

• 实验研究 •

参芪扶正注射液对脐血 CIK 细胞
体外增殖及杀瘤活性的影响颜维仁* 余 琴 刘立华 王 维 杨隆奎 冯 莉
管 波 冉建英 涂芳芳 郭绪平 喻甫国

重庆市万州区中医院, 重庆市万州区王牌路 1268 号, 404000)

基金项目: 重庆市万州区科委指导性计划课题(20084029)

* 通讯作者: yanweiren@cscq.org.cn, 13364079186

[摘要] 目的 观察参芪扶正注射液对脐血细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK 细胞)体外增殖及杀瘤活性的影响。方法 用脐血单个核细胞, 诱导分化 CIK 细胞, 分为 4 组。细胞因子组加入 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素 1 α (IL-1 α)、白细胞介素 2 (IL-2)、CD3 单抗细胞因子; 参芪扶正注射液组: 加入参芪扶正注射液; 细胞因子+参芪扶正注射液组: 加入参芪扶正注射液、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-2、CD3 单抗细胞因子; 对照组只加培养液。培养 12 天后 CIK 细胞达到增殖高峰期, 用流式细胞仪检测细胞表型和增殖能力, MTT 法检测 CIK 细胞对 K562 细胞的杀伤作用, ELISA 法检测 CIK 细胞分泌的细胞因子 IL-2、IFN- γ 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平。结果 对脐血 CIK 细胞体外增殖的影响, 在培养 12 天时, 参芪扶正注射液组与细胞因子组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 细胞因子+参芪扶正注射液组与细胞因子组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$); CIK 细胞对 K562 细胞的杀伤作用, 各实验组与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$), 参芪扶正注射液组 CIK 细胞在 12、16 天时分泌 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 因子水平优于对照组 ($P<0.01$)。结论 参芪扶正注射液对脐血 CIK 细胞既有显著的增殖和杀瘤作用, 又可促进脐血 CIK 细胞分泌 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 。

[关键词] 参芪扶正注射液; 脐血; CIK 细胞; 增殖; 杀瘤活性

Effect of Shenqi Fuzheng Injection on Proliferation and Cytotoxicity of CIK Cells Originated from Umbilical Cord Blood

YAN Weiren, YU Qin, LIU Lihua, WANG Wei, YANG Longkui, FENG Li, GUAN Bo, RAN Jianying, TU Fangfang, GUO Xuping, YU Fuguo

(TCM Hospital of Wanzhou District, Chongqing 404000)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of Shenqi Fuzheng Injection (Ginseng and Astragalus Right-Supporting Injection) on proliferation and cytotoxicity of cytokine-induced killer (CIK) cells originated from umbilical cord blood. **Methods** CIK cells were induced and differentiated from the cord blood mononuclear cells and then were divided into Cytokine group, Shenqi Fuzheng Injection group, Cytokine plus Shenqi Fuzheng Injection group and the control group. Cytokine group was added γ -interferon (IFN- γ), interleukin (IL)-1 α , IL-2 and CD3. Shenqi Fuzheng Injection group was added Shenqi Fuzheng Injection. Cytokine plus Shenqi Fuzheng Injection group was added Shenqi Fuzheng Injection and IFN- γ , IL-1 α , IL-2 and CD3. The control group was added only culture solution. After 12 days of cultivation, the proliferation of CIK cells reached the peak. The phenotype and proliferative capacity of CIK cells was detected with flow cytometry, the cytotoxicity was detected by MTT assay, and the level of IL-2, IFN- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α was detected by ELISA assay. **Results** On the 12th day of cultivation, there was no significant difference in the proliferation of CIK cells between Cytokine group and Shenqi Fuzheng Injection group ($P>0.05$), but with significant difference between Cytokine group and Cytokine plus Shenqi Fuzheng Injection group ($P<0.01$). The killing effect of CIK cells against K562 cells in Cytokine group, Shenqi Fuzheng Injection group and Cytokine plus Shenqi Fuzheng Injection group was better than that of the control group ($P<0.01$). CIK cells in Shenqi Fuzheng Injection group could secrete IL-2, IFN- γ and TNF- α . **Conclusion** Shenqi Fuzheng Injection could improve the proliferation and cytotoxicity of CIK cells and promote the secretion of IFN- γ , IL-2 and TNF- α as well.

Keywords Shenqi Fuzheng Injection; umbilical cord blood; cytokine-induced killer cell; proliferation; cytotoxicity

细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK 细胞)是利用外周血单个核细胞(PBMC)在体外经多种细胞因子共同刺激诱导产生的一种细胞表面标志为 CD3⁺CD56⁺,

具有免疫活性的效应细胞。1991 年 Schmidt-Wolf 首先报道 CIK 细胞^[1]。此后, 国内外学者多采用 PBMC 在体外经多种细胞因子诱导 CIK 细胞, 但很少利用中

药诱导。因此,本研究探讨参芪扶正注射液对脐血 CIK 细胞的体外增殖及杀瘤活性的影响,旨在为 CIK 细胞培养寻找新的路径和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

在无菌条件下,收集健康产妇足月顺产健康胎儿脐带血(肝素抗凝)50ml。RPMI-1640 培养基:日本日水制药株式会社,批号 K39702045。淋巴细胞分离液:上海试剂二厂,批号 D4271。细胞因子:上海吉泰生物科技有限公司,批号 S10980006。CD8⁺-FITC/CD28-PE、CD3⁺-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP、CD4⁺-APC、CD3⁺-FITC/CD16⁺+CD56-PE:美国 BD 公司,批号 340503。胎牛血清:美国 Sigma 公司,批号 C2027050。K562 细胞株:上海瑞齐生物科技有限公司,批号 RS20418。参芪扶正注射液:广东珠海医药集团,国药准字 Z19990665。

1.2 方法

1.2.1 诱导培养 CIK 细胞 取肝素抗凝的脐带血 50ml,加入淋巴细胞分离液 15ml,2000r/min 离心 30min,分离单个核细胞。用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 1×10^6 /ml,接种于 24 孔板,每孔 930 μ l。然后按下述进行实验分组:细胞因子组: γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素 1 α (IL-1 α)、白细胞介素 2 (IL-2)、CD3⁺ 单抗;参芪扶正注射液组:用参芪扶正注射液;细胞因子+参芪扶正注射液组:用参芪扶正注射液、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-2、CD3 单抗;对照组:只用培养液;实验组与对照组均设 4 个复孔。按分组情况,第 1 天,细胞因子组、细胞因子+参芪扶正注射液组加入 IFN- γ 1000U/ml,参芪扶正注射液组、细胞因子+参芪扶正注射液组加入参芪扶正注射液 50 μ l/ml;培养 24h 后,细胞因子组、细胞因子+参芪扶正注射液组加入 IL-1 α 100U/ml、IL-2 300U/ml、CD3 单抗 50ng/ml,参芪扶正注射液组、细胞因子+参芪扶正注射液组加入参芪扶正注射液 50 μ l/ml,继续培养;第 4 天更换培养基,调整细胞浓度为 1×10^6 /ml,细胞因子组、细胞因子+参芪扶正注射液组补加 IL-2 300U/ml、CD3 单抗 50ng/ml,参芪扶正注射液组、细胞因子+参芪扶正注射液组补加参芪扶正注射液 50 μ l/ml;第 8 天,细胞因子组、细胞因子+参芪扶正注射液组补加 IL-2 300U/ml、CD3 单抗 50ng/ml,参芪扶正注射液组、细胞因子+参芪扶正注射液组补加参芪扶正注射液 50 μ l/ml。

1.2.2 细胞表型分析及细胞增殖测定 各组于培养第 0、4、8、12 天,用台盼蓝拒染法计数细胞,用流式细胞仪检测 CIK 细胞的比例及细胞表型,并计数 CIK 细胞总数,每组每次各查 4 个复孔,计算平均值。

1.2.3 CIK 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 、肿瘤坏死因子 (TNF- α) 水平测定 于培养的第 0、4、8、12、16、20 天,取参芪扶正注射液组 CIK 细胞,充分洗涤,调整细胞浓度为 2×10^6 /ml,培养 24h 后,收集上清,用 ELISA 法测定细胞培养上清中 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 含量,设 4 个平行孔。

1.2.4 细胞毒测定 用 MTT 显色法测定 CIK 细胞杀瘤活性,各组以培养 12 天的 CIK 细胞为效应细胞,以对数生长期 K562 细胞为靶细胞,效靶比为 20:1。杀瘤活性(%)=(1-效靶细胞组 OD 值-单独效应细胞组 OD 值)/单独靶细胞组 OD 值 $\times$ 100%

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析软件处理,计量变量值用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间及配对比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.0182$ 。

2 结果

2.1 CIK 细胞体外增殖及细胞表型分析

参芪扶正注射液组在培养第 4 天开始增殖,从细胞表型观察,有 CD3⁺、CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 细胞;培养 12 天后细胞扩增加速,培养 12~14 天细胞增殖达到高峰,随后细胞增殖减少。各实验组 CD3⁺CD56⁺ 细胞增殖幅度最大,细胞因子组由 0.20% 升到 30.42%,增长 152 倍;参芪扶正注射液组由 0.20% 升到 31.81%,增长 159 倍;细胞因子+参芪扶正注射液组由 0.20% 升到 34.26%,增长 171 倍。提示参芪扶正注射液初期对脐血 CIK 细胞有扩增作用,并维持一定的扩增水平。参芪扶正注射液组与细胞因子组、细胞因子+参芪扶正注射液组与参芪扶正注射液组比较差异均无统计学意义($P>0.05$);细胞因子+参芪扶正注射液组与细胞因子组比较差异有统计学意义($P<0.05$),细胞因子+参芪扶正注射液组优于细胞因子组。见表 1。

2.2 CIK 细胞对 K562 细胞杀瘤活性的影响

对照组 CIK 细胞对 K562 细胞杀伤活性为 (38.42 $\pm$ 5.28)%,细胞因子组为 (69.64 $\pm$ 7.26)%,参芪扶正注射液组为 (78.00 $\pm$ 5.32)%,细胞因子+参芪扶正注射液组为 (92.86 $\pm$ 5.62)%。细胞因子组、参芪扶正注射液组、细胞因子+参芪扶正注射液

表 1 培养 0、12 天时各组脐血 CIK 细胞表型比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	时间(d)	孔数	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺
对照组	0	4	63.06±2.80	40.92±2.10	23.06±3.84	0.20±0.04
	12	4	15.98±0.70	10.74±0.98	6.52±0.48	2.48±0.21
细胞因子组	0	4	63.06±2.08	40.92±2.10	23.06±3.84	0.20±0.04
	12	4	95.46±0.87*△	16.06±3.73	78.20±0.34*△	30.42±0.78*△
参芪扶正注射液组	0	4	63.06±2.08	40.92±2.10	23.06±3.84	0.20±0.04
	12	4	97.42±0.78*△	16.76±3.74	80.43±3.21*△	31.81±1.87*△
细胞因子+参芪扶正注射液组	0	4	63.06±2.08	40.92±2.10	23.06±3.84	0.20±0.04
	12	4	98.56±0.84*△	16.86±2.76	89.16±3.87*△	34.26±1.24*△

注:与本组 0 天时比较,* $P<0.01$;与对照组同时时间点比较,△ $P<0.01$

表 2 参芪扶正注射液组 CIK 细胞不同时间分泌细胞因子水平比较(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	时间(d)	孔数	IL-2	IFN- γ	TNF- α
对照组	0	4	0	0	0
	4	4	12.348±1.176	11.542±0.624	12.128±0.480
	12	4	0	0	0
	16	4	0	0	0
	20	4	0	0	0
	24	4	0	0	0
参芪扶正组	0	4	0	0	0
	4	4	34.254±1.386	26.087±0.758	23.762±0.968
	12	4	190.136±4.336*	104.276±6.584*	76.842±3.648*
	16	4	146.028±4.672*	248.472±5.402*	247.628±4.678*
	20	4	39.437±2.346	97.623±3.028	184.364±5.357
	24	4			

注:与对照组同时时间点比较,* $P<0.01$

组各组分别与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。参芪扶正注射液组与细胞因子组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。细胞因子+参芪扶正注射液组优于细胞因子组,差异有统计学意义($P<0.01$),说明参芪扶正注射液与 IFN- γ 、IL-1 α 、IL-2、CD3 单抗合用诱导的 CIK 细胞对 K562 细胞杀瘤活性更强。

2.3 参芪扶正注射液组 CIK 细胞不同时间分泌细胞因子水平比较

本研究中细胞因子组、细胞因子+参芪扶正注射液组实验中加了细胞因子 IL-2、IFN- γ ,参芪扶正注射液组未加细胞因子,故只测定参芪扶正注射液组 CIK 细胞分泌细胞因子的水平。表 2 示,参芪扶正注射液组 CIK 细胞在 12、16 天时分泌 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 因子水平优于对照组($P<0.01$)。

3 讨论

CIK 细胞是一种独具生物学特性的异质细胞群,在体外细胞增殖速度快,杀瘤活性高,具有 T 淋巴细胞强大的抗肿瘤活性,杀瘤谱广,具有 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤、对多重耐药肿瘤细胞敏感、对正常骨髓造血前体细胞毒性小、能抵抗肿瘤细胞引发的效应细胞 Fas-FasL 的凋亡等优点。参芪

扶正注射液是党参、黄芪的萃取物,主要成分为皂苷、多糖等。现代研究表明,活性多糖可以诱导免疫细胞产生多种细胞因子,提高机体免疫力,改善机体抗病能力等^[3]。本研究结果表明,对脐血 CIK 细胞体外增殖与杀瘤活性的影响,参芪扶正注射液组与细胞因子组比较差异无统计学意义($P>0.05$),而细胞因子组、参芪扶正注射液组、细胞因子+参芪扶正注射液组各组分别与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),细胞因子+参芪扶正注射液组优于细胞因子组($P<0.01$)。表明参芪扶正注射液与 IFN- γ 、IL-1 α 、IL-2、CD3 单抗在体外诱导的脐血 CIK 细胞具有更为显著的增殖和杀瘤作用。CIK 细胞能分泌多种细胞因子,Gritzapis 等研究发现,CIK 细胞分泌的多种细胞因子能进一步提高免疫效应细胞的细胞毒作用^[4];Lopez 等发现,CD56⁺ 细胞高表达 IFN- γ 和 TNF- α ^[5];Laderach 等也检测到 CIK 细胞能表达 IL-2、IFN- γ 及 TNF^[6];蒋永新等实验表明,脐血 CIK 细胞在体外诱导培养过程中,能分泌 IL-2、IFN- γ 、TNF- α ^[7]。本研究发现,参芪扶正注射液在体外既能促进脐血 CIK 细胞的增殖及杀瘤活性,又能促进脐血 CIK 细胞分泌 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 因子,通过细胞间信号转导通路作

用,这些细胞因子又促进 CIK 细胞增殖、分化并分泌细胞因子,CIK 细胞分泌细胞因子是以旁分泌或自分泌形式作用于附近细胞或细胞因子作用于细胞本身,这是参芪扶正注射液对脐血 CIK 细胞体外增殖及杀瘤的机理。这种分泌作用从第 4 天开始,但要到 12~14 天才达到高峰,提示在临床应用时,回输时间最好在 12 天以后进行。

Schmidt-Wolf 采用细胞因子诱导杀伤细胞操作复杂、试剂昂贵。本研究中参芪扶正注射液组只用一种参芪扶正注射液与 Schmidt-Wolf 诱导 CIK 细胞的细胞因子组进行对照研究,结果差异无统计学意义($P>0.05$),说明参芪扶正注射液在诱导 CIK 细胞方面具有与细胞因子相同的作用,且实验操作简单、价格低廉。本研究为脐血 CIK 细胞免疫治疗提供了依据,为 CIK 细胞的体外培养提供了新的路径和方法,同时为中药参芪扶正注射液的扶正作用提供了理论根据。本研究未与外周血作对照研究,需进一步探讨。

参考文献

- [1] Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cyto-

kine-induced killer cells with potent antitumor cell activity[J]. J Exp Med, 1991,174(1):139-149.

- [2] 郝希山. 生物治疗 肿瘤治疗的新希望[J]. 中国医药生物技术, 2008,3(6):401-403.
- [3] 陆益, 陆益线. 参芪扶正注射液的药理作用和临床应用[J]. 时珍国医国药, 2006,17(10):2083-2085.
- [4] Gritzapis AD, Dimitroulopoulos D, Paraskevas E, et al. Large-scale expansion of CD3⁺CD56⁺ lymphocytes capable of lysing autologous tumor cells with cytokine-rich supernatants [J]. Cancer Immunol Immunother, 2002, 51(8): 440-448.
- [5] Lopez RD, Waller EK, Lu PH, et al. CD58/LFA-3 and IL-12 provided by activated monocytes are critical in the in vitro expansion of CD56⁺ T cells[J]. Cancer Immunol Immunother, 2001, 49(12):629-640.
- [6] Laderach D, Movassagh M, Johnson A, et al. 4-1BB co-stimulation enhances human CD8⁺ T cell priming by augmenting the proliferation and survival of effector CD8⁺ T cells[J]. Int Immunol, 2002, 14(10):1155-1167.
- [7] 蒋永新, 王熙才, 金从国, 等. 体外 CK 细胞分泌细胞因子水平动态观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2006, 11(11): 806-809.

(收稿日期:2011-10-31;修回日期:2012-03-24)

[编辑:王利芬]

(上接第 1225 页)

来自原肠内胚层,舌前 2/3 的部分和胃上皮的病变有密切的关系^[8]。由上可知,舌与脾胃密切相关,若脾胃有病,多能体现于舌上,可见舌诊在慢性胃炎诊疗中是十分重要的。

本研究结果显示,各组之间存在的差异蛋白峰能在一定程度上反映各组之间的区别,能从舌苔蛋白质组学的角度反映慢性胃炎与正常对照组之间的差别,可见慢性胃炎不同类型舌苔之间存在不同的生物学特点,这可能是胃的病变以及机体病理状态下人体整体机能改变在舌苔上的反映,说明 SELDI-TOF-MS 技术对慢性胃炎不同类型舌苔蛋白的研究具有一定的特异性。PCA 图分析发现,腻苔组与非腻苔组、白腻苔组与黄腻苔组之间存在部分重叠。ROC 曲线分析发现,腻苔组与非腻苔组、白腻苔组与黄腻苔组之间的差异度一般,可能由于慢性胃炎患者病情复杂,两组间的舌苔蛋白组成有部分相同,需进一步研究。这些差异蛋白峰的具体功能有待进一步确定。

这些差异蛋白峰的发现,为慢性胃炎的临床诊断与辨证治疗提供了一定的实验依据,具有较好的临床意义,也为中医舌诊的客观化发展提供了研究思

路。另外,SELDI-TOF-MS 技术的灵敏度较高,可以在疾病发生的极早期就检测到某些蛋白质的变化。

参考文献

- [1] 李萍,刘卫红,张蕾,等. 657 例慢性浅表性胃炎患者经舌象分析仪观察的舌象分布规律探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007,13(2):132-135.
- [2] 王毅. 慢性胃炎与舌象关系的探讨——附:2103 例临床资料分析[J]. 成都中医学院学报, 1989,12(4):22-24.
- [3] 庞宁海, 马文香. 226 例慢性胃十二指肠病及舌象与胃镜象观察[J]. 中医杂志, 1985,26(12):53-55.
- [4] 王忆勤, 郎庆波, 李果刚, 等. 慢性胃炎中医湿证证候诊断标准研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005,25(11):975-979.
- [5] 王文静, 陆晔, 张云英, 等. 蛋白质组学及其在公共卫生学领域中的应用[J]. 环境与职业医学, 2003,20(5):374-376.
- [6] 徐蓉娟. 内科学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003: 175-179.
- [7] 王忆勤, 李福凤, 李琴韵, 等. 慢性胃炎湿证患者舌苔液、胃液高效毛细管电泳图谱分析[J]. 上海中医药大学学报, 2004,18(4):41-43.
- [8] 戴豪良. 舌诊研究与临床应用[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006:187.

(收稿日期:2011-10-31;修回日期:2012-01-18)

[编辑:王利芬]