

CD- CIK 细胞对急性白血病细胞体外杀伤作用的研究

张小艳, 魏绪仓, 杨娣娣, 韩秀蕊 (陕西省人民医院中心实验室, 西安 710068)

摘要:目的 探讨树突状细胞(DC)对细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)增殖能力、免疫表型、分泌细胞因子水平以及抗白血病细胞作用的影响。方法 健康人外周血单个核细胞诱导DC和CIK细胞,将DC与CIK共培养,以CIK细胞单独培养为对照。用台盼蓝活细胞计数计算细胞扩增倍数,MTT法测定杀伤活性,流式细胞术分析免疫表型,ELISA双抗体夹心法检测分泌干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素12(IL-12)的水平。结果 DC- CIK 细胞增殖能力明显高于CIK细胞($P < 0.05$);DC,CIK细胞共培养后, $\text{CD}3^+\text{CD}8^+$ 、 $\text{CD}3^+\text{CD}56^+$ 双阳性细胞比率较同条件下CIK细胞组显著增多($P < 0.05$);共培养3d,DC- CIK 细胞上清液中IL-12、INF- γ 分泌量均比CIK细胞单独培养的分量高($P < 0.01$, $P < 0.05$);在5:1~40:1的效靶比范围内,DC- CIK 细胞对白血病细胞的杀伤率显著高于CIK细胞($P < 0.05$),且杀伤率与效靶比呈正相关。结论 DC- CIK 细胞增殖能力和抗白血病活性显著高于CIK细胞,DC- CIK 细胞可作为一种临床有效的抗白血病免疫治疗策略。

关键词:树突状细胞;细胞因子诱导的杀伤细胞;共培养;白血病;杀伤活性

中图分类号:R557;R392.12 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2009)04-032-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2009.04.014

Research of the Killing Activity of CD- CIK Cell on Leukemia Cells in Vitro

ZHANG Xiao-yan, WEI Xu-cang, YANG Di-di, HAN Xiu-rui

(Central Laboratory of Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: **Objective** The purpose was to investigate the effect of dendritic cells (DC) on proliferation, phenotype, secretory cytokines and anti-tumor activity against leukemia cells of cytokine-induced killer cells (CIK). **Methods** DC and CIK were prepared from healthy human peripheral blood mononuclear cells. They were co-cultured. CIK cells were cultured alone as control. Increase number of cells were counted by tapanblue staining, killing activity was detected by MTT assay, cells phenotypes were analyzed by flow cytometry, secretions of INF- γ , IL-12 were determined by ELISA. **Results** The proliferation activity of DC- CIK cells was significantly higher than that of CIK cells ($P < 0.05$). Under the same condition, the rate of $\text{CD}3^+\text{CD}56^+$ and $\text{CD}3^+\text{CD}8^+$ double positive cells in CIK cells were significantly enhanced by co-cultured with DC ($P < 0.05$). In DC- CIK cells, the level of IL-12, INF- γ in culture supernatants were all increased noticeably on day 3 compared to CIK cells which were cultured alone ($P < 0.01$, $P < 0.05$). At the effector target ratio from 5:1 to 40:1, the ant-tumor effect of DC- CIK cells was much higher than that of CIK cells ($P < 0.05$), and this effect was positive related with the effector target ratio. **Conclusion** The proliferation activity, anti-tumor effects against leukemia cells of DC- CIK cells were significantly higher than that of CIK cells. DC- CIK is promising as an immunotherapeutic strategy for patients leukemia.

Keywords: dendritic cells; cytokine induced killer cells; co-cultured; leukemia; killing activity

树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前已知的功能最强的抗原递呈细胞,它可以在体内、外向T淋巴细胞递呈抗原,并诱发细胞毒T淋巴细胞反应^[1]。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cells, CIK)是一种体外增殖能力强、杀伤活性高、对多重耐药肿瘤细胞较敏感的广谱抗肿瘤免疫活性细胞^[2],是恶性肿瘤过继性免疫治疗的重要手段之一。本研究通过多种细胞因子组合,从正常人外周血中诱导DC,CIK细胞,并将两者共培养,观察DC对CIK细胞增殖能力、杀伤活性、免疫表型及分泌细胞因子水平的影响,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 RPMI 1640 培养液及四甲偶氮唑盐(MTT), rhIL-2为Sigma公司产品; rhIL-4购自Gibco BRL公司; rhIL-1, rhIFN- γ , rhTNF- α 为上海生物制品研究所产品;培养用CD3McAb由Neomarkers公司提供; rhGM-CSF为先灵葆雅公司惠赠;鼠抗人CD1a, CD14, HLA-DR和FITC标记兔抗鼠荧光二抗购自中国医学科学院天津血液学研究所,流式细胞仪标记抗体CD3, CD3CD4, CD3CD8, CD3CD56及检测细胞因子(IL-12, IFN- γ)的ELISA试剂盒均购自晶美生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 白血病细胞获取(靶细胞):白血病细胞来自本院和兄弟单位血液科的初诊为急性淋巴细胞白血病病人,其中包括急性淋巴细胞白血病(ALL)和急性非淋巴细胞白血病(ANLL)。肝素抗凝,抽取患者外周血($WBC>20\times10^9/L$)3~5 ml或骨髓1~1.5 ml,经Ficoll-Hypaque梯度密度离心,获得白血病细胞加冷冻保存液贮于一196℃液氮罐中备用。要求白血病细胞比例>95%,活体细胞>90%。

1.2.2 CIK细胞获取及培养扩增:采集健康人外周血,肝素抗凝,以Ficoll-Hypaque淋巴细胞分离液分离获得单个核细胞(MNC),RPMI 1640洗3次,调细胞浓度为 $4\times10^6/ml$,贴壁培养1~2 h,收集悬浮细胞用含10 ml/dl小牛血清(FSC)的RPMI 1640液调细胞浓度为 $1\times10^6/ml$,加入rhIFN- γ 1 000 U/ml,放置37℃,5 ml/dl CO₂孵育箱中培养24 h后加入rhIL-2 300 U/ml,rhIL-1 100 U/ml,CD3 McAb 50 ng/ml,继续培养,以后每3 d更换新鲜培养液,补加rhIL-2。

1.2.3 DC细胞获取及体外培养:参照文献^[3]将获得健康人外周血单个核细胞(MNC)中的贴壁细胞,用含10 ml/dl FSC的RPMI 1640培养液培养,其中包含rhGM-CSF 550 U/ml,rhIL-4 500 U/ml。隔日半量换液,补加细胞因子,收获前72 h再加入rhTNF- α 50 U/ml,诱导DC成熟。

1.2.4 DC-CIK细胞混合培养:收获培养第9 d的DC细胞及CIK细胞,经活细胞计数后按1:5混合培养至第3,6 d,收集细胞做生物学活性测定。

1.3 CIK及DC-CIK细胞功能测定

1.3.1 细胞毒活性测定:以不同效靶比(5:1,10:1,20:1,30:1,40:1)的效应细胞(CD-CIK)和靶细胞(白血病细胞)放入96孔板,另设单独靶细胞及效应细胞孔,每孔设3个复孔,置37℃,5 ml/dl CO₂孵

育箱中培养48 h,用MTT法测杀伤活性。

杀伤活性(%)=[1-(实验组A-效应组A)/靶细胞A]×100%

1.3.2 细胞免疫表型分析:用流式细胞仪检测CIK及DC-CIK细胞的免疫表型;间接免疫荧光法测定DC免疫表型。

1.3.3 细胞因子检测:收集培养细胞上清液进行IL-12,IFN- γ 水平测定。采用ELISA双抗夹心法,操作按试剂盒说明进行。

1.4 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 增殖能力观察 CIK细胞培养第6 d进入显著增殖期,部分细胞体积明显增大,成丛或集落状悬浮生长。与DC共培养可明显提高CIK细胞的增殖速率。培养第15 d,经台盼蓝排斥法活细胞计数,CIK细胞总数扩增到原来的 43.57 ± 5.11 倍,而DC-CIK细胞为 60.75 ± 4.89 倍,两组差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 细胞表型分析

2.2.1 DC的形态及表型检测:培养9 d的DC细胞在倒置显微镜下可观察到典型的树状或毛刺状突起。经检测细胞表面分子表达,其特异性标志CD1a的阳性率为 $(80.56\pm1.72)\%$,MHC-I类分子HLA-DR的阳性率为 $(92.06\pm3.20)\%$,CD14的表达率为 $(8.69\pm1.76)\%$ 。表明此种方法可以诱导较高纯度的成熟DC。

2.2.2 DC与CIK细胞共培养后的免疫表型:CIK细胞单独培养,随着培养时间的延长,CD3⁺CD8⁺及CD3⁺CD56⁺双阳性细胞的比例逐渐增加。与DC共培养的CIK细胞CD3⁺CD8⁺及CD3⁺CD56⁺双阳性细胞的比例明显高于同条件下未共培养组($P<0.05$),见表1。

表1 CIK和DC-CIK细胞免疫表型变化($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	培养时间(d)	CD3 ⁺ cell	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺
对照	0	56.27±3.31	35.67±3.98	24.40±5.21	2.15±1.55
CIK	3	65.38±4.12	20.62±1.95	40.31±4.06	22.75±6.21
DC-CIK	3	70.56±5.71	14.96±2.25	56.38±5.12	34.18±2.01
CIK	6	75.42±4.78	13.12±1.67	61.95±6.13	32.21±1.75
DC-CIK	6	78.63±6.01	11.49±2.32	73.23±4.24	47.95±3.62

注:对照:为未经培养的MNC;与相同培养时间CIK比较 $P<0.05$ 。

2.3 体外细胞毒性 共培养3 d的DC-CIK细胞,对ALL细胞及ANLL细胞的杀伤活性均明显高于单纯CIK细胞($P<0.05$),且对ALL和ANLL

杀伤率无差异。在5:1~40:1的效靶比范围内,其杀伤作用与效靶比呈正相关,见表2。

表2 DC-CIK 细胞对白血病细胞的杀伤活性($\bar{x} \pm s, \%$)

效/靶	CIK 细胞杀伤活性		DC-CIK 细胞杀伤活性	
	ALL	ANLL	ALL	ANLL
5:1	12.32±3.14	13.68±5.16	18.57±1.82	19.72±2.13
10:1	19.98±2.66	20.98±2.67	29.01±0.86	31.99±1.78
20:1	31.60±4.16	33.76±3.15	42.60±4.10	44.02±5.10
30:1	41.66±2.64	42.18±3.11	56.13±6.17	54.55±2.76
40:1	54.89±6.11	52.61±6.12	64.77±3.38	66.41±3.90

2.4 细胞因子测定 DC 与 CIK 细胞共培养 3 d, 其上清液中 IFN- γ , IL-12 的水平分别为 (438.02~213.17)pg/ml 和 (30.65~9.10)pg/ml; 而同条件下单纯 CIK 细胞培养其上清液中 IFN- γ , IL-12 水平分别为 (213.96~137.00)pg/ml 和 (10.10~0.35)pg/ml; 两组相比 DC-CIK 细胞分泌 IFN- γ , IL-12 的水平显著高于 CIK 细胞 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 讨论 CIK 细胞是由多种细胞因子, 如 IL-2, IFN- γ 和 CD3 单克隆抗体等诱导的一种免疫活性细胞。其兼有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性与 NK 细胞的非主要组织相容性复合物 (MHC) 限制性杀瘤特点^[4]。DC 细胞摄取、加工、处理抗原, 高表达 MHC-I, MHC-II 类分子, 共刺激分子及黏附分子, 在体内外具有激发初次和继发性 T 细胞免疫应答功能, 并能分泌 Th1 型细胞因子 IL-12, 诱导 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ 和增强激活 NK 细胞的细胞毒活性, 为此, 将具有高效杀瘤活性的 CIK 细胞和具有强大肿瘤抗原递呈能力的 DC 共培养, 无疑会起到一定的抗肿瘤协同作用。

研究发现 DC 刺激 CIK 后, 细胞毒活性显著增强^[5]。本实验显示 DC, CIK 细胞一起培养后, 共培养物 DC-CIK 细胞对白血病细胞的杀伤作用显著高于同条件下单纯 CIK 细胞。虽然与文献^[5,6]报道有关 DC-CIK 细胞来源、制备方法、效靶比、效靶细胞作用时间以及靶细胞种类不尽相同, 但 DC-CIK 细胞对白血病细胞的杀伤活性与文献中 DC-CIK 细胞对胰腺癌细胞 DAN-G 及 CML 细胞的杀伤活性强于 CIK 细胞的结论相类同。证实 DC-CIK 细胞确实具有比 CIK 细胞更强的抗肿瘤活性。

CIK 细胞属于异质细胞群, 其抗肿瘤作用与 CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD56⁺ 双阳性细胞及分泌细胞因子的水平密切相关。将 DC, CIK 细胞一起培养后, 两者所分泌的细胞因子及表面分子表达发生了变化。研究发现 DC 与 CIK 细胞共培养时, DC 成熟表面标志 CD86, CD80, CD40, HLA-DR 的表达增加^[7]。而 CD4⁺CD25⁺ 细胞 (调节细胞 T 细胞) 和 IL-10 水平下降, 对肿瘤细胞的细胞毒活性增强^[8]。

负载 CA19-9 (肿瘤相关抗原) 的 DC 与 CIK 细胞混合培养 24 h 后 IL-12 的分泌量为 CIK 细胞单独培养时的 6.93 倍^[6]。DC 的抗原提呈作用能使 CIK 细胞分泌 IFN- γ 的时间延长, 分泌量增加^[9]。本实验显示, 共培养条件下, DC-CIK 细胞上清液中 IL-12, IFN- γ 分泌量均比同条件下单纯 CIK 细胞培养分泌量高, 且 CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD56⁺ 双阳性细胞比例也比 CIK 细胞组显著增多, 说明 DC-CIK 细胞的高杀伤活性与大量增殖的 CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD56⁺ 细胞有关, 细胞因子 IL-12, INF- γ 对杀伤肿瘤也发挥了直接和间接的重要作用。

DC 能够激活 CIK 细胞增殖。与 DC 共培养 14 d 后 CIK 细胞的增殖倍数比共培养 7 d 时高出 2 倍左右^[6]。本研究结果表明, 共培养 DC-CIK 细胞不仅具有很强的抗白血病活性, 且比同源 CIK 细胞具有更强的增殖速率, 共培养 6 d, DC-CIK 细胞总数比单独培养 CIK 细胞总数多扩增了 17 倍。说明利用共培养条件可提高 CIK 细胞的增殖能力, 获得大量高效的免疫细胞, 这对于解决目前临床免疫治疗效应细胞不足问题具有重要意义。

本研究初步证实, DC 可增加 CIK 细胞的增殖能力和抗白血病活性, 这为 DC-CIK 细胞临床应用提供了实验和理论依据。

参考文献:

- [1] 周昌菊, 马薇, 周建大, 等. 自体宫颈瘤树突细胞疫苗激活的 CTL 杀伤效应[J]. 癌症杂志, 2006, 25(2): 143-147.
- [2] Yamaguchi Y, Ohshita A, Kawabuchi Y, et al. Adoptive immunotherapy of cancer using activated autologous lymphocytes-current status and new strategies [J]. *Hum Cell*, 2003, 16(4): 183-189.
- [3] Motta MR, Castellani S, Rizzi S, et al. Generation of dendritic cells from CD14⁺ monocytes positively selected by immunomagnetic adsorption for multiple myeloma patients enrolled in a clinical trial of anti-idiotypic vaccination [J]. *Br J Haematol*, 2003, 121(2): 240-250.
- [4] Wang FS, Lin MX, Zhang B, et al. Autitumor activities of human autologous cytokine induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(3): 464-468.
- [5] Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(9): 1457-1462.
- [6] Marten A, Schottker B, Ziske C, et al. Increase of the immunostimulatory effect of dendritic cells by pulsing with CA19-9 protein [J]. *J Immunother*, 2000, 23

- (4):464-472.
- [7] Hackstein H, Thonson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targetes of immunosuppressive drugs[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(1):24.
- [8] Schmidt J, Eisold S, Buchler MW, *et al*. Dendritic cells reduce number and function of CD4+CD25+ cells in cytokine-induced killer cells derived from patients with pancreatic carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(11):1018-1026.
- [9] FuJii S, Shimiza K, Kronenberg M, *et al*. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(9):867-874.

收稿日期:2009-06-24

重氮试剂对尿素自动化测定的影响及处理措施

桂满元, 黄成文, 李洪波 (祁阳县第二人民医院检验科, 湖南祁阳 426100)

摘要:目的 分析自动生化仪中重氮试剂对尿素测定是否存在交叉污染及其产生原因并提出解决方法。方法 用迈瑞 BS-300全自动生化分析仪将新鲜混合血清单独进行尿素测定,然后将同份标本分别置于总胆红素(TB)或直接胆红素(DB)测试项目后再进行尿素测定,记录其结果并进行统计学分析;将重氮试剂一系列稀释作为标本来测定尿素,分析其对尿素自动化测定有无影响及影响程度。结果 重氮法原理中直接胆红素试剂对尿素测定结果没有影响,总胆红素试剂对尿素会产生明显的正干扰。结论 检验人员使用全自动生化仪时,不仅要熟悉仪器工作流程、试剂组成、测定原理等,更要注意试剂间的交叉污染,并根据仪器工作特点制定相应的措施来消除交叉污染,从根本上保证实验数据的可靠性,为临床提供客观真实的诊疗依据。

关键词:BS-300全自动生化分析仪;重氮试剂;尿素

中图分类号:R446.112 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2009)04-035-02

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2009.04.015

Influence of Diazonium Reagent in the Determination of Urea and Treatment Measures

GUI Man-yuan, HUANG Cheng-wen, LI Hong-bo (Department of

Clinical Laboratory, the 2nd People's Hospital of Qiyang, Hunan Qiyang 426100, China)

Abstract: Objective To analyse the exist and the cause of cross-contamination in the detection of urea by automatic biochemical analyzer, and put forward the resolvent. **Methods** Separately detected the urea of the fresh mixed serum by Mairui BS-300 automatic biochemical analyzer, then re-detected them after the detection of total bilirubin or direct bilirubin, and recorded the result and processed the statistics analysis. Detected the urea of the Diazonium reagent by a series of dilutions, then analysed the influence and degree. **Results** Direct bilirubin by Diazo principle had not influence to the detection of urea, but total bilirubin had obvious interference. **Conclusion** The laboratory worker not only know well the work process, the constitution of the reagent, the detecting principle, and also notice the cross-contamination between the reagents, then establish the relevant measure to eliminate them according to the instrument character, so ensure the reliabilities of the experiment data basically, and offer actual and impersonal evidence for the clinical diagnosis and treat.

Keywords: BS-300 automatic biochemical analyzer; Diazonium reagent; urea

尿素测定在临床应用十分广泛,其结果的可靠性直接影响临床的诊治。我科在应用迈瑞 BS-300全自动生化分析仪检测尿素时,时常遇到一些标本尿素值出现异常升高,经复查时结果又正常。出现这种异常结果前测试项目为总胆红素(重氮法),为了解重氮试剂对尿素自动化测定是否存在试剂间交叉污染,我们进行了以下实验,现报告如下:

1 材料

1.1 仪器 迈瑞 BS-300全自动生化分析仪。

1.2 试剂 总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)试剂是重氮法原理,并新鲜配制成单一试剂,尿素(UREA)试剂是

Urease-GLDH 法原理,均为3V 生物工程集团有限公司产品,批号:07061。

1.3 标本 新鲜混合血清(从患者血清中取无明显黄疸、无溶血、无乳糜的新鲜血清混合而成)。

1.4 质控物 RANDOX 质控血清(批号:498UN)。

1.5 统计学处理 用 SAS 统计软件对实验数据进行处理,组间比较采用 *t* 检验。

2 方法和结果 按试剂说明书设定仪器参数,并用新鲜配制的 RANDOX 质控血清进行仪器性能测定,结果在质控范围内,提示仪器性能及试剂都可靠。参照有关文献^[1,2],设