

巴马猪 NK 细胞表型鉴定及猪 CIK 细胞诱导方法建立

祝明皓^{1,2}, 陆涛峰², 牛银杰², 赵丽丽², 陈洪岩^{2*}

(1. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

【摘要】 目的 获得巴马猪外周血淋巴细胞中 NK 细胞的表型及比例的数据, 建立一种高效率猪 CIK (cytokine-induced killer) 细胞体外诱导培养的方法。**方法** 分离巴马小型猪外周血淋巴细胞, 通过检测 CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ 细胞以表征猪 NK 细胞的表型; 通过优化诱导培养条件, 提高诱导淋巴细胞中 CIK 的比例, 建立高效率 CIK 细胞体外诱导方法。**结果** 利用优化的诱导培养条件, 在诱导培养第 5 天时 CD3⁻/CD2⁺/CD8⁺ 的 NK 细胞的比例可高达 43.63%, 较最初分离时 NK 细胞比例提升了 5.59 倍; 细胞增殖活性实验表明诱导培养第 5 天时可见明显的 3 个荧光峰, 表明诱导后细胞发生了 3 次分裂, 理论上较最初分离增加了 8 倍; 诱导细胞的 qPCR 表型分析表明该细胞群体在诱导培养第 5 天时相关的表面标志有明显的上升也与流式分析结果一致。**结论** 建立了高效的猪 CIK 细胞体外诱导培养的方法。

【关键词】 巴马小型猪; NK 细胞; CIK 细胞; 表型鉴定

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0288-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.014

Isolation, phenotype identification and activation of natural killer (NK) cells in Bama miniature pigs

ZHU Ming-hao^{1,2}, LU Tao-feng², NIU Yin-jie²,
ZHAO Li-li², CHEN Hong-yan^{2*}

(1. Northeast Agricultural University, Harbin, 150001, China; 2. State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Harbin 150001, China)

【Abstract】 Objective To describe the phenotype of NK cells in Bama miniature pigs, and establish an efficient activation and culture method for porcine cytokine-induced killer (CIK) cells *in vitro*. **Methods** The porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Percoll gradient centrifugation, and the phenotype of NK cells was tested by detecting the CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ cell compartment. To establish an efficient activation and culture method for porcine CIK cells, we optimized the culture conditions to improve the CIK activation efficiency. **Results** Using the optimized induction culture conditions, the ratio of CIK (CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻) cells was up to 43.63% at the fifth day, approximately 5.59 times increased compared with the initially separated PBMCs. Cell proliferation experiments showed that three obvious fluorescence peaks were observed on the fifth day. The results indicated that the induced CIK cells underwent three times cell division, in theory, about increased 8-fold compared with the initial separation of PBMCs. Furthermore, the qRT-PCR result of the surface markers of porcine NK cells also showed a similar variation tendency as the flow cytometry results. **Conclusions** Our findings demonstrate the successful establishment of an efficient activation and culture method for porcine CIK cells *in vitro*.

【Key words】 Bama miniature pig; Natural killer cells; Cytokine-induced killer cells; Phenotype identification

Corresponding author: CHEN Hong-yan, E-mail: chenhongyan@caas.cn.

[基金项目] 哈尔滨市科技平台建设项目(编号:2014QA3BN002)。

[作者简介] 祝明皓(1990-), 男, 硕士研究生。研究方向: 动物学。E-mail: 15804635767@139.com

[通讯作者] 陈洪岩(1963-), 男, 研究员。研究方向: 实验动物学。E-mail: chenhongyan@caas.cn.

NK 细胞,即自然杀伤细胞,是机体重要的免疫细胞,具有杀伤性强、杀伤效果高效、可直接杀死癌细胞等特点,NK 细胞的靶细胞主要有某些肿瘤细胞、病毒感染细胞、某些自身组织细胞和寄生虫等^[1]。NK 细胞现已被越来越多地应用于各种临床研究之中,尤其是对人类及啮齿类的研究较为透彻。但某些大型动物如猪、牛等,其细胞表征与啮齿类相比差异很大^[5],目前临床研究也相对较少,因此能建立一种能够高效地分离猪 NK 细胞并使其能在体外稳定增殖的方法便尤为方便重要。

通过细胞因子而诱导细胞培养的方法在近些年中已有大量报道,而目前人的 CIK 细胞已研发成功并投入到临床应用。该细胞的培养方法是通过在无血清的悬浮细胞培养基中,分别在不同培养时期加入 CD3、IFN- γ 以及 IL-2 等细胞因子,以达到增强细胞杀伤性、促进细胞体外增殖的目的^[2-5]。根据已有报道,通过该方法培养的杀伤细胞可在体外连续培养 20 d 左右,增殖约 15 代左右,是在短时间内大量获得杀伤性细胞的有效方法。

本实验旨在对猪 NK 细胞进行体外诱导培养并进一步对其条件进行优化,以提高 NK 细胞比例。在细胞生长过程中,对 CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ 表型的猪 NK 细胞的数量比例进行流式检测^[6]。细胞培养过程中每天对细胞留样并提取 RNA,并根据 Talker 与 Gerner 的研究方法^[7,8],对各个时期猪 CIK 细胞的 CD2、CD3、CD8 α 、SLA-DRA 和 PRF1 这五种表面标志用荧光定量 RT-PCR 的方法进行表型鉴定^[8]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Percoll 细胞分离液购自于 Sigma 公司, RPMI 1640 培养液购自于 Gibco 公司, KBM581 培养液购自于 Corning 公司, 双抗由本研究所提供。人 CD3 单抗由博士德生物提供, IFN- γ 与 IL-2 诱导素购自于双鹭药业。Anti-CD2 (Apc) 抗体, Anti-CD3 (FITC) 抗体, Anti-CD8 (PE-cy5) 抗体均购自于 Abcam 公司。CFDA-SE 荧光染料购自于 KeyGen 公司, TransScript Green Two-Step qRT-PCR SuperMix 试剂盒由 Transgen 公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 猪外周血淋巴细胞分离及表型鉴定

从颈静脉采集巴马小型猪血液,加入到含有枸橼酸钠抗凝剂的离心管中。采用 Percoll (1.110 ng/L) 密度梯度离心法分离外周血淋巴细胞^[9,10], 收集淋巴细胞层,用 PBS 洗涤 2 次,加入适量细胞培养

液重悬,利用流式抗体 CD2、CD3、CD8 对细胞进行标记,用流式细胞仪检测各种表面标志的表达情况,实验方法参照表型分析部分。

1.2.2 细胞因子刺激及体外培养

在最初分离的外周血淋巴细胞按 1000 U/mL 的终浓度加入 IFN- γ ,置于培养箱中培养 24 h,次日按终浓度补加 CD3 50 ng/mL 和 IL-2 1000 U/mL。每 2~3 d 观察 CIK 细胞,并添加完全培养基和 IL-2 (终浓度 1000 U/mL)^[5,6]。培养过程中,对每天的细胞进行一次 200 μ L 的样本留取,用于表面标志的鉴定。为优化培养条件,本实验选择了 KBM581 无血清培养基和 1640 培养基 + 5% FBS 进行对比体外培养,以选取最合适的培养液。

1.2.3 细胞增殖活性检测

将最初分离出的外周血淋巴细胞留取一部分,用 CFDA-SE 以 1:1000 的比例对细胞进行染色。加入荧光指示剂后 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 即可完成染色^[7]。之后用 PBS 将细胞悬浮清洗两次,离心条件同之前步骤,最后按照 1.2.2 方法进行诱导培养。诱导培养的细胞分别在 1、3、5、7、9 d 取适量细胞样品,通过流式细胞仪检测细胞增殖状况。本实验同时对用 1640 和 KBM581 培养液培养的细胞进行染色,分别在相同时间点对其增殖状况进行检测,以便更准确地判断细胞诱导增殖的最适培养体系。

1.2.4 细胞表型分析

(1) 流式细胞仪检测 CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ 细胞比例

在猪外周血淋巴细胞诱导培养过程中,分别在培养的第 1、3、5、7、9 天对细胞取样,按照比例 1:100 加入流式抗体 CD2、CD3、CD8 对细胞进行标记,每次标记过程中都进行四组染色标记,分别为三种标签的单独标记及三种标签的共同标记,标记方法如下:首先吸取适量细胞培养液,600 g 离心 15 min,弃上清后用适量 PBS 悬浮清洗细胞,再次 600 g 离心 15 min,之后用 5% BSA 悬浮细胞,室温封闭 1 h,按上述条件离心,加入适量 PBS 悬浮细胞,并根据需求加入不同抗体对细胞进行荧光标记,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,离心,并用 PBS 清洗两次,最后再用适量 PBS 重悬细胞,过 300 目细胞筛后将样品转移至流式管中,通过流式细胞仪检测表型为 CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ 的 NK 细胞比例变化情况。

(2) 荧光定量 RT-PCR 检测细胞表型

首先以 Talker 等人研究报道为参考,在 NCBI 查获要检测的 CD2、CD3、CD8 α 、SLA-DRA 和 PRF1 五种基因 CDS 序列,并合成引物,再以韩建强等^[11]为参

考,合成 GAPDH 单拷贝基因引物^[8],待合成出可扩增出单一基因片段的全部引物后,以之前取得的 1~9 d 细胞样品提取的 RNA 为模板,根据所购买的试剂盒说明书分别用上述引物进行细胞表型的 qRT-PCR 检测。每个基因表达量原始数据,经处理后得到相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,用于后续数据分析。

2 结果与分析

2.1 巴马猪 NK 细胞的表型分析

分离巴马猪外周血淋巴细胞,利用流式抗体

CD2、CD3、CD8 对细胞进行标记,利用流式细胞仪检测各种表面标志的表达情况,结果如图 1 所致。结果表明,新鲜分离的外周血淋巴细胞中,淋巴细胞约占总细胞含量的 26.4%,淋巴细胞中 CD2⁺ 细胞的比例约为 41.54%、CD3⁺ 细胞的比例约为 26.89%、CD8⁺ 细胞的比例约为 34.83%,CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ 细胞的比例约为 7.82%。CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ 细胞被认为是猪 NK 细胞的典型表型,因此,本研究中测得的巴马猪 NK 细胞约占总淋巴细胞的 7.82%。

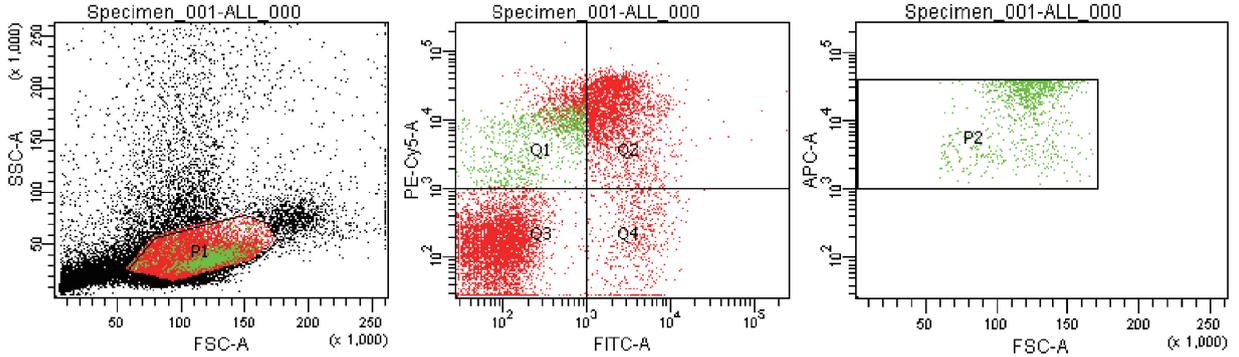


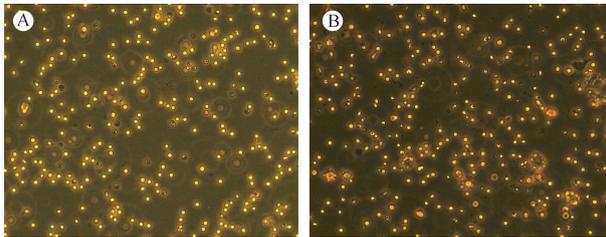
图 1 巴马猪外周血淋巴细胞表型分析

Fig. 1 Phenotype identification of PBMCs in the Bama miniature pigs

2.2 巴马猪 CIK 细胞体外诱导培养方法的建立

2.2.1 培养体系优化

将分离得到的淋巴细胞进行诱导,采用不同的培养体系,“1640 培养液 + 5% FBS”和“KBM581 无血清培养液”,分别对细胞进行培养,每天观察细胞形态,并对细胞的生长状况进行记录,绘制生长曲线。结果表明,两种培养液培养得到的细胞在前期培养过程中(1~6 d)在形态上差异不显著(如图 2),但在体外培养的后期(7 d 以后)KBM581 培养的细胞的凋亡速度和细胞碎片数量明显较 1640 培养多。



注:A. 1640 培养体系培养 3 d;
B. KBM581 培养体系培养 3 d。

图 2 巴马猪 CIK 细胞形态($\times 200$)

Note. A. Cells cultured in 1640 medium for 3 days.

B. Cells cultured in KBM581 medium for 3 days.

Fig. 2 Morphology of cytokine-induced killer cells in the Bama miniature pigs($\times 200$)

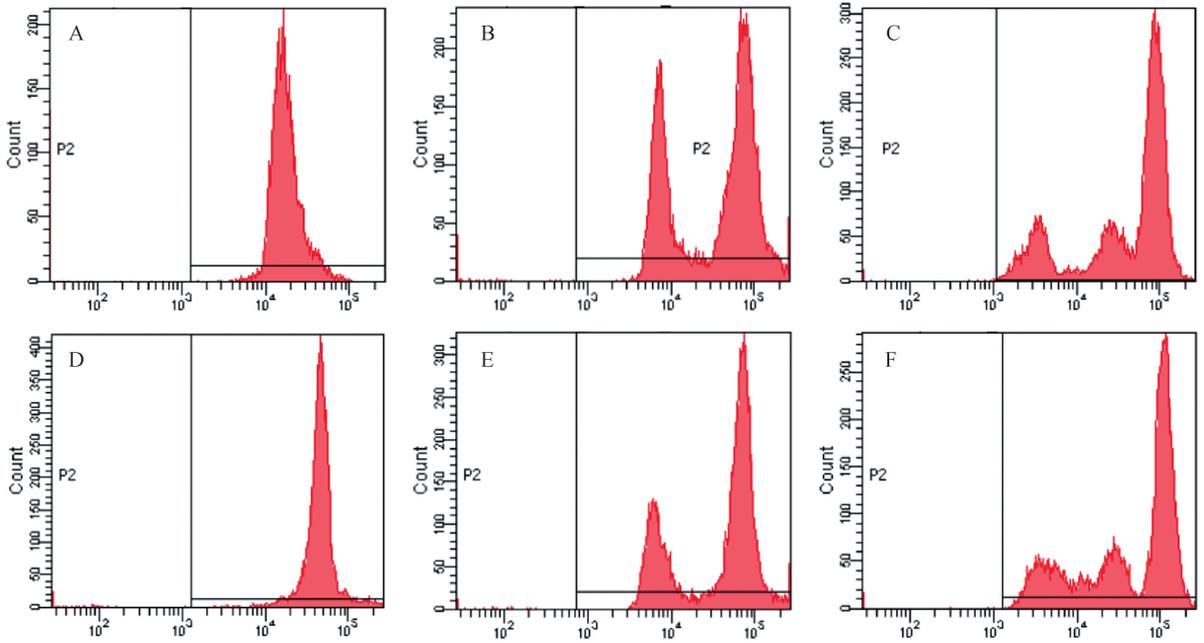
2.2.2 巴马猪 CIK 细胞增殖

选择同一批分离的外周血淋巴细胞,分别用“1640 培养液 + 5% FBS”和“KBM581 无血清培养液”进行培养,按照 1.2.2 的方法诱导产生的 CIK 细胞和按照 1.2.3 的方法用 CDFA-SE 标记细胞,分别在培养的第 1、3、5 天进行细胞取样,并通过流式细胞仪检测细胞增殖情况(如图 3 所示)。实验结果表明,两种培养体系得到结果基本一致,在诱导培养第 5 天时均可见明显的 3 个荧光峰,表明诱导后细胞发生了 3 次分裂,理论上较最初分离增加了 8 倍。

2.3 细胞表型分析

2.3.1 流式细胞仪检测 CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ 细胞比例变化

分离巴马猪外周血淋巴细胞,选择 1640 培养体系进行 CIK 细胞诱导培养,分别在培养的第 1、3、5、7、9 天对细胞取样,用 CD2、CD3、CD8 对细胞进行标记,利用流式细胞术分析猪 CIK 细胞在培养过程中的比例变化,结果如图 4 所示。实验结果表明,新鲜分离的淋巴细胞中具有 NK 细胞表型的细胞占 7.81%,诱导培养第 3 天开始,CIK 细胞比例明显上升,到第 5 天达到顶峰,其约占总细胞 43.63%,较最初分离时相比细胞比例提升了 5.59 倍,继续之后细胞比例趋于平稳,在第 7 天之后 NK 细胞比例略有下降。

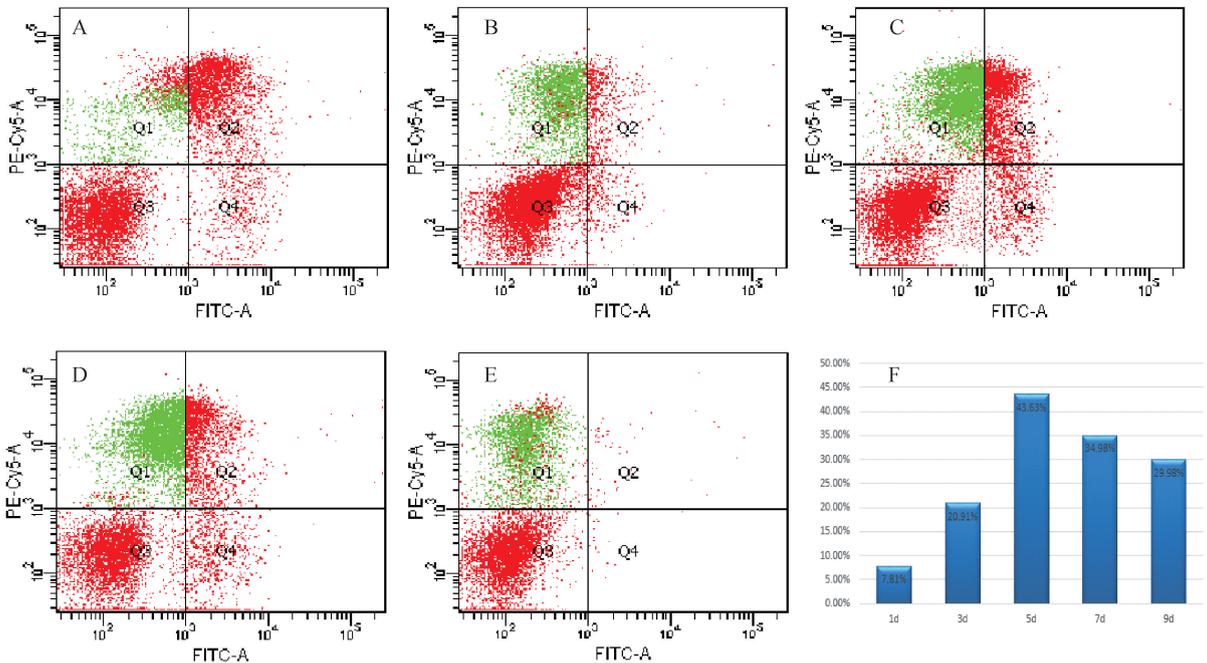


注:A~C 分别为 1640 培养体系分别培养 1、3、5 d 用流式测得的细胞增殖结果;D~F 分别为 KBM581 培养体系分别培养 1、3、5 d 用流式测得的细胞增殖结果。

图 3 巴马猪 CIK 细胞增殖活性分析

Note. A-C: CIK cells cultured in 1640 medium for 1, 3 and 5 days; D-F: CIK cells cultured in KBM581 medium for 1, 3 and 5 days.

Fig. 3 Analysis of the proliferation activity of CIK cells in the Bama miniature pigs



注:A~E 分别为 CIK 诱导培养过程中不同时间(1、3、5、7、9 d)具有 NK 细胞表型(CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻)的细胞比例变化情况;F 图为 CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ 细胞数据统计结果。

图 4 巴马猪 CIK 细胞培养过程比例变化分析

Note. A-E, Cultured in 1640 medium for 1, 3, 5, 7 and 9 days; F: Statistical results of the CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ cells.

Fig. 4 Changes of the ratio of CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻ cells of the Bama miniature pigs during the culture process

2.3.2 qRT-PCR 检测 CIK 细胞表型

系进行 CIK 细胞诱导培养,分别在培养的第 1、3、5、

分离巴马猪外周血淋巴细胞,选择 1640 培养体

7、9 天对细胞取样,进行荧光定量 RT-PCR 反应,检

测猪 NK 细胞表面标志 CD2、CD3、CD8 α 、SLA-DRA 和 PRF1 五个基因的表达变化情况,统计各个基因与内参的 Ct 值,对数据进行均一化处理,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,绘制曲线,所检测的数据在 1~9 d 变化结果如图 5 所示。结果表明,在细胞培养初期,由于诱导因子的加入,各 NK 细胞相关表型基因的表达量开始上升,在 5 d 达到顶峰,在 6 d 之后呈下降趋势,说明在第 5 天细胞群体有明显增殖,各种表面 marker 表达都在此时增强,此结果与流式结果一致,表明在体外使用细胞因子诱导巴马猪外周血淋巴细胞能够使具有 NK 细胞表型的细胞类群的比例明显提高。

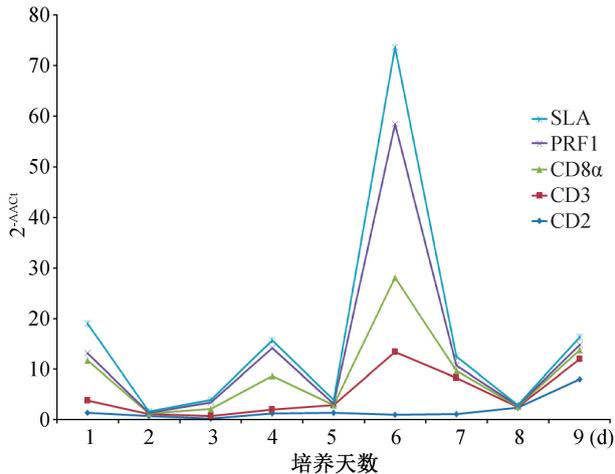


图 5 qRT-PCR 检测 CIK 细胞表型

Fig. 5 Phenotype analysis of the surface markers of porcine NK cells detected by qRT-PCR

3 讨论

本研究首先测定了新鲜分离的猪外周血淋巴细胞中 NK 细胞(CD2⁺/CD8⁺/CD3⁻)的比例,通过流式细胞仪检测的结果显示,当巴马猪外周血淋巴细胞刚被分离出时, NK 细胞约占总淋巴细胞的 7.82%,本结果可以为猪 NK 细胞研究提供参考。

接下来,本研究比较了两种培养体系培养效果,结果显示“1640 培养液 + 5% FBS”和“KBM581 无血清培养液”两种培养体系在培养 7 d 内,在增殖活性和细胞表型上差异不显著,但是在 7 d 之后,“1640 培养液 + 5% FBS”的培养体系培养的细胞状况要明显好于“KBM581 无血清培养液”体系的细胞,通过镜下观察细胞数量以及细胞形态均一程度便可较明显的体现出来。两种培养体系的主要差异在于培养体系中是否含有血清,因此,可以根据实验目的而选择不同的培养体系来达到实验效果。更重要的是本研究探索了一种无血清培养体系,对于利用该细胞进行实验过程中,实验条件的精细化控制具有探索性意义。

最后,通过对所分离培养的 NK 细胞每天进行的检测结果发现,利用我们建立的细胞诱导培养的方法可以使猪外周血淋巴细胞中具有 NK 细胞表型的细胞数量在第 5 天时达到巅峰,占总淋巴细胞的 43.63%,较最初分离时 NK 细胞比例提升了 5.59 倍,而淋巴细胞总体数量也增长近 8 倍,因此,可利用此方法为体外细胞免疫试验提供足够量的 NK 细胞表型的细胞。NK 细胞是固有免疫应答中一类十分重要的淋巴细胞,可通过选择性识别、杀伤低表达 MHC I 类分子的肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞的生长和转移,有效地清除肿瘤进而在机体抗肿瘤免疫和炎症反应中发挥关键性作用。静止 NK 细胞具有一定的杀伤活性,若 NK 细胞的有效活化,可显著增强其对肿瘤细胞的杀伤作用。本研究尝试了一种体外显著提高猪 NK 细胞的诱导培养方法,可以为抗肿瘤免疫及其机制研究提供足够量的效应细胞,也可以为病原微生物引起的体外细胞免疫和免疫逃逸研究提供良好的研究思路。

参 考 文 献

- [1] 彭六生. NK 细胞在胃癌中的应答调控及作用研究 [D]. 第三军医大学, 2014.
- [2] 刘军权, 朱云, 陈复兴, 等. 不同刺激因子对人 CIK 细胞功能影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 04:1021-1026.
- [3] 祝仲珍, 王占科, 傅颖媛. 肿瘤患者自体外周血 CIK/DC-CIK 细胞培养制备技术及临床应用研究进展 [J]. 实验与检验医学, 2015, 03: 300-303.
- [4] 贺孟来. CIK 细胞制备方法的研究进展 [J]. 中国医药指南, 2011, 13:208-209.
- [5] Pintaric M, Gerner W, A. Saalmuller A. Synergistic effects of IL-2, IL-12 and IL-18 on cytolytic activity, perforin expression and IFN-gamma production of porcine natural killer cells [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008. 121(1-2): 68-82.
- [6] Thierry A, Robin A, Giraud S, et al. Identification of invariant natural killer T cells in porcine peripheral blood [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2012. 149(3-4): 272-279.
- [7] Talker SC, Käser T, Reutner K, et al. Phenotypic maturation of porcine NK- and T-cell subsets [J]. Dev Comp Immunol, 2013, 40: 51-68.
- [8] Gerner W, Kaser T, Saalmuller A. Porcine T lymphocytes and NK cells—an update [J]. Dev Comp Immunol, 2009. 33(3): 310-320.
- [9] 张素华, 林丹丹, 张美娟, 等. Ficoll 密度梯度离心法分离猪外周血单个核细胞条件的探讨 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2007, 19(3):192-195.
- [10] 桑明, 代明, 周立, 等. 恒河猴外周血单核巨噬细胞体外培养方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 18-24
- [11] 韩建强, 许文花, 高斌. 猪 GAPDH 基因实时荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. 西南农业学报, 2010, 23(4): 1282-1285.