

CIK 细胞对人肺癌细胞 A549 凋亡作用的影响

师 岩 张春晶 刘秀财 吴 琦 高 涵 冯 丽 王淑英 李淑艳

摘 要 **目的** 观察细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cell, CIK)对人肺癌细胞 A549 凋亡作用的影响,并探讨机制。**方法** 常规方法体外诱导生成 CIK 细胞, CIK 细胞为效应细胞,人肺癌细胞 A549 为靶细胞,比较观察人肺癌细胞 A549 的凋亡情况。**结果** 电镜法观察 CIK 细胞能诱导人肺癌细胞 A549 出现凋亡的超微结构变化,annexinV/PI 流式细胞分析法检测早期凋亡率发现 CIK 实验组明显高于对照组。**结论** 体外培养的 CIK 细胞可明显诱导人肺癌细胞 A549 凋亡。

关键词 CIK 细胞 人肺癌细胞 A549 细胞凋亡

The Effect of CIK Cell on Apoptosis of Lung Cancer Cell A549. Shi Yan, Zhang Chunjing, Liu Xiucui, et al. Department of Biochemistry, Qiqihar Medical College, Heilongjiang 161006, China

Abstract Objective To investigate the inhibitory effects of CIK cell on apoptosis of lung cancer cell A549 in vivo. **Methods** CIK cells were induced by culturing PBMC with regular method and cell apoptosis was detected. **Results** Electron microscopic observations showed that CIK cells could induce the lung cancer cells A549 to apoptosis. Flow cytometry (FCM) demonstrated that apoptosis cells of lung cancer cells A549 were increased in CIK group as compared with the control group. **Conclusion** CIK cells can induce the apoptosis of lung cancer cells A549.

Key words Cytokine induced killer cell; Lung cancer cell A549; Apoptosis

世界各国肿瘤的发病率、病死率逐年增高,其治疗手段主要有 3 大类常规方法:手术、化疗、放疗。此外还有新型的生物治疗,它被列为肿瘤综合治疗的第 4 大模式。生物治疗肿瘤在不损伤机体免疫功能的前提下,直接损伤并消除肿瘤细胞,尤其在消除微小残留病灶方面具有显著作用。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cell, CIK)就是一种新型的免疫活性细胞,它是将外周血单个核细胞在体外用多种细胞因子诱导培养后获得的一种异质细胞^[1],这种细胞具有增生快、杀瘤谱广、杀瘤活性强等其他一些效应细胞无法比拟的优点,在过继免疫疗法中具有广泛的应用。本研究拟以体外培养的人肺癌细胞 A549 为靶细胞,CIK 细胞为效应细胞,探讨 CIK 细胞是否能诱导肺癌细胞 A549 凋亡。

材料与方法

1. 实验材料:基因重组人干扰素- γ (IFN- γ , 北京帮定生物医学公司),基因重组人白细胞介素-2、白细胞介素-1 (IL-2、IL-1, 美国 Peprotech 公司),CD3 单抗(北京帮定生物医学公司),人肺癌细胞株 A549(中科院上海生物研究所提供),胰

酶(美国 Sigma 公司),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(中国杭州四季青生物工程有限公司),annexinV/PI 细胞凋亡检测试剂盒(中国杭州联科生物技术有限公司)。

2. 实验方法:(1)CIK 细胞的制备及细胞体外培养,见参考文献[2]。(2)透射电镜法观察 CIK 细胞对人肺癌细胞 A549 凋亡情况的影响:将人肺癌细胞 A549 置于 37℃、5% CO₂ 细胞孵箱中培养 24h 后,取生长状态良好的贴壁细胞,CIK 细胞为效应细胞,人肺癌细胞 A549 为靶细胞,按 20:1 效靶比将效应细胞和靶细胞置于 37℃、5% CO₂ 细胞孵箱中培育,6h 后收取人肺癌细胞 A549,同时设单独培养的人肺癌细胞 A549 为对照组。各组分别用胰酶消化,消化时间 1min 左右,不宜过长。PBS 吹下后放入 15ml 离心管中,离心 10min,1000r/min,将底部细胞团转移到 EP 管中,再 4℃ 离心 10min,1500r/min,见底部细胞团较紧密聚集在一起,弃上清液。加 4℃ 预冷的 3% 戊二醛,在 4℃ 过夜后,透射电子显微镜观察超微结构。(3)流式细胞仪检测细胞凋亡:人肺癌细胞 A549 以 1×10^5 个/毫升浓度接种至细胞培养瓶,在 37℃、5% CO₂ 细胞孵箱中培养 24h 后,实验组按 20:1 效靶比加入 CIK 细胞,对照组为正常培养的人肺癌细胞 A549,继续培养 6h 后收集细胞,将单细胞悬液放入 15ml 离心管中,2000r/min,离心 5min,弃上清液,各组加入 500 μ l PBS,制成单细胞悬液并用滤膜过滤,取 400 μ l 悬液转至 5ml 流式专用管,再加 100 μ l 5 $\times$ Binding Buffer、FITC 5 μ l 和 10 μ l PI 溶液,对照组不加。混匀后,避光孵育 5min 后迅速检测,同时以不加 FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。每个样本至少重复 3 遍。

基金项目:黑龙江省教育厅科研基金项目(11541406)

作者单位:161006 黑龙江省齐齐哈尔医学院生物化学与分子生物学教研室

通讯作者:李淑艳,电子信箱:lsy6910553@163.com

3. 统计学处理:采用 SPSS10.0 软件进行两组间比较,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

结 果

1. 透射电镜观察细胞凋亡情况:透射电镜观察可见,CIK 实验组细胞体积略有变小,胞核缩小,核膜较完整,核膜下染色体有边集现象,胞质内内质网增多,

绕核周分布,并有溶酶体即吞噬体颗粒出现,线粒体内有空泡,呈现细胞凋亡早期形态学改变(图 1A:CIK 组)。对照组人肺癌细胞 A549 核膜结构清晰、细胞核内以常染色质为主,染色质边集现象少见,胞质内游离核糖体丰富,线粒体形态清晰,没有明显的细胞凋亡形态学改变(图 1B:对照组)。

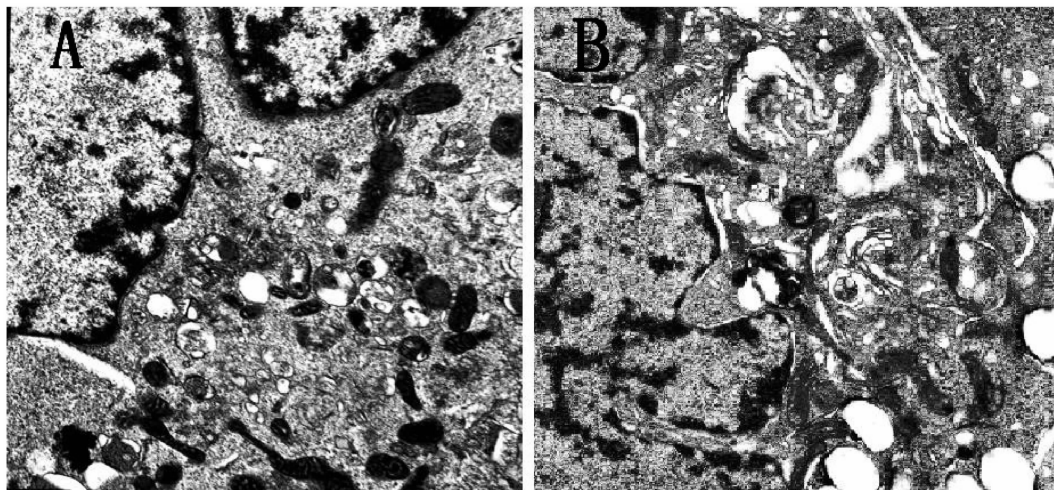


图 1 透射电镜观察人肺癌细胞超微结构($\times 12k$)

A. CIK 组;B. 对照组

2. annexinV/PI 流式细胞仪法检测细胞凋亡:如图 2 所示,两组细胞经 Annexin V/PI 流式细胞仪检测,在双变量的 FCM 散点图上,右下象限为早期凋

亡细胞,右上象限为晚期凋亡细胞。CIK 实验组细胞早期凋亡占 27.89%,且晚期凋亡占 19.28%(图 2A);对照组细胞早期凋亡细胞占 11.35%(图 2B),

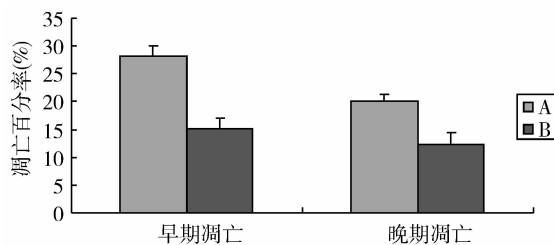
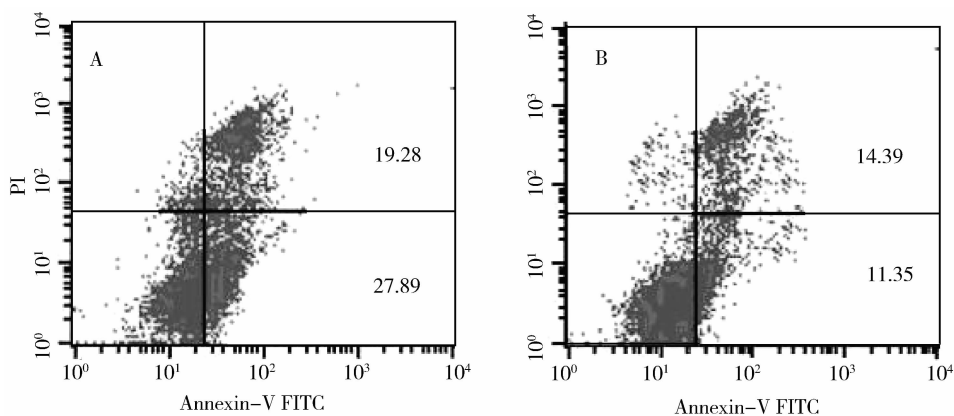


图 2 Annexin V/PI 检测人肺癌细胞 A549 凋亡的 FCM 散点图

A. CIK 组;B. 对照组

且晚期凋亡占 14.39% (图 2B)。统计学分析 CIK 实验组与对照组有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 CIK 细胞可明显诱导人肺癌细胞 A549 凋亡。

讨 论

在肿瘤临床治疗和预防中, 研究细胞凋亡的发生和发展有重要作用, 细胞凋亡的影响因素、细胞凋亡的机制成为当前肿瘤研究的一个热点。Diamatis 等^[3]提出了细胞凋亡的概念并对细胞凋亡的超微结构特征进行了详细的描述, 并且预测恶性肿瘤的凋亡可能会消退肿瘤, 达到治疗作用。目前广泛开展了一些动物实验和临床前期试验, 应用 CIK 细胞作用于多种肿瘤细胞系和活体肿瘤组织。在体外细胞培养的实验中 Linn YC^[4]等证实, CIK 细胞对急、慢性髓系白血病的治疗效果较好。Sun^[5,6]等对 CIK 细胞诱导的 MGC-803 胃癌细胞株凋亡及其机制进行了研究, 证明 CIK 细胞与胃癌细胞在一定的效靶比时, 明显诱导肿瘤细胞发生凋亡。他的电镜观察结果表明: 在效靶细胞混合培养 5h 后, 可见效靶细胞能互相接触, 靶细胞表面出现很多孔洞。混合培养 14h 后, 多数靶细胞出现凋亡, 细胞表面可见许多大小不一的凋亡小体及孔洞。细胞凋亡的现象可以通过多种定性与定量方法检测, 会呈现形态学改变及一些生化特征。本实验首先通过透射电镜观察体外培养的细胞形态学改变, 提示 CIK 细胞诱导人肺癌细胞 A549 凋亡样改变。在超微结构观察的基础上, 应用流式细胞仪双染法进一步定量检测细胞凋亡的情况, 同样说明了 CIK 细胞诱导人肺癌细胞 A549 凋亡。

CIK 细胞是一种非 MHC 限制性的免疫活性细胞, 其来源主要是 $CD4^+CD8^+$ T 淋巴细胞^[7], 作用是特异性直接杀伤靶细胞, 因此我们推测 CIK 杀伤靶细胞与 CTL 杀伤靶细胞的机制有相似之处^[8]。CTL 两种杀伤靶细胞的机制分别是启动细胞裂解和细胞

凋亡, 本文探讨 CIK 细胞能否通过诱导细胞凋亡来杀伤靶细胞。CIK 细胞具有细胞毒作用, 表达 CD3 和 CD56 两种膜蛋白分子, 且分泌 IL-2、IL-6、TNF- α 等多种细胞因子^[9], 通过诱导癌细胞表达 Fas 和 FasL 细胞表面分子, 致使肿瘤细胞凋亡。CIK 细胞杀伤靶细胞的途径应该是多方面的, 这些杀伤途径的具体机制以及他们之间的联系还有待于我们进一步的研究和探讨。

参考文献

- 1 Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human $CD3^+CD56^+$ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in micewith severe combined immunodeficiency. *J Immunol*, 1994, 153 (4): 1687-1696
- 2 任欢, 邢淑贤, 徐红薇, 等. CIK 的体外增殖及体内杀瘤活性的实验研究. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1999, 6(1): 17-21
- 3 Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas GH, *et al.* A brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Onkologie*, 2008, 31(12): 702-706
- 4 Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytotoxic specificity against leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44 (9): 1457-1462
- 5 Sun S, Li XM, Li XD, *et al.* Studies on inducing apoptosis effects and mechanism of CIK cells for MGC-803 gastric cancer cell lines. *Cancer Biother Radiopharm*, 2005, 20(2): 173-180
- 6 孔炯, 蒋敬庭. 细胞因子诱导的杀伤细胞的基础研究新进展. *医学综述*, 2009, 15(13): 1938-1941
- 7 黄文荣. 细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)的研究现状. *肿瘤防治研究*, 2000, 27(2): 157
- 8 李淑艳, 张春晶, 王淑英, 等. 细胞因子诱导的杀伤细胞对 Lewis 肺癌细胞的抑瘤作用及抑瘤机制的研究. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(21): 2605-2608
- 9 Marten A, Ziske C, Schottker B, *et al.* Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations. *J Immunother*, 2001, 24(6): 502-510

(收稿: 2009-12-25)

(修回: 2010-03-12)

《医学研究杂志》诚聘审稿专家启事

《医学研究杂志》(原名《医学研究通讯》), 是由卫生部主管, 中国医学科学院主办的国家级医学学术类杂志。中国科技论文统计源期刊, 中国科技核心期刊。为进一步提升杂志质量, 充分发挥《医学研究杂志》在我国医学领域中的前沿与导向作用, 经本刊研究决定, 邀请相关领域专家担任本刊审稿人, 希望各位专家登陆《医学研究杂志》网站: www.yxyjzz.cn, 通过主页左侧工具栏“专家审稿”版块进行注册。在此谨代表编辑部全体人员及广大作者和读者, 对各位专家的大力支持与指导深表感谢!

《医学研究杂志》编辑部