

香菇多糖诱导 CIK 细胞对肺癌 A549 细胞杀伤作用的研究

戴尔珣¹ 汪步海¹ 戴金梁² 陈丽¹ 蒋亚齐¹

(1.江苏省苏北人民医院,江苏扬州 225009; 2.扬州市中医院,江苏扬州 225000)

摘要 目的:明确香菇多糖对 CIK 细胞(细胞因子诱导的杀伤细胞)体外增殖及抗肿瘤活性的影响,为临床应用香菇多糖提高 CIK 细胞过继免疫治疗疗效提供理论数据。方法:于 CIK 细胞培养第 11 天加入不同浓度香菇多糖,诱导培养 72h 后比较细胞密度,流式细胞仪检测 CIK 细胞 CD3、CD56 双阳性率,CCK8 法检测比较经不同浓度香菇多糖诱导后的 CIK 细胞对肺癌 A549 细胞的杀伤率。结果:诱导 72h 后,加入 5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香菇多糖的 CIK 细胞密度虽有上升但与未加入香菇多糖的空白对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。经 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香菇多糖诱导的 CIK 细胞 CD3、CD56 双阳性率与空白对照组相当($P>0.05$);而经 25、50 及 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香菇多糖诱导的 CIK 细胞 CD3、CD56 双阳性率较空白对照组明显升高($P<0.05$),以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香菇多糖诱导组的差异最为明显。经 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香菇多糖诱导的 CIK 细胞对肺癌 A549 细胞的杀伤率与空白对照组相当($P>0.05$);而经 25、50 及 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香菇多糖诱导的 CIK 细胞对肺癌细胞杀伤率明显高于空白对照组($P>0.05$),以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香菇多糖诱导组对肺癌细胞的杀伤率最高。结论:香菇多糖对 CIK 细胞的体外增殖无促进作用,高浓度香菇多糖反而抑制 CIK 细胞增殖;适当浓度的香菇多糖处理 CIK 细胞能使 CD3、CD56 双阳性率上升,同时可提高 CIK 细胞对肺癌 A549 细胞株杀伤率。香菇多糖诱导 CIK 细胞的最适浓度在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词 香菇多糖 CIK 细胞 细胞免疫 肺癌细胞株 体外试验

中图分类号 R734.2

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2016)06-0071-04

CIK 细胞(细胞因子诱导的杀伤细胞)过继免疫疗法是目前应用较广的免疫治疗方法,其副作用小,病人易于耐受,是传统手术、化疗和放疗的有益补充。该疗法与 DC(树突状细胞)肿瘤疫苗及其他如免疫监测点抗体治疗相结合的治疗方法甚至有希望成为根除肿瘤细胞的方法之一。CIK 细胞中表达 CD3、CD56 双阳性的细胞是 CIK 细胞中最主要的效应细胞亚群,然而研究发现肿瘤患者的 CIK 细胞体外扩增率、CD3、CD56 双阳性率及对肿瘤细胞杀伤活性均低于健康人^[1],因此如何提高 CIK 细胞培养时的双阳性率进而提高 CIK 细胞肿瘤杀伤活性是当前过继免疫治疗中的重要问题。

香菇多糖作为一种中药类免疫调节剂,可以激活多种免疫细胞如 T 细胞、巨噬细胞,能促进 T、B 淋巴细胞增殖,提高 NK 细胞(自然杀伤细胞)活性^[2-3],增加免疫细胞的吞噬能力^[4];香菇多糖还可以上调 DC 细胞组织相容性复合体 II(MHC II)、CD40、CD83、CD80、CD86 和 DEC205 的表达,促进 DC 表型的成熟^[5],提高 DC 抗原递呈功

能^[6],提高树突状细胞表面分子 CD1a 及 HLA-DR 的表达,提升白介素-12(IL-12)的分泌水平^[7]。本研究通过在 CIK 细胞体外培养过程中加入不同浓度的香菇多糖进行诱导,观察比较 CIK 细胞增殖情况,CD3、CD56 双阳性率及对肿瘤细胞杀伤率,旨在明确香菇多糖对 CIK 细胞的影响,探求最适宜的诱导浓度,寻求可以提高 CIK 细胞疗法疗效的可能途径,并为临床合并用药治疗提供基础研究依据。

1 实验材料

1.1 血液与细胞 健康人外周血(扬州市中心血站),肺癌细胞株 A549(上海复祥生物科技有限公司)。

1.2 试剂与设备 easyCyte 6HT 流式细胞仪,南京兆坤仪器有限公司;Model 311 Series CO₂ 培养箱(Thermo);Multiskan FC 酶标仪(Thermo);注射用香菇多糖,南京易亨公司;Ficoll 分离液,美国 GE 公司;CCK8 试剂,日本同仁化工;异硫氰酸荧光素(FITC)anti-human CD3 单抗(Biolegend);藻红蛋白(PE)anti-human CD56 单抗(Biolegend);GT-T551

基金项目:江苏省名老中医药专家戴金梁传承工作室资助项目

培养基(TaKaRa);重组人白细胞介素-2(IL-2),北京双鹭药业;CD3单抗(CD3mAb),MACS-GMP;干扰素- γ (IFN- γ),上海凯茂医药。

2 实验方法

2.1 CIK 细胞培养 50mL 健康人全血,以 Ficoll 分离液分离单个核细胞,以培养基稀释调整密度至 1×10^6 /mL,加入 IFN- γ ,终浓度 1000IU/mL,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24h,加入 IL-2、CD3mAb,终浓度均为 500IU/mL。每 3d 半量换液,培养至第 11 天时,收集细胞备用。

2.2 分组加入香菇多糖诱导 将收集的 CIK 细胞重新调整密度至 1×10^6 /mL,取 30mL 均分到 6 个培养瓶中, I 组为空白对照组, II~VI 组分别加入终浓度为 5、25、50、75、100 μ g/mL 的香菇多糖,继续送入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 72h。

2.3 细胞计数 分别于诱导培养 24、48、72h 以台盼蓝排除法计数活细胞,每管计数 3 次,取平均值记录细胞密度。

2.4 流式细胞仪检测 CD3、CD56 双阳性率 将加入香菇多糖诱导培养 72h 的各组 CIK 细胞悬液取样离心,磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤,离心,分装,加入 FITC anti-human CD3 单抗及 PE anti-human CD56 单抗,室温避光孵育 30min 后离心机离心,重悬,加入 96 孔板,流式细胞仪检测。

2.5 肺癌细胞株培养 肺癌 A549 细胞加入 RPMI-1640 培养液并添加 10% 的胎牛血清培养,每 2d 换液 1 次,待肺癌细胞进入对数生长期,以 1mL 0.25% 的胰蛋白酶消化液消化,洗涤后将收集的癌细胞调整到浓度为 5×10^4 /mL 用于后续实验。

2.6 CIK 细胞杀伤试验 将诱导培养的各组 CIK 细胞与肺癌细胞 A549 按效靶比 20:1 混合,培养 24h 后加入 CCK8 试剂,酶标仪测定 OD (光密度)450nm 波长。CIK 细胞杀伤率公式:杀伤率=[1-(实验孔 OD 值-效应细胞孔 OD 值)/靶细胞孔 OD 值]×100%。

2.7 统计学方法 使用

SPSS17.0 软件进行统计分析。数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,各组均数比较行单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 实验结果

3.1 不同浓度不同诱导时间香菇多糖对 CIK 细胞体外扩增的影响 见表 1。与 I 组(空白对照组)相比,经 5、25、50 μ g/mL 香菇多糖诱导 72h、75、100 μ g/mL 香菇多糖诱导 24、48h,CIK 细胞密度相当,无统计学差异 ($P>0.05$);经 75、100 μ g/mL 香菇多糖诱导 72h,CIK 细胞密度明显低于空白对照组 ($P<0.05$)。

3.2 不同浓度香菇多糖诱导 72h 后 CIK 细胞 CD3、CD56 双阳性率比较 见图 1、表 2。空白对照组与 5 μ g/mL 香菇多糖干预组 CD3、CD56 双阳性率相当 ($P>0.05$),经 25、50 μ g/mL 香菇多糖干预后 CIK 细胞 CD3、CD56 双阳性率较空白对照组明显升高 ($P<0.05$),其中 IV 组(50 μ g/mL 香菇多糖诱导)双阳性率最高, V 组(75 μ g/mL 香菇多糖)双阳性率开始下降,但与对照组相比仍有统计学意义 ($P<0.05$)。VI 组(100 μ g/mL 香菇多糖)因 CIK 细胞死亡放弃检测。

表 1 不同浓度香菇多糖诱导不同时间后 CIK 细胞密度比较($n=10, \bar{x} \pm s$) $\times 10^6$ /mL

诱导时间	I 组(空白对照)	II 组(5 μ g/mL)	III 组(25 μ g/mL)	IV 组(50 μ g/mL)	V 组(75 μ g/mL)	VI 组(100 μ g/mL)
72h	3.71 \pm 0.26	3.67 \pm 0.29	3.74 \pm 0.29	3.67 \pm 0.25	2.39 \pm 0.21*	0.54 \pm 0.07*

注:*与 I 组比较, $P<0.05$ 。

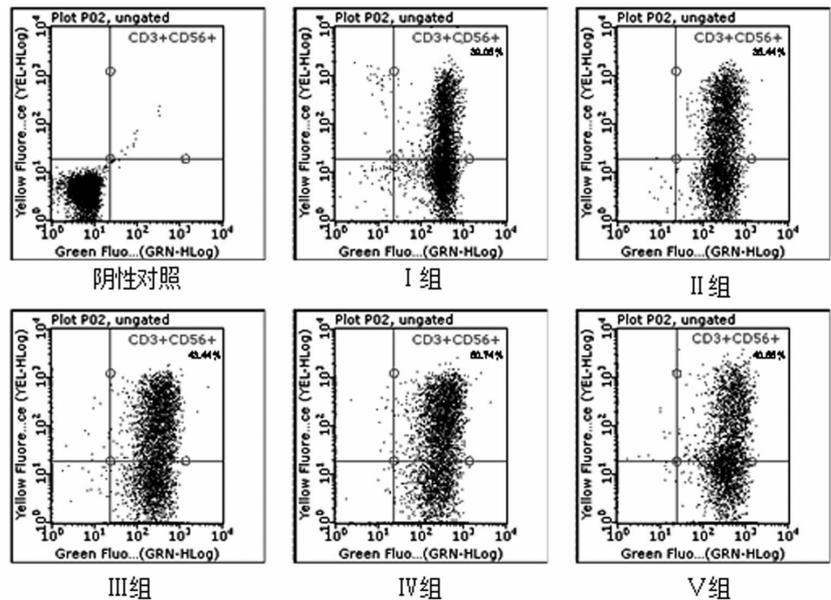


图 1 流式细胞仪检测 CIK 细胞 CD3、CD56 双阳性率(右上角为 CD3、CD56 双阳性区域)

表 2 各组 CIK 细胞 CD3、CD56 双阳性率比较($n=10, \bar{x} \pm s$) %

	I 组(空白对照)	II 组(5 μ g/mL)	III 组(25 μ g/mL)	IV 组(50 μ g/mL)	V 组(75 μ g/mL)
双阳性率	38.17 \pm 2.52	38.55 \pm 2.32	43.47 \pm 1.81*	50.73 \pm 2.90*	40.87 \pm 1.88*

注:*与 I 组比较, $P<0.05$ 。

3.3 各组 CIK 细胞对肺癌

A549 细胞株杀伤率比较 见

表 3。经不同浓度香菇多糖诱

导 72h 后, I 组(空白对照组)

与 II 组(5 μ g/mL 香菇多糖)CIK细胞对肺癌细胞株杀伤率相当 ($P>0.05$), III 组(25 μ g/mL 香菇多糖)、IV 组(50 μ g/mL 香菇多糖)与

空白对照组相比对肺癌细胞的杀伤率明显升高

($P<0.05$),其中 IV 组杀伤率最高;V 组(75 μ g/mL 香

菇多糖)杀伤率较 IV 组下降,与空白对照组相比差

异仍具有统计学意义($P<0.05$)。杀伤率曲线变化与CD3、CD56 双阳性率相似,以 50 μ g/mL 香菇多糖诱

导组最优,见图 2。

4 讨论

肿瘤过继免疫疗法是将自身或异体的抗肿瘤

效应细胞的前体细胞,在体外采用多种细胞因子进

行诱导、激活和扩增,然后回输给肿瘤患者,提高患

者抗肿瘤免疫力,以达到治疗肿瘤的目的。目前用

于过继免疫治疗的细胞有 LAK 细胞(淋巴因子激活

的杀伤细胞)、TIL 细胞(肿瘤浸润性淋巴细胞)、

CD3AK(CD3 单抗激活的杀伤细胞)、NK 细胞、CTL

(细胞毒 T 细胞)、DC 细胞及 CIK 细胞,但 LAK、

CD3AK、CTL 等存在增殖速度慢、数量少、输注困难

及细胞毒力低下等缺陷^[8]。与 LAK 细胞、TIL 细胞等

免疫细胞相比,CIK 细胞具有增殖速度快,杀瘤谱

广,杀瘤活性高,对正常造血前体细胞毒性小,对多

重耐药肿瘤细胞仍敏感,能抵抗肿瘤细胞引发的效

应细胞 Fas-FasL 凋亡,疾病的严重性和肿瘤的转移

不影响其抗癌活性等优势^[9-12]。鉴于以上特点,CIK 细

胞是目前肿瘤过继免疫疗法首选杀伤细胞。然而,

肿瘤患者 CIK 细胞功能低下,体外扩增率、CD3、

CD56 双阳性率及对肿瘤细胞杀伤活性均低于健康

人^[11,13],虽然有研究表明同一患者多次回输后进行单

核细胞采集可提高再次 CIK 细胞培养时的双阳性

率^[14],且多疗程治疗患者的 CD3、CD56 双阳性细胞量高于单疗程治疗^[15],但实验中患者治疗疗程 >14

次后方显示出差异,而多数患者并不能接受更多程

程的 CIK 细胞治疗。另有研究发现,CIK 细胞治疗

时高比例 CD3+、CD56+ 细胞亚群与 CIK 细胞治疗

后肿瘤患者总生存期改善有关^[16],所以更高的 CD3、

CD56 双阳性率预示着更好的疗效。因此,在自体

CIK 细胞治疗中如何提高 CIK 细胞双阳性率,提高

细胞对肿瘤细胞杀伤活性是目前 CIK 细胞过继免

疫治疗中需要攻克的难题。

已有研究发现,某些中药成分对 CIK 细胞有增

强功能、促进增殖的作用,如一定浓度的云芝多糖、

表 3 经不同浓度香菇多糖诱导后各组 CIK 细胞对肺癌 A549 细胞杀伤率($n=10, \bar{x} \pm s$) %

	I 组(空白对照)	II 组(5 μ g/mL)	III 组(25 μ g/mL)	IV 组(50 μ g/mL)	V 组(75 μ g/mL)
杀伤率(%)	33.58 \pm 1.63	34.23 \pm 1.79	39.94 \pm 1.41*	48.19 \pm 2.24*	39.04 \pm 1.85*

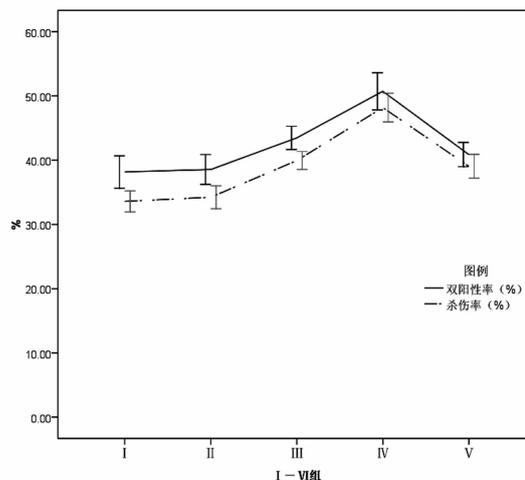
注:*与 I 组比较, $P<0.05$ 。

图 2 各组 CIK 细胞杀伤率与 CD3、CD56 双阳性率对应关系(均以第 IV 组最高且有统计学意义)

芹菜素可促进 CIK 细胞增殖^[17-18],而黄芪多糖、猪苓多糖、茯苓多糖、云芝多糖、芹菜素、白桦酯酸及姜黄素等可提高 CIK 细胞对肿瘤细胞抑制率,其机制可能与增加 CIK 细胞穿孔素和颗粒酶含量及提高 CD3、CD56 双阳性率有关^[17-21]。香菇多糖作为一种中药类免疫调节剂,可以激活多种免疫细胞,能促进 T、B 淋巴细胞增殖,提高 NK 细胞活性^[2-3],增加免疫细胞的吞噬能力^[4]。本研究发现,香菇多糖对 CIK 细胞的体外增殖无促进作用,高浓度香菇多糖反而抑制 CIK 细胞增殖,更高浓度香菇多糖使 CIK 细胞死亡。香菇多糖浓度达 25 μ g/mL 后 CIK 细胞 CD3、CD56 双阳性率上升,至 50 μ g/mL 浓度时双阳性率达到顶峰,由此可以认为 50 μ g/mL 的香菇多糖为提高 CIK 细胞 CD3、CD56 双阳性率的最适浓度。而在 CIK 细胞对肺癌细胞 A549 的杀伤试验中,同样为 50 μ g/mL 浓度香菇多糖组杀伤率最高。

本研究结果表明,香菇多糖可以促进 CIK 细胞的增殖并提高其抗肿瘤活性,从而解决过继免疫治疗中肿瘤患者 CD3、CD56 双阳性率不高的问题,提升 CIK 细胞治疗的疗效。通过比对发现,CIK 细胞杀伤率曲线变化与 CD3、CD56 双阳性率曲线呈对应关系,因此经香菇多糖诱导后的 CIK 细胞对肺癌细胞杀伤作用加强可能与更高的 CD3、CD56 双阳性率相关。关于香菇多糖提高 CIK 细胞 CD3、CD56 双阳性率的机制则有待进一步研究。

参考文献

- [1] 黄建云,邓晖,高小华,等.健康人和肿瘤患者 CIK 细胞的生物学特性比较及应用[J].广东医学,2011,32(20):2621.

- [2] ZHANG Y, LI S, WANG X, et al. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(2): 196.
- [3] 林卡莉, 张赛男, 林卡勤. 香菇多糖对荷瘤鼠脾细胞因子和 NK 活性的调节作用[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1188.
- [4] HOU X J, CHEN W. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible BaChu mushroom by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72(1): 67.
- [5] 胡婷婷, 孟一鸣, 单风平. 香菇多糖对小鼠骨髓树突状细胞表型和功能的影响[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(2): 54.
- [6] MUSHIAKE H, TSUNODA T, NUKATSUKA M, et al. Dendritic cells might be one of key factors for eliciting antitumor effect by chemoimmunotherapy in vivo [J]. Cancer Immunol Immunother, 2005, 54(2): 120.
- [7] 王玉虹. 香菇多糖对急性髓系白血病患者树突状细胞的成熟和功能影响的体内外研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2010.
- [8] ZHOU J, KANG N, CUI L, et al. Anti- $\gamma\delta$ TCR antibody-expanded $\gamma\delta$ T cells: a better choice for the adoptive immunotherapy of lymphoid malignancies [J]. Cell Mol Immunol, 2012, 9(1): 34.
- [9] HUANG B T, ZENG Q C, YU J, et al. High-dose homoharringtonine versus standard-dose daunorubicin is effective and safe as induction and post-induction chemotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia: a multicenter experience from China [J]. Med Oncol, 2012, 29(1): 251.
- [10] LINN Y C, YONG H X, NIAM M, et al. A phase I/II? clinical trial of autologous cytokine-induced killer cells? as adjuvant immunotherapy for acute and chronic myeloid leukemia in clinical remission. Cytotherapy, 2012, 14(7): 851.
- [11] AZUMA T, TOBINAI K, TAKEYAMA K, et al. Phase II study of intensive post-remission chemotherapy and stem cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma; Japan Clinical Oncology Group Study, JCOG9402 [J]. Jpn J Clin Oncol, 2012, 42(5): 394.
- [12] CLUZEAU T, DE MATTEIS M, MOUNIER N, et al. New sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation in very high-risk acute myeloid leukemia [J]. Am J Hematol, 2011, 86(7): 619.
- [13] 李壮, 董晨辉, 徐祥, 等. 自体及健康人 CIK 细胞治疗临床恶性肿瘤的比较 [J]. 基础医学与临床, 2014, 34(4): 475.
- [14] 于卉影, 孙英慧, 简迪, 等. 肿瘤患者自体 CIK 细胞输注增强再次制备时 CD3+CD56+ 细胞的体外扩增能力 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(7): 748.
- [15] 刘红伟, 孟明耀, 解燕华, 等. 不同疗程 CIK 治疗患者的 CIK 细胞的细胞毒活性研究 [J]. 昆明医学院学报, 2010(12): 37.
- [16] PAN K, WANG Q J, LIU Q, et al. The phenotype of ex vivo generated cytokine-induced killer cells is associated with overall survival in patients with cancer [J]. Tumour Biol, 2014, 35(1): 701.
- [17] 姚萍, 陈复兴, 刘军权, 等. 灵芝多糖对人 CIK 细胞及其杀伤功能相关分子表达的影响 [J]. 徐州医学院学报, 2013, 33(12): 802.
- [18] 魏沛, 陈剑群, 陈复兴, 等. 芹菜素对人 CIK 细胞杀伤结肠癌 SW1116 细胞的影响 [J]. 医学综述, 2012, 18(19): 3276.
- [19] 许云霞, 刘晓健, 屈飞. 中药多糖与过继免疫联合治疗卵巢癌 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 231.
- [20] 王美梅, 张南征, 陈复兴, 等. 白桦酯酸对人 CIK 细胞杀伤胃癌细胞株 SGC-7901 的功能影响及机制研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(1): 48.
- [21] 单廷红, 崔丽峰, 崔满华. 姜黄素联合人类细胞因子诱导的杀伤细胞诱导卵巢癌细胞凋亡的研究 [J]. 中华医学杂志, 2013, 93(5): 385.

第一作者: 戴尔珣(1977—), 男, 医学硕士, 主治医师, 从事中西医结合肿瘤诊治工作。

通讯作者: 汪步海, 医学博士, 主任医师, 硕士研究生导师。wbhself@sina.com

收稿日期: 2016-01-10

编辑: 吴宁



编辑部现有《江苏中医药》1990—2015 年期间各年度的合订本, 价格分别为 90 元/本(1990—2008 年)和 114 元/本(2009—2015 年), 邮购另加邮资 23 元/本。欢迎选购。地址: 江苏省南京市汉中路 282 号, 邮编: 210029, 电话: 025-86612950。

《江苏中医药》编辑部