

## 中药多糖与过继免疫联合治疗卵巢癌

许云霞<sup>1\*</sup>, 刘晓健<sup>1</sup>, 屈飞<sup>2</sup>

(1. 江苏大学附属人民医院妇产科, 江苏 镇江 212002;

2. 江西中医学院药学院药理学教研室, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**观察比较中药多糖干预后的多种细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)细胞在不同条件下特异性杀伤卵巢癌 SKOV3 细胞的效果,探讨中药与过继免疫联合治疗卵巢癌的可行性。**方法:**实验分 4 组,CIK 组、PBOC-CIK 组、SKOV3Ag-PBDC-CIK 组及 SKOV3Ag-ADC-CIK 组。联合猪苓多糖( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、茯苓多糖( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、黄芪多糖( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )及多种细胞因子对卵巢癌患者外周血 CIK 细胞进行体外诱导和扩增,以卵巢癌细胞株 SKOV3 冻融抗原致敏外周血与腹水来源的 DC 细胞,比较单纯 CIK、未经抗原负载的外周血树突状细胞(DC)活化的 CIK、经抗原负载的外周血 DC 活化的 CIK、经抗原负载的腹水 DC 活化的 CIK 对 SKOV3 细胞的杀伤作用,并动态观察 CIK 细胞的增殖情况。**结果:**①CIK 与 DC 共培养可显著增加 CIK 增殖倍数( $P < 0.01$ );②中药多糖干预后 CIK 对 SKOV3 卵巢癌细胞株有明显杀伤作用,且杀伤率随效靶比增加而提高,细胞杀伤率分别为( $9.12 \pm 0.21$ )%、( $10.15 \pm 0.27$ )%、( $11.20 \pm 0.34$ )%和( $12.73 \pm 0.43$ )% ( $P < 0.05$ );③SKOV3 冻融抗原负载的外周血 DC 可显著增加 CIK 特异性杀伤卵巢癌 SKOV3 细胞的能力,杀伤率显著高于未负载抗原外周血 DC 活化的 CIK 细胞和单纯 CIK 细胞( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );④腹水来源 DC 负载抗原后所活化的 CIK 细胞对 SKOV3 细胞杀伤率,与负载抗原的外周血来源 DC 活化的 CIK 无明显差异。**结论:**经 SKOV3 肿瘤细胞冻融抗原冲击致敏的 DC,可促进中药多糖干预后 CIK 细胞扩增,增强 CIK 细胞对 SKOV3 卵巢癌细胞的杀伤作用,且卵巢癌腹水可作为过继免疫治疗中效应细胞的一个重要来源。

**[关键词]** 卵巢肿瘤; CIK 细胞; 树突细胞; 中药多糖; 细胞毒性

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0231-04

## Effects of Chinese Medicine Polysaccharides Combined with Adoptive Immunotherapy on Ovarian Cancer

XU Yun-xia<sup>1\*</sup>, LIU Xiao-jian<sup>1</sup>, QU Fei<sup>2</sup>

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, People Hospital Affiliated

to Jiangsu University, Zhenjiang 212002, China;

2. Department of Pharmacology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the killer activity of cytokine-induced killer (CIK) cells treated with Chinese medicine polysaccharides against the ovarian cancer cell line SKOV3 under different conditions, and explore the possibility of adoptive immunotherapy combined with Chinese medicine in the treatment of ovarian cancer. **Method:** The experiment were divided into four groups, such as CIK group, PBDC-CIK group, SKOV3Ag-PBDC-CIKgroup and SKOV3Ag-ADC-CIKgroup. CIK cells derived from the peripheral blood (PB) were induced by cytokine and grifola polysaccharide ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), pachyman ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and astragalan ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). while dendritic cells (DC) derived from PB and ascites by SKOV3 tumor cell lysate. The cytotoxic activities of CIK group, PBDC-CIK group, SKOV3Ag-PBDC-CIK group and SKOV3 Ag-ADC-CIK group against SKOV3 were analyzed, as well as the proliferation of CIK cells between groups. **Result:** ①The proliferation rate of CIK cells co-cultured with DC significantly increased. ( $P < 0.01$ ) ②CIK cells induced by Chinese medicine polysaccharides

**[收稿日期]** 20110621(016)

**[通讯作者]** \*许云霞, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤, Tel: 13679022633, E-mail: jingxiaojingx@163.com

were cytotoxic to SKOV3 cells, which increased with effector: target (E:T) ratios, which were  $(9.12 \pm 0.21)\%$ 、 $(10.15 \pm 0.27)\%$ 、 $(11.20 \pm 0.34)\%$  and  $(12.73 \pm 0.43)\%$  ( $P < 0.05$ ), ③ The cytotoxic activities of SKOV3Ag-PBDC-CIK group against SKOV3 cells were significantly higher than that of both DC-CIK group and CIK groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). ④ There was no significant difference in killing activity between SKOV3Ag-PBDC-CIK group and SKOV3Ag-ADC-CIK group. **Conclusion:** DC pulsed with tumor lysate antigens of SKOV3 could enhance the proliferation and cytotoxicity of CIK cells induced by Chinese medicine polysaccharides. And DC derived from ascites could serve as an important source in adoptive immunotherapy.

[**Key words**] ovarian neoplasms; CIK cell; dendritic cells; Chinese medicine polysaccharides; cytotoxicity

过继免疫疗法通过向肿瘤患者体内输入免疫效应细胞,激发和增强患者机体的抗肿瘤免疫功能,达到治疗和预防癌症复发的目的<sup>[1]</sup>。研究表明,中药多糖及多种细胞因子的共同作用,可诱导具有 T 淋巴细胞抗瘤活性和 NK 细胞非 MHC 限制性杀瘤特点的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)大量扩增;树突状细胞(dendritic cell, DC),作为抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC),可有效激发 T 细胞应答,增强 CIK 的细胞毒作用<sup>[2]</sup>。本实验的目的是观察中药多糖干预后的 CIK 细胞在不同条件下特异性杀伤卵巢癌细胞的效果,为临床开展中药联合过继免疫治疗卵巢癌提供理论依据及实验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 卵巢癌 SKOV3 细胞的培养及冻融抗原的制备

以含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养基培养 SKOV3 卵巢癌细胞,每 2 天换液 1 次,待细胞长至 75% 时按 1:3 进行传代;取处于对数生长期的 SKOV3 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后, D-Hanks 洗 2 次,用完全培养基调整肿瘤细胞密度至  $1 \times 10^6/\text{mL}$ ,液氮  $37^\circ\text{C}$  水浴反复冻融 5 次,  $1 \text{ 万 r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 min,取上清,获得肿瘤可溶性抗原。

### 1.2 自体外周血 CIK 细胞的体外诱导和扩增

以血细胞分离机采集本医院妇科卵巢癌患者外周血单个核细胞,  $15 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  肝素生理盐水洗涤,  $2 \text{ 500 r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,去上清,细胞沉淀以 1% 人血白蛋白生理盐水稀释,过滤,取单核细胞层,洗涤后计数总细胞数,进行细胞活力计算;用 RPMI 1640 培养基混悬细胞,调整细胞密度为  $5 \times 10^6/\text{mL}$ ,置  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  培养箱贴壁 1~2 h;收集非贴壁细胞,加入含 10% 人 AB 血清的 RPMI 1640 培养基,调整细胞密度为  $1 \times 10^6/\text{mL}$  加入  $\text{IFN-}\gamma$  ( $1 \text{ 000 U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  培养 24 h 后,加入白细胞介素(IL)-2 ( $1 \text{ 000 U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、鼠抗人 CD3 单克隆抗体 ( $100 \text{ g} \cdot$

$\text{L}^{-1}$ ) 及 IL-1 ( $500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),作为 CIK 细胞的培养体系;培养至第 4 天 2/3 换液,同时向 CIK 培养体系中加入猪苓多糖( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、茯苓多糖( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、黄芪多糖( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),以增强 CIK 细胞毒性,每隔 3 d 换液 1 次。

**1.3 外周血及腹水中 DC 细胞的制备** 无菌条件下,收集本院妇科卵巢癌患者腹水各约 200 mL,肝素抗凝( $200 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $2 \text{ 500 r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,去上清, D-Hanks 液洗涤 2 次,获得腹水单个核细胞;同时以血细胞分离机分离卵巢癌患者外周血单个核细胞,计数腹水及外周血单个核细胞数,计算细胞活力;分离的腹水及外周血单核细胞中均加入含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640,调整细胞密度为  $5 \times 10^6/\text{mL}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  培养箱中培养 2 h,弃去悬浮细胞,收集贴壁细胞。移入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,同时加入 GM-CSF ( $1 \text{ 000 U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 及 IL-4 ( $500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  培养箱中培养,每 3 天半定量换液;分别于培养第 3,7 天对体外共培养部分所需的部分 DC 细胞培养体系中按细胞比例为 5:1 加入含有卵巢癌冻融抗原的培养基,进行肿瘤细胞冻融抗原刺激。

**1.4 CIK 细胞和 DC 细胞共培养** 分别收集 CIK 与 DC 细胞,按 10:1 比例进行共培养,培养体系为含有 10% 胎牛血清及 IL-2 ( $500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 RPMI 1640,每 3 d 半定量换液并补充 IL-2。实验共分 4 组,单纯 CIK 组(CIK),未经 SKOV3 抗原负载的外周血 DC-CIK 组(PBDC-CIK),经 SKOV3 抗原负载的外周血 DC-CIK 组(SKOV3Ag-PBDC-CIK)和经 SKOV3 抗原负载的腹水 DC-CIK 组(SKOV3Ag-ADC-CIK)。分别于共培养后第 3,6,9,12,15,18,21 d 计数 CIK 细胞,观察细胞扩增情况。

**1.5 CIK 细胞杀瘤活性检测** 取对数生长的 SKOV3 细胞消化、计数,以  $2.5 \times 10^5$  个/孔细胞密度

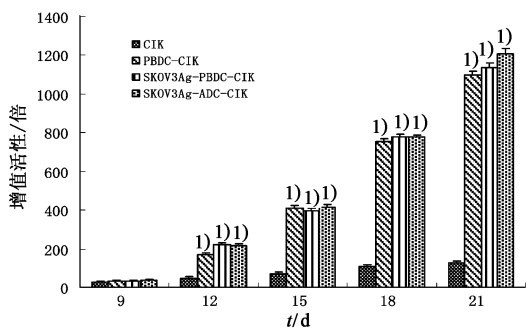
接种于 96 孔板,培养过夜。分别按 5:1,10:1,20:1,40:1 的效靶比向每孔中加入培养的上述各组效应细胞,并设单独靶细胞孔和单独效应细胞孔作为对照,调整每孔培养基终体积为 100  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 培养过夜,采用 MTT 法,以酶标仪测定 A<sub>450</sub>,参考波长 600 nm。

$$\text{杀伤率} = \{1 - (A_{\text{实验孔}} - A_{\text{效应细胞孔}}) / A_{\text{靶细胞孔}}\} \times 100\%$$

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件包进行相关分析,数据资料率的比较用 *t* 检验和方差分析,*P* < 0.05 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CIK 细胞增殖倍数** 培养第 3 天,组间 CIK 细胞增殖倍数无明显差异,至培养第 6,9 天,DC 与 CIK 共培养组中细胞增殖倍数开始显著增加,与单纯 CIK 组间差异逐渐明显 (*P* < 0.01),但 PBDC-CIK,SKOV3Ag-PBDC-CIK 和 SKOV3Ag-ADC-CIK 3 组间 CIK 细胞增殖倍数无明显差异,见图 1。



与单纯 CIK 组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.01

图 1 不同组间 CIK 细胞增殖倍数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**2.2 中药多糖干预后单纯 CIK 细胞对 SKOV3 卵巢癌细胞株的杀伤作用** 中药多糖预处理的 CIK 细胞

对 SKOV3 卵巢癌细胞株有明显的杀伤作用,在 5:1 ~ 40:1 效靶比范围,细胞杀伤率分别为 (9.12  $\pm$  0.21)%, (10.15  $\pm$  0.27)%, (11.20  $\pm$  0.34)%, (12.73  $\pm$  0.43)%,随着效靶比增加,CIK 细胞对 SKOV3 细胞的杀伤率提高,各组间差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

**2.3 负载卵巢癌系 SKOV3 抗原的 DC 诱导的 CIK 对 SKOV3 细胞的杀伤活性** 单纯 CIK 细胞、未负载 SKOV3 冻融抗原的外周血 DC 诱导的 CIK 细胞、抗原负载的外周血 DC 诱导的 CIK 细胞对于卵巢癌 SKOV3 细胞均有明显的杀伤作用,且随着效靶比增加,该作用逐渐增强,其中在相同效靶比条件下,杀伤活性大小依次为 SKOV3Ag-PBDC-CIK 组 > PBDC-CIK 组 > CIK 组,各组间差异有统计学意义 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),见表 1。

**2.4 不同来源 DC 负载 SKOV3 抗原诱导的 CIK 对 SKOV3 细胞的杀伤活性** 腹水及外周血来源 DC 负载 SKOV3 冻融抗原后,与 CIK 细胞共培养,均可增强 CIK 对 SKOV3 细胞的杀伤活性,且随着效靶比增加而提高,但 SKOV3Ag-PBDC-CIK 和 SKOV3Ag-ADC-CIK 两组间 SKOV3 细胞杀伤率无明显差异,见表 2。

## 3 讨论

大量研究表明,手术、放化疗后残存的少量肿瘤细胞是引发肿瘤复发转移,导致患者死亡的重要原因,因此寻找一种可有效清除残存微量肿瘤细胞的治疗方法,对预防肿瘤复发和转移,改善患者晚期生存质量具有重要意义,是当前卵巢癌治疗的迫切需要<sup>[3]</sup>。

近年来,体内回输免疫活性细胞的过继免疫疗法取得了很大突破,逐渐发展成为继手术、放化疗之

表 1 CIK 细胞与 DC 联合对 SKOV3 细胞株的杀伤作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	5:1	10:1	20:1	40:1
CIK	9.26 $\pm$ 0.25	10.37 $\pm$ 0.31	11.82 $\pm$ 0.49	13.28 $\pm$ 0.78
PBDC-CIK	16.47 $\pm$ 0.85 <sup>1)</sup>	19.18 $\pm$ 0.92 <sup>1)</sup>	24.10 $\pm$ 1.17 <sup>1)</sup>	29.76 $\pm$ 1.41 <sup>1)</sup>
SKOV3Ag-PBDC-CIK	18.93 $\pm$ 0.88 <sup>1,2)</sup>	29.65 $\pm$ 1.27 <sup>1,3)</sup>	38.01 $\pm$ 2.64 <sup>1,3)</sup>	44.25 $\pm$ 3.58 <sup>1,3)</sup>

注:与 CIK 组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.01;与 PBDC-CIK 组比较<sup>2)</sup> *P* < 0.05,<sup>3)</sup> *P* < 0.01。

表 2 不同来源的 DC 与 CIK 联合对 SKOV3 卵巢癌细胞株的杀伤作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	5:1	10:1	20:1	40:1
SKOV3Ag-PBDC-CIK	21.54 $\pm$ 1.22	33.76 $\pm$ 2.43	41.37 $\pm$ 3.52	51.24 $\pm$ 4.45
SKOV3Ag-ADC-CIK	23.47 $\pm$ 1.38 <sup>1)</sup>	31.81 $\pm$ 2.39 <sup>1)</sup>	42.61 $\pm$ 3.74	53.32 $\pm$ 5.12

后的第 4 种治疗模式。过继免疫治疗在体外进行免疫细胞的纯化、诱导、扩增,可绕过体内的种种免疫障碍,增强肿瘤对机体免疫效应的敏感性,又能避免体内大量应用免疫制剂所带来的严重毒副反应<sup>[4]</sup>。朱建平<sup>等</sup>研究发现,体外培养的 CIK 细胞回输入化疗后卵巢癌患者体内,约 84.4% 患者血清 CA-125 水平下降,63.2% 患者生命质量得以提高,且不良反应少,表明以 CIK 细胞为效应细胞的过继免疫疗法治疗卵巢癌安全、有效<sup>[5]</sup>。CIK 细胞是单个核细胞在体外通过 IFN- $\gamma$ , CD<sub>3</sub> 单克隆抗体及 IL-2 等多种细胞因子共同作用,诱导和大量扩增的一组具有非特异性细胞毒作用的异质细胞群<sup>[6]</sup>。已知黄芪多糖、茯苓多糖等植物多糖能通过诱导 NK 细胞、LAK 细胞等免疫活性细胞的增殖、分化和成熟,介导细胞免疫,抑制肿瘤生长<sup>[7]</sup>。因此,本研究以猪苓多糖、茯苓多糖、黄芪多糖联合多种细胞因子,共同诱导、激活和扩增 CIK 细胞,所获得的 CIK 细胞对 SKOV3 卵巢癌细胞株杀伤作用明显,且随着效靶比的升高,其杀伤效率逐渐提高。

DC 是目前发现的功能最强的 APC,可通过加工和处理肿瘤抗原,有效激发机体抗肿瘤免疫反应,增强 CIK 的细胞毒作用,弥补 DC 的 MHC 限制性的不足。研究发现,负载人卵巢癌 SKOV3 冻融抗原的 DC 与 CIK 细胞共培养,可促进 DC 与 CIK 细胞的增殖活性和细胞毒活性,提高后者对于 SKOV3 的杀伤作用。因此,本研究在中药多糖预处理 CIK 细胞的基础上,将 CIK 细胞与经卵巢癌细胞株 SKOV3 冻融抗原致敏的 DC 共培养,结果 DC-CIK 细胞的增殖速率显著提高,且经 DC 诱导的 CIK 细胞对 SKOV3 细胞表现出强大杀伤作用,其对于 SKOV3 细胞的杀伤率较未致敏 DC 活化的 CIK 细胞与单纯 CIK 细胞均明显高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),表明肿瘤抗原负载的 DC 可促进中药多糖干预 CIK 细胞增殖,并进一步提高 CIK 细胞对于卵巢癌细胞株 SKOV3 的特异性细胞毒作用,与文献报道相一致<sup>[8]</sup>。

腹水是卵巢癌患者的常见症状,发生率高达 81.9%。晚期卵巢癌患者由于免疫力低下、体质差,抽取大量外周血分离免疫效应细胞在执行上有一定

的困难,而腹水中含有大量免疫细胞,且采集方便,无副作用,患者抗拒心理低,可考虑作为免疫过继治疗中的细胞来源。本研究中,分别培养了腹水及外周血来源的 DC 细胞,发现两者联合 CIK 细胞对 SKOV3 细胞杀伤率无明显差异,提示腹水及外周血来源的 DC 细胞在增强 CIK 细胞杀瘤活性上无区别。

结果提示,中药多糖干预后的 CIK 细胞对 SKOV3 卵巢癌细胞具有显著杀伤作用,而经 SKOV3 肿瘤细胞冻融抗原冲击致敏的卵巢癌患者腹水来源 DC,可有效增加 CIK 细胞毒性,与外周血来源的致敏 DC 作用相近,可作为卵巢癌临床免疫治疗中大量免疫细胞的重要来源。

### [参考文献]

- [1] Yao X, Ahmadzadeh M, Rosenberg S, et al. Reconstitution of peripheral CD4 + FOXP3 + regulatory T cells in cancer patients receiving adoptive immunotherapy is related to the clinical response to therapy [J]. *J Immunol*, 2010, 184:131.
- [2] 孔炯,蒋敬庭,吴昌平. 细胞因子诱导的杀伤细胞的基础研究新进展[J]. *医学综述*, 2009, 15(13):1938.
- [3] Hashimoto K, Man S, Xu P, et al. Potent preclinical impact of metronomic low-dose oral topotecan combined with the antiangiogenic drug pazopanib for the treatment of ovarian cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9:985.
- [4] Pawel M, Nicholas P R. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4 + T cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(2):200.
- [5] 朱建平,朱寿兴,朱美萍,等. CIK 细胞辅助治疗卵巢癌的临床疗效[J]. *江苏医药*, 2008, 34(4): 404.
- [6] Jursik C, Prchal M, Grillari-Voglauer R, et al. Large-scale production and characterization of novel CD4 + cytotoxic T cells with broad tumor specificity for immunotherapy [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(3): 339.
- [7] 王阳,王伯初,周菁,等. 多糖的免疫调节功能研究进展[J]. *重庆大学学报*, 2004, 27(3):104.
- [8] 崔莹莹,周婷,张蓓,等. SKOV3 冻融抗原负载的 DC-CIK 细胞对 SKOV3 的杀伤作用[J]. *山东大学学报:医学版*, 2010, 48(2):131.

[责任编辑 邹晓翠]