

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.09.009

· 基础研究 ·

ATG-F 培养体系制备 CIK 细胞的表型特点及其对 K562 细胞的杀伤作用

张宇尘, 沈燕, 张萍, 白凤霞, 娄世锋(重庆医科大学第二附属医院 血液内科, 重庆 400010)

[摘要] **目的:** 探讨抗人 T 细胞兔免疫球蛋白-费森尤斯(anti-human T lymphocyte rabbit immunoglobulin-Fresenius, ATG-F) 和 IFN- γ 、IL-2 组成的培养体系诱导细胞因子诱导的杀伤(cytokine induced killer, CIK) 细胞的性能并用于临床细胞治疗的可行性。**方法:** 采集分离健康供者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 依照激活抗体的不同分组分别培养 CIK 细胞, 在第 7 和 14 天计数总细胞数量。流式细胞术检测 ATG-F 组、CD3 组和 TG(抗人胸腺细胞兔免疫球蛋白, Thymoglobulin) 组 CIK 细胞组成及细胞表面活化性、抑制性受体分子的比例, 还检测第 14 天时 ATG-F 高剂量组、CD3 组和 TG 组 CIK 细胞对 K562 靶细胞的杀伤性能。**结果:** 使用 ATG-F、IFN- γ 、IL-2 培养体系成功诱导出 CIK 细胞。第 14 天时高剂量 ATG-F(F-H) 组增殖倍数明显高于 TG 组(27.25 \pm 1.25 vs 16.60 \pm 1.72, $P < 0.01$); 其 CD3⁺CD56⁺ 细胞比例与 CD3 组无统计学差异($P > 0.05$), 但 CD3⁺CD56⁺ 的 NK 细胞显著高于 TG 组及 CD3 组[(11.19 \pm 2.60)% vs (5.66 \pm 1.00)%、(1.42 \pm 0.51)], $P < 0.01$], CD4⁺T 细胞比例显著低于 CD3、TG 组[(4.35 \pm 1.47)% vs (26.88 \pm 5.01)%、(14.52 \pm 6.22)%], $P < 0.01$], CD56⁺CD94⁺、CD56⁺CD158a⁺、CD56⁺CD158b 细胞比例均明显高于 CD3 组(均 $P < 0.01$); F-H 组在靶效比为 1:10 时对 K562 的杀伤效力显著高于 CD3 组[(60.52 \pm 2.05)% vs (30.02 \pm 6.67)%], $P < 0.01$]. **结论:** ATG-F 培养体系制备的 CIK 细胞比常规培养体系所得 CIK 细胞具有更高的 NK 细胞比例, 其活化受体对 K562 细胞更强的细胞毒性。

[关键词] 细胞因子诱导的杀伤细胞; 抗人 T 细胞兔免疫球蛋白-费森尤斯; 生物治疗; CD3

[中图分类号] R392.33; R73-36² **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)09-0898-06

Phenotypes of CIK cells prepared by ATG-F culture system and its killing effect against K562 cells

ZHANG Yuchen, SHEN Yan, ZHANG Ping, BAI Fengxia, LOU Shifeng (Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Medical University of Chongqing, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the function of CIK (cytokine induced killer) cells cultured using ATG-F (anti-human T lymphocyte rabbit immunoglobulin-Fresenius) and IFN- γ , IL-2 system and its feasibility in clinical practice. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy donors and were used to culture CIK cells by different activating antibodies; the total cell count was calculated on Day 7 and 14. The CIK cell composition, cell surface activation and proportion of inhibitory receptor molecular in ATG-F group, CD3 group and TG (Thymoglobulin) group were analyzed by Flow cytometry, and the cytotoxicity of CIK cells against K562 cells were also determined by flow cytometry at day 14 in ATG-F high-dose group, CD3 group and TG group. **Results:** CIK cells were successfully cultured by ATG-F, IFN- γ , IL-2 system. The proliferation rate of ATG-F high-dose group was significantly higher than that in TG group (27.25 \pm 1.25 vs 16.60 \pm 1.72, $P < 0.01$), but the proportion of CD3⁺CD56⁺ cells showed no statistical difference compare with the CD3 group ($P > 0.05$). The percentage of CD3⁺CD56⁺ NK cells in ATG-F high-dose group was significantly higher than that in TG group and CD3 group [(11.19 \pm 2.60)% vs (5.66 \pm 1.00)%、(1.42 \pm 0.51)%], $P < 0.01$], while the proportion of CD4⁺T cells was significantly lower than that in CD3, TG group [(4.35 \pm 1.47)% vs (26.88 \pm 5.01)%、(14.52 \pm 6.22)%], $P < 0.01$]; the proportion of CD56⁺CD94⁺, CD56⁺CD158a⁺, CD56⁺CD158b cells was significantly higher than those in CD3 group (all $P < 0.01$). The ATG-F high does group showed significantly higher cytotoxicity against K562 cells than that of CD3 group at the target/effect ratio of 1:10. **Conclusion:** CIK cells cultured by ATG-F culture system has higher NK cell proportion than other ordinary culture system, and its activated receptor has more stronger cytotoxicity against K562 cells.

[基金项目] 重庆市自然科学基金资助项目(No. cstc2017jcyjAX0239)。Project supported by the Natural Science Foundation of Chongqing City (No. cstc2017jcyjAX0239)

[作者简介] 张宇尘(1989-), 男, 硕士生, 主要从事血液学疾病的研究, E-mail: 676756786@qq.com

[通信作者] 娄世锋(LOU Shifeng, corresponding author), 硕士, 教授, 硕士生导师, 主要从事血液学肿瘤的研究, E-mail: loushifeng@hotmail.com

[Key words] cytokine induced killer(CIK) cell; anti-human T lymphocyte rabbit immunoglobulin-Fresenius(ATG-F); Biological treatment; CD3

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(9): 898-903. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.09.009]

恶性肿瘤的免疫治疗目前是研究热点,细胞因子诱导的杀伤(cytokine induced killer cells, CIK)细胞很早被发现具有非MHC限制的杀伤肿瘤细胞作用,虽然临床应用尚存争议,但因对部分肿瘤有确切疗效,现仍广泛应用于恶性肿瘤的治疗^[1-2]。有报道^[3-5]显示,CIK细胞尤其对血液学恶性肿瘤有效,且副作用小,甚至对复发难治血液疾病有效,可延长患者生存期,清除微小残留灶。传统的CIK细胞制作步骤是取供者/患者PBMC,用IFN- γ 、CD3 mAb及IL-2刺激并在体外培养增殖,产生一群以CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞为主要效应细胞的异质性细胞群,其中CD3⁺CD56⁺细胞起主要作用。传统制作CIK细胞的技术关键是在培养第1天使用CD3mAb刺激单个核细胞增殖^[6]。BONANNO等^[7]报道,使用多克隆抗体-抗人胸腺细胞兔免疫球蛋白(thymoglobulin, TG)刺激培养出的CIK细胞表型与传统CD3 mAb刺激的CIK细胞有差异,杀瘤能力也更强。抗人T细胞兔免疫球蛋白-费森尤斯(anti-human T lymphocyte rabbit immunoglobulin-Fresenius, ATG-F)是除TG外另一种临床常用的多克隆抗T细胞球蛋白。TG是用人胸腺细胞免疫兔,抽取其血液经分离纯化而得,ATG-F是用人Jurkat T淋巴细胞株免疫兔后制造的,两种抗体中都含有CD2抗体成分,但两种多克隆免疫球蛋白的抗体成分及效价具有明显不同^[8]。既往研究^[9-10]显示,CD2抗体能通过与CD3单抗不同的分子机制促进血液中PBMC增殖。传统CIK细胞杀伤肿瘤细胞能力较弱,是临床应用出现争议的主要原因。本研究使用ATG-F作为PBMC增殖刺激抗体用于CIK细胞的培养,并将所得CIK细胞与另外几种不同的抗体刺激方案制备的CIK细胞进行初步对比,且ATG-F为临床批准用药,便于临床推广应用。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

K562细胞株由重庆医科大学第二附属医院血液科实验室长期保存。外周静脉血由健康供者提供(已签署知情同意书)。人淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司, RBMI-1640、IFN- γ 购自Gbico公司, FBS胎牛血清购自四季青公司, CD3单抗(克隆号OKT3)购自Gibco公司, IL-2购自北京双鹭药业股份有限公司, TG购自法国赛默飞公司, ATG-F购自安斯泰来制药, 锥虫蓝购自Sigma

公司, PBS购自无锡傲锐东源生物科技有限公司, CD3-PECY5、CD4-FITC、CD8-PE及相关同型对照购自四正柏公司, CD56-PC5.5、CD56-FITC、CD94-PE、CD158a (KIR2DL1) - PE、CD158b (KIR2D) - PE、CD314-PE及相关同型对照购自BD Pharmingen公司, 死/活细胞检测试剂盒购自凯基公司。

1.2 CIK细胞的制备

按照说明书方法分离出PBMC, 使用培养液将其稀释至 2×10^6 个/ml, 按照1 000 U/ml的终浓度添加IFN- γ , 在37 °C、5% CO₂、饱和湿度恒温箱中培养; 24 h后加入IL-2至终浓度300 U/ml, 将细胞分别依照添加抗体不同分为传统CD3组(CD3终质量浓度50 ng/ml)、TG组(TG终质量浓度500 ng/ml)、低浓度ATG-F组(F-L组, ATG-F终质量浓度50 ng/ml)、中浓度ATG-F组(F-M组, ATG-F终质量浓度250 ng/ml)、高浓度ATG-F组(F-H组, ATG-F终质量浓度500 ng/ml)。定期补充含IL-2的培养液, 共培养14 d。

1.3 锥虫蓝染色检测CIK细胞增殖倍数

在培养的第7天和第14天将细胞混匀后在倒置显微镜下计数CIK细胞。重复计数3次取均值。

1.4 流式细胞术测定CIK细胞扩增水平

在第7天及第14天每组取1 ml细胞, 适当稀释, 按照抗体说明书要求取100 μ l待测细胞及加入适量抗体, 避光孵育15 min, 2 ml PBS洗涤并离心。细胞上机前使用含1.5%多聚甲醛的PBS溶液固定, 4 °C避光保存, 24 h内测定完毕。

1.5 CAM/PI双染法检测CIK细胞毒性

细胞毒性测定遵照文献[7]中的方法, 取K562细胞, 制成的悬液 5×10^6 /ml; 使用含20% FBS的RPMI 1640配置0.2 μ mol/L的CAM工作液及8 μ mol/L的PI液, 将K562细胞及CAM工作液1:1充分混匀, 避光孵育染色; 离心弃上清, 将K562细胞洗涤后使用锥虫蓝染色, 细胞计数并将细胞密度调整为 1×10^6 /ml。取K562细胞50 μ l, 以 1×10^5 /孔接种于96孔板; 将每组CIK细胞稀释至 1.35×10^7 /ml、 6.75×10^6 /ml、 3.38×10^6 /ml, 取150 μ l细胞接种至96孔板中, 靶效比正好达到20:1、10:1及5:1, 均设置3个复孔。取仅加入K562细胞作为对照组, 置3个复孔。37 °C、5%CO₂培养箱中4 h后以PI染色15 min, 上机测定CIK细胞对K562细胞的杀伤力, K562细胞为CAM⁺细胞, 坏死/凋亡K562细胞为CAM⁺PI⁺双阳性细胞。

$$\text{CIK 细胞杀伤率}(\%) = \left(\frac{\text{CIK + K562 细胞组中 + PI + 细胞比例}}{\text{CIK + K562 杀伤组中 CAM + 细胞比例}} - \frac{\text{K562 对照组中 CAM + PI + 细胞比例}}{\text{K562 对照组中 CAM + 细胞比例}} \right) \times 100\%$$

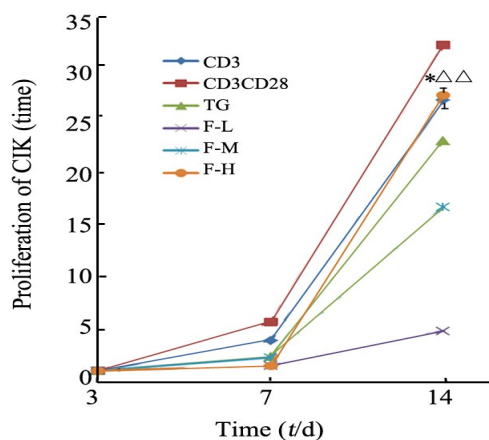
1.6 统计学处理

采用 SPSS 25.0 统计学软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析或析因分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高质量浓度 ATG-F 可有效诱导 CIK 细胞增殖

锥虫蓝染色测定结果(图1)显示, 在第14天, F-H 组 CIK 细胞增殖倍数明显高于 F-M 组 (27.25 ± 1.25 vs 16.60 ± 1.72 , $P < 0.05$), 亦明显高于 F-L 组 (27.25 ± 1.25 vs 4.77 ± 0.96 , $P < 0.01$), 较 CD3 组无统计学差异 (27.25 ± 1.25 vs 26.82 ± 2.15 , $P > 0.05$)。表明高浓度 ATG-F 能更有效激活 CIK 细胞增殖, 其扩增倍数与 ATG-F 添加量相关, 故后续实验仅选用 F-H 组、TG 组及 CD3 组进行。



* $P < 0.05$ vs F-M group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs F-L group

图1 ATG-F 对 CIK 细胞增殖倍数的影响

Fig.1 Effect of ATG-F on proliferation of CIK cells

2.2 高质量浓度 ATG-F 对 CIK 细胞中 CD3⁺CD56⁺ 细胞表达的影响

流式细胞术检测各组 CIK 细胞 CD3、CD56 双阳性细胞比例(图2)显示, 在第14天时, F-H 组 CD3⁺CD56⁺ 细胞比例略高于 TG 和 CD3 组 [$(32.26 \pm 11.67)\%$ vs $(30.07 \pm 11.37)\%$ 、 $(26.93 \pm 5.34)\%$, 均 $P > 0.05$], 但差异无统计学意义。

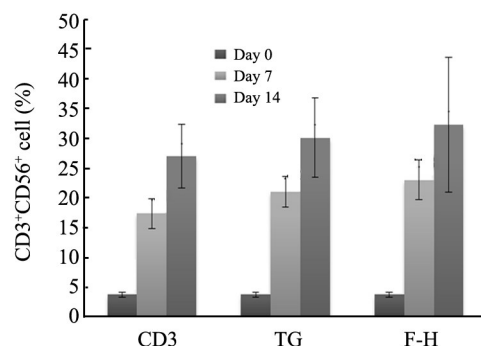
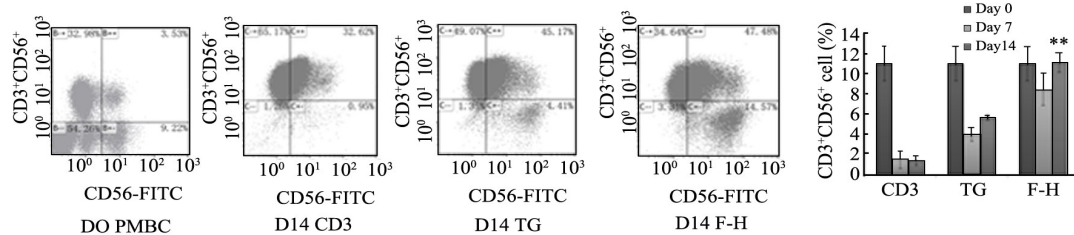


图2 高质量浓度 ATG-F 对 CIK 细胞中 CD3⁺CD56⁺ 细胞比例的影响

Fig.2 Effect of high mass concentration of ATG-F on the proportion of CD3⁺CD56⁺ cells in CIK cells

2.3 高质量浓度 ATG-F 可诱导 CIK 细胞中 CD3⁺CD56⁺ 细胞高表达

流式细胞术检测结果(图3)显示, 在第14天时 F-H 组 CD3⁺CD56⁺ 的 NK 细胞显著高于 TG 组及 CD3 组 [$(11.19 \pm 2.60)\%$ vs $(5.66 \pm 1.00)\%$ 、 $(1.42 \pm 0.51)\%$, 均 $P < 0.01$]。



** $P < 0.01$ vs CD3 or TG group

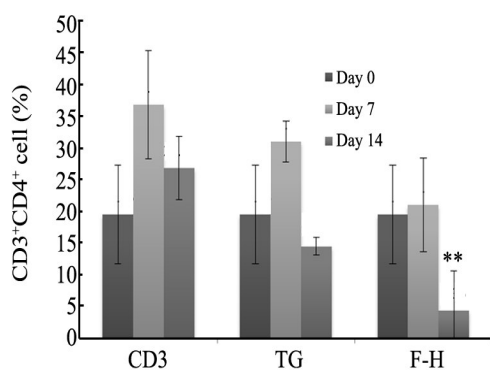
图3 高质量浓度 ATG-F 对 CIK 细胞中 CD3⁺CD56⁺ 比例的影响

Fig.3 Effect of high mass concentration of ATG-F on the proportion of CD3⁺CD56⁺ cells in CIK cells

2.4 高质量浓度 ATG-F 可抑制 CIK 细胞中 CD4⁺T 细胞的表达

流式细胞术检测结果(图4)显示, 在第14天时 F-

H 组 CD4⁺T 细胞比例显著低于 CD3、TG 组 [$(4.35 \pm 1.47)\%$ vs $(26.88 \pm 5.01)\%$ 、 $(14.52 \pm 6.22)\%$, 均 $P < 0.01$]。



** $P < 0.01$ vs CD3 or TG group

图4 高质量浓度 ATG-F 对 CIK 细胞中 CD3⁺CD4⁺ 细胞表达的影响

Fig.4 Effect of high mass concentration of ATG-F on the ratio of CD3⁺CD4⁺ cells in CIK cells

2.5 高质量浓度 ATG-F 可诱导 CIK 细胞中活化受体 CD56⁺CD314⁺ 细胞高表达

流式细胞术检测结果(表 1)显示,第 14 天时 ATG-F 培养组中 F-H 组 CD56⁺CD314⁺ 细胞比例显著高于 CD3 组和 TG 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明高质量浓度 ATG-F 可诱导 CIK 中部分活化性受体高表达。

表 1 高质量浓度 ATG-F 对 CIK 细胞中活化受体 CD56⁺CD314⁺ 表达的影响[($\bar{x} \pm s$)%]

Tab.1 Effect of high mass concentration of ATG-F on the expression of activated receptor CD56⁺CD314⁺ in CIK cells [($\bar{x} \pm s$)%]

Group	Time(t/d)		
	0	7	14
CD3	13.78±2.57	5.57±1.86	22.30±4.22
TG	13.78±2.57	7.71±1.04	30.44±6.18
F-H	13.78±2.57	20.99±4.20	38.37±6.57 ^{△△}

* $P < 0.05$ vs TG group, ^{△△} $P < 0.01$ vs CD3 group

2.6 高质量浓度 ATG-F 提高 CIK 细胞中抑制受体 CD56⁺CD94⁺、CD56⁺CD158a⁺、CD56⁺CD158b 的表达

流式细胞术检测结果(表 2)显示,第 14 天时 F-H 组 CD56⁺CD94⁺、CD56⁺CD158a⁺、CD56⁺CD158b 细胞比例均明显高于 CD3 组 [CD56⁺CD94⁺: (23.47±3.28)% vs (8.73±4.80)%, $P < 0.01$]、[CD56⁺CD158a⁺: (11.70±0.96)% vs (1.67±0.92)%, $P < 0.01$]、[CD56⁺CD158b: (11.44±1.66)% vs (3.30±2.00)%, $P < 0.01$]。表明高浓度 ATG-F 促进 CIK 细胞中抑制性受体的表达。

表 2 高质量浓度 ATG-F 对 CIK 细胞中抑制性受体表达的影响(%, $\bar{x} \pm s$ n=6)

Tab.2 Effects of high mass concentration of ATG-F on the expression of inhibitory receptors in CIK cells(%, $\bar{x} \pm s$ n=6)

Time (t/d)	CD3			TG			F-H		
	CD56 ⁺ CD94 ⁺	CD56 ⁺ CD158a ⁺	CD56 ⁺ CD158b ⁺	CD56 ⁺ CD94 ⁺	CD56 ⁺ CD158a ⁺	CD56 ⁺ CD158b ⁺	CD56 ⁺ CD94 ⁺	CD56 ⁺ CD158a ⁺	CD56 ⁺ CD158b ⁺
	0	9.97±1.83	4.19±3.06	6.09±0.76	9.97±1.83	4.19±3.06	6.09±0.76	9.97±1.83	4.19±3.06
7	4.76±1.32	1.68±0.92	1.90±0.55	12.56±6.21	4.28±3.16	4.23±2.47	19.76±7.02	11.89±5.29	10.75±3.66
14	8.73±4.80	1.67±0.92	3.30±2.00	10.06±4.08	5.17±1.95	6.28±2.06	23.47±3.28**	11.70±0.96**	11.44±1.66**

** $P < 0.01$ vs CD3 or TG group

2.7 高质量浓度 ATG-F 可提高 CIK 细胞对 K562 细胞杀伤率

流式细胞术检测结果(图 5)显示,CIK 细胞对 K562 靶细胞作用 2 h 后,各组 CIK 细胞对 K562 的杀伤率均随 CIK 细胞比例上升而增加(靶效比主效应 $F = 25.278$, $P < 0.01$; 不同培养组主效应 $F = 104.462$, $P < 0.01$; 不同处理主效应×效靶比主效应 $F = 3.379$, $P < 0.05$),F-H 组在靶效比为 1:5、1:10、1:20 时对 K562 细胞杀伤率分别为(39.37±19.11)%、(60.52±2.05)%、(64.62±4.70)%,F-H 组在靶效比为 1:10 时对 K562 的杀伤率就已经显著高于靶效比为 1:20 的 CD3 组 [(60.52±2.05)% vs (30.02±6.67)%, $P < 0.01$]。

3 讨论

CIK 细胞治疗具有 MHC 非限制性,培养扩增能力强,成本较低的特点,目前仍在我国广泛推广。但

传统 CIK 细胞扩增数量及杀伤能力仍有限,主要用于放、化疗及手术治疗后的维持治疗。自从 SCHMIDT-WOLF 等^[6]发现 CIK 细胞以来,CIK 细胞的培养方式不断发展,人们不断尝试改良 CIK 细胞的培养体系,以期培养出更具杀伤效力及增殖活性的 CIK 细胞。CD3 单抗在 CIK 细胞的培养中发挥重要作用,但 CD3 单抗目前在我国无临床用试剂,通过实验用 CD3 单抗进行 CIK 细胞培养,不能进行临床应用。TG 是用人胸腺细胞免疫兔,抽取其血液,经分离纯化而得到的多克隆免疫球蛋白,其中含有 CD2 及 CD3 抗体成分。使用 TG 代替 CD3 mab 进行杀伤细胞的培养,发现制得的杀伤细胞中 NK 细胞比例及总杀伤活性都较传统的 CIK 细胞提高。ATG-F 是除 TG 外另一种临床常用的多克隆抗 T 细胞球蛋白,用人 Jurkat T 淋巴细胞株免疫兔后制造的。有研究^[7-8]显示, TG 及 ATG-F 两种多克隆免疫球蛋白的抗体成分,发

现TG中含有CD3抗体及CD2抗体,而ATG-F含CD2抗体但几乎不含CD3抗体,两种多克隆免疫球蛋白的抗体成分及效价明显不同。CD2分子表达于所有的外周血T淋巴细胞及80%~90%的NK细胞膜上,是一种与淋巴细胞成熟、发育、分化密切相关的黏附分子,其天然配体CD58广泛分布于纤维母细胞、表皮细胞及淋巴细胞表面,又称为淋巴细胞功能相关抗原3(LFA-3)^[9]。天然情况下CD2-LFA-3系统是淋巴细胞激活的旁路途径,在没有抗原介入的情况下即可非特异的激活淋巴细胞。不过激活CD2的途径较为复杂,需至少两个针对CD2不同表位的单抗配合同时识别CD2中的不同亚基。ROSENTHAL-ALLIERI等^[10]使用3种识别不同CD2表位的CD2单抗在单核细胞依赖的情况下成功扩增淋巴细胞,发现

CD2途径对CD8⁺T淋巴细胞具有更强的扩增作用,而CD4⁺T细胞比例明显降低。CD314的表达与NK-T细胞杀瘤活性正相关为活化性受体^[11-12]。CD94、CD158a、CD158b为抑制性受体,其与NK-T细胞杀瘤活性负相关^[13]。NK细胞中仅有少量表达完整的CD3分子,并不受OKT3克隆来源的CD3单抗的影响,单纯IL-2并不能促进NK细胞大量增殖,NK细胞体外需接受IL-15等细胞因子的刺激才能大量增殖^[14-15]。传统CD3培养体系可以观察到NK细胞由于增殖缓慢,随培养时间延长占CIK细胞比例逐渐降低^[7]。研究^[9]显示,CD2抗体能通过CD2-LFA-3系统激活NK细胞中的CD3 ζ 链促进NK细胞增殖,提示ATG-F及TG培养体系中NK细胞比例增多可能与CD2激活途径有关。

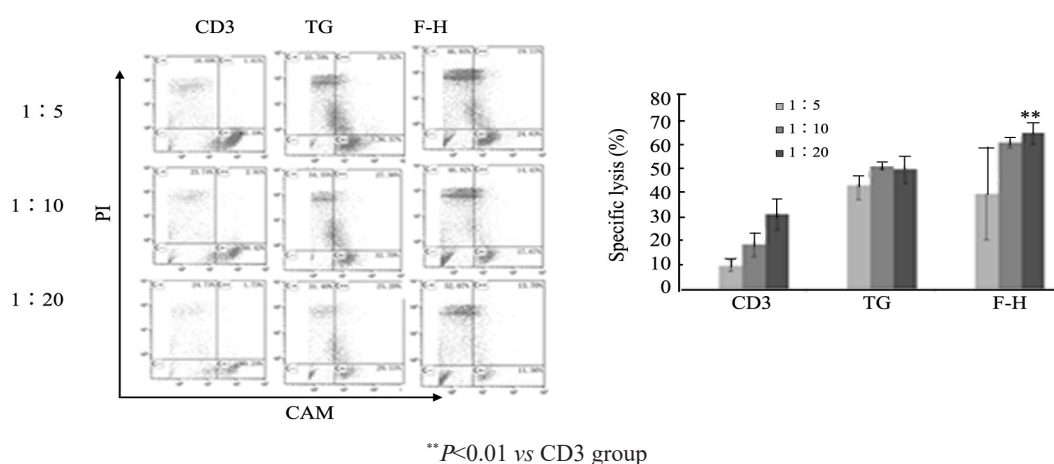


图5 高质量浓度ATG-F对CIK细胞杀伤K562细胞的影响

Fig.5 Effect of high mass concentration of ATG-F on CIK cells killing against K562 cells

本研究首次建立了使用临床药物ATG-F培养CIK细胞的体系,证实了不含CD3抗体成分的ATG-F能刺激PBMC扩增并用以培养杀伤细胞。本研究表明,使用500 ng/ml的ATG-F能够较全面的激活PBMC,与INF- γ 及IL-2协同培养14 d时,虽然CD3⁺CD56⁺的细胞数量与传统CD3培养组无明显差异,但NK细胞得到显著扩增,CD4⁺T淋巴细胞显著降低。进一步研究发现,ATG-F培养体系中CIK细胞较传统CD3体系亦具有更高的活化受体比例,更强的对K562的细胞毒性。除此之外,ATG-F培养体系中杀伤细胞针对K562的细胞毒性也强于TG培养体系。

将本研究结果与POPOW等^[8]和LEITNER等^[9]的研究进行比较,初步推断ATG-F诱导杀伤细胞与传统的CD3单抗诱导CIK细胞的分子机制不同,ATG-F能同时激活T淋巴细胞及NK细胞,在含有INF- γ 的环境中能与IL-2一同促进培养体系中CD3⁺CD56⁺细胞及NK细胞的增殖,NK与CIK细胞都具有肿瘤杀伤活性,故增强了总体杀伤活性。相较于另一种多

克隆抗体TG的培养体系,由于抗体成分差异,ATG-F体系制得的杀伤细胞在细胞组成及杀伤效力方面都有差异,其杀伤效力高于TG培养体系。

本研究首次构建了以临床药物ATG-F为PBMC激活抗体的杀伤细胞培养体系,得到的杀伤细胞中NK细胞数量显著增多,总体抗肿瘤活性显著增强。由于ATG-F为临床批准用药,该技术有明显的临床推广潜力,其临床疗效有待进一步验证。

[参考文献]

[1] WANG Z, LIU Y, LI R, et al. Autologous cytokine-induced killer cell transfusion increases overall survival in advanced pancreatic cancer[J]. J Hematol Oncol, 2016, 9 (1): 6-11. DOI: 10.1186/s13045-016-0237-6.
 [2] CHU H, DU F, JIANG L, et al. The efficacy of CIK-based immunotherapies for advanced solid tumors[J]. Technol Cancer Res Treat, 2017, 16(5): 577-585. DOI: 10.1177/1533034616659163.
 [3] LINN Y C, LAU S K, LIU B, et al. Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell

- subsets against acute myeloid leukaemia target cell[J]. *Immunology*, 2009, 126(3): 423-435. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.02910.x.
- [4] MA L, WANG Y, BO J, et al. Autologous cytokine-induced killer (CIK) cell immunotherapy combined with cyclophosphamide in five patients with POEMS syndrome[J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 184(1): 83-89. DOI: 10.1111/cei.12755.
- [5] LINN Y C, NIAM M, CHU S, et al. The anti-tumour activity of allogeneic cytokine-induced killer cells in patients who relapse after allogeneic transplant for haematological malignancies[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2012, 47(7): 957-966. DOI: 10.1038/bmt.2011.202.
- [6] SCHMIDT-WOLF I G, NEGRIN R S, KIEM H P, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity[J]. *J Exp Med*, 1991, 174(1): 139-149.
- [7] BONANNO G, IUDICONE P, MARIOTTI A, et al. Thymoglobulin, interferon-gamma and interleukin-2 efficiently expand cytokine-induced killer (CIK) cells in clinical-grade cultures[J]. *J Transl Med*, 2010, 8(2): 129-134. DOI: 10.1186/1479-5876-8-129.
- [8] POPOW I, LEITNER J, GRABMEIER-PFISTERSHAMMER K, et al. A comprehensive and quantitative analysis of the major specificities in rabbit antithymocyte globulin preparations[J]. *Am J Transplant*, 2013, 13(12): 3103-3113. DOI: 10.1111/ajt.12514.
- [9] LEITNER J, HERNDLER-BRANDSTETTER D, ZLABINGER G J, et al. CD58/CD2 is the primary costimulatory pathway in human CD28⁺CD8⁺ T cells[J]. *J Immunol*, 2015, 195(2): 477-487. DOI: 10.4049/jimmunol.1401917.
- [10] ROSENTHAL-ALLIERI M A, TICCHIONI M, DECKERT M, et al. Monocyte-independent T cell activation by simultaneous binding of three CD2 monoclonal antibodies (D66⁺T11.1⁺GT2) [J]. *Cell Immunol*, 1995, 163(1): 88-95. DOI: 10.1006/cimm.1995.1102.
- [11] VERNERIS M R, KARIMI M, BAKER J, et al. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8⁺ T cells [J]. *Blood*, 2004, 103(8): 3065-3072. DOI: 10.1182/blood-2003-06-2125.
- [12] CAMPBELL K S, HASEGAWA J. Natural killer cell biology: an update and future directions[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(3): 536-544. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.07.006.
- [13] LINN Y C, HUI K M. Cytokine-induced NK-like T cells: from bench to bedside[J/OL]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 13: 435745[2018-05-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC435745/>. DOI: 10.1155/2010/435745.
- [14] 肖鹏, 冯睿婷, 梅家转, 等. IL-21增强CIK细胞对食管癌EC9706细胞的杀伤作用及其可能的机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(11): 1266-1270. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.11.004.
- [15] BECKER P S, SUCK G, NOWAKOWSKA P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(4): 477-484. DOI: 10.1007/s00262-016-1792-y.

[收稿日期] 2018-06-10

[修回日期] 2018-08-27

[本文编辑] 王映红