

肿瘤 HSP70 活化的 CIK 细胞杀瘤作用研究

Study of Cytotoxicity Effects of Cytokine-induced Killer Cells Stimulated by Heat Shock Protein 70

Derived from Tumor Cells // FU Qing-guo, YING Ke-ming, ZHU Lin-bo

付庆国¹, 应可明², 朱林波²

(1. 宁波市第二医院, 浙江 宁波 315010; 2. 宁波大学医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: [目的] 比较分析人大肠癌细胞 HSP70 活化 CIK 细胞和普通 CIK 细胞的杀瘤活性, 为该类 CIK 的临床应用提供有重要参考价值的实验依据。[方法] 用液相色谱法提纯人大肠癌细胞中的 HSP70。取健康人外周血单核细胞, 用 CD3 单克隆抗体、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-2 等细胞因子对其诱导、培养获取 CIK 细胞; 运用 GM-CSF、IL-4、TNF- α 等细胞因子对其诱导、培养获取 DCs, HSP70 诱导活化 DCs, 按 HSP70 活化的 DC:CIK=1:3 混合培养 1 周。用 MTT 法进行杀瘤活性试验。[结果] 人大肠癌细胞 HSP70 活化的 CIK 细胞和普通 CIK 细胞的杀瘤活性相比较, 在靶靶比例为 10:1、20:1、40:1 时, 杀伤活性差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。[结论] 与普通的 CIK 细胞相比, 肿瘤细胞 HSP70 活化的 CIK 细胞具有更强的杀瘤活性。

关键词: 肿瘤; 热休克蛋白 70; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 树突状细胞

中图分类号: R73-34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)07-0512-04

CIK(cytokine-induced killer)过继免疫疗法作为恶性肿瘤综合治疗的一种重要的方法, 其疗效已得到医学界肯定。该细胞是在多种细胞因子刺激下产生的多克隆 T 效应细胞, 可杀伤绝大部分恶性肿瘤细胞, 杀瘤活性强大, 体外增殖迅速, 并且能使患者免疫力提高, 生活质量改善。但是, 仍有小部分恶性肿瘤细胞不能被 CIK 细胞杀伤或者对 CIK 细胞不敏感, 致使患者体内残留肿瘤病灶, 对预后不利。因此研究如何提高 CIK 细胞杀伤肿瘤细胞的细胞毒性和杀瘤活性, 从而提高治疗效果, 对 CIK 细胞免疫治疗的拓展和应用有着很重要的价值。

CIK 细胞被负载单一肿瘤抗原的树突状细胞(dendritic cells, DCs)诱导活化后, 其杀瘤活性明显增强, CD8⁺T 细胞显著增加, 但由于肿瘤抗原的单一性、组织相容性抗原(MHC)的限制性等原因影响了疗效。而肿瘤源性的热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)携带多种肿瘤抗原肽, 具有高表达、可激活多个克隆的效应细胞及其杀伤活性不受 MHC 分子限制等优点, 故以 HSP70 活化的 CIK 细胞杀瘤活性将高于其他单一抗原活化的 CIK。

本研究以人大肠癌细胞的 HSP70 活化 CIK 细胞, 并与普通 CIK 细胞进行了杀伤活性的对比分析, 现报道如下。

基金项目: 宁波市科技局社发基金重大科技专项(2007C10043)

收稿日期: 2011-09-16; **修回日期:** 2012-01-29

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

淋巴细胞分离液(北京拜尔迪公司), IFN- γ 、IL-1 α 、IL-2、IL-4、TNF- α 、GM-CSF (美国 PEPROTECH 公司), 抗小鼠 HSP70 单克隆抗体、抗人 HSP70 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 生物技术公司, 碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。Bradford Reagent 蛋白浓度检测试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。MTT 试剂盒购自北京拜尔迪生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器、耗材

超速离心机(日本 HITACHI KOKI 公司), SDS-PAGE 电泳仪、半干式转印仪、凝胶成像系统和超级多功能酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), Con A-Sepharose 柱 (瑞典 Pharmacia 公司)、DEAE-52 柱 (瑞典 Pharmacia 公司)和全自动蛋白纯化系统(瑞典 Amersham 公司, AKTA basic PH/C 100)。

1.1.3 细胞来源

人大肠癌细胞株 LS 174T 购于中科院上海细胞库。用于培养 CIK 细胞的外周血单核细胞, 来源于健康志愿者。

1.2 实验方法

1.2.1 HSP70 提取、纯化与检测^[1]

首先大量扩增人类大肠癌细胞 LS 174T, 收集细胞后经低渗裂解、超声破碎、超速离心, 依次过 Con A-Sepharose 亲和柱和 DEAE 离子交换柱层析纯化, 各洗脱峰样品在 10% SDS-PAGE 上进行相对分子质量(Mr)和纯度测定, 最后经 Western Blot 进行蛋白定性检测。

1.2.2 CIK 细胞培养

密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 悬浮细胞用于扩增 CIK。于 IFN- γ (1 000U/ml)、37℃、5% 的二氧化碳培养箱中培养 24h 后加入 CD3 Mab (50 μ g/ml)、37℃、5% 的二氧化碳培养箱中培养 48h, 再加入 IL-1 α (200U/ml)、IL-2 (500 μ g/ μ l), 每天观察细胞的生长情况。隔天加培养液, 加 IL-2, 培养 2 周。

1.2.3 DC 细胞的培养及 HSP70 活化 CIK

密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 贴壁单核细胞用于诱导 DC。DC 培养液中加入 GM-CSF (1 000U/ml)、IL-4 (500U/ml), 每 2d 加入 GM-CSF 和 IL-4。第 7d 时, 在培养瓶中加入配好的 TNF- α (500U/ml) 二氧化碳培养箱中培养 48h。更换培养基、GM-CSF、IL-4 后, 加入 400 μ g/ml 的大肠癌 HSP70, 培养 48h 活化 DC 细胞。再次更换培养基, 按 HSP70 活化的 DC:CIK=1:3 混合培养 (此时 CIK 细胞已经按 1.2.2 中的方法培养 1 周), 放入 37℃、5% 的二氧化碳培养箱中培养, 隔天加入无血清培养基和 IL-2, 培养 1 周后, 进行杀瘤试验。

1.2.4 杀瘤试验

收集 HSP70-DC-CIK 共培养细胞作为效应细胞 (effector cell, E), 收集对数生长期的 LS 174T 大肠癌细胞作为靶细胞 (target cell, T), 按照 HSP70-DC-CIK 与 LS 174T 效靶比 (E:T) 分别为 10:1、20:1、40:1 混合, 另设未用 HSP70 活化 CIK 与 LS 174T 效靶比

分别为 10:1、20:1、40:1 混合, 效应细胞和靶细胞分别按效靶比例设空白对照, 均设 3 个复孔, MTT 法杀伤活性分析操作: 靶细胞浓度为 5×10^4 个/ml, 效应细胞浓度为 5×10^5 个/ml, 用含 MTT 96 孔板, 每孔液体量 200 μ l, E:T=10:1/100 μ l:100 μ l, E:T=20:1/133 μ l:67 μ l, E:T=10:1/160 μ l:40 μ l。37℃、5% CO₂ 培养箱中放置 4h 后, 吸去上清, 每孔加入 DMSO 150 μ l, 平板摇床上振摇 5min 后, 用酶标仪测量各孔 490nm 处的 OD 值。杀伤活性的计算方法: [对照组 OD 值 (肿瘤细胞+淋巴细胞)-实验组 OD 值]/相应对照组肿瘤细胞的 OD 值 $\times$ 100%

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行两独立样本均数的 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

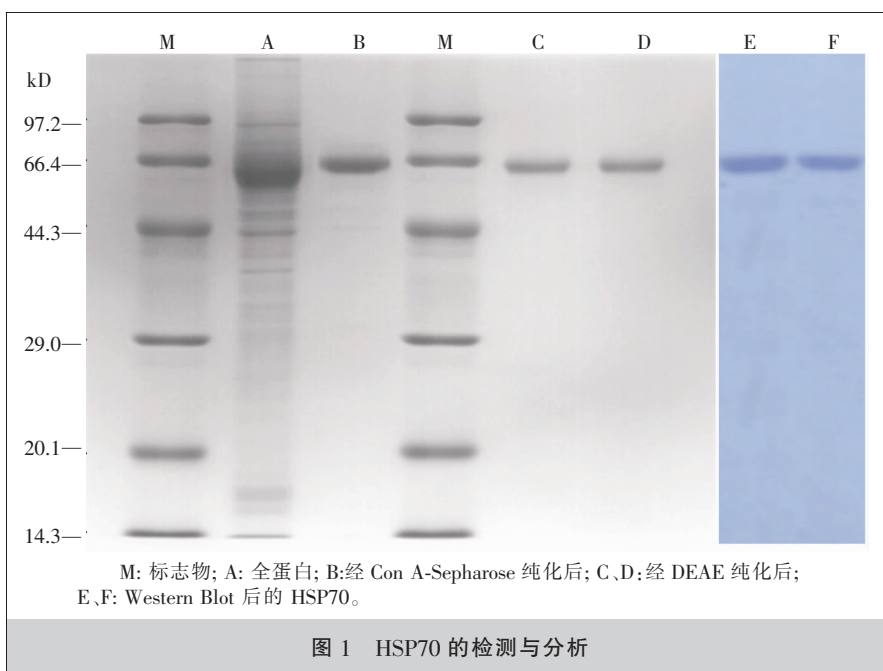
2 结果

2.1 HSP70 的纯化

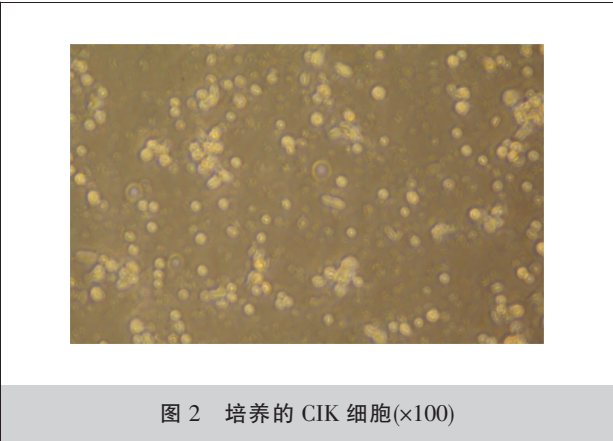
经过 Con A-Sepharose 亲和柱和 DEAE 离子交换柱分离纯化后, 得到纯度较高的分子量约为 70kD 的蛋白质, 经免疫印记分析证实该蛋白质即为 HSP70 (图 1)。

2.2 CIK 细胞培养

如图 2 所示, CIK 细胞生长情况良好, CIK 细胞

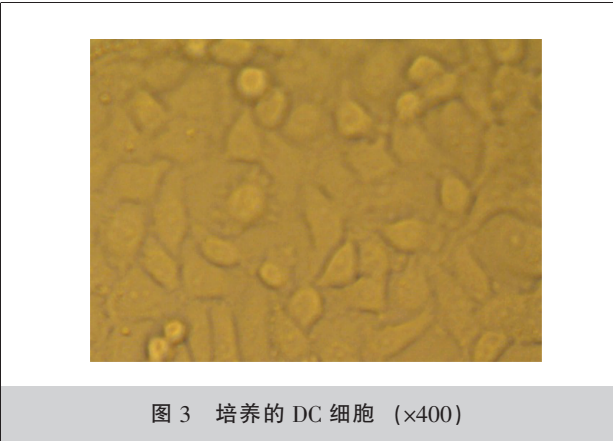


为悬浮生长细胞,呈球形。

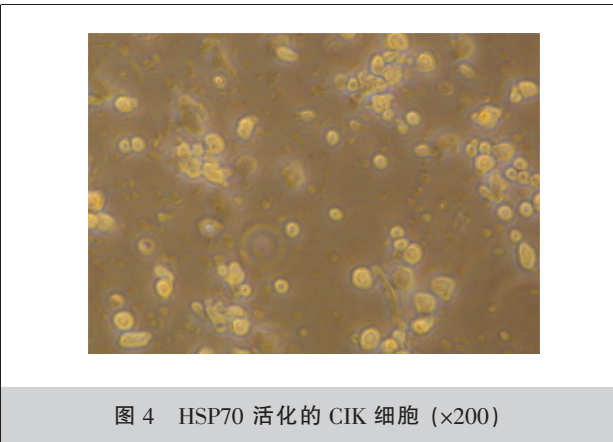


2.3 DC 细胞的培养及人大肠癌细胞 HSP70 活化 CIK 细胞

图 3 所示已培养的 DC 细胞,可见 DC 细胞生长情况良好。成熟 DC 细胞,在倒置显微镜下观察如树突样突起。



HSP70 诱导活化后的 CIK 细胞见图 4 所示,细胞生长情况良好。



2.4 HSP70 诱导活化 CIK 细胞杀瘤试验

普通 CIK 和 HSP70 活化的 CIK 的杀伤活性在 3 个效靶比例分别为 18.42%/23.89%、26.39%/33.90%、61.25%/84.49%,统计学分析各效靶比例均具有显著性差异 ($P<0.01$),而在效靶比例为 40:1 时,HSP70 活化 CIK 杀伤活性显著提高。各效靶比例的杀伤活性见表 1。

表 1 CIK 细胞和人大肠癌细胞 HSP70 活化的 CIK 细胞杀伤活性的比较(%,n=8)

效靶比例	CIK 细胞	HSP70 活化的 CIK 细胞	t	P
10:1	18.42±1.11	23.89±1.23	9.33	0.00093
20:1	26.39±2.27	33.90±1.56	7.71	0.00052
40:1	61.25±2.02	84.49±2.50	20.45	0.00017

3 讨 论

CIK 细胞可来源于健康志愿者或接受过化疗的恶性肿瘤患者,经自体或异体外周血细胞分离、提取单核细胞、细胞因子诱导培养而成。具有很强的、非 MHC 限制性的溶细胞活性,可以溶解自体或者异体起源的敏感的肿瘤细胞^[2]。因此,在过去的 20 多年里,CIK 细胞已经从实验观察进入到临床应用。国内外诸多机构、单位报道了 CIK 细胞在治疗肾细胞癌、结直肠癌、淋巴瘤、急性白血病、胃癌等恶性肿瘤的情况,无论是临床试验还是体外试验 CIK 细胞都显示了具有较好的抗肿瘤活性,但也普遍存在抗肿瘤活性不高的问题。

为此,很多学者进行了如何提高 CIK 细胞的抗肿瘤活性的探索,研究证明 DCs 可以向 CIK 细胞呈递肿瘤抗原,希望通过这种方式,增强 CIK 细胞对肿瘤的识别能力,进而对其进行有效的杀伤。将抗原冲击后 DCs 和 CIK 细胞共培养,再用培养后的 CIK 细胞对多种肿瘤细胞有杀伤活性^[3]。目前国内外研究最多的是负载单一肿瘤抗原的 DCs 活化的 CIK 细胞对肿瘤细胞进行杀伤研究,虽然其杀瘤活性有一定程度的增强,但是其杀瘤范围过于狭窄,仅能杀伤表达该抗原的恶性肿瘤细胞,同时其杀瘤活性受 MHC 分子的限制,使得其治疗效果有限。

HSP70 是伴随着细胞表面温度的升高而被诱导表达的热休克蛋白家族的一种蛋白。其他不利因素

也会诱导 HSP70 的表达。据报道,肿瘤源性的 HSP70 作为一种肿瘤抗原可活化多个效应细胞^[5],那么其活化细胞毒 T 细胞的杀瘤作用强于单个抗原活化的细胞毒 T 细胞,另外,肿瘤源性的 HSP70 能够向树突细胞(DCs)呈递肿瘤抗原,然后交叉呈递给 T 细胞^[6]。肿瘤源性的 HSP70 可以活化 DCs,这已经被认为是一种辅助促进肿瘤细胞抗原呈递和诱导抗肿瘤免疫的一种方法^[7]。

要对恶性肿瘤进行更加有效的杀伤,必须大大增强 CIK 细胞的抗肿瘤活性,本研究是对增强 CIK 细胞抗肿瘤活性方法的一种探索,进而为临床应用研究提供重要的参考依据。

本研究显示,人大肠癌细胞 HSP70 活化的 CIK 细胞具有很好的杀伤大肠癌细胞活性,在效应细胞和靶细胞比例为 40:1 时,人大肠癌 HSP70 活化的 CIK 细胞杀伤人大肠癌细胞的效率高达 84.49%,而普通的 CIK 细胞杀伤率仅为 61.25%,统计学分析表明,具有显著的统计学差异($P<0.01$)。可以肯定,人大肠癌细胞 HSP70 活化的 CIK 细胞比普通的 CIK 细胞具有更强的杀瘤活性。这一结果与 HSP70 可诱导活化多种可杀伤肿瘤的效应细胞有密切联系^[8]。至于为何 HSP70 可诱导活化多种效应细胞,这可能与 HSP70 结合了大量肿瘤细胞起源的抗原多肽有关。另外,人大肠癌细胞 HSP70 活化的 CIK 细胞杀瘤活性的提高与其杀伤活性不受 MHC 分子的限制有关^[9]。这是因为 HSP70 作为一种重要肿瘤抗原,可以通过 APCs 向 CD8⁺ T、CD4⁺、CD8⁻ T 细胞呈递肿瘤抗原,这使得 HSP70 既可以诱导活化 CD8⁺ T 细胞,同样也可以诱导活化 CD4⁺、CD8⁻ T 细胞。而 CD4⁺、CD8⁻ T 细胞的杀瘤活性与 MHC 分子无关^[10],无论恶性肿瘤细胞表达 MHC 分子与否,均能对其进行有效的杀伤。

本研究对于提高 CIK 的杀伤活性和 HSP70 活化 CIK 进行深入研究,希望对于改进肿瘤免疫治疗方法和提高治疗效果有一定的参考意义。

参考文献:

- [1] 傅庆国,郭仁宣,姚振宇,等. 肿瘤热休克蛋白 70-多肽复合物诱导特异性细胞毒 T 淋巴细胞产生的实验研究[J]. 中华医学杂志,2000,80(4): 301-303.
- [2] Multhoff G. Activation of natural killer cells by heat shock protein 70 [J]. *Int J Hyperthermia*, 2009, 25(3):169-175.
- [3] Koide T, Iinuma H, Fukushima R. Efficient CTL productivity of modified fusion cells by increase of heat shock protein 70 [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(3):737-746.
- [4] Liu G, Yao K, Wang B, et al. Reconstituted complexes of mycobacterial HSP70 and EBV LMP2A-derived peptides elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte responses and anti-tumor immunity[J]. *Vaccine*, 2011, 29(43):7414-7423.
- [5] 李可,吕章春,陈海祥,等. 抗原致敏 DC 诱导 CIK 细胞对肺癌细胞的杀伤作用[J]. 肿瘤学杂志,2008,14(4): 310-313.
- [6] Gong J, Zhang Y, Durfee J, et al. A heat shock protein 70-based vaccine with enhanced immunogenicity for clinical use [J]. *J Immunol*, 2010, 184(1):488-496.
- [7] Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20:395-425.
- [8] Stocki P, Morris NJ, Preisinger C, et al. Identification of potential HLA class I and class II epitope precursors associated with heat shock protein 70 (HSPA) [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2010, 15(5):729-741.
- [9] Weng D, Calderwood SK, Gong J. Preparation of a heat-shock protein 70-based vaccine from DC-tumor fusion cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 787:255-265.
- [10] Takemoto S, Nishikawa M, Guan X, et al. Enhanced generation of cytotoxic T lymphocytes by heat shock protein 70 fusion proteins harboring both CD8(+) T cell and CD4(+) T cell epitopes [J]. *Mol Pharm*, 2010 [Epub ahead of print].
- [11] Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell [J]. *Nature*, 1992, 355:33-45.
- [12] Young D, Roman E, Moreno C, et al. Molecular chaperones and the immune response[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1993, 339(1289):363-367.
- [13] Pierce SK. Molecular chaperones in the processing and presentation of antigen to helper T cells [J]. *Experientia*, 1994, 50(11-12):1026-1030.
- [14] Zhu X, Zhou P, Cai J, et al. Tumor antigen delivered by Salmonella III secretion protein fused with heat shock protein 70 induces protection and eradication against murine melanoma [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101 (12):2621-2628.