

· 基础研究 ·

# 联合应用 NK 细胞及 CTL 对黑色素瘤 B16 细胞的影响

余少鸿<sup>1</sup>, 汤荣春<sup>1</sup>, Per H Basse<sup>2</sup>

(1. 云南省昆明市第一人民医院普外科 650011; 2. 美国匹兹堡大学肿瘤中心, 宾夕法尼亚州匹兹堡 15213-1863)

**摘要:**目的 探讨联合应用自然杀伤(NK)细胞及细胞毒 T 细胞(CTL)对黑色素瘤 B16 细胞的作用。方法 提取 NK 细胞及 CTL, 分别用白细胞介素-2(IL-2)(6 000、600 IU/L)及植物血凝素(8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )活化, 流式细胞仪检测细胞表面受体, 将 NK 细胞及 CTL 互为靶细胞及效应细胞进行细胞毒性实验; 以黑色素瘤 B16 细胞为靶细胞检测 CTL 的杀伤率。结果 NK 细胞表面受体 NK1.1<sup>+</sup> 的百分比在 87% 以上, NKp46<sup>+</sup> 在 90% 以上; CTL 表面受体 CD3<sup>+</sup> 的百分比在 99% 以上, CD8<sup>+</sup> 在 98% 以上。NK 细胞与 CTL 相互无细胞毒性, 联合应用 NK 细胞与 CTL 明显增加对黑色素瘤 B16 细胞的杀伤作用。结论 联合应用 NK 细胞及 CTL 对黑色素瘤 B16 细胞有协同杀伤作用。

**关键词:**黑色素瘤, 实验性; T 淋巴细胞, 细胞毒性; 自然杀伤细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.09.017

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)09-0878-03

## Effects of combination of NK cells and CTL on B16 melanoma cells

Yu Shaohong<sup>1</sup>, Tang Rongchun<sup>1</sup>, Per H Basse<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, the First People's Hospital of Kunming, Kunming, Yunnan 650011, China;

2. University of Pittsburgh Cancer Center, Pittsburgh, Pennsylvania 15213-1863, USA)

**Abstract: Objective** To explore the effects of combination of natural killer(NK) cells and cytotoxic T lymphocyte(CTL) on B16 melanoma cells. **Methods** NK cells and CTL were extracted, and activated with interleukin-2(IL-2) (6 000 IU/L), IL-2 (600 IU/L) and phytohaemagglutinin(8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), respectively. Flow cytometry was employed to detect the cellular surface receptors. NK cells and CTL were served as target and effector cells each other, respectively, and the cytotoxicity experiments were conducted. B16 melanoma cells were used as target cells to assay the killing rate of CTL. **Results** The percentage of NK cellular surface receptor NK1.1<sup>+</sup> was more than 87%, and that of NKp46<sup>+</sup> was more than 90%. The percentage of CTL surface receptor CD3<sup>+</sup> was more than 99%, and that of CD8<sup>+</sup> was more than 98%. NK cells and CTL showed no mutual cytotoxicity, and combination of NK cells and CTL significantly increased the killing effects on B16 melanoma cells. **Conclusion** Combination of NK cells and CTL possesses synergistic killing effect on melanoma cells.

**Key words:** melanoma, experimental; T-lymphocytes, cytotoxic; natural killer cells

细胞免疫在肿瘤免疫中发挥重要的作用, 其中, 自然杀伤(natural killer, NK)细胞及细胞毒 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)是体内主要的免疫细胞<sup>[1]</sup>。研究表明, 白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)及血凝素激活的 CTL 体外能有效破坏肿瘤细胞<sup>[2]</sup>。CTL 能够识别结合主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) I 类抗原及来源于小鼠和人类多种肿瘤细胞的多肽抗原。临床及动物实验表明, MHC I 类抗原限制性导致 CTL 不能有效杀灭肿瘤细胞。下调肿瘤细胞表面人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)是肿瘤细胞逃避 CTL 攻击的重要原因之一<sup>[3]</sup>。研究表明 MHC I 类抗原部分或全部缺失是黑色素瘤对 CTL 不敏感的因素之一<sup>[4-5]</sup>。

NK 细胞表达自杀相关因子配体(factor associated suicide ligand, FasL)、颗粒酶 B(granzyme B, GzmB)及穿孔素(perforin)。NK1.1、NKp30、NKp44、NKp46 活化时表达活化性受体 NKG2D(natural-killer group 2, member D), 同时, NK 细胞分泌大量细胞因子[如肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-12 及干扰素  $\alpha$ (interferon  $\alpha$ , IFN- $\alpha$ )], 通过 Fas-FasL、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)、NKG2D-主要组织相容性

复合体-I 类分子链相关蛋白 A(major histocompatibility complex class I chain-related protein A, MICA)等途径, 抑制肿瘤细胞增殖及分化, 促进肿瘤细胞凋亡。研究表明, NK 细胞可直接杀伤血液循环的肿瘤细胞及肿瘤组织<sup>[6]</sup>, 并且对黑色素肺转移也有抑制作用<sup>[7-8]</sup>。细胞因子 IL-2 可调节其杀伤及分泌功能<sup>[9]</sup>。NK 细胞可识别靶细胞“非己”性改变, 能够识别无 MHC 表达或 MHC 低表达的肿瘤细胞, 有利于靶向定位于肿瘤及转移部位<sup>[10]</sup>, 而 CTL 能够识别结合 MHC I 类抗原的肿瘤细胞, 因此, 推测联合应用 NK 细胞及 CTL 可提高对肿瘤细胞的抑制作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物及肿瘤细胞培养** C57BL/6 雌性裸鼠购自 Jackson 实验室, 匹兹堡大学肿瘤中心无菌环境饲养, 8~12 周龄。黑色素瘤 B16 细胞为匹兹堡大学肿瘤中心实验室保存培养, 于 RPMI 1640 培养基(含 10% 灭活小牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、0.8 g/L 链霉素及  $1.6 \times 10^5$  U/L 青霉素)中常规培养。

**1.2 NK 细胞及 CTL 的分离培养、纯化及表面受体检测** 断颈处死 C57BL/6 裸鼠, 取脾脏磨碎, 离心 5 min(离心半径 8 cm, 1 200 r/min), 溶解红细胞 3 min, 再离心、过滤, 制成脾单细胞悬液, 计数, 置于 T75 培养瓶中, 并加入 25 mL 细胞条件

培养基及 6 000 IU/mL IL-2(美国 Dynal Biotech 公司)培养。2 d 后,用抗白细胞分化抗原(cluster of differentiation, CD)3 抗体磁珠纯化,敲除 T 细胞,制成 NK 细胞;再加入 6 000 IU/mL IL-2(美国 Chiron Corporation 公司)培养 2~3 d 后,制得活化 NK (adherent NK, A-NK) 细胞。收获细胞,将每管 0.5 mol/L 细胞离心、取沉淀、混匀,分别加入抗体 NK1.1、NKp46、CD3、CD4 及 CD8,采用流式细胞仪(FACS)检测其表面受体。脾单细胞悬液的制备同上,加入 8 μg/mL 植物血凝素(美国 DIFCO 公司)及 600 IU/mL IL-2 进行培养。2 d 后,可见大量细胞聚集成团,静置 5~7 min,小心吸弃上清液,即可获得细胞团块,再加入 600 IU/mL IL-2 培养 2 d,即可制得 CTL。

**1.3 NK 细胞及 CTL 功能的检测** 将 <sup>51</sup>Cr 溶液与靶细胞(NK 细胞或 CTL)混合,于 37 °C 培养 1 h 左右,洗去游离 <sup>51</sup>Cr 后,即可得到 <sup>51</sup>Cr 标记的靶细胞。收集 CTL 或 NK 细胞为效益细胞,将待检细胞毒性的细胞与 <sup>51</sup>Cr 标记的靶细胞混合 4 h,用 γ 射线测量仪检测上清液的放射性每分钟计数(counts per minute, CPM)值,根据公式即可计算出 NK 细胞及 CTL 的杀伤率。特异性细胞杀伤率(%)=(特异性释放 CPM 值-自发性释放 CPM 值)÷(最大量释放 CPM 值-自发性释放 CPM 值)×100%

**1.4 NK 细胞及 CTL 体外对黑色素瘤细胞作用的检测** 设立对照组,收集 NK 细胞和 CTL,计数并调整细胞,使 NK 细胞与 B16 细胞比值从 10 : 1 稀释至 0.312 : 1,CTL 细胞与 B16 细胞比值从 200 : 1 稀释至 3.12 : 1,分别用 <sup>51</sup>Cr 标记靶细胞,使这 2 种靶细胞 1 : 1 混合后,轻轻旋转 96 孔板(使细胞紧密接触),37 °C 孵育 4 h。即可检测上清液 CPM 值,计算待检细胞的杀伤率。特异性肿瘤细胞杀伤率(%)=(特异性释放 CPM 值-自发性释放 CPM 值)÷(最大量释放 CPM 值-自发性释放 CPM 值)×100%

**2 结 果**

NK 细胞及 CTL 的形态、大小均匀,NK 细胞表面受体 NK1.1<sup>+</sup> 的百分比在 87% 以上,NKp46<sup>+</sup> 在 90% 以上;CTL 表面受体 CD3<sup>+</sup> 的百分比在 99% 以上,CD8<sup>+</sup> 在 98% 以上,见图 1~3。NK 细胞、CTL 相互无细胞毒性,见图 4、5。联合应用 NK 细胞与 CTL 对 B16 细胞的杀伤活性见图 6。

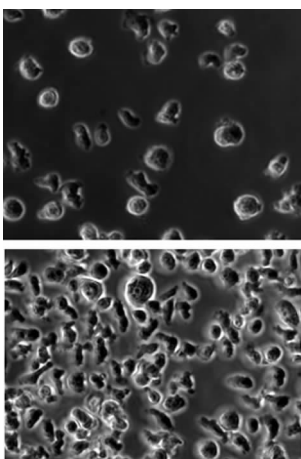
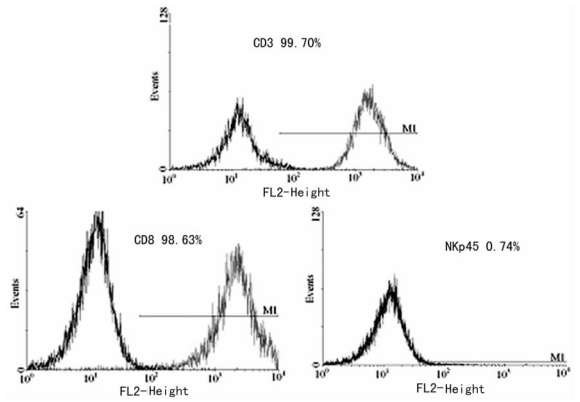
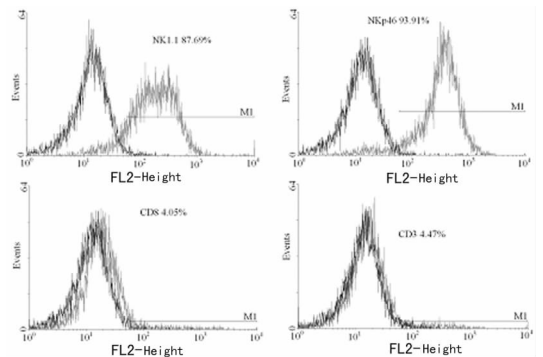


图 1 NK 细胞(上)及 CTL(下)的形态表现(倒置相差显微镜 ×200)



上:CD3;左下:CD8;右下:NKp46。

图 2 CTL 细胞表面受体的表达情况(流式细胞术)



左上:NK1.1;右上:NKp46;左下:CD8;右下:CD3。

图 3 NK 细胞表面受体的表达(流式细胞术)

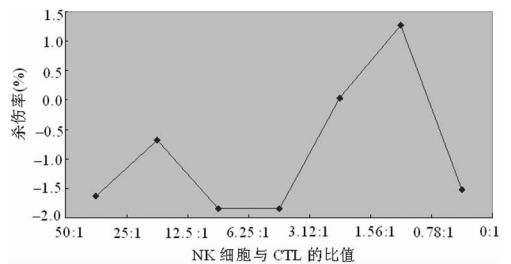


图 4 NK 细胞与 CTL 相互的细胞毒性(4 h)

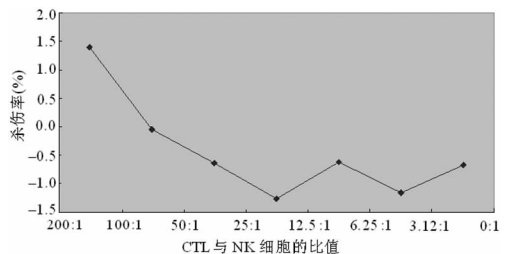


图 5 CTL 与 NK 细胞相互的细胞毒性(4 h)

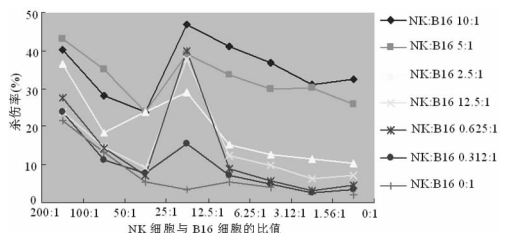


图 6 NK 细胞与 CTL 对 B16 细胞的杀伤活性

### 3 讨 论

研究证实体内活化 NK 细胞及 CTL 均需要 IL-2 维持, IL-2 是激发细胞因子(如 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ )级联反应的关键因素,活化的 NK 细胞及 CTL 均有较高的细胞活性及较高的纯化度<sup>[8]</sup>,同时,也可应用其他细胞因子如 IL-12、IL-18 活化 NK 细胞,以 IL-2 活化的 NK 细胞对肿瘤细胞杀伤力较强<sup>[11-12]</sup>。为进一步研究 NK 细胞与 CTL 是否具有协同作用,首先要了解 NK 细胞与 CTL 之间是否能互相杀伤,如果两者之间互相杀灭,那么就不能联合应用这两种细胞共同作用于肿瘤细胞,本研究表明,这两种细胞并不相互作用,因此,可同时应用 NK 细胞与 CTL 作用于肿瘤细胞。研究表明 NK 细胞与 CTL 混合后对恶性黑色素瘤细胞具有叠加作用,在 CTL 与 B16 细胞数之比为 25 : 1 时,CTL 与 NK 细胞存在协同作用。CTL 单独应用,CTL 与肿瘤细胞数之比为 200 : 1 时,其杀伤肿瘤细胞效率为 21.57%;CTL 与肿瘤细胞数之比为 10 : 1 时,其杀伤肿瘤细胞效率为 32.43%。当 NK 细胞与 B16 细胞数之比为 10 : 1,CTL 与 B16 细胞数之比为 25 : 1 时,两种细胞对肿瘤细胞杀伤率为 46.72%,具有明显协同作用。其机制可能在于 CTL 能够识别并结合 MHC I 类抗原。MHC I 类抗原的限制性导致 CTL 不能有效杀灭肿瘤细胞<sup>[13]</sup>。但是,NK 细胞可识别靶细胞“非己性”改变,能够识别无 MHC 表达或 MHC 低表达的肿瘤细胞,因此,同时应用这两种细胞可协同杀伤肿瘤细胞,有研究表明,IFN- $\gamma$  在这种协同作用中发挥关键作用<sup>[14-15]</sup>,为进一步联合应用 NK 细胞及 CTL 治疗及预防肿瘤复发提供理论基础。

### 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(5): 441-450.

[2] Bullock TN, Mullins DW, Colella TA, et al. Manipulation of avidity to improve effectiveness of adoptively transferred CD8(+) T cells for melanoma immunotherapy in human MHC class I-transgenic mice [J]. *J Immunol*, 2001, 167(10): 5824-5831.

[3] Aptsiauri N, Cabrera T, Mendez R, et al. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 601: 123-131.

[4] Méndez R, Ruiz-Cabello F, Rodríguez T, et al. Identification of different tumor escape mechanisms in several metastases from a melanoma patient undergoing immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(1): 88-94.

[5] Kjaergaard J, Hokland M, Nannmark U, et al. Infiltration patterns of short- and long-term cultured A-NK and T-LAK cells following adoptive immunotherapy[J]. *Scand J Immunol*, 1998, 47(6): 532-540.

[6] Basse P, Goldfarb RH. Localization of immune effector cells to tumor metastases[J]. *Immunol Ser*, 1994, 61: 149-158.

[7] Basse PH, 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.

[8] 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.

[9] Lauwerys BR, Garot N, Renauld JC, et al. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18 [J]. *J Immunol*, 2000, 165(4): 1847-1853.

[10] Ljunggren HG, Kärre K. In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition [J]. *Immunol Today*, 1990, 11(7): 237-244.

[11] 余少鸿, 汤荣春, 温小明, 等. 不同细胞因子活化的 NK 细胞形态及功能的研究 [J]. *重庆医学*, 2011, 40(21): 2099-2101.

[12] Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions [J]. *Biofactors*, 2010, 36(4): 274-288.

[13] Bullock TN, Mullins DW, Colella TA, et al. Manipulation of avidity to improve effectiveness of adoptively transferred CD8(+) T cells for melanoma immunotherapy in human MHC class I-transgenic mice [J]. *Immunol*, 2001, 167(10): 5824-5831.

[14] Tsai L, Ohlén C, Ljunggren HG, et al. Effect of IFN-gamma treatment and in vivo passage of murine tumor cell lines on their sensitivity to lymphokine-activated killer (LAK) cell lysis in vitro; association with H-2 expression on the target cells [J]. *Int J Cancer*, 1989, 44(4): 669-674.

[15] Proper DJ, Chao D, Braybrooke JP, et al. Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(1): 84-92.

(收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2012-01-22)

**启事: 本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道, 欢迎投稿。**