

恶性肿瘤患者 CIK 细胞诱导培养与乙肝病毒携带的关系

The Relationship Between the Incubation of Cytokine-induced Killer Cells (CIK) and Carrying of Hepatitis B Virus in Malignant Patients // MA Xue-bin, MA Cong, QIU Wei, et al.

马学斌, 马 聪, 邱 伟, 袁红霞, 杨 平, 王小会
(海军总医院, 北京 100048)

摘 要: [目的] 探讨恶性肿瘤患者细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)体外培养过程中细胞增殖、淋巴细胞亚群表达与乙肝病毒(HBV)携带状况的关系。[方法] 80 例肿瘤患者根据 HBV 表面抗原表达状况分为 HBV 阴性组和 HBV 阳性组。分别抽取患者外周血 54ml 进行 CIK 细胞诱导培养, 在第 1、5、7、10、13、15d 对细胞进行检测, 包括细胞计数、细胞活率和细胞表型分析。[结果] 两组患者 CIK 细胞生长情况细胞数量比较差异无统计学意义, 增殖倍数 HBV 阳性组高于 HBV 阴性组, 并且在第 13d 和 15d 差异有统计学意义($P<0.05$); 细胞亚群分析中 CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞、CD3⁺CD56⁺T 细胞比例均随培养时间延长而升高, CD4⁺T 细胞、CD3⁺CD4⁺T 细胞随培养时间延长而降低, HBV 阳性组更显著; 其中 CD8⁺T 细胞和 CD3⁺CD4⁺T 细胞在两组间的差异具有统计学意义($P<0.05$)。CIK 细胞回输后 HBV 阳性组 DNA 含量较治疗前显著降低。[结论] HBV 表面抗原阳性患者 CIK 细胞较阴性患者扩增能力更强, 回输后可以使 HBV DNA 含量显著降低。

主题词: 乙型肝炎病毒; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 细胞亚群

中图分类号: R73-3 **文献标识码:** B

文章编号: 1671-170X(2015)01-0070-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.01.B016

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是慢性肝病的主要病原之一, 我国是 HBV 感染的主要流行区, 15~59 岁人群 HBV 携带率为 8.12%^[1], 肿瘤患者 HBV 携带率与普通人群无显著性差异。HBV 感染是导致中国人群肝肿瘤发生的重要因素, 同时也与其他肿瘤的发生发展具有很密切的关系, 有报道 HBV 阳性的肿瘤患者化疗可能引起 HBV 的复发^[2]。因此对于 HBV 感染者的肿瘤患者治疗需要考虑兼顾肿瘤与 HBV。细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine induced killer cells, CIK) 是一种新型的免疫效应细胞, 作为过继免疫治疗中最有前景的细胞, 受到了研究者们广泛的关注, 在应用于临床肿瘤治疗和肝炎病毒治疗中都取得了较好的效果。CIK 细胞的优势在于其体外增殖速度快, 杀瘤谱广, 对自体肿瘤细胞具有特异性识别能力, 杀伤活性高, 不受主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 限制, 对正常骨髓前体细胞毒性很小, 对多重耐药肿瘤细胞同样敏感, 可以抵抗肿瘤细胞引发的 Fas-FasL 凋亡等。在肝炎的治疗中 CIK 细胞能够明显抑制 HBV 复制, 安全无毒副作用^[3]。我们对 HBV

携带与否对肿瘤患者外周血诱导培养的 CIK 细胞增殖能力及细胞表面分子的表达的影响进行了初步的分析, 现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 试剂与仪器

无血清淋巴细胞培养液 (GT-T551)、D-PBS 缓冲液和透气细胞培养袋 (GT-T610(A)) 为日本 TARAKA 公司产品; 细胞培养瓶、离心管及移液管均为 CORNING 公司产品; 人淋巴细胞分离液为天津美德太平洋科技有限公司产品; rhIL-2 为北京双露药业公司产品; IFN- γ 为上海凯茂生物医药有限公司产品; CD3 单克隆抗体为古巴分子免疫学中心产品; CD3、CD4、CD8、CD56 荧光标记抗体均为 Beckman Coulter 公司产品。3111 型 CO₂ 培养箱为美国 ThermoFisher 公司产品; 4000 型低速离心机为日本 Kubota 公司产品; BCM 型生物洁净工作台为苏州安泰空气技术有限公司产品; Epics XL MCL 型流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品, XE-2100 全自动血液细胞分析仪及配套试剂为日本 Sysmex 公司产品; LX-20 全自动生化分析仪及配套试剂为美国 Beckman Coulter 公司产品。

1.2 临床资料

本研究收集中国人民解放军海军总医院住院肿瘤患者 80 例, 所有患者均为中晚期恶性肿瘤患者, 均经病理确诊。男性 53 人, 女性 27 人, 平均年龄 (54.31 $\pm$ 14.41) 岁, 其中肝癌 15 例, 肺癌 15 例, 胃癌 13 例, 乳腺癌 8 例, 鼻咽癌 7 例, 结直肠癌 6 例, 甲状腺癌 5 例, 食管癌 2 例, 肾癌 2 例, 宫颈癌 2 例, 其他恶性肿瘤 5 例, 所有患者均经过 HBV 表面抗原、丙肝抗体、艾滋抗体和梅毒抗体检测, 除 HBV 表面抗原检测结果外, 其他 3 项结果均为阴性。分组: 根据 HBV 表面抗原检测结果将上述研究对象分为 HBV 阳性组 (30 例) 和 HBV 阴性组 (50 例)。

1.3 研究方法

1.3.1 治疗前淋巴细胞数量及相关生化指标的比较

抽取肿瘤患者外周静脉血 54ml, 送 GMP 实验室进行细

通讯作者: 马聪, 主任技师, 教授, 硕士; 海军总医院生物治疗中心, 北京市海淀区阜成路 6 号 (100048); E-mail: macong958166@163.com
收稿日期: 2014-02-12

胞分离和培养。同时取患者外周血进行全自动血液细胞分析,HBV DNA 的检测和相关生化指标的检测。

1.3.2 CIK 细胞的体外培养流程

所有入组患者均签署知情同意书。早晨采集患者外周静脉血 54ml,在 GMP 实验室分离单个核细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,加入 IFN- γ 800U/ml 和 10%的自体血浆,混匀后转入用 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ CD3 单抗预先包被的培养瓶中,放置 37°C ,5% CO_2 培养箱中培养,第 2d 添加培养液并加入 rhIL-2 1 000U/ml,之后根据细胞生长情况补充细胞培养液、rhIL-2 和自体血浆。至第 5d,根据细胞生长增殖情况调整细胞密度,并转入培养袋进行扩大培养,以后每 2~3d 根据细胞生长情况,补充培养液、rhIL-2 和自体血浆。分别在培养的第 5、7、10、13、15d 进行细胞检测,包括细胞计数、细胞活力和细胞表型分析。

1.3.3 CIK 细胞的检测

细胞计数:用血细胞计数板,根据细胞密度推算细胞总量。

细胞活力检测:胎盘蓝染色法检测细胞活力,活细胞率(%)=(活细胞总数/活细胞总数+死细胞总数) $\times 100\%$ 。

细胞表型检测:调整细胞密度至 $(1\sim 5) \times 10^6/\text{ml}$,在 $100\mu\text{l}$ 细胞悬液中加入 $10\mu\text{l}$ 荧光素标记抗体(CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5,CD3-FITC/CD56-PE),轻轻震荡混匀后,室温避光孵育 20min,加入磷酸盐缓冲液(PBS)5ml,颠倒混匀后 1500r/min 离心 8min,弃上清液,沉淀中加入适量 PBS 混悬细胞后,流式细胞仪检测,每份样本分析细胞数 $\geq 5 \times 10^4$ 个,采集的数据使用流式细胞仪配套软件进行分析。

1.3.4 CIK 细胞回输后的分析

在 CIK 细胞回输时进行密切监测和患者反应的观察,回输后 1 个月抽血对患者进行肝肾功能、血常规的检测,对 HBV 阳性患者再次进行 HBV DNA 滴度的测定,并对结果进行分析。

1.4 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计数资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量数据组间比较采用单因素方差分析和多元方差分析,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本情况比较

HBV 阳性组 HBV DNA 高于 HBV 阴性组,差异有统计学意义。两组患者除总蛋白含量无差异外,其他生化指标差异均有统计学意义($P < 0.05$)(Table 1)。

Table 1 Comparison of the two groups

Index	HBV negative	HBV positive	P
Age(years old)	56.36 $\pm$ 13.16	48.71 $\pm$ 9.53	0.341
HBV DNA(copies)	1250 $\pm$ 543	84 $\pm$ 38	0.000*
Lymphocyte($\times 10^9/\text{L}$)	1.31 $\pm$ 0.76	0.85 $\pm$ 0.47	0.038*
ALB(g/L)	38.76 $\pm$ 4.54	43.42 $\pm$ 5.17	0.016*
TP(g/L)	69.51 $\pm$ 7.36	70.75 $\pm$ 5.12	0.469
ALT(U/L)	16.87 $\pm$ 8.74	29.35 $\pm$ 16.71	0.004*
TBIL($\mu\text{mol}/\text{L}$)	9.87 $\pm$ 3.51	13.82 $\pm$ 5.76	0.012*
DBIL($\mu\text{mol}/\text{L}$)	5.23 $\pm$ 1.45	6.97 $\pm$ 3.51	0.023*

Note: *: Compared with HBV negative group ($P < 0.05$). ALB: albumin; TP: total protein; ALT: alanine transaminase; TBIL: total bilirubin; DBIL: direct bilirubin.

2.2 两组患者 CIK 细胞增殖数量及增殖倍数的比较

在 CIK 细胞培养的第 5、7、10、13、15d 检测细胞活力均 $\geq 98\%$ 。

在对两组患者 CIK 细胞数量的比较上,两组细胞在相同时间点的细胞数量组间比较无显著性差异,均在第 7d 左右开始进入快速增长期,至第 15d 仍处于对数生长期;对两组患者 CIK 细胞增殖率的比较上,从第 5d 起 HBV 阳性组高于 HBV 阴性组,至培养的第 13d 和第 15d,这种差异具有显著性($P < 0.05$),HBV 阳性组细胞数增殖率分别约为初始的 174 倍和 306 倍,而 HBV 阴性组分别为 111 倍和 199 倍(Table 2, Figure 1)。

Table 2 Comparison of CIK cells of the two groups

Day	HBV negative		HBV positive		P	
	Cell number	Multiple	Cell number	Multiple	Cell number	Multiple
1	6.13 $\pm$ 2.57	—	4.52 $\pm$ 1.74	—	0.1421	
5	12.53 $\pm$ 4.25	1.93 $\pm$ 1.26	11.77 $\pm$ 3.87	2.62 $\pm$ 1.89	0.530	0.08
7	42.81 $\pm$ 18.24	7.66 $\pm$ 3.03	38.56 $\pm$ 10.65	9.54 $\pm$ 3.50	0.053	0.09
10	295.00 $\pm$ 186.32	41.26 $\pm$ 26.51	276.00 $\pm$ 135.62	56.21 $\pm$ 24.51	0.267	0.08
13	642.47 $\pm$ 363.41	110.59 $\pm$ 62.38	679.26 $\pm$ 487.34	174.00 $\pm$ 99.28*	0.331	0.01*
15	1132.4 $\pm$ 823.72	198.97 $\pm$ 94.20	1327.6 $\pm$ 931.12	305.62 $\pm$ 188.95*	0.253	0.01*

Note: *: Compared with HBV negative group ($P < 0.05$).

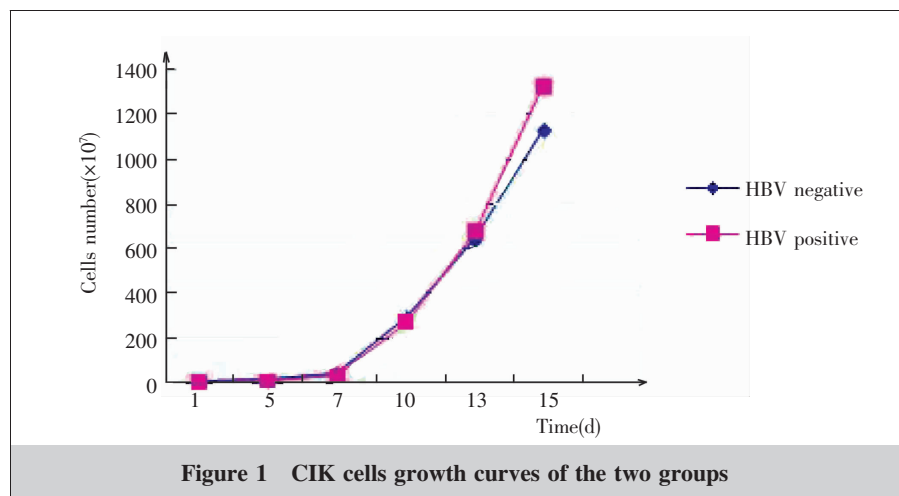


Figure 1 CIK cells growth curves of the two groups

2.3 诱导培养过程中淋巴细胞亚群的比较

在培养过程中,分别于第 5、7、10、13、15d 收取两组患者的 CIK 细胞,检测淋巴细胞表面表型的变化。结果显示,两组患者的 CIK 细胞中 CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞、CD3⁺CD56⁺T 细胞比例均随培养时间延长而呈升高的趋势,其中 HBV 阳性组升高较 HBV 阴性组更多;CD4⁺T 细胞、CD3⁺CD4⁺T 细胞随培养时间延长而呈逐渐降低的过程,HBV 阳性组降低较 HBV 阴性组更多。经多因素方差分析,结果显示 CD8⁺T 细胞比例的升高和 CD3⁺CD4⁺T 细胞比例的降低在两组间的差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 3, Figure 2)。

2.4 CIK 细胞回输后患者反应的检测分析

CIK 细胞回输后,患者出现不同程度的精神、体力好转,食欲增加,未见明显的不良反应发生。1 个月后检测两组患者的肝肾功能及血常规检测基本正常,HBV 阳性组患者在回输后 1 个月时进行 HBV DNA 定量复查,HBV DNA 的拷贝数为 (852±545)copies,与回输前比较明显下降 ($P<0.05$)。

3 讨论

免疫疗法有助于使患者 HBV 表面抗原血清学转阴,恢复或改善缺陷的 T 细胞抗病毒免疫反应,CIK 细胞治疗对于 HBV DNA 复制具有抑制作用,回输后可以使慢性乙肝患者 HBV DNA 水平明显下降。CIK 细胞治疗后患者病毒载量明显下降者其效应细胞 CD3⁺CD56⁺T 细胞比例明显高于治疗无应答者,提示免疫细胞数量和功能恢复与机体抗病毒能力的密切相关^[4]。在肿瘤的发生发展过程中,多种因素影响肿瘤的发展和转归^[5-6],但我们研究了 HBV 携带状况对肿瘤患者 CIK 细胞增殖的影响,在免疫细胞治疗恶性肿瘤的临床应用过程中发现,HBV 表面抗原阳性表达者在细胞回输治疗中的效果似乎要优于 HBV 表面抗原阴性表达者,为深入研究,我们对 CIK 细胞治疗的 80 例患者的 CIK 细胞培养过程中的原始数据进行了分析研究。

对于入组患者初始的淋巴细胞计数,HBV 阳性组的数量要显著低于 HBV 阴性组,且 HBV 阳性组的白蛋白、转氨酶、总胆红素和直接胆红素水平都要显著高于 HBV 阴性组的平均水平,显示了 HBV 阳性表达对于患者的一般状况是一个负性的影响,这与 HBV 存在会影响人体的健康状况是一致的^[7]。对于两组患者的 CIK 细胞的增殖情况,结果显示不论是

Table 3 Subtypes of CIK cells in the two groups

Index	HBV negative				HBV positive			
	Day 7	Day 10	Day 13	Day 15	Day 7	Day 10	Day 13	Day 15
CD3 ⁺	69.2±16.8	81.1±11.7	90.6±5.4	91.3±3.8	72.7±11.5	82.9±6.9	90.2±3.3	93.3±3.5
CD3 ⁺ 4 ⁺	17.1±8.9	14.6±8.6	14.3±12.2	13.4±11.6	14.8±8.7	11.2±7.1	9.1±6.0	7.7±5.7*
CD3 ⁺ 8 ⁺	45.8±15.3	55.1±12.5	61.9±13.5	63.8±17.3	51.1±7.5	61.2±6.9	68.8±5.9	73.2±6.8
CD3 ⁺ 56 ⁺	2.17±0.94	3.51±1.62	5.34±1.84	7.81±4.66	2.73±1.5	4.5±2.6	6.1±3.5	8.5±6.5

Note: *: Compared with HBV negative group ($P<0.05$)

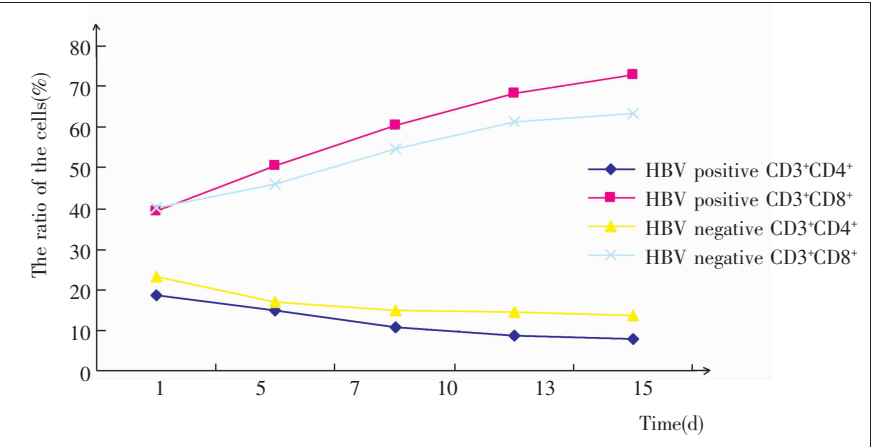


Figure 2 The tendency of the subtypes in the two groups

HBV 表面抗原阳性或者阴性,CIK 细胞的增殖都是大约从第 7d 开始进入快速增长期,在相同时间点两组细胞数比较没有显著性差异,但是第 13d 和第 15dHBV 阳性组细胞的增殖倍数要显著高于 HBV 阴性组,对于这一原因的分析,我们认为 HBV 阳性组患者的淋巴细胞除与肿瘤细胞接触被活化和识别外,还与乙肝病毒接触,接受双重的刺激和激活,从而促进了其增殖和成熟^[8],在体外受到进一步的诱导刺激后,更容易生长和增殖,因此其增殖倍数 HBV 阳性组要显著高于 HBV 阴性组。

对淋巴细胞表面标志的研究结果,CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞、CD3⁺CD56⁺T 细胞均随着培养时间延长而升高,升高程度 HBV 阳性组优于 HBV 阴性组;CD4⁺T 细胞、CD3⁺CD4⁺T 细胞随着培养时间的延长而降低,降低程度 HBV 阳性组优于 HBV 阴性组。经过多元方差分析,其中差异具有统计学意义的是 CD8⁺T 细胞和 CD3⁺CD4⁺T 细胞 ($P<0.05$),其余差异没有显著的统计学意义。对于这一现象的分析,在 CIK 异质细胞群中,主要的效应细胞是 CD3⁺CD8⁺T 细胞和 CD3⁺CD56⁺T 细胞,而 CD3⁺CD4⁺T 细胞属于抑制细胞群^[9],在阳性组中 CD3⁺CD8⁺T 细胞升高和 CD3⁺CD4⁺降到最低更为显著,利于其杀伤作用的发挥;通过我们的分析可以看出,在阳性患者组中 CIK 细胞回输后患者的 HBV DNA 滴度较前有明显的降低,CIK 细胞的这种兼有杀伤肿瘤细胞和 HBV DNA 的双重效果,为乙肝病毒携带者的肿瘤患者提供了一种全新

疗法。关于 CIK 细胞培养技术,也有认为 IL-6 的加入可以降低其中抑制细胞的比例,增加效应细胞的增殖和毒性^[10],具有更好的效果。

免疫治疗对于恶性肿瘤及乙型肝炎病毒的治疗都是一种很有前途的治疗策略^[11-13],如何有效地提高这种治疗的效果,提高 CIK 细胞的靶向性^[14],更好地发挥抗肿瘤和抗病毒作用,将是这一领域的一个研究热点,本研究样本数量有限,还需要再进一步扩大样本继续深入研究。

参考文献:

- [1] Cui FQ,Zhang GM,Sun XJ. Analysis on susceptibility of hepatitis B virus infection among population aged between 15 and 59 in China [J].Jiangsu Journal of Preventive Medicine,2013,24(4):1-3.[崔富强,张国民,孙校金. 中国 15-59 岁人群乙型肝炎病毒感染易感性分析[J].江苏预防医学,2013,24(4):1-3.]
- [2] Zhu PZ,Lv ZC,Zhang M,et al. Clinical analysis on prophylactic lamivudine for chemotherapy induced hepatitis b reactivation in patient with cancer[J]. Journal of Oncology, 2011,17(9):695-697. [朱佩祯,吕章春,章敏,等. 拉米呋定预防肿瘤患者化疗后乙型肝炎发作的临床分析[J].肿瘤学杂志,2011,17(9):695-697.]
- [3] Shi M,Fu J,Shi F,et al. Transfusion of autologous cytokine-induced killer cells inhibits viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Clin Immunol,2009,132(1):43-54.
- [4] Tang ZR,Shi M,Zhang B,et al. Effect of treatment of autologous cytokine-induced killer cells (CIKs) on the suppression of hepatitis B virus and its mechanism[J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army,2011,36(9):901-903. [汤紫荣,施明,张冰,等. 自体 CIKS 治疗对乙肝病毒的抑制作用及机制分析 [J]. 解放军医学杂志,2011,36(9):901-903.]
- [5] Ruan J,Luo RC. The environment and clinical significance of neoplasm metastasis [J].Translational Medicine Journal,2012,1(2):111-114. [阮健,罗荣城. 肿瘤转移的微环境及其临床意义 [J]. 转化医学杂志,2012,1(2):

111-114.]

- [6] Zheng YW,Li RM,Zhang XW,et al. Current adoptive immunotherapy in non-small cell lung cancer and potential influence of therapy outcome [J]. Cancer Invest,2013,31(3):197-205.
- [7] Wang H,Xue L,Yan R,et al. Comparison of FIB-4 and APRI in Chinese HBV-infected patients with persistently normal ALT and mildly elevated ALT [J]. J Viral Hepat, 2013,20(4):e3-e10.
- [8] Pan CC,Huang ZL,Li W,et al. Serum alpha-fetoprotein measurement in predicting clinical outcome related to autologous cytokine-induced killer cells in patients with hepatocellular carcinoma undergone minimally invasive therapy[J]. Chin J Cancer,2010,29(6):596-602.
- [9] Ma Y,Zhang Z,Tang L,et al. Cytokine-induced killer cells in the treatment of patients with solid carcinomas:a systematic review and pooled analysis [J]. Cytotherapy, 2012,14(4):483-493.
- [10] Lin G,Wang J,Lao X,et al. Interleukin-6 inhibits regulatory T cells and improves the proliferation and cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells [J]. J Immunother, 2012,35(4):337-43.
- [11] Jiang J,Wu C,Lu B. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity[J]. J Transl Med,2013,11:83.
- [12] Yang L,Ren B,Li H,et al. Enhanced antitumor effects of DC-activated CIKs to chemotherapy treatment in a single cohort of advanced non-small-cell lung cancer patients[J]. Cancer Immunol Immunother,2013,62(1):65-73.
- [13] Zhang J,Zhu L,Wei J,et al. The effects of cytokine-induced killer cells for the treatment of patients with solid tumors:a clinical retrospective study[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2012,138(6):1057-1062.
- [14] Fu QG,Ying KM,Zhu LB. Study of cytotoxicity effects of cytokine-induced killer cells stimulated by heat shock protein 70 derived from tumor cells [J]. Journal of Chinese Oncology,2012,18(7):512-515. [付庆国,应可明,朱林波. 肿瘤 HSP70 活化的 CIK 细胞杀瘤作用研究[J]. 肿瘤学杂志,2012,18(7):512-515.]