

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.23.002

细胞因子诱导杀伤细胞对卵巢癌细胞耐药的影响*

吴利英 双 婷 谢婷婷 李玲霞 白 璐

(空军军医大学第一附属医院妇产科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探究细胞因子诱导杀伤细胞(cytokine-induced killers, CIK)对卵巢癌细胞耐药的影响。**方法:**选取荷人卵巢癌 SKOV3 / CDDP 耐药细胞株,经培养后将其调整为细胞浓度为 $1 \times 10^5/L$ 的单细胞悬液,均分为 2 份,分别设定为实验组和对照组,其中对照组给予贝伐单抗,实验组加入 CIK 进行刺激,两组培养时间均为 48 h,而后使用电镜观察细胞形态,并记录细胞凋亡率,而后吸取培养液上层清液,离心后采用放射免疫分析法测定其细胞因子转化生长因子- α (TGF- α)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的浓度,采用电化学发光法检测糖类抗原 125(CA125)及人附睾蛋白 4(HE4)的水平。**结果:**治疗前,两组细胞形态较为饱满、圆润,无凋亡细胞;治疗后,实验组出现明显细胞萎缩、膜发泡,且出现较多凋亡细胞,实验组细胞凋亡率高于对照组,实验组早期和中晚期凋亡率均显著高于对照组($P < 0.05$)。治疗前,两组细胞上清 TGF- α 、TNF- α 、CA125、HE4 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗后,实验组细胞上清 TGF- α 、TNF- α 、CA125、HE4 水平均显著低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**较贝伐单抗而言,CIK 对卵巢癌细胞具有更强的杀伤作用,能够显著降低 CA125、HE4 水平。

关键词:细胞因子诱导杀伤细胞;卵巢癌;耐药;糖类抗原 125;人附睾蛋白 4

中图分类号:R-33;R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)23-4405-04

Effect of Cytokine-induced Killer Cells on the Drug Resistance of Ovarian Cells*

WU Li-ying, SHUANG Ting, XIE Ting-ting, LI Ling-xia, BAI Lu

(The First Affiliated Hospital of the Military Medical University of the Air Force, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of cytokine induced killer cell line cytokine-induced killer cells (CIK) on the resistance of ovarian cancer cells. **Methods:** Human ovarian cancer SKOV3/CDDP resistant cell line was selected and cultured into a single cell suspension with cell concentration of $1 \times 10^5/L$. The cells were divided into the experimental group and control group, and control group as blank control. The experimental group was stimulated with CIK. The cell morphology of the two groups was observed by electron microscope, the apoptosis rate was recorded, and then the supernatant of the culture medium was extracted. After centrifugation, the concentrations of TGF- α and TNF- α of TGF- α and TNF- α were measured by radioimmunoassay. The levels of tumor markers carbohydrate antigen 125 (CA125) and human epididymal protein 4 (HE4) in the two groups were determined and compared by electrochemiluminescence. **Results:** Before treatment, the morphology of the cells in the two groups was relatively full, round and no apoptotic cells was observed by electron microscope. After treatment, the cells in experimental group were obviously atrophied, and the membrane was foaming. More apoptotic cells appeared in the experimental group and the apoptotic rate in the experimental group was higher than that in the control group. The early and late apoptotic rates in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The level of TGF- α , TNF- α in the experimental group were significantly lower than those in the control group before treatment ($P < 0.05$), but the level of TGF- α , TNF- α in the experimental group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). There was no significant difference between the two groups before treatment ($P > 0.05$). After treatment, the level of CA125 and HE4 in the experimental group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions:** CIK has a strong killing effect on ovarian cancer resistant cells and can significantly reduce the levels of CA125 and HE4.

Key words: CIK; Ovarian cancer; Drug-resistant CA125; HE-4

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)23-4405-04

前言

卵巢癌是女性生殖系统常见恶性肿瘤,病死率较高,原因是卵巢癌初期临床特征不典型,发现时基本已经处于癌症晚

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81702555)

作者简介:吴利英(1983-),硕士,主治医师,研究方向:妇科肿瘤,E-mail:wuliying1005@163.com

(收稿日期:2018-04-30 接受日期:2018-05-26)

期,治疗方式受到较大限制^[1,2]。现阶段对于卵巢癌的治疗主要包括手术治疗、放射治疗和化学治疗,手术治疗因受病情发展限制,对晚期出现转移的卵巢癌的治疗效果不佳;放射治疗在抑制肿瘤细胞生长、缓解病情方面具有较好的效果,但会诱发骨髓抑制等较为严重的并发症,因而选择需要慎重;化学具有使用方便、副作用相对性较小等优点,因而临床上使用较为广泛^[3,4]。近些年的研究显示随着化学治疗进程的推进,卵巢癌细胞会逐渐产生耐药性,降低治疗效果,甚至导致卵巢癌复发。

细胞因子诱导杀伤细胞(CIK)是近些年新发现的一种免疫活性细胞,具有增殖能力强、细胞毒性作用强等特点,能够发挥特异性的肿瘤杀伤作用,提高机体免疫力^[5,6]。本研究结果表明CIK细胞能够有效杀灭具有耐药性的卵巢癌细胞,同时降低机体CA125及HE4水平,现详述如下。

1 资料与方法

1.1 材料及仪器

选取荷人卵巢癌 SKOV3/CDDP 耐药细胞株,经培养后将其调整为细胞浓度为 $1 \times 10^5/L$ 的单细胞悬液,均分为 2 份,分别设定为实验组和对照组,使用电镜检查,两组细胞株形态、大小等不存在明显差异。选择 Allegra X-15R 型离心机对采取的细胞混悬液进行离心,电镜选择 COXEM 公司生产的 EM-30AX Plus,CA125 及 HE4 水平测定选择罗氏公司生产的电化学发光仪进行检测。

1.2 方法

1.2.1 CIK 细胞制备及扩增 于血库中取健康人群血液,使用肝素抗凝处理后,参照学者 Tang^[3] 的 CIK 细胞系制备方法制备 CIK 细胞系,并取培养第 11 d 的细胞系收获备用。

1.2.2 作用效果观察 两组细胞系经培养后将其调整为细胞浓度为 $1 \times 10^5/L$ 的单细胞悬液,对照组细胞系给予贝伐单抗(生产厂家:Roche Pharma (Schweiz) Ltd,规格 7.5 $\mu g/mL$,药品批号 20141206)进行治疗,实验组细胞系与 CIK 细胞按照 50:1 的比例进行混合,而后两组细胞系处于同一环境下进行培养,时间为 48 h,治疗结束后使用电镜观察两组细胞系的细胞形态、凋亡情况,而后检测干预前后细胞因子 TGF- α 、TNF- α 及卵巢癌标志物 CA125 及 HE4 水平。

1.3 观测指标及评测标准

1.3.1 细胞形态 将两组细胞系干预前后的细胞使用细胞刮子刮下,使用离心机以 3000 r/min 的速率离心 5 min,而后使用磷酸盐缓冲液冲洗一次,放入离心管中,使用戊二醛进行固定,时间为 30 min,而后将固定的细胞团刮下,使用丙酮进行梯度脱水,环氧树脂包埋,使用切片机进行切片,最后用醋酸铀枸橼酸铅进行染色,使用电镜对细胞形态进行观测,主要观测治疗前后细胞形态及治疗后细胞凋亡率。

1.3.2 细胞凋亡率 取处在对数生长期的细胞,以 1×10^6 个/mL 的密度,取 1.5 细胞悬液接种于 6 孔板,设置阳性对照组,采用流式细胞仪检测凋亡情况,Annexin V-FITC 为绿色荧光,PI 为红色荧光。注意流式细胞仪检测时,细胞数量不应低于 1×10^5 ,不适用于检测组织样本、荧光物质均易发生淬灭,进行荧光观察时,尽量缩短观察时间,同时在操作和存放过程中也尽量注意避光保存等。

1.3.3 细胞因子水平 两组细胞系分别于治疗前后吸取上层混悬液,使用离心机进行离心,而后采用放射免疫分析法测定两组细胞系中细胞因子 TGF- α 及 TNF- α 的水平,并进行对比。

1.3.4 肿瘤标志物水平 两组细胞系分别于治疗前后吸取上层混悬液,使用离心机进行离心,而后使用电化学发光法对两组肿瘤标志物 CA125 及 HE4 的水平进行测定并进行对比。

1.4 统计学方法

使用 SPSS22.0 对采集的数据实施分析,计数资料以率(%)的形式表示,采用卡方检验,使用以 $(\bar{x} \pm s)$ 的形式表示统计数据,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组治疗前后细胞形态对比

治疗前,两组细胞系细胞形态无明显差别,细胞较为饱满,细胞核较大,呈畸形状,常染色质较为丰富,无凋亡细胞;治疗后,两组均出现凋亡细胞,且细胞体积萎缩,线粒体浓缩染色质固缩于核膜四周,呈半月状,两组对比实验组细胞凋亡数量更多,同时细胞形态改变更为明显。

2.2 两组细胞凋亡率比较

实验组早期和中晚期凋亡率均显著高于对照组 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组早期和中晚期细胞凋亡率比较

Table 1 Comparison of the early and late apoptotic rate between two groups

Group	Apoptotic rate	
	Early apoptotic rate	Late apoptotic rate
Experiment group	45.78 $\pm$ 4.32	56.37 $\pm$ 5.34
Control group	34.65 $\pm$ 5.45	43.45 $\pm$ 6.34
P	0.023	0.034

2.3 两组治疗前后细胞因子水平的比较

治疗前,两组细胞上清 TGF- α 、TNF- α 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);治疗后,两组上清 TGF- α 、TNF- α 水平均较治疗前显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),且实验组以上指标水平较对照组更低,与对照组相比差异具有统计学意义

($P < 0.05$),见表 2。

2.4 两组治疗前后 CA125、HE4 水平的比较

治疗前,两组细胞上清 CA125、HE4 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);治疗后,两组细胞上清 CA125、HE4 水平均较治疗前显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),且实验组以上

指标水平明显低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表3。

表 2 两组治疗前后细胞因子水平对比

Table 2 Comparison of the cytokine levels between two groups before and after treatment

Group	TGF- α (μ g/L)		TNF- α (μ g/L)	
	Before treatment	After treatment	Before treatment	After treatment
Experiment group	31.02 $\pm$ 3.26	13.29 $\pm$ 5.21	3.18 $\pm$ 0.96	1.06 $\pm$ 0.06
Control group	30.96 $\pm$ 4.05	17.23 $\pm$ 4.95	3.09 $\pm$ 1.02	1.68 $\pm$ 0.15
P	0.235	0.015	0.302	0.021

表 3 两组治疗前后 CA125、HE4 水平的对比

Table 3 Comparison of the CA125 and HE4 levels between two groups before and after treatment

Group	CA125(U/mL)		HE4(pmol/L)	
	Before treatment	After treatment	Before treatment	After treatment
Experiment group	305.26 $\pm$ 22.15	156.23 $\pm$ 12.54	191.53 $\pm$ 12.06	98.59 $\pm$ 10.35
Control group	311.02 $\pm$ 16.29	206.41 $\pm$ 11.29	189.67 $\pm$ 11.59	123.62 $\pm$ 11.26
P	0.329	0.025	0.415	0.026

3 讨论

卵巢癌是女性常见恶性肿瘤之一,其发病率仅次于子宫颈癌和子宫体癌,位居女性肿瘤发病第三位。由于卵巢的解剖结构及功能极为复杂,卵巢癌起病时表现不明显,早期患者常无异常感觉,发现时常已处于晚期,加之该病发病年龄段广,故而对女性生命健康造成较严重的威胁^[7,8]。流行病学调查显示全球每年约有 20 万人被诊断为卵巢癌,每年约有 12.5 万人死于该病,而我国的统计数据显示 2010 年全国约有 4.15 万例新发卵巢癌病例,死亡 1.76 万例,至 2012 年我国卵巢囊肿的发病率已达 2.25 %^[9,10]。现阶段卵巢癌的治疗手段主要包括手术治疗、放射治疗及化学治疗等,其中化学治疗应用范围最广,但近几年的研究显示卵巢癌患者初次化疗效果往往较好,但随着化疗的进行,卵巢癌细胞往往会产生耐药性,导致治疗失败。有研究^[11]对卵巢癌耐药性机制进行了总结,认为卵巢癌细胞会通过加速药物外排、增加细胞 DNA 修复能力、加快化学药物代谢等方式来产生耐药机制,进而诱发治疗失败。

CIK 是将人外周血单个核细胞于体外环境下使用多种细胞因子进行综合培养而获得的一类异质细胞,能够同时表达出 CD3⁺ 和 CD56⁺ 两类膜蛋白分子,具有强大的抗肿瘤细胞生长及杀灭肿瘤细胞的作用,目前主要被应用于肿瘤治疗^[16]。有研究^[17]结果显示使用 CIK 细胞进行治疗的患者外周血 T 细胞亚群表型出现显著变化,CD3⁺、NKT 细胞数量、IL-2 及 TNF- α 的水平均显著提升,提示 CIK 细胞明显增强了患者的免疫功能和对肿瘤细胞的杀伤作用。有研究^[18]探讨了 CIK 细胞对耐药卵巢癌细胞的杀伤作用,结果显示 CIK 细胞对耐药卵巢癌细胞株具有较好的杀灭作用,该学者分析认为 CIK 细胞能够分泌多种细胞因子,如 TNF- α 、IL-2 等,能够直接对肿瘤细胞产生杀灭作用,同时 CIK 细胞能够提高机体 T 淋巴细胞的免疫功能,促进肿瘤细胞凋亡。

CA125 是发生恶变的卵巢癌细胞会大量表达的细胞因子,

目前常被作为卵巢癌的首选标志物,且能够对卵巢癌的预后进行评估。Luo^[12]等的研究显示在正常生理条件下 CA125 得分较少,但在恶性肿瘤中分泌量会骤增,且该血清因子在诊断卵巢癌方面具有较高的敏感度,但单独将 CA125 作为检测指标具有较低的特异度。且近些年的研究^[13-15]表明盆腔炎、消化道肿瘤患者中 CA125 的表达能力也较高,故而建议采取联合检测的方式来提高检测准确性。HE4 是近些年发现的一种新的卵巢癌标志物,是一类 Whey 酸性蛋白家族分泌的蛋白质,该物质常常在卵巢癌细胞中处于高表达状态,在正常组织中分泌较少,因而可以用来反映卵巢癌的进展情况。有研究^[19]表明机体 CA125 及 HE4 水平与卵巢癌患者的病情呈现正相关联系,卵巢癌患者 CA125 阳性率远高于健康人或良性病变患者,因而可以通过对 CA125 及 HE4 水平的检测来达到评估卵巢癌病情的目的。

本研究结果显示相比于应用贝伐单抗的对照组患者,应用 CIK 细胞的实验组细胞株其细胞凋亡率更高,同时 CIK 的应用也降低了细胞株血清 CA125 及 HE4 的水平,提示 CIK 细胞的应用对病情改善具有较为积极的作用。分析 CIK 细胞能够杀灭耐药卵巢癌细胞的作用机制可能有如下几方面^[20-22]:① 直接分泌细胞因子如 IL-2、TNF- α 杀灭肿瘤细胞;② 通过分泌穿孔素加快肿瘤细胞凋亡;③ 增强机体免疫功能;④ 改变肿瘤细胞基因,抑制蛋白质合成,通过以上集中机制,CIK 细胞能够起到较好的对耐药卵巢癌细胞的杀灭作用。

综上所述,较贝伐单抗而言,CIK 对卵巢癌耐药细胞具有更强的杀伤作用,能够显著降低 CA125、HE4 水平,但其具体机制尚需进一步研究证实。

参考文献(References)

- [1] Claus E B, Schildkraut J M, Thompson W D, et al. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer [J]. Cancer, 2015, 77(11): 2318-2324
- [2] Vogl S E, Seltzer V, Calanog A, et al. "Second-effort" surgical resection for bulky ovarian cancer[J]. Cancer, 2015, 54(10): 2220-2225

- [3] Berek J S, Bast R C. Ovarian cancer screening. The use of serial complementary tumor markers to improve sensitivity and specificity for early detection[J]. *Cancer*, 2015, 76(S10): 2092-2096
- [4] Varia M, Rosenman J, Venkatraman S, et al. Intraperitoneal chronic phosphate therapy after second-look laparotomy for ovarian cancer[J]. *Cancer*, 2015, 61(5): 919-927
- [5] Fang W, Rong X X, Xie R Y, et al. Cytokine-induced killer cells efficiently kill stem-like cancer cells of nasopharyngeal carcinoma via the NKG2D-ligands recognition[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 35023-35039
- [6] Lin T, Song C, Chuo D Y, et al. Clinical effects of autologous dendritic cells combined with cytokine-induced killer cells followed by chemotherapy in treating patients with advanced colorectal cancer: a prospective study[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(4): 4367-4372
- [7] Bristow R E, Lagasse L D, Karlan B Y. Secondary surgical cytoreduction for advanced epithelial ovarian cancer. Patient selection and review of the literature[J]. *Cancer*, 2015, 78(10): 2049-2062
- [8] Averette H E, Janicek M F, Menck H R. The National Cancer Data Base report on ovarian cancer. American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society [J]. *Cancer*, 2015, 76(6): 1096-1103
- [9] Oza A M, Cibula D, Benzaquen A O, et al. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial[J]. *Lancet Oncology*, 2015, 16(1): 87-97
- [10] Skates S J, Horick N, Yu Y, et al. Preoperative sensitivity and specificity for early-stage ovarian cancer when combining cancer antigen CA-125II, CA 15-3, CA 72-4, and macrophage colony-stimulating factor using mixtures of multivariate normal distributions [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2016, 22(20): 4059-4066
- [11] Corn B W, Lanciano R M, Boente M, et al. Recurrent ovarian cancer. Effective radiotherapeutic palliation after chemotherapy failure [J]. *Cancer*, 2015, 74(11): 2979-2983
- [12] Luo G, Xiao Z, Long J, et al. CA125, Pancreatic Cancer[J]. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2013, 17(12): 2092-2098
- [13] Romagnolo C, Leon A E, Fabricio A S, et al. HE4, CA125 and risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) as diagnostic tools for ovarian cancer in patients with a pelvic mass: An Italian multicenter study[J]. *Gynecologic Oncology*, 2016, 141(2): 303-311
- [14] Lan Z, Fu D, Yu X, et al. Diagnostic values of osteopontin combined with CA125 for ovarian cancer: a meta-analysis [J]. *Familial Cancer*, 2016, 15(2): 221-230
- [15] Xu Y, Zhong R, He J, et al. Modification of cut-off values for HE4, CA125 and the ROMA algorithm for early-stage epithelial ovarian cancer detection: Results from 1021 cases in South China[J]. *Clinical Biochemistry*, 2016, 49(1-2): 32-40
- [16] Liu J, Li H, Cao S, et al. Maintenance therapy with autologous cytokine-induced killer cells in patients with advanced epithelial ovarian cancer after first-line treatment [J]. *Journal of Immunotherapy*, 2015, 37(2): 115-122
- [17] Gammaitoni L, Giraudo L, Macagno M, et al. Abstract 2290: Effective immunotherapy with cytokine-induced killer cells against autologous melanoma cancer stem cells [J]. *Cancer Research*, 2016, 76(14 Supplement): 2290-2290
- [18] Liu J, Wang L, Wang Y, et al. Phenotypic characterization and anti-cancer capacity of CD8⁺ cytokine-induced killer cells after antigen-induced expansion[J]. *Plos One*, 2017, 12(4): e0175704
- [19] Zhang Q, Wang C R, Yu J P, et al. The Establishment of an HE4-CLIA Method and the Combined Analysis of HE4 and CA125 in Ovarian Cancer [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2016, 30(5): 709-718
- [20] Zhao X, Zhang Z, Li H, et al. Cytokine induced killer cells-based immunotherapies in patients with different stages of renal cell carcinoma [J]. *Cancer Letters*, 2015, 362(2): 192-198
- [21] Yelei Guo, Weidong Han. Cytokine-induced killer (CIK) cells: from basic research to clinical translation [J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2015, 34(3): 1-9
- [22] Wang S, Wang Z. Efficacy and safety of dendritic cells co-cultured with cytokine-induced killer cells immunotherapy for non-small-cell lung cancer [J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 28 (1): 22-28

(上接第 4404 页)

- [23] Dai S H, Chen T, Wang Y H, et al. Sirt3 attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress through the preservation of mitochondrial function in HT22 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(4): 1159-1168
- [24] Das S, Mitrovsky G, Vasanthi H R, et al. Antiaging properties of a grape-derived antioxidant are regulated by mitochondrial balance of fusion and fission leading to mitophagy triggered by a signaling network of Sirt1-Sirt3-Foxo3-PINK1-PARKIN [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 345105
- [25] Finkel T, Deng C X, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins[J]. *Nature*, 2009, 460(7255): 587-591