%$ 、 $(75.98 \pm 4.79)\%$ ,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。效靶比 40 : 1 时冻存前细胞和复苏后细胞杀伤率均显著高于效靶比 10 : 1 时,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

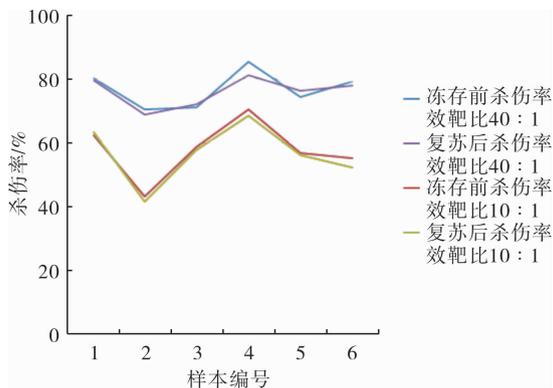


图 3 效靶比 10 : 1 和 40 : 1 杀伤率比较  
Fig.3 Comparison of killing rates of target ratio 10 : 1 and 40 : 1

### 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的肿瘤治疗模式。肿瘤生物治疗又被认为是唯一有希望治愈肿瘤的治疗方式。

肿瘤生物治疗以其安全有效、不良反应小等优点逐渐被广大患者接受。体内活化的CIK细胞可分泌多种细胞因子(IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 等),不仅对肿瘤细胞有直接抑制作用,还可通过调节免疫系统间接杀伤肿瘤细胞,而且还可诱导肿瘤凋亡及坏死<sup>[9-11]</sup>。多项临床研究表明,利用CIK细胞进行免疫治疗对食管癌、胃癌、乳腺癌及非小细胞肺癌等多种肿瘤是安全的,且有可能改善患者的预后<sup>[12-15]</sup>。

目前,肿瘤生物治疗主要还是与放射治疗、化学治疗、手术治疗联合进行临床应用<sup>[16-18]</sup>。肿瘤患者在放射治疗、化学治疗前进行自体外周血采集,放射治疗、化学治疗后4周左右进行CIK细胞回输,一般CIK细胞体外培养周期为14 d。大量研究证明,诱导成熟的CIK细胞在-80℃冰箱直接冻存2周后与新鲜CIK细胞杀伤活性差异有统计学意义<sup>[19]</sup>,但此研究冻存过程使用的是0.5 mL冻存体系。目前对大体系(50 mL)冻存研究的数据报道较少。本研究将诱导成熟的CIK细胞大体系(50 mL)低温冻存以备患者放射治疗、化学治疗后使用,其优势在于CIK细胞经扩增之后细胞基数增大,而且冻存复苏后能直接进行肿瘤细胞杀伤,临床意义在于能更早应用于治疗。大体系(50 mL)低温冻存是否会使CIK细胞杀伤活性降低是影响这一设想实施的关键因素,本研究结果显示,大体系低温冻存1个月的CIK细胞杀伤活性与新鲜CIK细胞相比较,杀伤活性差异无统计学意义;低温冻存对CIK细胞表型的影响无统计学意义;冻存后活细胞计数与冻存前计数差异有统计学意义,但其在效靶比40:1时杀伤活性仍大于50%,不影响其临床应用,提示大体系(50 mL)低温冻存CIK细胞可行。本研究为大体系冻存建立提供了有效数据,下一阶段需进一步研究,优化该大体系冻存方法,加快在临床肿瘤免疫治疗中的应用。

#### 参考文献:

[1] YANG K, ZHAO Y M, GAO X T, *et al.* Bio-activity of CIK cells under different culture time[J]. *Chin Med*, 2013, 109(1): 12-14.  
 [2] 杨涛, 邵江河, 李启英, 等. 树突状细胞联合CIK应用于晚期恶性肿瘤治疗的临床疗效观察[J]. *肿瘤*, 2010, 30(8): 700-705.

[3] HONTSCHA C, BORCK Y, ZHOU H, *et al.* Clinical trials on CIK cells; first report of the international registry on CIK cells (IRCC) [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(2): 305-310.  
 [4] MA Y, XU Y C, TANG L, *et al.* Cytokine-induced killer (CIK) cell therapy for patients with hepatocellular carcinoma; efficacy and safety [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2012, 1(1): 11-20.  
 [5] 赵强, 豆兴芳, 何苗, 等. 不同冻存时间对CIK细胞免疫表型及杀伤活性的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(10): 1534-1536.  
 [6] 陶岚, 周明先, 徐晓凤, 等. 不同方式冻存的外周血干细胞复苏培养CIK细胞的实验研究[J]. *现代诊断与治疗*, 2014, 25(21): 4946-4947.  
 [7] 王菲, 王丽萍, 张震, 等. 冻存对细胞因子诱导的杀伤细胞免疫表型及细胞内因子表达的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2014, 49(1): 11-14.  
 [8] 胡焕焕, 姬国杰, 赵青, 等. 人外周血与脐带血来源自然杀伤细胞大体系扩增培养比较[J]. *新乡医学院学报*, 2017, 34(3): 177-179, 183.  
 [9] SHI L, ZHOU Q, WU J, *et al.* Efficacy of adjuvant immunotherapy with cytokine-induced killer cells in patients with locally advanced gastric cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(12): 2251-2259.  
 [10] 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.  
 [11] 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.  
 [12] SCHMEEL L C, SCHMEEL F C, COCH C, *et al.* Cytokine-induced killer (CIK) cells in cancer immunotherapy: report of the international registry on CIK cells (IRCC) [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(5): 839-849.  
 [13] 张彤, 王佩, 张振海. 紫杉醇顺铂方案联合自体CIK细胞输注治疗晚期食道癌的临床分析[J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(7): 652-656.  
 [14] 张曼, 杨涛, 石洋, 等. DCs-CIK细胞免疫治疗联合化疗对晚期非小细胞肺癌疗效及安全性的影响[J]. *肿瘤*, 2014, 34(4): 361-365.  
 [15] 樊永丽, 赵华, 于津浦, 等. 胃癌患者术后化疗联合CIK免疫治疗的临床疗效[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(2): 168-173.  
 [16] LI X D, XU B, WU J, *et al.* Review of Chinese clinical trials on CIK cell treatment for malignancies [J]. *Clin Transl Oncol*, 2012, 14(2): 102-108.  
 [17] THANENDRARAJAN S, NOWAK M, ABKEN H, *et al.* Combining cytokine-induced killer cells with vaccination in cancer immunotherapy: more than one plus one [J]. *Leuk Res*, 2011, 35(9): 1136-1142.  
 [18] 周亮, 姚飞, 陈继冰, 等. 冷冻联合免疫疗法治疗无法手术的转移性乳腺癌[J]. *中华乳腺病杂志*, 2014, 8(1): 23-27.  
 [19] 吴秀娟, 任思坡, 罗小虎, 等. -80℃冰箱直接冻存对细胞因子诱导的杀伤细胞杀伤活性的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(10): 1078-1080.