

人CIK细胞培养方案

外周血单个核细胞的采集

1. 用血细胞分离机采集患者自身的外周血单个核细胞50-100ml;
2. 淋巴细胞分离液密度梯度离心法进一步纯化单个核细胞(PBMC);
3. 无血清培养液洗涤2次, 获得纯度在90%以上的PBMC。

CIK细胞的培养及鉴定

1. 将PBMC按 $1-2 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度悬浮于无血清培养液中, 加入 $1,000 \mu/\text{ml}$ 的重组人IFN- γ , 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养;
2. 24h后加入 50 ng/ml 的CD3单克隆抗体和 $300 \mu/\text{ml}$ 的重组人IL-2, 刺激CIK细胞的生长和增殖;
注: 此时也可同时加入 $100 \mu/\text{ml}$ 的重组人IL-1 α 。
3. 每3天半量换液或扩瓶一次, 并补加重组人IL-2 $300 \mu/\text{ml}$;
4. 在培养的第14d, 收获CIK细胞。
5. CIK细胞质控:
 - 5.1 台盼蓝染色检测: 活细胞应在80%以上;
 - 5.2 流式细胞仪检测细胞表面CD3、CD8、CD56等分子的表达: CD3+CD56+细胞的比例应在20%以上。
 - 5.3 细胞杀伤实验: 以CIK细胞为效应细胞, 以肿瘤细胞(可为原代肿瘤细胞或肿瘤细胞株)为靶细胞, 将效应细胞与靶细胞按10:1(数目比)的比例加入96孔U型板中, 每孔含靶细胞 1×10^4 个, 终体积为 $200 \mu\text{l}$, 设3个复孔。培养4 h, 然后取培养上清, 用乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测效应细胞对靶细胞的杀伤率。
 - 5.4 收获细胞前, 取少量培养物进行细菌、真菌培养, 并检测支原体、衣原体, 及内毒素(标准: 病原学检测阴性, 内毒素 $<5 \text{ Eu}$)。

细胞培养所需细胞因子及抗体:

生产商	产品编号	产品名称	产品规格
PeproTech	AF-300-02	Recombinant Human IFN- γ (Animal Free)	100 μ g/250 μ g/500 μ g/1 mg
PeproTech	AF-200-01A	Recombinant Human IL-1 α (Animal Free)	10 μ g/100 μ g/250 μ g/500 μ g/1 mg
PeproTech	AF-200-02	Recombinant Human IL-2 (Animal Free)	50 μ g/100 μ g/250 μ g/500 μ g/1 mg
BioGems	05121-25	Anti-Human CD3 SAFIRE Purified	100 μ g/500 μ g

细胞鉴定所需抗体:

生产商	产品编号	产品名称	产品规格
BioGems	05131-77	Anti Human CD3 PE-Cy7	25 tests/100 tests
BioGems	08211-50	Anti Human CD16 FITC	25 tests/100 tests
BioGems	08631-80	Anti Human CD56 (NCAM) APC	25 tests/100 tests

参考文献:

- [1] Li R, Wang C, et al. Autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy in lung cancer: a phase II clinical study. *Cancer Immunol Immunother.* 2012; 61:2125–2133



苏州中维鑫创生物医药科技有限公司
 电话: 0512-6789 5080
 企业QQ: 3440695713
 邮箱: info@zvxcbio.com
 地址: 江苏省苏州市工业园区裕新路168号脉山龙大厦2幢

