

· 论 著 ·

## 不同细胞因子活化的 NK 细胞形态及功能的研究

余少鸿, 汤荣春, 温小明, 张继红

(云南省昆明市第一人民医院普外科 650011)

**摘要:**目的 研究白细胞介素-2(IL-2), IL-2 及白细胞介素-12(IL-12), IL-2 及白细胞介素-18(IL-18), IL-2、IL-12 及 IL-18 活化的自然杀伤细胞(NK 细胞)的形态及对黑色素瘤细胞的杀伤率。方法 提取 NK 细胞, IL-2 6 000 IU/mL, IL-2 6 000 IU/mL + IL-12 10 ng/mL, IL-2 6 000 IU/mL + IL-18 100 ng/mL, IL-2 6 000 IU/mL + IL-12 10 ng/mL + IL-18 100 ng/mL 活化, 3 d 后流式细胞仪检测其前向角散射(FSC)值, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测干扰素  $\gamma$ (IFN $\gamma$ )含量, 以 B16 黑色素瘤细胞为靶细胞检测 NK 细胞对肿瘤细胞杀伤率。结果 IL-2+IL-12、IL-2+IL-18、IL-2+IL-12+IL-18 活化的 NK 细胞 FSC 值明显比仅用 IL-2 活化的 NK 细胞大( $P < 0.05$ ), 并且分泌的 IFN 量高( $P < 0.05$ ), 但对 B16 黑色素瘤细胞杀伤率低。结论 同时应用 IL-12 及 IL-18 与 IL-2 活化的 NK 细胞能够分泌较高的 IFN $\gamma$ , 但是对肿瘤细胞的杀伤作用较低。

**关键词:** NK 细胞; 白细胞介素-2; 白细胞介素-12, 白细胞介素-18; 黑色素瘤细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.21.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)21-2099-03

## Research of morphology and function of different cytokines activated natural killer cells

Yu Shaohong, Tang Rongchun, Wen Xiaoming, Zhang Jihong

(Department of General Surgery, Kunming 1st Hospital, Kunming 650011, China)

**Abstract:** Objective To investigate shape and function of different cytokines activated NK cells. Methods Natural Killer(NK) cells were cultured and activated with IL-12 10 ng/mL, IL-18 100 ng/mL, and both with IL-2 6 000U/L, 3 days later took out NK cells, markers and Forward Scatter(FSC) FACS were detected by FACS, IFN gamma production was detected by ELISA, and B16 melanoma cells as targets for NK cells for cytotoxic assay. Results IFN gamma production from NK cells with IL-2+IL-12, IL-2+IL-18, and IL-2+IL-12+IL-18 were higher and more than with IL-2 respectively, but NK cells with IL-2+IL-12, IL-2+IL-18, and IL-2+IL-12+IL-18 kill less B16 cells than with IL-2. Conclusion NK cells with IL-2+IL-12, IL-2+IL-18, and IL-2+IL-12+IL-18 will produce more IFN gamma, but kill less tumor cells.

**Key words:** natural killer cells; interleukin-2; interleukin-12; interleukin-18; melanoma cells

细胞免疫在肿瘤免疫发挥重要的作用, 其中, 自然杀伤细胞(natural killer cell, NK 细胞)是体内主要的免疫细胞<sup>[1]</sup>。NK 细胞可识别靶细胞“非己”性改变, 能够识别主要组织相容性复合体(MHC)无或低表达肿瘤细胞, 有利于靶向定位于肿瘤及转移部位, 直接杀伤血液循环的肿瘤细胞及肿瘤组织<sup>[2-3]</sup>, 并且对黑色素瘤肺转移也有杀灭作用<sup>[4-5]</sup>。细胞因子白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-12(IL-12)和白细胞介素-18(IL-18)可调节其杀伤及分泌功能<sup>[6-7]</sup>。NK 细胞表达 FasL、粒酶 B、穿孔素、NK1.1 和 NKp30、44、46, 活化时表达 NKG2D; 同时, NK 细胞分泌大量细胞因子如肿瘤细胞坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-12、干扰素  $\gamma$ (IFN $\gamma$ ); MICA、Fas 主要表达于肿瘤细胞, 通过 Fas-FasL、TRAIL、NKG2D-MICA 等途径, 从而抑制肿瘤细胞增殖及分化, 促进肿瘤细胞凋亡。最近研究表明, NK 细胞可通过分泌 IL-12 活化的 DC 细胞活化 CTL 细胞, 介导获得性免疫<sup>[8]</sup>。因此, 研究不同细胞因子活化的 NK 细胞的形态及功能, 为进一步应用 NK 细胞治疗肿瘤提供良好的基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物及肿瘤细胞培养** C57BL/6 雌性裸鼠, 8~12 周龄, 购买于 Jackson 实验室, 匹兹堡大学肿瘤中心无菌环境饲养。黑色素瘤细胞(B16 细胞)由本实验室保存培养, 于 RPMI1640 液(含 10% 灭活小牛血清, 2 mM/L 谷氨酰胺, 0.8 g/L 链霉素, 1.6 $\times 10^5$  U/L 青霉素)培养(生物技术公司, USA)。

**1.2 分离培养纯化的 NK、NK-IL-2+IL-12、NK-IL-2+IL-18、NK-IL-2+IL-12+IL-18 细胞及表型检测** 从 C57BL/6 裸小鼠提取出脾脏, 磨碎, 使之成单细胞悬液, 1 200 r/min 离心 5

min, 溶解红细胞, 即可制成脾细胞悬液, 计数, 按 1 $\times 10^7$  细胞/mL 加入培养液, 在 IL-2(Chiron Corporation, Emeryville, CA 提供)6 000 IU/mL 培养。2 d 后, 用抗 CD3 抗体磁珠(Dynal Biotech, NY, USA)法纯化, 敲除 T 细胞, 即可制成 NK 细胞, 再加入 IL-2 6 000 IU/mL 培养 24 h 后, 加入 IL-12 10 ng/mL (BD 生物公司, USA)和 IL-18 100 ng/mL (BD 生物公司, USA)或同时加入 IL-12 10 ng/mL 及 IL-18 100 ng/mL, 再培养 48 h 后, 收获细胞(分别称为 NK、NK-IL-2+IL-12、NK-IL-2+IL-18、NK-IL-2+IL-12+IL-18 细胞)。把每管 0.5 M 细胞, 离心, 取沉淀, 混匀, 添加抗体(2  $\mu$ L/0.5 M), 添加抗体 NK1.1, NKp46 及 CD3, CD4 和 CD8, 流式细胞仪(FACS)检测表型。NK 细胞表型 NKp46 $> 95\%$ , NK1.1 $> 90\%$ ,  $< 2\%$  CD8 $^+$ ,  $< 2\%$  CD4 $^+$ , 与作者以前研究一致。

**1.3 流式细胞仪(FACS)检测 NK、NK-IL-2+IL-12、NK-IL-2+IL-18、NK-IL-2+IL-12+IL-18 细胞前向角散射(forward scatter, FSC)值** 准备 NK, NK-IL-2+IL-12, NK-IL-2+IL-18, NK-IL-2+IL-12+IL-18 细胞 0.5 M/管, 离心, 取沉淀, PBS 液洗涤 2 次, FACS 检测 5 000 细胞 FSC 值, 实验重复 3 次。

**1.4 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 NK、NK-IL-2+IL-12、NK-IL-2+IL-18、NK-IL-2+IL-12+IL-18 细胞分泌的 IFN $\gamma$  含量** 同上法培养 NK、NK-IL-2+IL-12、NK-IL-2+IL-18、NK-IL-2+IL-12+IL-18 细胞, 在收集细胞同时, 2 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, -80  $^{\circ}$ C 冻存备用, 按照说明书应用双抗体夹心法检测 IFN $\gamma$ 。

**1.5 不同细胞因子活化的 NK 细胞对 B16 黑色素瘤杀伤率**  
 设立对照组, 51Cr 溶液与 B16 细胞混合, 于 37 °C 培养 1 h 左右, 51Cr 即可进入靶细胞, 洗去游离的 51Cr 后, 即可得到 51Cr 标记的靶细胞。收集 NK 细胞与 51Cr 标记的靶细胞混合(比例约为 50 : 1, 25 : 1…… 3.125 : 1) 4 h, 用  $\gamma$  射线测量仪检测上清液中的 cpm 值, 即可计算出待检细胞杀伤活性的高低。特异性肿瘤细胞杀伤率 % = (特异性释放 - 自发性释放) ÷ (最大量释放 - 自发性释放) × 100%。

**1.6 统计学处理** 试验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS10.0 软件对结果进行方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 不同细胞因子活化的 NK 细胞 FSC 值** IL-2 能够激活 NK 细胞增殖, 结合其他细胞因子如 IL-12 及 IL-18, 能大量刺激 NK 细胞增殖(表 1), 流式细胞仪测定的 FSC 值为 NK < NK-IL-12 < NK-IL-18 < NK-IL-12+IL-18,  $P < 0.05$ , 图 1~5。

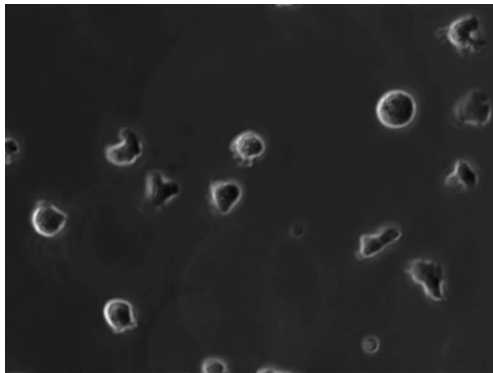


图 1 NK 细胞 (×200)

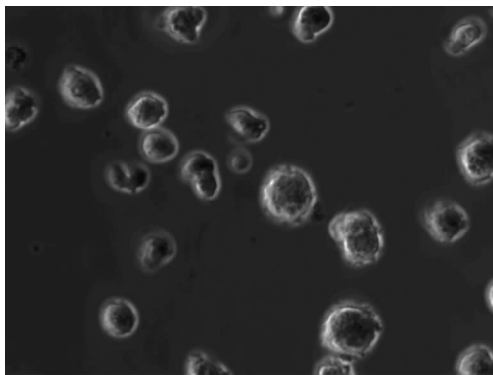


图 2 NK-IL-2+IL-12 细胞 (×200)

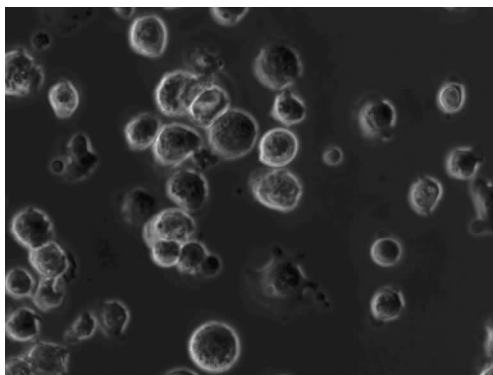


图 3 NK-IL-2+IL-18 细胞 (×200)

**2.2 不同细胞因子活化的 NK 细胞分泌的 IFN $\gamma$  含量** NK-IL-12、NK-IL-18 及 NK-IL-12+IL-18 细胞分泌的 IFN $\gamma$  含量高于 NK 细胞上清液中 IFN $\gamma$  含量 ( $P < 0.05$ ), 见图 6 及表 2。

表 1 不同细胞因子活化的 NK 细胞 FSC 值 ( $\bar{x} \pm s$ )

细胞	n	FSC 值
NK 细胞	3	578.66 ± 23.5
NK+IL-12 细胞	3	637.06 ± 31.2 <sup>#</sup>
NK+IL-18 细胞	3	645.36 ± 35.6 <sup>#</sup>
NK+IL-12+IL-18 细胞	3	691.47 ± 47.9 <sup>#</sup>

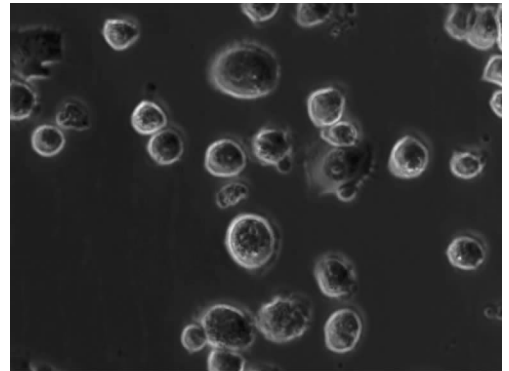


图 4 NK-IL-2+IL-12+IL-18 细胞 (×200)

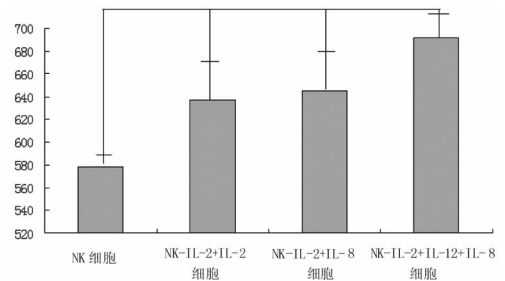


图 5 不同细胞因子活化的 NK 细胞 FSC 值

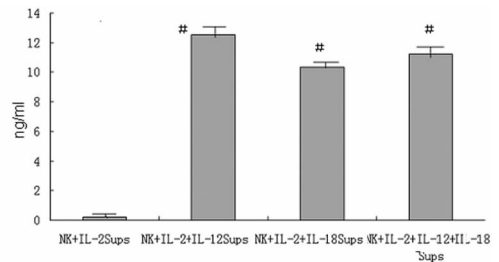


图 6 NK、NK-IL-12、NK-IL-18 及 NK-IL-12+IL-18 细胞上清液中 IFN $\gamma$  含量

表 2 NK、NK-IL-2+IL-12、NK-IL-2+IL-18 及 NK-IL-2+IL-12+IL-18 细胞上清液中 IFN $\gamma$  含量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IFN $\gamma$ (ng/mL)
NK Sups	3	0.21 ± 0.01
NK+IL-2+IL-12 Sups	3	12.52 ± 0.37 <sup>#</sup>
NK+IL-2+IL-18 Sups	3	10.36 ± 0.23 <sup>#</sup>
NK+IL-2+IL-12+IL-18 Sups	3	11.20 ± 0.28 <sup>#</sup>

**2.3 不同细胞因子活化的 NK 细胞对黑色素瘤靶细胞的杀伤活性** 不同细胞因子活化的 NK 细胞对 B16 黑色素瘤细胞的杀伤率比较, 可见, NK 细胞在 50 : 1 时对 B16 肿瘤细胞杀伤

率均值可达 52.19%，明显高于 NK-IL-12、K-IL-18 及 NK-IL-12+IL-18 细胞 ( $P<0.05$ )；其次，NK-IL-12 细胞在 50:1 时对 B16 肿瘤细胞杀伤率均值可达 40.77%，比 K-IL-18 及 NK-IL-12+IL-18 细胞对 B16 肿瘤细胞杀伤率 25.56% 及 20.33% 明显为高 ( $P<0.05$ )，见图 7。

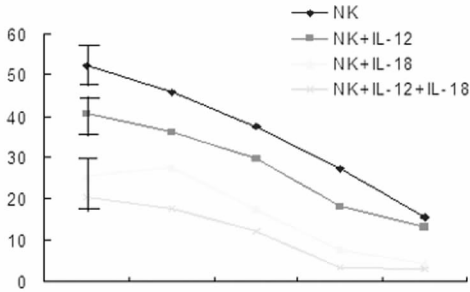


图 7 不同细胞因子活化的 NK 细胞对 B16 黑色素瘤细胞的杀伤活性

### 3 讨论

体内外活化的 NK 细胞需要 IL-2 维持，其他细胞因子，如 IL-12 及 IL-18 能增强其作用 IFN $\gamma$ <sup>[9]</sup>，IL-18 可诱导 IFN mRNA 合成<sup>[10]</sup>，并且只有和 IL-2 合用才能活化 NK 细胞<sup>[11]</sup>。有研究表明，IL-2、IL-12、IL-18 活化的 NK 细胞可以极化 DC 细胞诱导 T 细胞向 Th1 分化，分泌大量 IFN $\gamma$ <sup>[12]</sup>，并且多种因素可加强此作用<sup>[13]</sup>，IL-2 是激发细胞因子如 TNF- $\alpha$  及 IFN $\gamma$  级联反应的关键因素。FSC 值与流式细胞仪激光入射光线一致，与平均细胞体积正相关，可以提示细胞平均体积。本研究发现 IL-2、IL-2+IL-12、IL-2+IL-18 及 IL-2+IL-12+IL-18 培养的 NK 细胞 FSC 值逐渐增大；IL-2+IL-12+IL-18 培养的 NK 细胞平均体积比 IL-2+IL-12、IL-2+IL-18 的平均体积大，但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )；但是，IL-2+IL-12 培养的 NK 细胞分泌的 IFN $\gamma$  含量最高，次为 IL-2+IL-18 及 IL-2+IL-12+IL-18 培养的 NK 细胞，可能与细胞因子刺激的量与 NK 细胞表面 IL-2、IL-12、IL-18 受体数量有关，这些细胞因子受体在 NK 细胞表面可能存在一定的竞争有关。

令人惊讶的是，IL-2 培养的 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤力最强，在 E:T 为 50:1 时，能够达到 50% 左右；IL-2+IL-12 培养的 NK 细胞，在 E:T 为 50:1 时，能够达到 40% 左右。这是由于 NK 细胞杀伤力与肿瘤细胞接触有关，在同样条件下，NK 细胞体积越小，与肿瘤细胞接触细胞越多，释放的粒酶 B、穿孔素等越多，对肿瘤细胞杀伤力越高，而 IL-2+IL-12、IL-2+IL-18 及 IL-2+IL-12+IL-18 培养的 NK 细胞的体积较大，在显微镜下可观察其活动能力较低，故对肿瘤细胞杀伤力低。其次，IL-12 及 IL-18 可显著提高 NK 细胞表面抑制受体 (KIRs)，KIRs 升高时，可以抑制对肿瘤细胞杀伤力<sup>[14-15]</sup>。再次，IL-2+IL-12、IL-2+IL-18 及 IL-2+IL-12+IL-18 培养的 NK 细胞分泌的 IFN $\gamma$  主要通过诱导肿瘤细胞凋亡的途径，在 4 h 内并没有完全诱发肿瘤细胞凋亡有关，因此，即使其分泌的 IFN $\gamma$  较高也可能未在较短时间内诱发肿瘤细胞凋亡。

综上所述，在应用 IL-2、IL-2+IL-12、IL-2+IL-18 及 IL-2+IL-12+IL-18 培养的 NK 细胞，具有不同细胞因子分泌量和对肿瘤细胞不同杀伤能力，因此，对肿瘤作用效果如何，如何优化选择不同细胞因子活化的 NK 细胞，有待进一步研究并应用于临床。

### 参考文献:

- [1] Goding S, Yang Q, Mi Z, et al. Targeting of products of genes to tumor sites using adoptively transferred A-NK and T-LAK cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14: 441-450.
- [2] Ljunggren HG, Karre K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition[J]. *Immunol Today*, 1990, 11(7): 237-244.
- [3] Basse P, Goldfarb RH. Localization of immune effector cells to tumor metastases[J]. *Immunol*, 1994, 61: 149-158.
- [4] Basse P, Goldfarb RH, Herberman RB, et al. Accumulation of adoptively transferred A-NK cells in murine metastases: kinetics and role of interleukin-2[J]. *In Vivo*, 1994, 8(1): 17-24.
- [5] Yang Q, Hokland ME, Bryant JL, et al. Tumor-localization by adoptively transferred, interleukin-2-activated NK cells leads to destruction of well-established lung metastases[J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(4): 512-519.
- [6] Lauwerys BR, Garot N, Renaud JC, et al. Cytokine production and killer activity of NK/T-cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18[J]. *J Immunol*, 2000, 165(4): 1847-1853.
- [7] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3: 133-146.
- [8] Brilot F, Strowig T, Munz C. NK cells interactions with dendritic cells shape innate and adaptive immunity[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 6443-6454.
- [9] De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, et al. The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation[J]. *J Immunol*, 2010, 185(11): 6679-6688.
- [10] Chaix J, Tessmer MS, Hoebe K, et al. Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18[J]. *J Immunol*, 2008, 181(3): 1627-1631.
- [11] Huang Y, Lei Y, Zhang H, et al. Day 10 a role of interleukin-18 in human natural killer cell is associated with interleukin-2[J]. *Mol Immunol*, 2010, 47(16): 2604-2610.
- [12] Agaogué S, Marcanaro E, Ferranti B, et al. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells[J]. *Blood*, 2008, 112(5): 1776-1783.
- [13] Kannan Y, Yu J, Raices RM, et al.  $\kappa B\delta$  augments IL-12- and IL-18-mediated IFN- $\gamma$  production in human NK cells[J]. *Blood*, 2011, 117(10): 2855-2863.
- [14] Chrul S, Polakowska E, Szadkowska A, et al. Influence of interleukin IL-2 and IL-12 + IL-18 on surface expression of immunoglobulin-like receptors KIR2DL1, KIR2DL2, and KIR3DL2 in natural killer cells[J]. *Mediators of Inflammation*, 2006: 1-6.
- [15] Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions[J]. *Biofactors*, 2010, 36(4): 274-288.