

IL-15 对 CIK 细胞的扩增及细胞表型的影响

李晓峰 孙伟芬 黄 苹 刘 玉 黄伟贤 苏 齐 陈 强 叶韵斌

摘 要 目的 探索 IL-15 对 CIK 细胞的扩增及细胞表型的影响。方法 以常规培养的 CIK 细胞为对照,观察培养体系中加入 IL-15 后 CIK 细胞的扩增情况,并用流式细胞仪检测其表面标志的变化。结果 ①IL-15 组的扩增速度大于常规培养组,从培养 14 天起两组扩增倍数的差异有统计学意义($P < 0.05$);②培养后 IL-15 组的 CD3⁺CD56⁺ 细胞比例及 NKG2D 表达率均高于常规培养组,于培养 14 天起,两组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 IL-15 可增加 CIK 细胞的增生能力,并增加 CD3⁺CD56⁺ 细胞及 NKG2D 的表达率。

关键词 白介素 15 细胞因子诱导杀伤细胞

The Effect of Interleukin-15 on the Proliferation of Cytokine-Induced Killers and on the Expression of Cell Surface Markers. Li Xiaofeng, Sun Weifen, Huang Ping, Liu Yu, Huang Weixian, Su Qi, Chen Qiang, Ye Yunbin. Department of Oncology, Quanzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fujian 362000, China

Abstract Objective To investigate the effect of interleukin-15 (IL-15) on the proliferation of cytokine-induced killers (CIKs) and on the expression of cell surface markers. **Methods** Mononuclear cells were isolated from peripheral blood of 15 healthy volunteers by Ficoll density gradient centrifugation, and then were induced to differentiating into CIKs in the presence of various cytokines with or without IL-15. Cells were harvested each week for 4 weeks starting with day 0, and viable cell number was determined using the Trypan blue dye-exclusion method. The levels of cell surface markers CD3, CD56, and NKG2D were measured by flow cytometry. **Results** CIKs in the IL-15-treated group had a significantly higher proliferation rate from day 14 than those in the group without IL-15 treatment ($P < 0.05$). Moreover, IL-15 treatment resulted in a significantly higher proportion of CD3⁺CD56⁺ cells as well as enhanced expression of NKG2D as compared to the IL-15-untreated group ($P < 0.05$). **Conclusion** IL-15 increases the proliferation of CIKs and enhances the expression of NKG2D on the surface of CD3⁺CD56⁺ CIKs.

Key words IL-15; Cytokine induced killers

细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killers, CIKs)是将人外周血单个核细胞在体外用多种细胞因子共同培养而获得的一群异质细胞群,因其兼具 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性和 NK 细胞的非主要组织相容抗原(MHC)限制性杀瘤特点,从而成为肿瘤过继免疫治疗的重要手段之一^[1]。能否获得足够数量的效应细胞及效应细胞的杀伤活性与 CIK 细胞治疗的临床疗效有着密切的关系^[2]。本研究通过在常规 CIK 细胞培养体系中加入 IL-15,初步观察 IL-15 对 CIK 细胞扩增及免疫表型变化的影响,现报道如下。

材料与方法

1. 主要试剂:淋巴细胞分离液(Ficoll,相对密度 1.077,中国医学科学院天津血液研究所),D-PBS 及人淋巴细胞培养液 KBM-551(日本 Takara 公司),IL-1 α (美国 Peprotech 公司),IL-2(双鹭制药有限公司),IFN- γ (丽珠生物有限公司),IL-15(美国 Amoytop Biotech 公司),CD3 单抗、CD3-FITC、CD56-PE、NKG2D-APC 及羊抗鼠 IgG1-APC(均美国 BD 公司)。

2. CIK 细胞的制备:共 15 例健康供血者的外周抗凝血纳入研究,将每例健康供血者的外周抗凝血分为 2 份,即常规培养组(常规组)及常规培养+IL-15 组(IL-15 组),每组 15 份。参照并稍调整本实验室建立的 CIK 细胞培养方法^[3],将外周血用淋巴细胞分离液经 Ficoll 密度梯度离心分离,吸取单个核细胞层,D-PBS 洗涤 3 遍,用人淋巴细胞培养液 KBM-551 调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$,移至经 CD3 单抗包被的细胞培养瓶中,加入 IFN- γ 1000U/ml,置于 37°C 5% 的 CO₂ 培养箱条件下培养。(1)常规组:24h 后加入 IL-1 α 100U/ml、CD3 单抗 50ng/ml、IL-2 500U/ml,此后每隔 3 天换液 1 次,并补加 CD3 单抗、IL-2。(2)IL-15 组:24h 后加入 IL-1 α

基金项目:福建省泉州市科技局资助项目(2007Z37);2008 年福建省泉州市组织部优秀人才培养专项经费资助

作者单位:362000 福建省泉州市中医院(李晓峰、孙伟芬、刘玉、黄伟贤);350014 福州,福建省肿瘤医院(黄苹、陈强、叶韵斌);362000 泉州市医药研究所(刘玉、苏齐)

通讯作者:李晓峰,电子信箱:listar@tom.com

100U/ml、CD3 单抗 50ng/ml、IL-2 500U/ml、IL-15 20ng/ml, 此后每隔 3 天换液 1 次, 并补加 CD3 单抗、IL-2 及 IL-15。

3. CIK 细胞的增生测定: 取诱导培养第 0 天、7 天、14 天、21 天、28 天的 CIK 细胞悬液, 台盼蓝染色后, 用血细胞计数仪进行计数, 将目前细胞总数除以培养前的单个核细胞数, 求出扩增倍数; 动态观察细胞的增生状态。

4. 细胞表型分析: 取诱导培养第 0 天、7 天、14 天、21 天、28 天的 CIK 细胞悬液, 经 PBS 洗涤 2 次后调整细胞浓度为 1×10^5 /ml, 分别标记单克隆抗体 CD3-FITC、CD56-PE、NKG2D-APC 及相应的同亚型对照 IgG₁, 于室温暗处孵育 15min, PBS 洗涤去除多余的抗体, 上流式细胞仪(美国 BD 公司)检测。

5. 统计学方法: 采用 SPSS16.0 软件包建立数据库及统计分析, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 正态分布的计量资料作 *t* 检验, 方差齐性检验用 *Levene* 检验; 组间比较采用两样本 *t* 检验。

表 1 细胞增生倍数 ($\bar{x} \pm s$)

培养天数	0	7	14	21	28
常规组	1	9.36 $\pm$ 3.14	47.35 $\pm$ 6.34	67.49 $\pm$ 8.77	63.32 $\pm$ 7.14
IL-15 组	1	10.25 $\pm$ 3.57	62.71 $\pm$ 5.69 *	96.78 $\pm$ 10.36 *	103.85 $\pm$ 9.28 *

* 与常规组比较, $P < 0.05$

2. CIK 细胞中 CD3⁺CD56⁺ 及 NKG2D 细胞的表达情况: 随着培养时间的延长, 两组 CIK 细胞的 CD3⁺CD56⁺ 和 NKG2D 阳性率均逐渐增加。在培养后的 7 天、14 天、21 天、28 天检测到 IL-15 组的

结 果

1. CIK 细胞增生的动态观察: 两组的外周血单个核细胞在细胞因子作用下均处于增生状态, 镜下可见细胞饱满透亮、聚集成团, 呈集落样生长; 且随着时间的增长, 集落数增多, 组成集落的细胞数亦增多, 细胞呈堆积样, 色深。表 1 显示, 在这一观察时段内, 两组细胞在各种细胞因子的诱导下均快速增生, IL-15 组的增生速度要快于常规组, 从 14 天起两组细胞的增生倍数差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 21 天时, 常规组扩增 67.49 $\pm$ 8.77 倍, 达到最大值, 此后增生呈下降趋势, 而 IL-15 组在 21 天时扩增 96.78 $\pm$ 10.36 倍, 此后细胞增生趋缓, 在 28 天时达到峰值。提示 IL-15 既可以促进 CIK 细胞的增生, 又可使 CIK 细胞的增生维持较长的时间。

CD3⁺CD56⁺ 和 NKG2D 的表达率均高于常规培养组, 于 14 天起与两组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2、图 1。提示 IL-15 能进一步促进 CD3⁺CD56⁺ 细胞的增生及细胞上 NKG2D 的表达。

表 2 CD3⁺CD56⁺、NKG2D 的表达 ($\bar{x} \pm s, \%$)

培养天数(天)	CD3 ⁺ CD56 ⁺		NKG2D	
	常规组	IL-15	常规组	IL-15
0	1.12 $\pm$ 0.32	1.16 $\pm$ 0.43	20.86 $\pm$ 3.12	21.53 $\pm$ 3.53
7	5.36 $\pm$ 1.41	7.27 $\pm$ 2.26	32.71 $\pm$ 3.31	34.02 $\pm$ 3.79
14	11.84 $\pm$ 2.34	15.17 $\pm$ 3.38 *	51.88 $\pm$ 4.12	58.47 $\pm$ 5.27 *
21	17.88 $\pm$ 3.71	22.73 $\pm$ 3.51 *	67.23 $\pm$ 5.76	78.51 $\pm$ 5.84 *
28	23.47 $\pm$ 4.45	29.24 $\pm$ 4.85 *	82.95 $\pm$ 5.87	91.36 $\pm$ 4.31 *

* 与常规培养组比较, $P < 0.05$

讨 论

CIK 细胞由于具有较强的增生能力和细胞毒性且杀瘤谱广而受到广泛的重视, 在一些实体瘤、血液肿瘤及血液病骨髓移植后的免疫治疗中已显示出良好的应用前景, 研究已表明, CIK 的主要效应细胞为 CD3⁺CD56⁺ 双阳性细胞^[2,4,5]。至于 CIK 的杀伤作用机制尚不完全明了。有研究发现, 封闭 CIK 细胞的 NKG2D 受体后, CIK 细胞的杀伤活性显著下降^[6]。

因此目前认为 CIK 细胞的杀伤效应与 NKG2D 途径关系密切, 即通过 CIK 细胞上的活化性受体—NKG2D 与肿瘤细胞上的 NKG2D 配体(NKG2DL)相互作用, 从而启动细胞杀伤^[7]。这些研究成果提示, CIK 细胞培养后 CD3⁺CD56⁺ 细胞的实际扩增数量以及 CIK 细胞上 NKG2D 的表达水平是重要观察指标。

IL-15 是一种功能多样的细胞因子, 是体内外造血前体细胞向 NK 细胞定向发育的决定性因子, 具

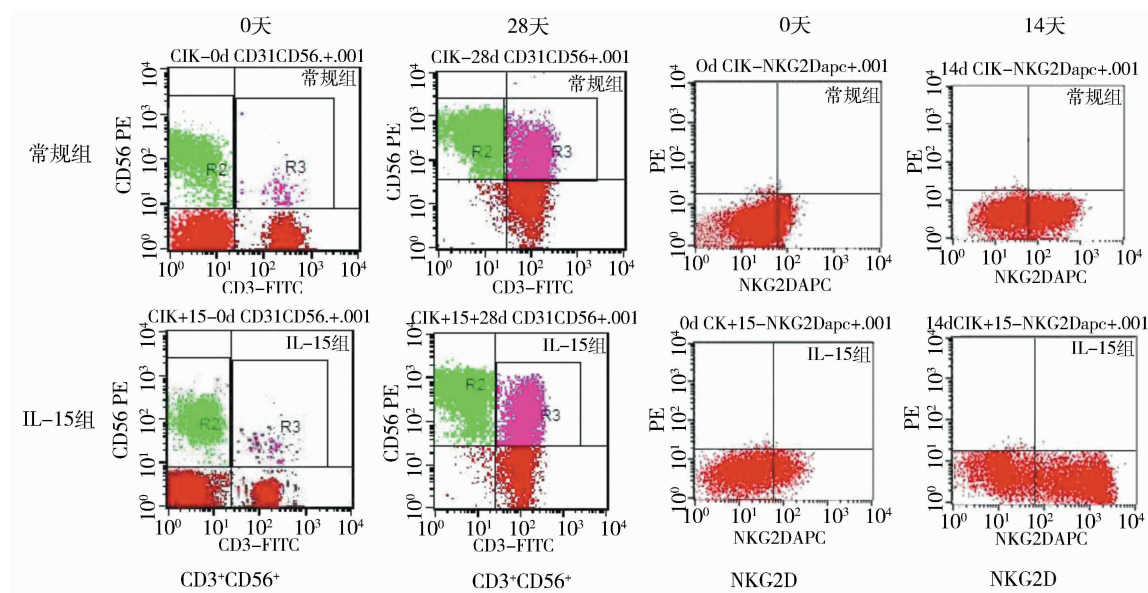


图 1 $CD3^+CD56^+$ 细胞和 NKG2D 表达水平

有促进 NK 细胞的增生,上调 NK 的细胞毒活性,促进 NK 细胞分泌各种细胞因子参与免疫调节和趋化作用^[8]。近来研究发现 IL-15 可以上调 NK 细胞的 NKG2D 表达及 NK 细胞的细胞毒活性^[9,10]。Roberts 等^[11]证实 IL-15 还可以上调细胞毒 T 淋巴细胞 (CTLs) 表面的 NKG2D 受体表达。

考虑到 IL-15 可以上调 NK 和 T 细胞上 NKG2D 受体表达和增加这些效应细胞的细胞毒活性,我们在 Schmidt-Wolf 等^[1]建立的常规 CIK 细胞培养体系中,加入细胞因子 IL-15 共同诱导,结果显示:与传统的 CIK 细胞培养方法相比,加入 IL-15 培养可以促进 CIK 细胞的扩增及 $CD3^+CD56^+$ 细胞比例的增加,从而大大增加 $CD3^+CD56^+$ 细胞的实际数量,还可以明显上调 CIK 细胞上 NKG2D 的表达。效应细胞的增加和效应细胞上活化受体表达的增加,能否使 CIK 细胞的杀伤活性增加呢? 我们将作进一步研究。

参考文献

- Schmidt Wolf GD, Negrin RS, Schmidt Wolf IGH. Activated T cells and cytokine induced $CD3^+CD56^+$ killer cells[J]. Ann Hematol, 1997,74(2): 51-56
- Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, et al. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma[J]. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2005,11(3): 181-187
- 陈明水,陈强,叶韵斌,等. CIK 细胞的体外扩增及其抗肿瘤特性的研究[J]. 福建医药杂志,2004,26(6):162-164
- Introna M, Borleri G, Conti E, et al. Repeated infusions of donor-

- derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study[J]. Haematologica, 2007, 92(7): 952-959
- Ryosei N, Jeanette B, Andreas B, et al. In vivo trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity[J]. Blood, 2008, 112(8): 2563-2574
- Chan JK, Hamilton CA, Cheung MK, et al. Enhanced Killing of Primary Ovarian Cancer by Retargeting Autologous Cytokine-Induced Killer Cells with Bispecific Antibodies: A Preclinical Study[J]. Clinical Cancer Research March, 2006, 12(6): 1859-1867
- Verneris MR, Karami M, Baker J, et al. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded $CD8^+$ T cells[J]. Blood, 2004, 103(20): 3065-3072
- Dunne J, Lynch S, O'Farrelly C, et al. Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. J Immunol, 2001, 167: 3129-3138
- Zhang C, Zhang J, Niu J, et al. Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. Cytokine, 2008, 42: 128-136
- Boyiadzis M, Memon S, Carson J. Up-regulation of NK cell activating receptors following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation under a lymphodepleting reduced intensity regimen is associated with elevated IL-15 Levels. BiolBloodMarrowTransPlant, 2008, 14: 290-300
- Roberts AI, Lee L, Schwarz E, et al. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate $CD28^-$ negative effector CTL in the tissue microenvironment[J]. J Immunol, 2001, 167(10): 5527-5530

(收稿:2010-02-24)

(修回:2010-04-09)