

# 重组人纤维蛋白片段诱导 CIK 的增殖及对肺癌耐顺铂细胞的杀伤作用

任玮, 王志华

哈尔滨医科大学肿瘤研究所, 哈尔滨 150081

**摘要:** 为探讨重组人纤维蛋白片段(RetroNectin)对 CIK(Cytokine-induced killer cells)细胞活化、增殖的影响及 CIK 细胞的免疫学特性和对肺癌耐药细胞 DDP-A549 (DDP: Cisplatin)的杀伤作用。提取健康人外周血中单个核细胞, I 组细胞接种于前一天用 RetroNectin 和 CD3MAb 包被好的培养瓶中, II 组接种于单独用 CD3MAb 包被好的培养瓶中, 接种当天加入 IFN- $\gamma$ , 第二天加入 IL-2 诱导 CIK 细胞。细胞计数法测定 CIK 细胞的增殖,并绘制细胞生长曲线, MTT 法测定细胞杀伤活性,流式细胞术分析细胞表型。扫描电镜和透射电镜下观察 CIK 细胞对 DDP-A549 的杀伤和 DDP-A549 细胞的变化。RetroNectin 对 CIK 细胞有很强的激活作用,可使其细胞增殖总数达 524.77 倍,其主要效应细胞 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>可达 (31.40 $\pm$ 1.91)%; 对肺癌耐顺铂细胞 DDP-A549 的杀伤作用明显高于其亲代药物敏感株 A549( $P<0.01$ )。但两组 CIK 细胞对靶细胞的杀伤率在相同效靶比时无明显差异( $P>0.05$ )。RetroNectin 能显著增强 CIK 增殖活性,但对 CIK 细胞的杀伤活性并无明显影响。CIK 能够显著抑制 DDP-A549 的生长,可用于耐顺铂肺腺癌的免疫治疗。

**关键词:** 细胞因子诱导的杀伤细胞, RetroNectin, 增殖, 肺癌细胞, 杀伤活性

## Proliferation and Cytotoxicity of RetroNectin-Activated Cytokine-induced Killer Cells against Cisplatin-resistant Lung Carcinoma Cell

Wei Ren, and Zhihua Wang

Cancer Research Institute of Harbin Medical University, Harbin 150081, China

**Abstract:** To investigate the immunologic characteristics and cytotoxicity of the RetroNectin-activated cytokine-induced killer cells (CIK) against drug-resistant lung cancer cell lines DDP-A549 (DDP: Cisplatin). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected from healthy donors and divided into two groups: group I and group II. Seeded samples of group I into culture flask precoated with RetroNectin and CD3MAb to induce the CIK cells while seeded the group II into culture flask precoated with CD3MAb. In both groups, IFN- $\gamma$  was put into the flask on the same day and then IL-2 on the second day. The proliferation of CIK cells was tested by cytometric analysis. The cytotoxicity activity of CIK cells was determined by MTT assays. The phenotype changes of CIK cells were identified by flow cytometric analysis. Scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM) were used to view the cytotoxicity against DDP-A549 of CIK cells and the changes of DDP-A549. The total CIK cells significantly increased by 524.77 fold in cell proliferation number due to the activation to CIK cells of RetroNectin. The

**Received:** January 8, 2008; **Accepted:** April 7, 2008

**Supported by:** the National Natural Sciences Foundation of China (No. 39270765) and Heilongjiang Province Grand (No. GOOC190401).

**Corresponding author:** Zhihua Wang. Tel: +86-451-86298393; Fax: +86-451-86665003; Email: hljwzh000@163.com

国家自然科学基金资助(No. 39270765), 黑龙江省重点攻关课题基金项目(No. GOOC190401)资助。

expression rate of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells was (31.40±1.91)%. The cytotoxicity of CIK cells showed statistically significance between DDP-A549 and the sensitive strains of parental generation A549 ( $P<0.01$ ). There was no significant difference of CIK cells' cytotoxicity between two groups when the effector: target ratio was fixed ( $P>0.05$ ). RetroNectin can significantly improve the proliferation activity of CIK cells. There was no evident influence to the cytotoxicity of CIK cells. CIK cells may be used as the immuotherapy to lung adenocarcinoma owing to its significant inhibition to the proliferation of DDP-A549.

**Keywords:** cytokine-induced killer cell, RetroNectin, proliferation, lung carcinoma cell, cytotoxicity activity

1991年, 斯坦福大学 Schmidt-Wolf 等首先报道了一种在多种细胞因子共同作用下培养出的具有细胞毒活性的杀伤细胞, 即细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK), 它比 LAK 细胞具有更强大的肿瘤杀伤活性<sup>[1-3]</sup>。

近来, 有研究报道重组人纤维蛋白片段(RetroNectin)可参与细胞的附着、伸展、分化和增殖。该产品已注册美国药典和国际专利。本研究拟观察 RetroNectin 对 CIK 细胞的增殖辅助作用, 以便缩短 CIK 细胞的培养周期, 以最大限度地获取临床所需的输入数量; 并观察此种方法诱导出的 CIK 的免疫学特性和对肺癌耐药细胞 DDP-A549 的杀伤作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

干扰素(IFN- $\gamma$ )为美国 Peprotech 公司产品, RetroNectin、GT-T503 培养基(人淋巴细胞培养基)及 GT-T603 培养袋均为北京宝日医生物技术有限公司产品, CD3MAb 购于北京宝日医生物技术有限公司, 由古巴分子免疫学中心研制生产。IL-2 购自江苏金丝利药业有限公司, 鼠抗人 CD3-PerCP/CD4-FITC/CD8-PE 和 CD3-FITC/CD56-PE 及同亚型对照抗体兔抗鼠 IgG1 均为美国 BD 公司产品, 胎牛血清为杭州四季青生物责任有限公司产品, RPMI-1640 干粉为美国 GibcoBRL 产品, 顺铂(DDP)购自科鼎医疗有限公司。健康人外周血由哈尔滨红十字中心血站提供, 淋巴细胞分离液为天津市灏洋生物制品科技有限责任公司产品, MTT 为北京索莱宝科技有限公司产品, 流式细胞仪为美国 BD 公司产品, 酶标分光光度计为 BioRAU,450 型, 美国制造。荧光倒置显微镜为日本 OLYMPUS 公司产品。

### 1.2 靶细胞

人肺腺癌耐 DDP 细胞株 A549/DDP 受赠予研究所(购于湖南省万佰生物有限公司), 耐药倍数为

24.44; A549 肺腺癌细胞为哈尔滨医科大学肿瘤研究所保留株。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 CIK 细胞的诱导

将 RetroNectin 10  $\mu\text{g/mL}$  与 CD3MAb 5  $\mu\text{g/mL}$  加入 10 mL pH7.2~7.4 PBS 中, 另一组单独用 CD3MAb 5  $\mu\text{g/mL}$  加入 10 mL pH7.2~7.4 PBS 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 避光, 过夜, 包被底面积为 75  $\text{cm}^2$  的培养瓶。次日, 弃包被液, PBS(1 次)RPMI(1 次)清洗培养瓶。取健康人外周血, 经人淋巴细胞分离液密度梯度分离: 2000 r/min, 20 min。取中间环状乳白色单核细胞层, 用生理盐水反复洗 2 次(1800 r/min, 8 min; 1000 r/min, 5 min), 悬浮于 GT-T503 中, 2 h 后细胞计数, 两组均按细胞总数为  $2\times 10^7$  个接种于培养瓶中用加入 6% 人血浆的 GT-T503 淋巴细胞培养基培养, 按 1000 u/mL 加 IFN- $\gamma$ , 24 h 后按 300 u/mL 加 IL-2。RetroNectin 刺激 4 d 后, 将 2 组培养瓶中的细胞完全吹打下来后转移到 GT-T603 培养袋, (因为贴壁细胞是经过 RetroNectin 刺激的, 所以要尽量吹打干净)。扩充培养基体积至 4-6 倍, 每 3 天补充新鲜培养液和细胞因子 IL-2。CIK 细胞从培养第 14 天开始回收, 余分袋培养。

#### 1.3.2 耐药肿瘤细胞 DDP-A549 的培养

将  $1\times 10^6$  A549 接种在 DDP 浓度为 1  $\mu\text{mol/mL}$  的 RPMI-1640 培养液中, 正常换液, 培养 1 周; 改 DDP 浓度为 2  $\mu\text{mol/mL}$ , 培养 1 周; 再改 DDP 浓度为 3  $\mu\text{mol/mL}$ , 培养 1 周。以后培养均维持该浓度。收集生长良好的 DDP-A549, 按常规方法测定其在含 3  $\mu\text{mol/mL}$  DDP 的 RPMI-1640 中的生长情况, 计算倍增时间:  $T_d=T\times \lg 2/(\lg N_2-\lg N_1)$ ,  $N_1$  为起始时间细胞数,  $N_2$  为终止时间细胞数,  $T$  为  $N_1$  到  $N_2$  的时间(h)。

#### 1.3.3 光镜下细胞形态观察

在诱导过程中每天于光镜下观察 CIK 细胞形态变化。与肿瘤细胞共同培养, 观察两者形态上的差别。

### 1.3.4 CIK 细胞增殖活性的测定

用注射器随机抽取培养袋中的 CIK 细胞 1 mL, 5 次, 混匀, 用胎盘蓝计数细胞总数计算平均值, 每 3 天 1 次, 根据细胞增殖倍数绘制生长曲线。

### 1.3.5 CIK 细胞毒活性的测定

CIK 诱导第 14 天时, 取对数生长期的肿瘤细胞, 调整细胞浓度分别为  $1 \times 10^5/\text{mL}$ 、 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 、 $2.5 \times 10^4/\text{mL}$ , 每孔 100  $\mu\text{L}$  铺于 96 孔板中, 每组设 4 个复孔, 置  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  孵箱内培养, 6 h 后将浓度调整为  $1 \times 10^6/\text{mL}$  的效应细胞 CIK 按与靶细胞浓度分别为 10:1、20:1、40:1 加入 96 孔板中, 另设单独靶细胞组(靶细胞+培养液)和单独效应细胞组(效应细胞+培养液)为阴性对照组, 作用 48 h 后每孔加入 MTT 20  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 继续培养 4 h, 离心, 然后翻板弃去上清液, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO, 震荡几分钟, 等沉淀全部溶解后用酶标仪(波长 570 nm)测定吸光度 A 值, 计算杀伤率( $\%$ )= $\{1-[A(\text{效}+\text{靶})-A(\text{效})]/A(\text{靶})\} \times 100\%$ 。

### 1.3.6 CIK 细胞表型测定

取  $2 \times 10^6/\text{mL}$  细胞于流式专用管中, 相应抗体混匀  $4^\circ\text{C}$  避光放置 20 min, 用无钙镁 PBS 洗 2 遍, 1500 r/min 离心 5 min, 1% 甲醛固定后待上机测定, 分别于 7 d、14 d、21 d 时测  $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}8^+$ 、 $\text{CD}3^+$  $\text{CD}56^+$ , 结果分析采用 CellQuest Pro 软件。

### 1.3.7 扫描电镜和透射电镜标本的制备

(1) 扫描电镜标本的制备: 在 6 孔板中放置载玻片, 在紫外线下照射, 在 6 孔板中铺种 DDP-A549 细胞 3 mL ( $1 \times 10^5$ ), 34 h 后, 加 CIK 细胞 ( $1 \times 10^6$ ), 比例大约为 10:1, 并作单独肿瘤细胞对照组。24 h 后用吸管吸出培养液, 添加生理盐水轻轻冲洗细胞, 弃盐水, 然后加戊二醛(2.5%)固定, 以漫过玻片为宜, 取出玻片, 常规 HE 染色和 2.5% 戊二醛脱水、临界点干燥、喷金、扫描电镜观察、照相。

(2) 透射电镜标本的制备: 取 5 mL DDP-A549 ( $1 \times 10^5$ ) 铺于培养瓶中, 对数生长期(34 h)后, 加 5 mL CIK 细胞 ( $1 \times 10^6$ ), 比例大约为 10:1, 作用 24 h 后用细胞刮刀刮取细胞, 使细胞悬浮于培养液中, 吸出, 1000 r/min 离心 5 min, 倒出离心管中培养液, 用盐水洗细胞 1~2 遍, 然后转移到 Eppendorf 管中, 1000 r/min 离心 5 min, 弃去生理盐水, 用戊二醛(2.5%)及 1.0% 锇酸固定, 经乙醇梯度脱水, 超薄切片铅铀染色后置透射电镜下观察、照相。

## 1.4 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件包处理, 所有数据用  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 采用方差分析、配对  $t$  检验和 SNK-q 检验统计学分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 诱导过程中细胞形态的变化

#### 2.1.1 肿瘤细胞

肺癌细胞 A549 形态不规则, 伸展状态良好, 胞体两侧可见细长伪足状突起(图 1)。加顺铂培养后的 DDP-A549 细胞较 A549 体积略有缩小, 椭圆形, 边界不清晰, 伪足状突起变钝。镜下胞膜呈白色环状, 界限清晰, 胞质透亮, 细胞核无聚集, 部分可见核仁(图 2)。

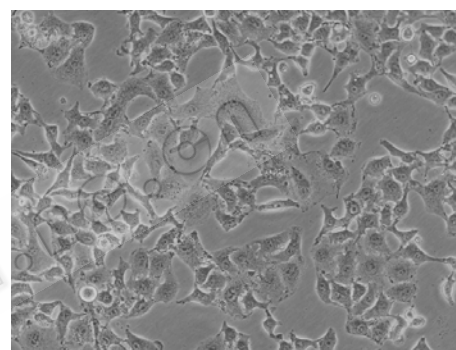


Fig. 1 Lung carcinoma cell A549 ( $\times 200$ )

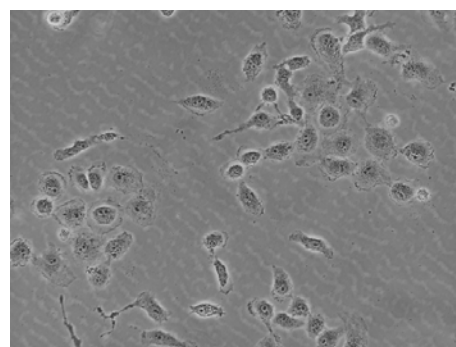


Fig. 2 Cisplatin-resistant lung carcinoma cell DDP-A549 ( $\times 200$ )

#### 2.1.2 CIK 细胞

诱导 1 天的单个核细胞大小较均一, 折光性较一致, 少数形态已经开始改变, 胞核密度加强, 细胞异型性较明显, 胞核中可见多量颗粒, 为大颗粒淋巴细胞(LGL)(图 3), 经 3 天培养诱导后的活化细胞中, 部分细胞死亡, 余大多数细胞明显增大, 呈典型的“逗号”细胞, 可见很多小集落开始生成(图 4)。第 7 天观察细胞集落明显增多、增大, 肉眼下即可

以观察到白色的斑点集落, 镜下大集落成黑团, 看不清细胞形态, 周边游离细胞饱满折光性好, 大小形态各异(图 5)。

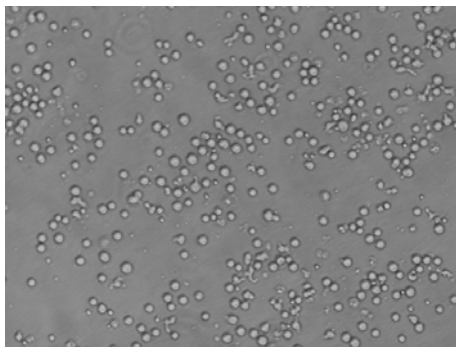


Fig. 3 Morphology of CIK cells on the 1<sup>st</sup> day of inducement (×200)

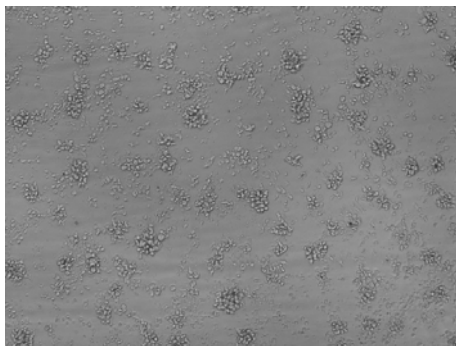


Fig. 4 Morphology of CIK cells on the 3<sup>rd</sup> day of inducement (×100)

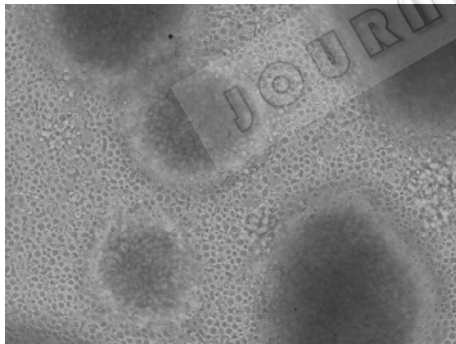


Fig. 5 Morphology of CIK cells on the 7<sup>th</sup> day of inducement (×100)

## 2.2 细胞增殖活性

### 2.2.1 耐药细胞增殖活性

DDP-A549 在含 3  $\mu\text{mol/mL}$  的 DDP-1640 中稳定生长, 倍增时间为: 34 h。

### 2.2.2 CIK 细胞增殖活性

2 组 CIK 在诱导第 3 天可见大量细胞死亡, 培养 4 天开始增殖, 在培养 12~21 d 时进入快速增殖期, 24 d 以后增殖趋于缓慢进入平台期, 加

RetroNectin 的一组在 29 d 后细胞数较前略有减少。从图中可见加 RetroNectin 的 1 组增殖倍数明显高于未加 RetroNectin 的另一组。(图 6)

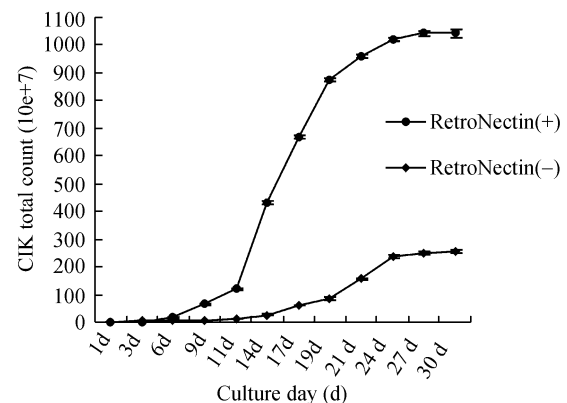


图 6 CIK 细胞增殖曲线

Fig. 6 The growth curve of CIK

## 2.3 CIK 细胞的杀伤活性

统计学分析显示 CIK 细胞对 DDP-A549 组和 A549 组的杀伤率在各个效靶比(10:1, 20:1, 40:1)均有显著差别( $P<0.01$ ), 对 DDP-A549 组的杀伤率高于 A549 组。对这两种细胞株的杀伤率均随着效靶比(E:T)的增高而增高( $P<0.05$ )。但 2 组 CIK 细胞对靶细胞的杀伤率在相同效靶比时无明显差异( $P>0.05$ )。

## 2.4 CIK 细胞表型测定

从表 2 可以看出 2 组 CIK 细胞的表型在不同诱导时间均具有显著差异( $P<0.05$ )。其中 CIK 的主要效应细胞  $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$  双阳性细胞所占百分比随着诱导时间的延长大幅度升高, 且在杀伤活性强的第 14 天和 21 天 I 组均高于 II 组( $P<0.05$ )。图 7~12 为诱导时间分别为 7、14、21 d 加入 RetroNectin 的 I 组 CIK 细胞的流式细胞仪表型图。

## 2.5 电镜下细胞形态观察

透射电镜下可以看到正常 DDP-A549 呈圆形, 细胞表面有丰富的微绒毛结构, 胞质内有大量线粒体, 内质网呈扩张状态, 内有丰富的游离核蛋白, 核大, 核仁明显, 核异型性明显(图 13)。DDP-A549 周围有很多活性淋巴细胞的包围(图 14)。加入 CIK 后, DDP-A549 细胞形态不规则, 表面光滑, 内质网广泛脱颗粒, 细胞核皱缩, 染色质边集加剧, 核膜结构不清, 细胞质线粒体几乎完全消失, 胞质水肿,

空泡变性，核浆比例明显减小。(图 15)

扫描电镜下观察可以看到正常的 A549 呈不规则形状，表面微绒毛丰富而且细长(图 16)，耐药细胞 DDP-A549 细胞形态变椭圆，伪足状突起变钝且数量减少(图 17)。杀伤状态下 CIK 细胞聚集在 DDP-A549 周围，与 DDP-A549 细胞接触，肿瘤细胞明显变小(图 18)，有的肿瘤细胞已经坏死崩解坏死(图 19)。

表 1 诱导第 14 天时不同效靶比 CIK 细胞对肿瘤细胞 DDP-A549 及 A549 的抑制率( $\bar{X} \pm S$ )

Table 1 Inhibition ratio of CIK against DDP-A549 and A549 on different E:T( $\bar{X} \pm S$ ) on the 14<sup>th</sup> day

Tumor cell	Effector-target ratio (E:T)					
	10:1 (%)		20:1 (%)		40:1 (%)	
	Group I	Group II	Group I	Group II	Group I	Group II
DDP-A549	44.72±1.80 <sup>△</sup>	43.04±4.37*	73.54±9.50 <sup>△</sup>	72.38±1.26*	89.42±4.08 <sup>△</sup>	88.78±1.06*
A549	39.95±4.29	39.68±2.61*	66.34±7.12*	64.08±1.20*	82.64±1.70	80.62±1.74*

group I : with RetroNectin; group II : without RetroNectin.  
DDP-A549 compared with group A549, <sup>△</sup>P<0.01; group II compared with group I , \*P>0.05.

表 2 不同培养时间下 CIK 细胞的细胞表型( $\bar{X} \pm S$ )

Table2.The cell phenotype of CIK at different culture time( $\bar{X} \pm S$ )

pheno	7 d (%)		14 d (%)		21 d (%)	
	group	group II	group I	group II	group I	group II
CD3 <sup>+</sup>	94.03±0.78	84.62±2.65	97.85±1.09	89.05±3.33	99.31±0.13	94.52±2.15
CD4 <sup>+</sup>	24.51±0.79	15.23±3.14	12.90±1.60	8.32±1.97	6.63±1.75	4.30±1.52
CD8 <sup>+</sup>	66.10±2.39	70.92±2.52	83.08±2.47	82.49±1.62	87.21±2.65	84.58±3.47
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	5.51±0.47	6.53±2.09	16.77±0.79	14.35±1.85	31.40±1.91	21.61±1.70

Group I : added with RetroNectin; group II : without RetroNectin

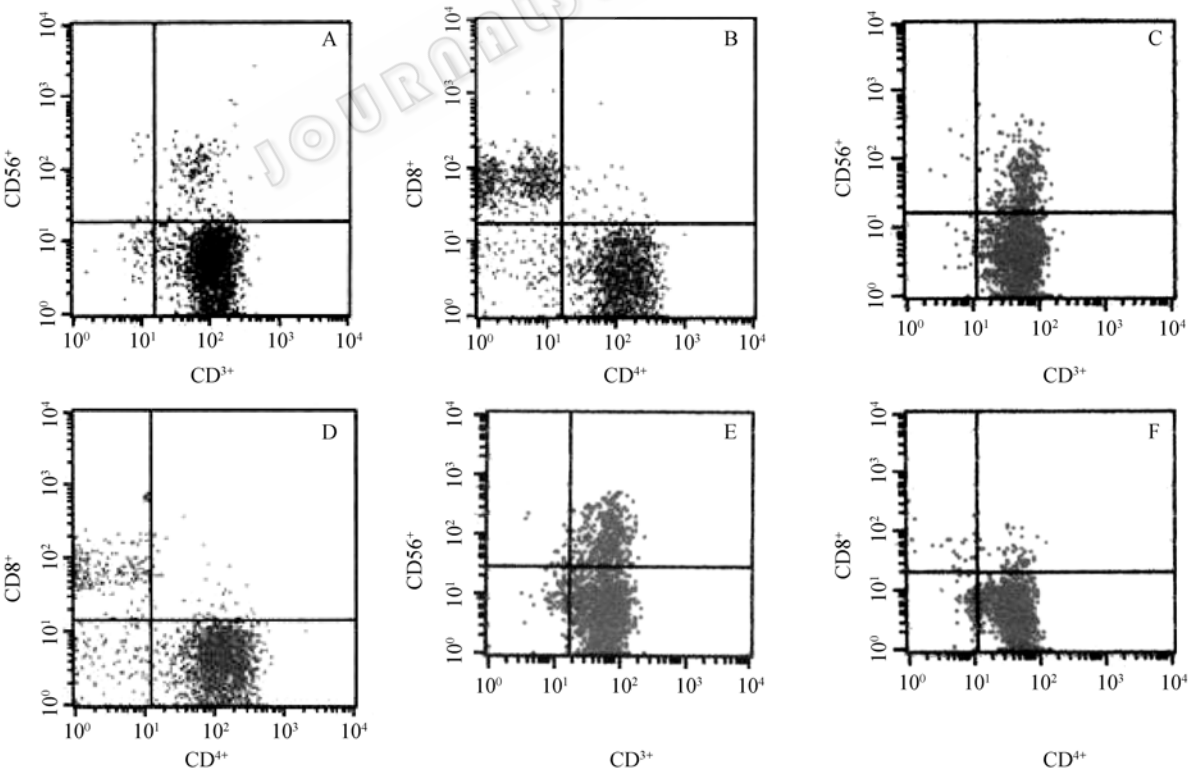


Fig. 7

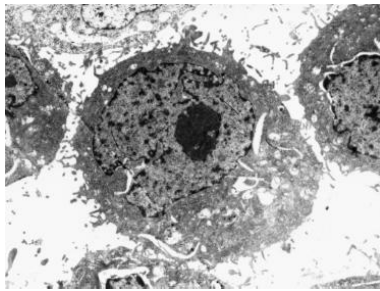


Fig. 8 Normal DDP-A549 ( $\times 5000$ )

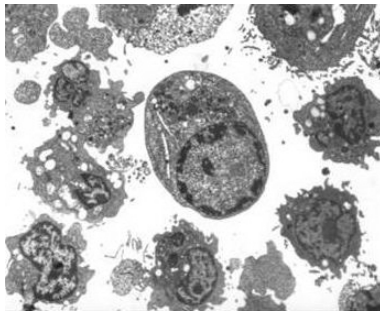


Fig. 9 DDP-A549 surrounded by CIK ( $\times 2500$ )

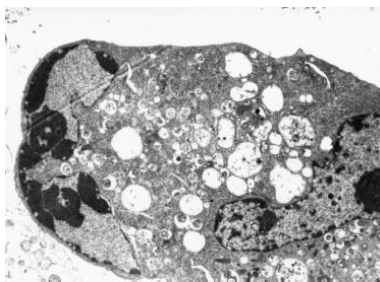


Fig. 10 Lethal effect of CIK on DDP-A549 ( $\times 5000$ )

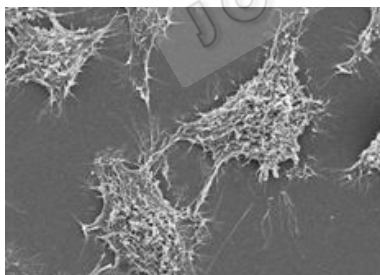


Fig. 11 Normal A549(the shape was irregular; microvillies on the surface were plentiful ( $\times 800$ ))

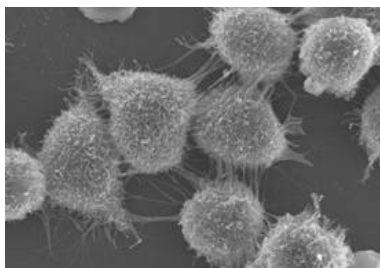


Fig. 12 Cisplatin- resistant cell DDP-A549 ( $\times 2700$ )

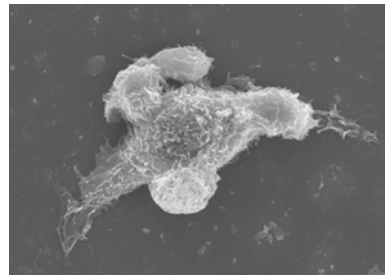


Fig. 13 CIK assemble to DDP-A549 ( $\times 2700$ )

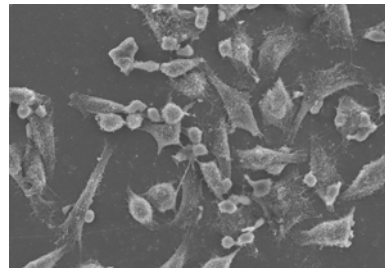


Fig. 14 CIK surround DDP-A549, and showed that DDP A549 disaggregated and necrosed ( $\times 700$ )

### 3 讨论

RetroNectin 是大肠杆菌 *E. coli* 中扩增的人的纤维连接蛋白的一种嵌合体, 包括 3 个功能域: 中央的细胞结合区(Type III repeat, 8, 9, 10)、肝磷脂结合区 II (Type III repeat, 12, 13, 14) 和在选择性结合 III CS 区域内的 CS-1 位点(如图 20)。RetroNectin 由 573 个氨基酸组成, 分子量为 63 kD。当包被在培养皿和培养瓶中时, RetroNectin 能显著提高逆转录病毒转染入哺乳动物细胞内的效率。这种增强作用可能与逆转录病毒颗粒和靶细胞在 RetroNectin 分子上共区域化有关。病毒颗粒通过与肝磷脂结合区域 II 相互作用而结合在这个分子上。靶细胞聚集在 RetroNectin 上主要通过纤维蛋白配基及 CS-1 位点与细胞表面整合素受体 VLA-4 相互作用或是在中央细胞结合区域内的另一个纤维蛋白配体(RGDS)与细胞表面整合素受体 VLA-5 互相作用。RetroNectin 还可参与细胞的附着、伸展、分化和增殖, 可增加体外培养淋巴细胞数量数百倍, 提高基因转染率 30%~70%。其用于激活 CIK 细胞的包被浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ 。该技术是 TaKaRa 公司与美国印第安娜大学医学部共同开发的生物技术。该项技术使一直以来几乎不可能的血液细胞内基因转染变为可能, 开启了血液细胞基因治疗的新篇章<sup>[4-11]</sup>。目前, 研究

者 都在致力于提高 CIK 的增殖及杀伤肿瘤细胞的活性<sup>[12, 13]</sup>。本实验将 RetroNectin 引入 CIK 细胞的培养中, 研究其对 CIK 细胞增殖的协同作用。

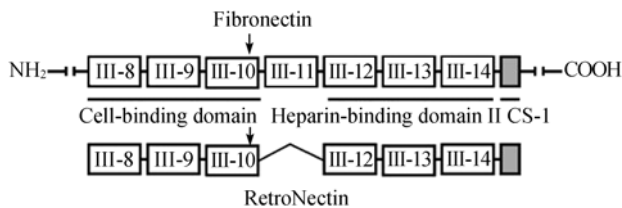


Fig. 20 Structure of RetroNectin

IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-1、CD3MAb 此细胞因子组合为经典的 CIK 激活方法, 以 IL-2 为基础, CD3 MAb 主要起到刺激扩增作用, 而 IFN- $\gamma$ 的先期 24 小时投放对于提升细胞毒性起关键作用, 至于 IL-1 只有在此组合中应用才对提高细胞毒性有帮助<sup>[3]</sup>。故本次实验并未加入 IL-1。

CIK 细胞属异质性细胞群, 主要由 2 种具有杀伤活性的亚群组成: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞和 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞<sup>[14]</sup>。而这种细胞后者较培养前增殖了 1000 倍以上, 在正常外周血中含量较少。有报道认为 CD56 抗原可能是 CIK 细胞中起增强细胞杀伤活性作用的重要抗原, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞是 CIK 细胞群体中的主要效应细胞<sup>[15]</sup>。

多药耐药(Multidrug resistance, MDR)被视为影响化疗疗效的主要障碍之一, 引发 MDR 的耐药蛋白, 往往随着化疗的用药过程会过度表达, 造成化疗药物不能进入其作用靶点——细胞核, 而导致化疗失败<sup>[16]</sup>。MDR 肿瘤细胞过度表达的耐药蛋白很可能成为 CIK 细胞攻击的免疫源从而破坏耐药蛋白的功能。因此有学者认为细胞免疫治疗与化疗之间的疗效可能有某种协同作用<sup>[17]</sup>。细胞免疫治疗与化疗对耐药肿瘤的协同治疗, 在近年来的临床应用中已有相关报道<sup>[18-20]</sup>。对于多数手术后的内源性耐药肿瘤(如肾癌)患者以及接受放化疗甚至骨髓移植等缓解后的肿瘤患者而言, 免疫效应细胞联合化疗对消除其体内表达耐药蛋白的残余肿瘤细胞可能会有更好的效果。而对于放化疗等无效的中晚期耐药肿瘤患者, 亦有希望成为发展前景良好的综合治疗方案。

本实验中在诱导 CIK 过程中加入了 RetroNectin, 此因子对增殖活性有显著的影响, 使 CIK 绝对数值由培养前的  $2 \times 10^7$  增加到  $(1049.53 \pm 15.66) \times 10^7$ , 增殖

倍数可达 524.77 倍, 明显高于未加 RetroNectin 的另一组  $(255.17 \pm 4.81) \times 10^7$ ; 其主要效应细胞 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 可达  $(31.40 \pm 1.91)\%$ 。但杀伤实验未显示 RetroNectin 对 CIK 的杀伤活性有显著作用: 两组 CIK 细胞对靶细胞的杀伤率在相同效靶比时无明显差异( $P > 0.05$ )。在 10:1、20:1 和 40:1 效靶比(E:T)时两组 CIK 对肺癌耐顺铂细胞 DDP-A549 的杀伤作用均明显高于其亲代药物敏感株 A549( $P < 0.01$ ), 再次说明体外实验证实免疫效应细胞对 MDR 肿瘤细胞的杀伤活性高于对其亲代药物敏感肿瘤细胞系<sup>[21]</sup>。本实验中随着效靶比的增高, CIK 细胞对肿瘤细胞的杀伤率也增高, 也说明目前 CIK 细胞对耐药肿瘤的杀伤活性对效靶细胞比例呈依赖性升高<sup>[22]</sup>。

综上所述, 在 CIK 诱导过程中加入 RetroNectin 能显著提高 CIK 细胞增殖力和 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞扩增比例。诱导 14~21 d 时, CIK 细胞增殖率和 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>阳性细胞比例均达到高峰, 这一时相的 CIK 细胞在增殖表型与细胞活力两方面均达到动态平衡。且本实验采用的 GT-T503 为日本原装进口无血清培养基, 适用于人体淋巴细胞及 DC 细胞培养, 配合大容量培养袋, 操作更简单, 污染率更低, 适合于临床应用。此外, CIK 对肺癌耐药细胞 DDP-A549 杀伤活性高于其亲代药物敏感株 A549, 更适合与化疗药物同时作用于耐药肺癌的治疗。

## REFERENCES

- [1] Finke S, Trojanek B, Lefterova P, *et al.* Increase of proliferation rate and enhancement of antitumor cytotoxicity of expanded human CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> immunologic effector cells by receptor-mediated transfection with the interleukin-7 gene. *Gene Ther*, 1998, **5**(1): 31.
- [2] Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Johnston V, *et al.* Propagation of large numbers of T cells with natural killer cell markers. *Br J Haematol*, 1994, **87**(3): 453.
- [3] Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, *et al.* Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *Exp Med*, 1991, **174**(1): 139-149.
- [4] Marion GO, Manfred S, Kerstin S, *et al.* Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nature*, 2006, **12**, 401-409.
- [5] Stefan G, Donald M, Li W, *et al.* Enforced expression of the homeobox gene Mixl1 impairs hematopoietic differentiation and results in acute myeloid leukemia.

- PNAS, 2006, **103**, 16460–16465.
- [6] Junya K, Hamsa P, Mark SC, *et al.* Bim and bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl<sup>+</sup> leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**, 14907–14912.
- [7] Franco CB, Scripture-Adams DD, Proekt I, *et al.* Notch/Delta signaling constrains reengineering of pro-T cells by PU.1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**, 11993–11998.
- [8] Williams RT, Roussel MF, Sherr CJ. Arf gene loss enhances oncogenicity and limits imatinib response in mouse models of Bcr-Abl-induced acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**, 6688–6693.
- [9] Weerkamp F, Baert MM, Naber BE, *et al.* Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**, 3322–3326.
- [10] Ida BE, Eva N, Andreas O, *et al.* Effective cell and gene therapy in a murine model of Gaucher disease. *PNAS*, 2006, **103**, 13819–13824.
- [11] Emanuela C, Paola M, Raffaella Z, *et al.* Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the Leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res*, 2006, **66**, 3044–3050.
- [12] Yuan YT, Wang ZH, Qin L. Effects of IL-24 on cytokine-induced killer cells. *World China J Digestol*, 2007, **15**(6): 548–553.  
袁玉涛, 王志华, 秦莉. IL-24 对细胞因子诱导的杀伤细胞的作用. *世界华人消化杂志*, 2007, **15**(6): 548–553.
- [13] Qin L, Wang ZH, Yuan YT. Effects of IL-12 on cytokine-induced killer cells. *Int J Immunol*, 2007, **30**(4): 203–207.  
秦莉, 王志华, 袁玉涛. IL-12 对 CIK 细胞体外增殖及细胞毒活性影响的研究. *国际免疫学杂志*, 2007, **30**(4): 203–207.
- [14] Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *Immunol*, 1994, **153**: 1687.
- [15] Linn YC, Lau LC, Hui KM. Generation of cytokine-induced killer cells (CIK) from leukemic samples and its in vitro cytotoxicity against autologous leukemia. *Blood*, 2000, **96**(Suppl 1b): 41b.
- [16] Gong YP, Wang YT, Chen FY, *et al.* Abnormal distribution of daunorubicin in HL260/ADR cell. *Chin Hematol Mag*, 2000, **21**: 309–311.  
龚玉萍, 王燕婷, 陈芳源, 等. 柔红霉素在 HL260/ADR 细胞内的异常分布. *中华血液学杂志*, 2000, **21**: 309–311.
- [17] Azuma E, Masuda S, Qi J, *et al.* Cytotoxic T-lymphocytes recognizing P-glycoprotein in murine multidrug-resistant leukemias. *J. Eur J Haematol*, 1997, **59**(1): 14–19.
- [18] Shi YJ, Ren HY, Cen XN, *et al.* Immunological effect cell promote ADR to induce the apoptosis of breast carcinoma drug-fast cell. *Chin Oncol Mag*, 2006, **28**(3): 188–191.  
石永进, 任汉云, 岑溪南, 等. 免疫效应细胞促进阿霉素诱导乳腺癌耐药细胞凋亡. *中华肿瘤杂志*, 2006, **28**(3): 188–191.
- [19] Atkins MB, Regan M, McDermott D. Update on the role of interleukin-2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**: 6342–6346.
- [20] Chen SG, Rui JA, Zhao HQ, *et al.* 13 reports of primarily hepatoma accompany with Vena portalis hepatis cancer epistomium. *Chin Oncol Mag*, 2005, **27**: 186.  
陈曙光, 芮静安, 赵海清, 等. 伴有门静脉癌栓的原发性肝癌 13 例报告. *中华肿瘤杂志*, 2005, **27**: 186.
- [21] Schmidt-Wolf IGH, Lefterova P, Johnston V, *et al.* Sensitivity of multidrug-resistant tumor cell lines to immunologic effector cells. *Cell Immunol*, 1996, **169**: 85–90.
- [22] Shi YJ, Yu JR, Zhu P, *et al.* Cytokine induced killer cell to lower the tolerance effect of breast carcinoma drug-fast cell to ADR. *J Peking Univ (Health Sci)*, 2001, **33**(5): 415–418.  
石永进, 虞积仁, 朱平等. 细胞因子诱导的杀伤细胞降低乳腺耐药细胞系对阿霉素的耐受效应. *北京大学学报(医学版)*, 2001, **33**(5): 415–418.