

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.05.003

IL-15 上调 NKG2D 表达对 CIK 细胞杀伤活性的增强效应

梅家转, 刘桂举, 李瑞君, 栗敏, 张晓娟

Enhancement of Cytotoxicity against IL-15 Up-regulate NKG2D Expression on Cytokine-induced Killer Cells

MEI Jia-zhuan, LIU Gui-ju, LI Rui-jun, LI Min, ZHANG Xiao-juan

Department of Oncology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Abstract: Objective To analyse the effects of IL-15 on the expression of NKG2D and the cytotoxicity of cytokine-induced killer (CIK) cells against human esophagus carcinoma cell EC9706 *in vitro*. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy donors then divided into two groups: the control group (cells were cultured in the presence of IFN- γ , anti-CD3 antibody and IL-2) and IL-15 group (cells were cultured in the presence of IFN- γ , anti-CD3 antibody, IL-2 and 10 ng/ml IL-15). Phenotypic characteristics of CIK cells and the expression of NKG2D were analyzed by flow cytometry. After 14 days culture, cytotoxicity of CIK cells against EC9706 cells was measured by using a standard LDH releasing assay. Effector cells were added to target cells at E:T ratios of 20:1, 30:1. In blocking experiments, NKG2D monoclonal antibody was added to CIK cells for 15 min before plating at 30:1 E:T ratio. **Results** NKG2D molecules were significantly up-regulated during the culture period on CD3⁺ cells (the CIK cells population) and the CD56⁺ cells. The differences of NKG2D expressions were significant between IL-15 group and the control group ($P < 0.05$). Cytotoxicity of CIK cells treated by the IL-15 group was higher than that of the control group, both at 20:1 E:T ratios and at 30:1 E:T ratios ($P < 0.05$). When the NKG2D molecules on CIK cell ular membrane were blocked by the NKG2D monoclonal antibody, the cytolytic activity in the control group cells and IL-15 group cells was significantly inhibited. **Conclusion** IL-15 up-regulated the expression of NKG2D on CIK cells, which enhanced the NKG2D mediated cytotoxicity against EC9706 cells. CIK cells played a role through the NKG2D molecules.

Key words: Cytokine-induced killer cells; NKG2D; Esophagus Carcinoma; Cell therapy; IL-15

摘要:目的 观察 IL-15 对细胞因子诱导的杀伤细胞(Cytokine-induced killer cells, CIK)NKG2D 受体表达及其对食管癌 EC9706 细胞杀伤活性的影响。**方法** 体外分离外周血单个核细胞,分为两组。对照组:干扰素- γ 、白细胞介素-2、CD3 单抗诱导培养 CIK 细胞。IL-15 组:加用 IL-15 培养。流式细胞仪检测细胞免疫表型及 CD3⁺ 细胞、CD56⁺ 细胞表面 NKG2D 的表达,LDH 法测定第 14 天细胞在效靶比 20:1、30:1 时对 EC9706 细胞的杀伤活性;效靶比 30:1 时,观察 NKG2D 单抗封闭细胞表面 NKG2D 分子后对两组细胞杀伤活性的影响。**结果** 随着培养时间的延长,CIK 群体细胞及 CD56⁺ 细胞表面 NKG2D 表达逐渐增强,IL-15 组与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);效靶比 20:1、30:1 时,IL-15 组细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性均较对照组明显增强,差异均有统计学意义($P < 0.05$);效靶比 30:1 时 NKG2D 单抗封闭 CIK 细胞表面 NKG2D 分子后,对照组细胞、IL-15 组细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性均较阻断前明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** IL-15 上调 CIK 细胞表面 NKG2D 分子表达,增强 CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性,CIK 细胞通过 NKG2D 发挥作用。

关键词: 细胞因子诱导的杀伤细胞;NKG2D;食管癌;细胞治疗; IL-15

中图分类号:R392.12 文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2011)05-0495-03

收稿日期:2010-09-19;修回日期:2011-01-25

基金项目:郑州市博士创业基金资助项目(郑卫 2009175)

作者单位:450003 郑州,河南省郑州市人民医院肿瘤内科

作者简介:梅家转(1966-),男,博士,主任医师,主要从事恶性肿瘤生物治疗的研究

0 引言

我们的研究^[1]表明食管癌 EC9706 细胞表达 NKG2D 的配体 MICA、ULBP2,CIK 细胞表面表达

NKG2D 受体,且随着培养时间的延长,CIK 细胞表面 NKG2D 的表达率逐渐增强,CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性与 CIK 细胞表达的 NKG2D 受体水平呈正相关。基于我们的研究结果,增强 CIK 细胞 NKG2D 受体的表达有助于提高 CIK 细胞的杀伤活性。IL-15 能上调 NK 细胞表面 NKG2D 的表达,提高 NK 细胞杀伤活性^[2],本研究观察 IL-15 对 CIK 细胞表面 NKG2D 受体的表达及其对 CIK 细胞杀伤 EC9706 细胞活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

基因重组人白细胞介素 2 (IL-2,辽宁卫星生物制品研究所);白细胞介素 15(Peprotech 公司);干扰素- γ (IFN- γ ,上海克隆生物高技术有限公司);淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品有限公司);RPMI 1640 (Gibco 公司);CD3 单抗(ProSpec-Tany TechnoGene 公司); FITC-CD4/PE-CD8/PerCP-CD3、FITC-CD56、PE-CD3、APC-CD3 单抗(e-Bioscience 公司); PE-NKG2D、FITC-IgG1、PE-IgG1、NKG2D 单抗(R&D 公司);流式细胞分析仪(Beckman Coulter EPICS XL, Beckman Coulter 公司); LDH 释放试验试剂盒(Promega 公司);人食管癌 EC9706 细胞株由本实验室冻存。

1.2 方法

1.2.1 CIK 细胞的制备^[3] 在血细胞分离机上用淋巴细胞采集程序单采健康人成分血,经淋巴细胞分离液密度离心,0.9%氯化钠溶液洗涤获得外周血单个核细胞。用 RPMI 1640 液调至起始密度 5.0×10^6 cells/ml。对照组加入 1 000 u/ml 的 IFN- γ ,放置 37 $^{\circ}\text{C}$,5 %CO₂ 培养箱中培养 24 h 后加入浓度为 50 ng/ml 的 CD3mAb、500 u/ml 的 IL-2,以后每 2-3 天添加浓度为 500 u/ml 的 IL-2 新鲜培养液。IL-15 组细胞培养在上述培养条件下,加入 10 ng/ml IL-15。

1.2.2 CIK 细胞表型及 CIK 细胞 NKG2D 受体表达分析 培养第 7、14 天细胞,参照文献^[4],测定 CD3⁺ 细胞、CD56⁺ 细胞表面 NKG2D 的表达率。为减少误差,实验重复 3 次。

1.2.3 CIK 细胞杀伤活性测定 参照文献^[4],采用 4h 乳酸脱氢酶释放测定法,为减少误差,实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

应用 SPSS10.0 软件进行分析,数据均以“平均值 \pm 标准差”表示,两组 CIK 细胞杀伤活性的组间比较、CIK 细胞相关分子表达率组间比较采用独立样本 *t* 检验;抗 NKG2D 单抗阻断实验采用配对样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CIK 细胞表型

CIK 细胞免疫表型见表 1。培养第 14 天,对照组、IL-15 组 CD3⁺ 细胞在 CIK 群体细胞中的比例均在 95%以上,IL-15 组 CD3⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞的比例较对照组增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。随着培养时间的延长,CIK 群体(CD3⁺)细胞及 CD56⁺ 细胞表面 NKG2D 荧光强度逐渐增强,IL-15 组与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.2 CIK 细胞杀伤活性

效靶比 20 : 1 时,对照组、IL-15 组细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性分别为(37.08 \pm 0.62)%、(44.64 \pm 0.82)% ,差异有统计学意义($P < 0.05$) ; 30 : 1 时对照组、IL-15 组细胞杀伤活性分别为(45.73 \pm 0.35)%、(58.57 \pm 0.49)% ,差异有统计学意义($P < 0.05$) ;效靶比 30 : 1 时 NKG2D 单抗封闭 CIK 细胞表面 NKG2D 分子后,对照组细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性为(21.44 \pm 0.94)% ,与阻断前(45.73 \pm 0.35)% 相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。IL-15 组细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性为(22.16 \pm 0.39)% ,与阻断前(58.57 \pm 0.49)% 相比

表 1 第 14 天 CIK 细胞的免疫表型(% , $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Phenotypic characteristics of CIK cells after 14 days culture(% , $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Groups	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁻	CD3 ⁺ CD8 ⁺
Control	95.99 \pm 0.46	2.16 \pm 0.18	31.38 \pm 0.10	64.61 \pm 2.93	75.22 \pm 0.69
IL-15	98.39 \pm 0.21	8.33 \pm 0.05	40.85 \pm 0.38	50.21 \pm 1.36	85.45 \pm 1.00

表 2 第 14 天 CIK 细胞不同亚群表面 NKG2D 表达的相对荧光强度($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 NKG2D expression(relative MFI) of different cell populations after 14 days culture ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Groups	7 d		14 d	
	CD3 ⁺	CD56 ⁺	CD3 ⁺	CD56 ⁺
Control	36.87 \pm 3.97	67.15 \pm 1.60	51.85 \pm 0.56	87.24 \pm 0.94
IL-15	54.10 \pm 3.28	77.24 \pm 0.94	77.44 \pm 1.32	107.39 \pm 5.68

差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。阻断后两组细胞的杀伤活性比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

CIK 细胞是将人的外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子共同培养一段时间后获得的一群异质细胞。本研究表明 CIK 细胞主要为 $CD3^+ CD56^-$ (T) 细胞、 $CD3^+ CD56^+$ (NKT) 细胞、 $CD3^- CD56^+$ (NK) 细胞、 $CD3^+ CD8^+$ T 细胞组成。本研究提示 IL-15 促进了 $CD3^+ CD56^+$ (NKT) 细胞、 $CD3^- CD56^+$ (NK) 细胞和 $CD3^+ CD8^+$ T 细胞扩增。

文献报道^[5] CIK 细胞的杀伤活性主要有 $CD3^+ CD56^+$ 细胞介导,有研究表明^[6-7] IL-15 能通过 NK 细胞和 $CD8^+$ T 细胞抑制肿瘤的生长。结合本研究 IL-15 主要促进了 CIK 群体细胞中 $CD3^+ CD56^+$ 细胞、NK 细胞和 $CD3^+ CD8^+$ T 细胞扩增,因而有助于提高 CIK 细胞的杀伤活性。

NKG2D 是 C 型凝集素受体家族成员,表达在 NK 细胞、NKT 细胞和 $CD8^+$ T 细胞表面^[8],我们的研究表明 CIK 细胞的成分除上述三种细胞外, $CD3^+ CD56^-$ (T) 细胞也是 CIK 细胞的主要成分,该类细胞表面也表达 NKG2D 受体,且随着培养时间的延长,CIK 群体细胞表面及各组分细胞表面 NKG2D 受体的表达亦增强(资料未完全显示),和国外的研究相同^[9-11]。

人 NKG2D 配体主要为 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3^[12],广泛表达于肺癌、乳腺癌、肾癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌等肿瘤组织。CIK 细胞表面的 NKG2D 受体通过与肿瘤细胞表面的相应配体结合,使 CIK 细胞活化,获得攻击靶细胞的能力。我们前期的研究表明^[1] EC9706 细胞表达 NKG2D 的配体 MICA、ULBP2,CIK 细胞具备杀伤 EC9706 细胞的分子基础。

本研究表明 CIK 细胞在效靶比 20 : 1、30 : 1 时对 EC9706 细胞均具有杀伤活性,加用 IL-15 培养进一步增强了 CIK 细胞的杀伤活性。单抗阻断实验表明 NKG2D 单抗抑制了对照组和 IL-15 组细胞对 EC9706 的杀伤活性(下降 50% 以上),说明两组细胞对 EC9706 细胞的杀伤主要通过 NKG2D 发挥作用。

Sutherland 等^[13]通过动物实验证实 IL-15 在体内抗肿瘤效应是通过增强 NKG2D 的表达发挥作用,结合我们的研究,在常规 CIK 细胞培养的基础上加用

IL-15 有望进一步提高 CIK 细胞的抗肿瘤效果。

参考文献:

- [1] 刘桂举,梅家转,栗敏,等. 细胞因子诱导的杀伤细胞免疫表型及其对 EC9706 细胞杀伤活性的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2010, 45(1): 24-27.
- [2] 梅家转,刘桂举,冯睿婷,等. IL-2、IL-15 增强免疫编辑后 NK 细胞 NKG2D 表达及其对鼻咽癌 CNE2 细胞的杀伤活性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(4): 379-382.
- [3] Introna M, Borleri G, Conti E, et al. Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study[J]. Haematologica, 2007, 92(7): 952-959.
- [4] 梅家转,刘桂举,栗敏,等. NKG2D 介导 CIK 细胞对食管癌 EC9706 细胞杀伤作用的体外研究[J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(18): 1036-1038.
- [5] Kim HM, Lim J, Kang JS, et al. Inhibition of human cervical carcinoma growth by cytokine-induced killer cells in nude mouse xenograft model[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(3): 375-380.
- [6] Rowley J, Monie A, Hung CF, et al. Inhibition of tumor growth by NK1.1+ cells and $CD8^+$ T cells activated by IL-15 through receptor β /common γ signaling in trans [J]. J Immunol, 2008, 181(12): 8237-8247.
- [7] Dubois S, Patel HJ, Zhang M, et al. Preassociation of IL-15 with IL-15R α -IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and $CD8^+ / CD44$ high T cells and its antitumor action [J]. J Immunol, 2008, 180(4): 2099-2106.
- [8] Champsaur M, Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses[J]. Immunol Rev, 2010, 235(1): 267-285.
- [9] Introna M, Franceschetti M, Ciocca A, et al. Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 38(9): 621-627.
- [10] Ayello J, van de Ven C, Cairo E, et al. Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from ex vivo expanded and activated cord blood mononuclear cells: implications for adoptive cellular immunotherapy[J]. Exp Hematol, 2009, 37(10): 1216-1229.
- [11] Chan JK, Hamilton CA, Cheung MK, et al. Enhanced killing of primary ovarian cancer by retargeting autologous cytokine-induced killer cells with bispecific antibodies: a preclinical study[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6): 1859-1867.
- [12] Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity [J]. Oncogene, 2008, 27(45): 5944-5958.
- [13] Sutherland CL, Rabinovich B, Chalupny NJ, et al. ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity with enhancement by IL-15[J]. Blood, 2006, 108(4): 1313-1319.

[编辑:黄国玲;校对:周永红]