

人外周血细胞毒性 CD3⁻ CD56⁺ NK 细胞 高效扩增的研究

黄朝晖, 王 丰, 刘志辉, 华 东, 李莉华, 任金冬

Study on efficient expansion of human cytotoxic CD3⁻ CD56⁺ NK cells from peripheral blood

HUANG Zhao-hui, WANG Feng, LIU Zhi-hui, et al

Oncology institute of the Fourth Affiliated Hospital of Suzhou University, Wuxi 214062, China

Abstract: Objective To study the expansion of human cytotoxic CD3⁻ CD56⁺ NK cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Methods** PBMCs were cultured in stem cell growth medium (SCGM) or RPMI 1640 supplemented with monoclonal anti-CD3 antibodies, IL-2 and PHA at varying concentrations. The cytotoxicity of the expanded cells was detected by MTT method. **Results** After being activated by monoclonal anti-CD3 antibodies and IL-2, PBMCs cultured in SCGM got the obvious expansion, performed the highest proliferation while PHA was present ($P < 0.05$), expanded 51.3 ± 7.2 fold and contained (52.4 ± 7.9) % CD3⁻ CD56⁺ NK cells, (14.2 ± 4.0) % CD3⁺ CD56⁺ T cells. The expanded cells population lysed 83.7% of K562 and 55.8% of Raji target cells in 10 h effect to target ratio, respectively. **Conclusion** Cytotoxic cells including major NK cells could be expanded from PBMCs in SCGM with the synergistic induction by monoclonal anti-CD3 antibodies, IL-2 and PHA. This work provided a simple and efficient way of expansion and enrichment of human NK cells for the adoptive immunotherapy of tumor with NK cells.

Keywords: Natural killer cells; Anti-CD3 antibodies; Interleukin-2; Adoptive immunotherapy

摘 要:目的 探索从人 PBMC 中高效扩增细胞毒性 CD3⁻ CD56⁺ NK 细胞的方法。方法 使用干细胞生长培养基 (SCGM) 和 RPMI1640 培养基, 在抗 CD3 单抗、IL-2 和植物血凝素 (PHA) 的作用下从 5 例健康成人 PBMC 中诱导扩增 CD3⁻ CD56⁺ NK 细胞, 并用 MTT 法检测其细胞毒活性。结果 只有在 SCGM 为基础培养基时, PBMC 经抗 CD3 单抗、IL-2 作用获得大量增殖, 在 PHA 存在时获得最大增殖 ($P < 0.05$), 在 14 天时扩增 51.3 ± 7.2 倍, 含有 (52.4 ± 7.9) % CD3⁻ CD56⁺ NK 细胞和 (14.2 ± 4.0) % CD3⁺ CD56⁺ T 细胞; 在效/靶比 10:1 时, 对 K562 和 Raji 的杀伤率分别达 83.7% 和 55.8%。结论 可使用 SCGM, 在抗 CD3 单抗、IL-2 和 PHA 协同作用下大量扩增细胞毒性 CD3⁻ CD56⁺ NK 细胞, 为应用 NK 细胞进行肿瘤过继免疫治疗提供了一种简单有效的扩增 NK 细胞的方法。

关键词: NK 细胞; 抗 CD3 单抗; IL-2; 过继免疫治疗

中图分类号: R392.33 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)01-0036-03

0 引言

成功发展肿瘤过继免疫治疗的关键是如何获得足够数量的高效细胞毒效应细胞。NK 细胞具高效细胞毒活性, 不仅可用于肿瘤过继免疫治疗, 而且还可作为干细胞/骨髓移植的辅助疗法, 用于消除微残留减少复发或用于自体移植物的体外净化。但 NK 细胞体外扩增效率低, 成为限制其临床应用的重要因素之一。如何建立一种简单有效、易于推广的 NK 体外扩增方法是其应用于临床需要解决的首要问题^[1]。最近, Carlens 等人^[2]建立了一种简单高

效的扩增 NK 细胞的方法, 并将用这种方法获得的以 CD3⁻ CD56⁺ NK 细胞为主的细胞群体称为细胞因子诱导的自然杀伤细胞 (cytokine-induced natural killer, CINK), 检测结果显示 CINK 细胞是一种新型高效的免疫活性细胞。本研究试从方法学角度对 Carlens 等人建立的方法进行改进, 以期进一步提高 CINK 细胞的体外扩增效率。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

IL-2 购于上海华新公司, 鼠抗人 CD3 单抗购于加拿大 YES 公司, 干细胞生长培养基 (stem cell growth medium, SCGM) 由德国 CellGro 公司提供, CD3、CD56 单抗均由法国 Immunotech 公司提供,

收稿日期: 2003-04-01; 修回日期: 2003-05-14

基金项目: 无锡市卫生局“十五”重大科研项目资助课题

作者单位: 214062 江苏无锡, 苏州大学附属第四医院肿瘤研究所

K562 和 Raji 细胞购于中国科学院上海细胞所。

1.2 实验方法

1.2.1 外周血的采集与单个核细胞的分离 健康志愿者 5 例, 采集肘静脉外周血 10ml, 肝素抗凝, 用 PBS 等体积稀释后, 用淋巴细胞分离液(比重 1.077)以密度梯度离心法分离得 PBMC, PBS 洗涤 2 次。

1.2.2 细胞培养 分为 3 大组:(1) SCGM 实验组: PHA-CINK 组:用 SCGM(含 5% 人 AB 血清, 含 0、100、500、1000U/mlIL-2), 调整 PBMC 密度为 5×10^5 /ml, 接种于 24 孔板中, 1ml/ 孔, 分别加入鼠抗人 CD3 单抗 0、10、500ng/ml 和 PHA50 μ g/ml, 放置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中培养。3 天后离心洗去培养基中的 CD3 单抗和 PHA, 加入 SCGM(含 5% 人 AB 血清和相应浓度 IL-2)继续培养, 每 3 天半量换液。

CINK 组:不加 PHA, 其它条件同 PHA-CINK 组。(2) RPMI1640 组:以 1640 培养基代替 SCGM 进行与(1)组相同试验。(3)对照组:以 Carlens 等^[2]建立的方法为对照组扩增 NK 细胞, 简述如下:用 SCGM(含 5% 人 AB 血清, 500U/mlIL-2)调整 PBMC 密度为 5×10^5 /ml, 加入抗 CD3 单抗 10ng/ml, 接种于 24 孔板中培养 5 天, 离心洗去 CD3 单抗后, 加入新鲜培养基继续培养。

1.2.3 免疫表型分析 取培养第 0、14 天细胞用流式细胞仪检测 CD3、CD56 的表达情况。

1.2.4 肿瘤细胞的培养 NK 敏感细胞株 K562 和 NK 抵抗细胞株 Raji, 均培养于 RPMI1640 (含 10% FCS) 中, 置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 条件下培养。

1.2.5 杀伤活性测定 以对数生长期 K562 和 Raji 细胞为靶细胞, 调细胞密度为 1×10^5 /ml, 培养 14 天的细胞为效应细胞, 效/靶比为 10:1, 同时设靶细胞孔、效应细胞孔和 RPMI1640 空白对照孔, 均设 3

个复孔。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养 12h, 每孔加入 20 μ l MTT (5mg/ml), 继续孵育 4h, 每孔加 DMSO100 μ l, 充分吹打、混匀, 用酶标仪检测 570nm 波长 OD 值, 按下式计算杀伤率:

$$\text{杀伤率}(\%) = \left[1 - \frac{\text{实验孔 OD 值} - \text{效应细胞孔 OD 值}}{\text{靶细胞孔 OD 值}} \right] \times 100\%$$

1.3 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两样本均数 *t* 检验。所有统计学分析均用 SPSS10.0 进行。

2 结果

2.1 细胞扩增情况

在不加或加入 10ng/ml 抗 CD3 单抗条件下, 实验各组细胞增殖倍数均小于 5; 在 500ng/ml 抗 CD3 单抗条件下, 细胞获得明显增殖。CINK 实验组在不同 IL-2 浓度(100、500、1000U/ml)下, 细胞扩增倍数无显著差异 ($P > 0.05$), 但在无 IL-2 存在时, 则未见明显增殖。培养至 14 天时对照组与 SCGM 实验组细胞均明显增殖, 对照组细胞扩增了 47.0 ± 8.5 倍; CINK 组与 PHA-CINK 组的扩增倍数分别是 49.4 ± 8.1 和 51.3 ± 7.2 , 均显著高于对照组 ($P < 0.01$); PHA-CINK 组细胞扩增倍数也显著高于 CINK 组 ($P < 0.05$)。RPMI1640 组在各种实验条件下细胞扩增倍数均小于 5。

2.2 免疫表型分析

培养前 PBMC 及在 500ng/ml 抗 CD3 单抗、和 100U/mlIL-2 条件下培养 14 天 SCGM 实验组流式检测结果见表 1。可见经 14 天培养 SCGM 实验组和对照组细胞中 CD3⁺CD56⁺ NK 细胞和 CD3⁺CD56⁺ T 细胞(NKT 细胞)比例均显著增加, 但在不同组间均无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 杀伤活性测定

表 1 PHA-CINK 细胞免疫表型变化 ($\bar{x} \pm s$) %

培养时间 (d)	n	CD3 ⁻ CD56 ⁺			CD3 ⁺ CD56 ⁺		
		对照组	CINK 组	PHA-CINK 组	对照组	CINK 组	PHA-CINK 组
0	3	12.7 \pm 3.9	12.7 \pm 3.9	12.7 \pm 3.9	1.8 \pm 1.3	1.8 \pm 1.3	1.8 \pm 1.3
14	3	51.2 \pm 6.4	52.4 \pm 7.9	49.8 \pm 7.2	12.8 \pm 2.7	14.2 \pm 4.0	14.7 \pm 3.9

培养 14 天细胞对 K562 和 Raji 细胞的杀伤率(效/靶比 10:1)。这 3 组细胞对 K562 和 Raji 的杀伤活性均无显著差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 CINK 细胞对肿瘤细胞杀伤活性 (%)

	对照组	CINK 组	PHA-CINK 组
K562	79.5 \pm 5.6	82.4 \pm 6.3	83.7 \pm 4.4
Raji	54.5 \pm 3.8	53.2 \pm 3.6	55.8 \pm 5.4

3 讨论

NK 细胞是机体天然免疫的主要承担者, 也是获得性细胞免疫的核心调节细胞。NK 细胞功能低下的肿瘤患者往往易发生转移和预后不佳。

目前应用 IL-2 为主要刺激因子扩增了淋巴因子激活杀伤细胞(LAK)、CD3 活化杀伤细胞(CD3AK)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、细胞因子诱导

的杀伤细胞(CIK)等多种细胞毒效应细胞用于过继免疫治疗,临床试验结果显示具有较好的应用前景,这些效应细胞是以NK为主或富含NK样细胞^[1],但通常这些细胞中NK细胞的含量都不高。由于NK细胞在人外周血中的数量远少于T、B淋巴细胞,而且其体外扩增效率不高导致难以获得临床级别的细胞数量,因此建立一种简单高效的NK体外扩增方法具有重要的意义。Escudier等人^[3]用体外扩增的NK细胞进行了肾细胞癌的过继免疫治疗,并取得了积极的效果,但他们采用的NK细胞扩增方案费时长,难以推广,Pierson等人^[4]的方法也存在类似问题。Luhm等人^[5]建立了一种足以满足临床需要的NK细胞扩增方案,培养2周能使NK细胞扩增80倍以上,但该方法仍需要饲养细胞的存在和需进行免疫磁珠分选等步骤。相比之下,Carlens等人^[2]的方案较为简单,我们在他们的工作基础上加以改进,通过增加抗CD3单抗的用量和缩短刺激时间,运用抗CD3单抗、IL-2、PHA协同刺激,明显提高了CINK细胞的扩增效率,且对CINK细胞的组成和高细胞毒活性均无显著影响。虽然有研究^[6]提示高剂量IL-2(大于500U/ml)有利于NK细胞的增殖,但我们的研究结果显示IL-2浓度变化(100~1000U/ml)对细胞增殖无明显影响,提示获得的CINK细胞具有对IL-2依赖性低的特点。

由上述可见,我们所获得的CINK细胞具有细胞毒活性强,增殖倍数较高,培养扩增条件简单等优点,为CINK细胞将来用于肿瘤生物治疗奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Herberman RB. Cancer immunotherapy with natural killer cells[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29 (3 suppl 1): 27-30.
- [2] Carlens S, Gilljam M, Chambers BJ, et al. A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3⁺CD56⁺ natural killer cells[J]. *Hum Immunol*, 2001, 62 (10): 1092-1098.
- [3] Escudier B, Farace F, Angevin E, et al. Immunotherapy with interleukin-2 (IL-2) and lymphokine-activated natural killer cells: improvement of clinical responses in metastatic renal cell carcinoma patients previously treated with IL-2[J]. *Eur J Cancer*, 1994, 30A (8): 41078-41083.
- [4] Pierson BA, Europa AF, Hu WS, et al. Production of human natural killer cells for adoptive immunotherapy in a controlled stirred-tank bioreactor[J]. *J Hematother*, 1996, 5 (5): 475-483.
- [5] Luhm J, Brand JM, Koritke P, et al. Large scale generation of natural killer lymphocytes for clinical application[J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2002, 11 (4): 651-657.
- [6] Vitolo D, Vujanovic NL, Rabinowich H, et al. Rapid IL-2-induced adherence of human natural killer cells. Expression of mRNA for cytokines and IL-2 receptors in adherent NK cells[J]. *J Immunol*, 1993, 151 (4): 1926-1937.

(刘红武校对)