

· 论 著 ·

NK 细胞上清液提高 CTL 细胞对肿瘤细胞杀伤力及机制的研究

余少鸿¹, 汤荣春¹, Per H Basse²

(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, 匹兹堡 PA 15213-1863)

摘要:目的 研究从白细胞介素 2(IL-2)、IL-2+IL-12、IL-2+IL-18、IL-2+IL-12+IL-18 活化的 NK 细胞提取的上清液是否能提高细胞毒性 T 细胞(CTL)对黑色素瘤细胞的杀伤率及其机制。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 后提取上清液, 与 M05 细胞培养过夜, 流式细胞仪检测肿瘤细胞表面 I 类组织相容性抗原(MHC I)表达, 以其为靶细胞检测 CTL 细胞对 M05 细胞杀伤率。结果 NK 细胞上清液提高 M05 细胞表面 MHC I 分子表达及 CTL 细胞对 M05 细胞杀伤率。结论 NK 细胞上清液能够增强 CTL 对肿瘤细胞的杀伤作用。

关键词:自然杀伤细胞; 白细胞介素 12; 白细胞介素 18; 组织相容性抗原 I 类; 黑色素瘤细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.21.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)21-2136-03

Supernatants from different cytokines activated natural killer cells enhance CTL cells lysing tumor cells capability

Yu Shaohong¹, Tan Rongchun¹, Per H Basse²

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

2. University of Pittsburgh Cancer Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh PA 15213-1863, USA)

Abstract: Objective To investigate whether supernatants from activated NK cells endows T cells on melanoma cells function.

Methods Natural killer(NK) cells were cultured and activated with IL-12, IL-18, and both with IL-2, 3 days later take out supernatants, then culture with M05 tumor cells overnight, then check MHC class I (H-2K^b) expression, and as targets for phytohemagglutinin and IL-2 activated killer T (CTL) cells for cytotoxic assay. **Results** These supernatants increase M05 cells MHC class I expression, and CTL cells to M05 cells cytotoxicity. **Conclusion** Supernatants from NK cells will induce increased MHC expression on target cells and will enhance CTL functionality.

Key words: natural killer cells; interleukin-12; interleukin-18; hisptocompatibility antigens class I; melanoma cells

细胞免疫在肿瘤免疫中发挥着重要的作用, 其中自然杀伤细胞(NK 细胞)及细胞毒性 T 细胞(CTL 细胞)是体内主要的免疫细胞^[1]。有研究表明, 组织相容性抗原 I 类(MHC I)限制性导致 CTL 细胞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(HLA)是肿瘤细胞逃逸 CTL 细胞重要原因之一^[2]。MHC I 类抗原部分或全部缺失是黑色素瘤对 CTL 细胞不敏感因素之一^[3-4]。NK 细胞可直接杀伤血液循环的肿瘤细胞及肿瘤组织^[5], 并且对黑色素瘤肺转移细胞也有杀灭作用^[6-8]。细胞因子白细胞介素 2(IL-2)、IL-12 和 IL-18 可增强其杀伤及分泌功能^[9]。因此, 现将本研究 NK 细胞上清液提高 CTL 细胞对肿瘤细胞杀伤力及机制报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与肿瘤细胞 选择匹兹堡大学肿瘤中心 Jackson 实验室无菌环境饲养的 C57BL/6 雌性裸鼠, 8~12 周龄, 体质量 20~30 g; M05 黑色素瘤细胞由 Per H Basse 实验室保存培养, 于 RPMI1640 液中常规培养。

1.2 NK 及 CTL 细胞表型检测 从 C57BL/6 裸鼠提取出脾脏, 磨碎, 使之成单细胞悬液; 1 200 r/min, 离心 5 min; 溶解红细胞 3 min, 再离心, 过滤, 制成脾细胞悬液。计数, T75 培养瓶中加入 25 mL 培养液及 6 000 IU/mL IL-2 培养。2 d 后, 用抗 CD3 抗体磁珠(Dynal Biotech, Lake Success, NY, USA)法纯化, 敲除 T 细胞, 制成 NK 细胞, 再加入 6 000 IU/mL IL-2 培养 2~3 d 后, 制得活化的 NK 细胞。收获细胞, 把每管 0.5×10⁷/mL 细胞离心, 取沉淀, 混匀, 添加抗体 NK 1.1⁺、NKp 46、CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ 各 2 μL, 流式细胞仪(fluorescence activated cell sorter, FACS)检测表型。NK 细胞表型: NKp46>

90%, NK1.1⁺>90%, CD8⁺<2%, CD4⁺<2%。同上提取脾细胞, 加入 8 μg/mL PHA 和 600 IU/mL IL-2 培养。2 d 后, 可见大量细胞聚集成团, 静置 5~7 min, 轻轻抛弃上清液, 即可获得细胞团块, 再加入 600 IU/mL IL-2 培养 2 d 后, 即可制得 CTL 细胞。CTL 细胞表型: CD8⁺>90%, CD3⁺>90%, NK1.1⁺<5%, CD4⁺<2%。NK 细胞在 IL-2, IL-2+IL-12, IL-2+IL-18 或 IL-2+IL-12+IL-18 条件下培养, 提取上清液。同上法准备 NK 细胞, 用抗 CD3 磁珠法纯化, 再加入 6 000 IU/mL IL-2 培养 1 d 后, 加入 IL-12(10 ng/mL)和 IL-18(100 ng/mL)或同时加入 IL-12(10 ng/mL)及 IL-18(100 ng/mL), 再培养 48 h 后, 2 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, -80 °C 冻存备用。

1.3 ELISA 法检测上清液的 IFN γ 含量 将各种细胞因子活化的 NK 细胞上清液分为 4 组, 分别为 NK 上清液, NK+IL-12 上清液, NK+IL-18 上清液, NK+IL-12+IL-18 上清液, 按照说明书应用双抗体夹心 ELISA 法检测 IFN γ , 重复 3 次。

1.4 检测 M05 细胞表面 MHC I (H-2K^b) 表达 收集 M05 细胞, 调整细胞密度为 1×10⁷/mL, 与 NK 细胞在 IL-2, IL-2+IL-12, IL-2+IL-18, IL-2+IL-12+IL-18 条件下提取的上清液 125 μL 孵育过夜。1 d 后, 收获所有肿瘤细胞, 加入 H-2K^b 抗体染色 30 min, PBS 缓冲液洗涤 2 次后, 0.25% 多聚甲醛固定, FACS 计数 5 000 细胞, 检查 MHC I 表达。

1.5 检测 NK 细胞对 CTL 细胞的杀伤率 将⁵¹Cr 溶液与靶细胞[与不同 NK 上清液及干扰素 γ (IFN γ)]10 ng/mL 培养过夜 M05 细胞, 高表达 MHC I 类分子; 或预先用 6 μg/mL IFN γ 抗体与 1:8 NK 细胞上清液及 IFN γ 10 ng/mL 各 1 mL

孵育 30 min 后,再与 NK 上清液培养过夜的 M05 细胞)混合,实验共分为 6 组,分别为 M05 组(阴性对照组),M05+IFN γ 组(阳性对照组),M05+NK 上清液组,M05+NK+IL-12 上清液组,M05+NK+IL-18 上清液组,M05+NK+IL-12+IL-18 上清液组,于 37 $^{\circ}$ C 培养 1 h 左右,洗去游离的 51 Cr 后,即可得到 51 Cr 标记的靶细胞。收集 CTL 细胞,将待检细胞毒性的细胞与 51 Cr 标记的靶细胞混合 4 h(比例约为 200:1),用 γ 射线测量仪检测上清液中的 51 Cr 放射脉冲数(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) \times 100%

1.6 统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,IFN γ 抗体封闭后采用配对设计 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NK 细胞上清液对 M05 细胞表面 MHC I 表达的结果 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,释放大量细胞因子,从 IL-2、IL-2+IL-12、IL-2+IL-18、IL-2+IL-12+IL-18 条件下活化的 NK 细胞提取的上清液,即使稀释浓度为 1:8,也能有效提高 M05 细胞表面 MHC I 表达。加入 6 μ g/mL IFN γ 抗体与 NK 上清液 125 μ L 孵育 30 min,再与肿瘤细胞孵育过夜后,升高的 MHC I 降至正常。见表 1。

表 1 M05 细胞与 1:8 NK 上清液 +/-IFN γ 抗体 MHC 平均荧光强度的表达

组别	未加 IFN γ 抗体	加 IFN γ 抗体后
M05 组	0.39 \pm 0.04	1.00 \pm 0.32
M05+IFN 组	69.29 \pm 4.26 \blacksquare \blacktriangle	0.22 \pm 0.08
M05+NK 上清液组	2.07 \pm 1.12 \blacktriangle	0.66 \pm 0.21
M05+NK+IL-12 上清液组	78.74 \pm 5.40 \blacksquare \blacktriangle	0.94 \pm 0.27
M05+NK+IL-18 上清液组	77.87 \pm 5.62 \blacksquare \blacktriangle	1.75 \pm 0.82
M05+NK+IL-12+18 上清液组	80.76 \pm 6.34 \blacksquare \blacktriangle	27.5 \pm 2.56

: $P<0.05$,与同组 M05 组比较; \blacktriangle : $P<0.05$,与同组加 IFN γ 抗体后比较; \blacksquare : $P<0.05$,与 M05+NK 组比较。

2.2 IL-2、IL-2+IL-12、IL-2+IL-18、IL-2+IL-12+IL-18 活化 NK 细胞分泌的 IFN γ 含量 NK+IL-12 上清液、NK+IL-18 上清液、NK+IL-12+IL-18 上清液的 IFN γ 高于 NK 上清液的 IFN γ 含量($P<0.05$)。见表 2。

表 2 NK 上清液、NK+IL-12 上清液、NK+IL-18 上清液、NK+IL-12+IL-18 上清液的 IFN γ 含量

组别	n	IFN γ (ng/mL)
NK 上清液	3	0.21 \pm 0.01
NK+IL-12 上清液	3	12.52 \pm 0.37 $\#$
NK+IL-18 上清液	3	10.36 \pm 0.23 $\#$
NK+IL-12+IL-18 上清液	3	11.20 \pm 0.28 $\#$

: $P<0.05$,与 NK 上清液比较。

2.3 CTL 细胞对黑色素瘤靶细胞的杀伤活性 M05 黑色素瘤细胞高表达 OVA 抗原及低表达 MHC I 类分子,与 NK 上清液孵育过夜后能提高 M05 细胞表面 MHC I 类分子的表达,CTL 细胞对靶细胞的杀伤活性明显增强($P<0.05$),见图 1。

2.4 CTL 细胞对肿瘤细胞 4 h 的杀伤率 1:8 NK 细胞上清液与 CTL 细胞孵育过夜后,可见与 NK 细胞上清液孵育的

CTL 细胞并不能提高 CTL 细胞对 M05 细胞杀伤率,见图 2。

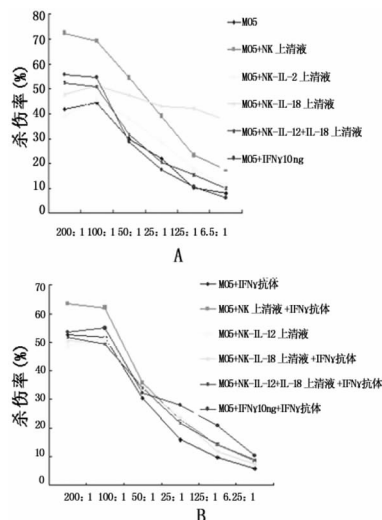


图 1 CTL 对靶细胞 4 h 细胞毒性 (n=3)

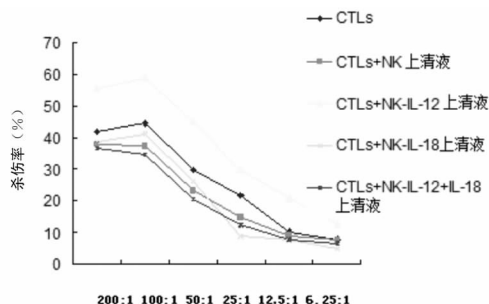


图 2 CTL 细胞对肿瘤细胞 4 h 的杀伤率 (n=3)

3 讨论

本研究证实,体内外活化 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,IL-2 是激发细胞因子如 TNF α 及 IFN γ 级联反应的关键因素。作者资料显示 IL-2、IL-2+IL-12、IL-2+IL-18、IL-2+IL-12+IL-18 条件下培养 NK 细胞在形态及功能上具有明显差异,并且 IL-2+IL-12、IL-2+IL-18、IL-2+IL-12+IL-18 培养 NK 细胞分泌的 IFN γ 比仅用 IL-2 培养 NK 细胞更高,并且,IL-12、IL-18 需要与 IL-2 共同刺激才能使 NK 细胞活化并分泌大量 IFN γ [12]。研究证实,不同细胞因子刺激的 NK 细胞上清液均能提高 M05 细胞 MHC I 类分子的表达,并且只需要 1:8 上清液即可显著提高 M05 细胞 MHC I 表达,其作用机理与 NK 细胞上清液中的 IFN γ 含量有关,抑制 IFN 的表达即可降低肿瘤细胞表面 MHC I 分子。

CTL 细胞在体内能直接破坏黑色素瘤细胞,因此,CTL 细胞已经成为肿瘤免疫的热点之一[13]。本研究结果显示,正常 M05 细胞低表达 MHC I 类分子而高表达 OVA 抗原,因此,CTL 细胞对其杀伤率低,但 M05 细胞与 NK 上清液培养后,提高黑色素瘤细胞表面 MHC I 类分子的表达,从而提高 CTL 细胞对黑色素瘤细胞的杀伤性,这种杀伤作用通过提高黑色素瘤细胞表面 MHC I 类分子的表达而发挥间接作用,为进一步研究联合应用 NK 及 CTL 细胞协调杀伤肿瘤细胞提供良好的理论基础。

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] 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.
- [3] Mendez R, Rodriguez T, Del CA, et al. Characterization of HLA class I altered phenotypes in a panel of human melanoma cell lines[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(5): 719-729.
- [4] Rodriguez T, Méndez R, Roberts CH, et al. High frequency of homozygosity of the HLA region in melanoma cell lines reveals a pattern compatible with extensive loss of heterozygosity[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54(2): 141-148.
- [5] Basse P, Goldfarb RH. Localization of immune effector cells to tumor metastases[J]. *Immunol Ser*, 1994, 61: 149-158.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Tsai L, Ljunggren HG, Hansson M, 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.
- [11] Timothy NJ, Bullock, David W, 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]. *Immunology*, 2001, 167(10): 5824-5831.
- [12] 余少鸿, 汤荣春, 温小明. 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.
- [13] 余少鸿, 汤荣春, Per H Basse. 联合应用 NK 细胞及 CTL 对黑色素瘤 B16 细胞的影响[J]. *重庆医学*, 2012; 41(9): 878-880.

(收稿日期: 2012-01-09 修回日期: 2012-03-06)

(上接第 2135 页)

- et al. Ntravesical therapy for bladder Cancer[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2010, 11(6): 947-958.
- [2] Au JL, Badalament RA, Wientjes MG. Methods to improve efficacy of intravesical mitomycin C: results of a randomized phase III trial[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(1): 597-604.
- [3] Liu Z, Sun XM, Nakayama-Ratchford N, et al. Supramolecular chemistry on water-Soluble Carbon nanotubes for drug loading and delivery[J]. *ACS Nano*, 2007, 1(1): 50-56.
- [4] Feazell RP, Nakayama-Ratchford N, Dai HJ, et al. Soluble single-walled Carbon nanotubes as longboat delivery systems for Platinum(IV) anticancer drug design[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(27): 8438-8439.
- [5] Liu HT, He J, Jy T, et al. Translocation of Single-Stranded DNA through Single-Walled Carbon nanotubes[J]. *Science*, 2010, 327(2): 64-67.
- [6] Shawn MC, William M. Shih; from the cover: DNA-nanotube-induced alignment of membrane proteins for NMR structure determination[J]. *PNAS*, 2007, 104(6): 6644-6648.
- [7] Jy C, Chen SY, Zhao XR, et al. Unfunctionalized single-walled Carbon nanotubes as rationally designed vehicles for tumor-targeted drug delivery [J]. *JACS*, 2008, 130(6): 16778-16785.
- [8] Muller J, Delos M, Panin N, et al. Absence of carcinogenic response to multiwall Carbon nanotubes in a 2-Year bioassay in the peritoneal cavity of the rat[J]. *Toxicol Sci*, 2009, 110(7): 442-448.
- [9] Liu Z, Cai W, He L. In vivo biodistribution and highly efficient tumor targeting of Carbon nanotubes in mice[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(5): 47-52.
- [10] Liu Z, Chen K, Davis C, et al. Drug delivery with Carbon nanotubes for in vivo Cancer treatment[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(16): 6652-6660.
- [11] Liu Z, Davis C, Cai W, et al. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled Carbon nanotubes in mice probed by raman spectroscopy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(93): 1410-1415.
- [12] 张兴源, 蔡元坤. 纳米载体在胃癌淋巴靶向化疗中的应用研究[J]. *国际外科学杂志*, 2010, 8(6): 862-866.
- [13] 华正豪, 蔡松晏, 黄广建. 载阿霉素纳米活性炭行淋巴化治疗的实验观察[J]. *中华医学杂志*, 2008, 32(16): 325-329.
- [14] 张李. 纳米活性炭的特性及其在胃癌治疗中的应用[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2007, 34(1): 52-55.
- [15] Miyawaki J, Masako Y, Takeshi A, et al. Toxicity of single-walled Carbon nanohorns[J]. *ACS Nano*, 2008, 2(2): 213-226.

(收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-04-26)