

放射线照射后 NK-92 细胞对人宫颈癌细胞体外杀伤活性的研究

许恬怡¹, 凌 斌¹, 陈 纲¹, 周 颖¹, 王群华¹, 姚凤球¹, 陈峥峥¹, 赵卫东¹, 田志刚²

In Vitro Cytotoxic Activity of Irradiated NK-92 Cells against Human Cervical Cancer Cells

XU Tian-yi¹, LING Bin¹, CHEN Gang¹, ZHOU Ying¹, WANG Qun-hua¹, YAO Feng-qiu¹, CHEN Zheng-zheng¹, ZHAO Wei-dong¹, TIAN Zhi-gang²

1. Department of Obstetric and Gynecology, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230032, China; 2. School of Life Sciences, University of Science and Technology of China

Abstract: Objective To study in vitro cytotoxic activity of NK-92 cells against human cervical cancer cells and effect of irradiation on NK-92 cytotoxicity. **Methods** NK-92 cells were mixed with ⁵¹Cr-labeled HeLa or K562 cells at different effector-to-target ratios for a 4h ⁵¹Cr-release assay. On the other hand, NK-92 cells were irradiated at 0 and 400 cGy and tested after 2d for cytotoxicity against K562 and HeLa cells. **Results** NK-92 cells (0 cGy) displayed high in vitro cytotoxicity against HeLa with a mean specific lysis of 47% and 50% at 10:1 and 20:1 E:T ratios, while these levels at 1:1 (15%) and 5:1 (33%) E:T ratios were lower; The cytotoxicity of NK-92 against K562 ranged from 33% to 69%. NK-92 cells maintained up to 14%~47% cytotoxicity against HeLa and 30%~60% cytotoxicity against K562 when irradiated with 400cGy after 2d. **Conclusion** In vitro cytotoxic activity of NK-92 cells against HeLa cells is high at suitable E:T ratios, and substantial cytotoxicity can be retained up to irradiation dose of 400cGy.

Key words: Killer cells; Natural/immunology; Tumor cells; Culture

摘 要:目的 研究放射线照射后 NK-92 细胞对人宫颈癌细胞的体外杀伤活性。方法 应用医用电子直线加速器对 NK-92 细胞进行照射处理(0、400cGy)后,以体外培养人宫颈癌细胞系 HeLa 为靶细胞,以 NK-92 的敏感细胞株 K562 作为对照,应用 4h⁵¹Cr 释放法检测不同效靶比情况下 NK-92 细胞的杀伤活性。结果 NK-92 细胞 0 cGy 照射组,效靶比较低时(1:1、5:1)对 HeLa 细胞杀伤率为 15%~33%,随效靶比升高,杀伤率随之上升,10:1 时杀伤率显著上升为 47%,20:1 时杀伤率仅上升了 3%;对于 K562 细胞,杀伤率为 33%~69%。400cGy 组照射后 2d, NK-92 细胞对 HeLa 细胞不同效靶比的杀伤率与 0cGy 组相比稍有降低,其总体杀伤率为 14%~47%,对 K562 细胞杀伤范围在 30%~60%之间。结论 放射线照射后的 NK-92 细胞对人宫颈癌 HeLa 细胞系具有一定的杀伤活性。

关键词:杀伤细胞;天然/免疫学;肿瘤细胞;培养

中图分类号:R737.33;R730.55 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)06-0357-03

0 引言

NK-92 细胞是 Gong 等在 1992 年从非霍奇金淋巴瘤患者的外周血淋巴细胞中分离出来,并建系成功的一种依赖 IL-2 自然杀伤(natural killer, NK)细胞系,具有与人 NK 细胞相似的表面分子特征和功能特点^[1]。近年来的研究资料表明,对不同肿瘤来源的细胞系,如白血病、淋巴瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌等, NK-92 细胞都表现出高效的杀伤活性。此外在免疫缺陷(SCID)鼠的人急

性髓性白血病模型和恶性黑色素瘤及卵巢癌模型中也表现出良好的抑瘤活性^[2-6]。但是对于宫颈癌的研究未见报道。本研究旨在探讨放射线照射后 NK-92 细胞对人宫颈癌细胞系 HeLa 的体外杀伤活性,为治疗宫颈癌寻求一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料 HeLa 细胞(购自中科院上海细胞所), NK-92 和 K562 细胞(中国科学技术大学免疫学研究所提供), -MEM 培养基和 RPMI-1640 培养基(美国 GIBCO 公司), 超级新生牛血清(杭州四季青公司), 供体马血清(美国 Hyclone 公司), 重组人白细胞介素 3/2 (rh-IL-2, 卫生部长春生物制品研究

收稿日期:2005-01-11;修回日期:2005-02-24

基金项目:国家 863 计划资助课题(2002AA216151)

作者单位:1. 230032 合肥,安徽医科大学附属省立医院妇产科;2. 中国科学技术大学生命科学院

所),胰蛋白酶 1 250 (Amresco 公司), Na₂⁵¹CrO₄ (PerkinElmer 公司), TritonX-100 (美国 Sigma 公司), 射线计数器(中国科技大学中佳公司), 医用电子直线加速器(德国西门子公司,型号 PrimusM)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 NK-92 细胞培养于 -MEM 完全培养基(12.5%热灭活新生牛血清、12.5%马血清、100U/mL rhIL-2), HeLa 和 K562 细胞培养于 RPMI1640 完全培养基(10%热灭活新生牛血清), 置于 37℃, 5%CO₂ 孵箱中培养, 根据细胞生长状态换液传代。其中 HeLa 细胞是贴壁细胞, 传代及试验前需用 0.25%胰蛋白酶溶液消化。

1.2.2 照射 NK-92 细胞 收集、洗涤 NK-92 细胞, 重悬于 -MEM 完全培养基, 分装于 15mL 离心管, 应用医用电子直线加速器(6MV X 射线)在室温下照射, 照射剂量为 0、400cGy, 剂量率为 200cGy/min。照后细胞洗涤、重悬于含 -MEM 完全培养基的培养瓶中, 置于 37℃, 5%CO₂ 孵箱中培养, 部分细胞培养 48h 用于细胞杀伤试验, 部分细胞用于细胞计数了解其生存情况。

1.2.3 血细胞计数板直接计数法 血细胞计数板和盖玻片用 75%乙醇擦净, 干燥后将盖玻片放在计数板上, 收集细胞, 微量加样器吸取 10μL 细胞悬液, 于计数板上盖玻片一端将液体注入其下方的计数室内, 如果细胞数多于 50~100/格, 应稀释; 静置 1min, 显微镜下观察并计算出四角大格内的细胞数, 将计数结果按以下公式计算出细胞密度: 细胞数/mL = 4 大格细胞总数 / 4 × 10⁴ × 稀释倍数

1.2.4 细胞杀伤试验 采用 4h⁵¹Cr 释放法^[7]。收集处于对数生长期的细胞, 根据实验需要确定靶细胞(HeLa 和 K562) 数目, 每 10⁵ 靶细胞加入 3.7 × 10⁵ Bq Na₂⁵¹CrO₄, 置于 37℃, 5%CO₂ 孵箱中孵育标记 1h, 标记过程中每 15min 混匀 1 次。标记结束后再用完全培养基洗涤靶细胞 3 次, 在 96 孔圆底板上每孔加入 10⁴ 个靶细胞, 根据效靶比(1:1、5:1、10:1、20:1) 加入相应数量效应细胞 NK-92, 并设立自然释放组(加入完全培养基)和最大释放组(加入终浓度为 1%的 TritonX-100), 每孔终体积 200μL, 每组 4 个平行孔, 置于 37℃, 5%CO₂ 孵箱中培养 4h, 离心后每孔吸取 100μL 上清, 加入放免管中, 用射线计数器检测。每次试验要求自然释放组 cpm 值 < 25%最大释放组 cpm 值。按下列公式计算杀伤活性: 细胞杀伤活性 (%) = $\frac{\text{实验组 cpm 值} - \text{自然释放组 cpm 值}}{\text{最大释放组 cpm 值} - \text{自然释放组 cpm 值}} \times 100\%$

1.2.5 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 Excel 2003 的 t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 NK-92 细胞(0 cGy 照射) 对 HeLa 和 K562 细胞的杀伤活性 对于 HeLa 细胞的杀伤试验, 数据显示, 效靶比较低时(1:1、5:1) 杀伤率为 15%~33%, 随效靶比升高, 杀伤率随之上升, 10:1 时杀伤率为 47%, 20:1 杀伤率仅上升 3%。效靶比为 5:1 和 10:1 两组之间的杀伤率差异有显著性 (P < 0.05), 而 10:1 和 20:1 两组之间的杀伤率差异无显著性 (P > 0.05), 提示 NK-92 细胞对 HeLa 细胞合适的效靶比为 10:1 左右, 继续提高 NK-92 细胞的浓度并不能显著提高其杀伤效应。NK-92 细胞对 K562 细胞的杀伤率为 33%~69%, 见图 1。

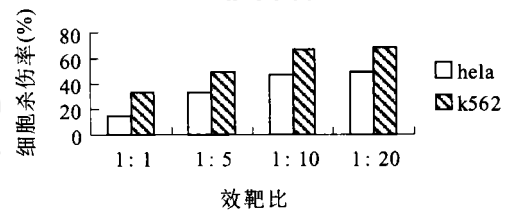


图 1 不同效靶比 NK-92 细胞对 K562 和 HeLa 细胞的杀伤率

2.2 照射后 NK-92 细胞生存情况 照射后(0、400cGy) NK-92 细胞每日计数, 与初始细胞数相比, 0cGy 组细胞呈指数增长, 而 400cGy 组细胞进行性下降, 照射后第 5 天仅有 9% 细胞存活, 见图 2。

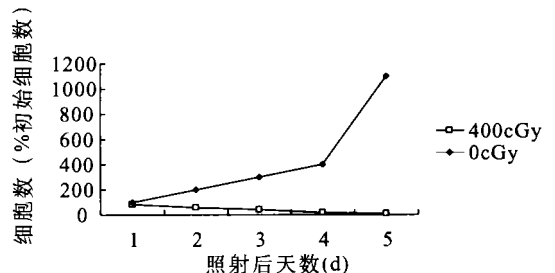


图 2 照射后 NK-92 细胞生存情况

2.3 照射后 NK-92 细胞对 HeLa 细胞杀伤活性变化 NK-92 细胞经照射(0、400cGy) 后继续培养 2 天, 对 HeLa 细胞杀伤结果显示, 与 0cGy 组相比, 400cGy 组 NK-92 细胞在不同效靶比时的杀伤率稍有降低, 随效靶比升高, 杀伤率有所上升, 总体杀伤率为 14%~47%; 对 K562 细胞杀伤试验表现出类似的结果, 与 0cGy 组相比, 400cGy 组 NK-92 细胞在不同效靶比时的杀伤率均有所降低, 总体杀伤率仍有 30%~60%, 见图 3。

3 讨论

宫颈癌是最常见的妇科肿瘤, 传统的宫颈癌治

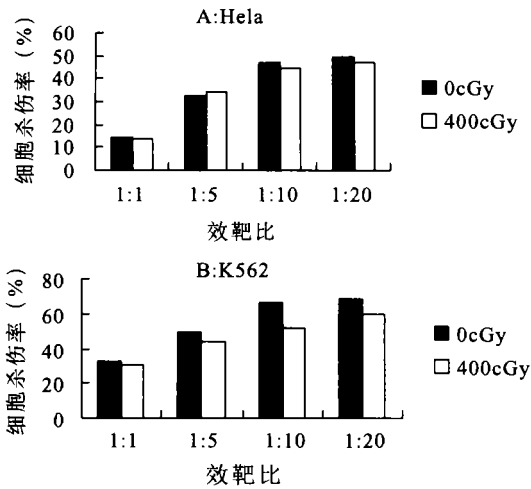


图3 照射后 NK-92 细胞对 HeLa (A) 和 K562 (B) 细胞杀伤活性的变化

疗手段主要包括手术、放疗、化疗、热疗等^[8]。随着免疫学与分子生物学的发展,宫颈癌的生物治疗研究也迅速进展。但目前的生物治疗多为针对人乳头瘤病毒的疫苗和基因治疗,而对过继性免疫活性细胞直接杀伤肿瘤细胞及病毒从而治疗宫颈癌的研究国内尚未见报导。过继性免疫活性细胞治疗其中包括淋巴因子活化的杀伤细胞(LAK)和肿瘤浸润淋巴细胞(TILs),在一些肿瘤动物模型和某些进展期肿瘤患者的临床试验中显示有一定效果^[9,10],但由于LAK和TIL细胞均以T细胞为主,T细胞发挥作用必须经过复杂的免疫激活过程,而患者肿瘤细胞多处于免疫逃逸状态,所以疗效欠佳;同时治疗过程中需辅以大剂量IL-2,副作用较多,限制了其在临床上的应用。

NK细胞来源于骨髓造血细胞,其无需抗原预先作用,就可直接杀伤肿瘤细胞,此外NK细胞还具有介导非特异抗病毒活性作用。目前已证实宫颈癌的主要病因就是人乳头瘤病毒的感染,因此研究NK细胞治疗宫颈癌就更有意义。但是,由于NK细胞难以在体外大量扩增并达到临床所需治疗量,因而不能广泛应用于临床。

NK-92细胞是一种已建立的NK细胞系,具有永生性,可在体外长期培养,大量扩增,从而解决了肿瘤免疫治疗中的细胞来源问题。诸多研究结果证明了NK-92细胞在生物治疗中的作用,使其成为进入期临床试验的细胞系。随着临床期试验的顺利进行,应用NK-92细胞进行过继免疫治疗必将成为肿瘤生物治疗中的一部分。

本实验旨在探讨放射线照射后NK-92细胞对人宫颈癌细胞的杀伤活性。K562细胞是NK-92细胞的敏感细胞株,研究结果显示,NK-92细胞对K562细胞有较高的杀伤活性,在效靶比(1:10),杀

伤率为67%,接近于文献报道。说明本实验的NK-92细胞功能状态良好。对人宫颈癌细胞系HeLa,放射线照射后NK-92细胞具有杀伤效应,且随效靶比升高,杀伤效率也随之上升,提示在合适的效靶比情况下,放射线照射后NK-92细胞体外对HeLa细胞具有杀伤作用。

NK-92细胞来源于恶性淋巴瘤患者的外周血,直接输注患者体内有增殖成瘤的潜在危险,因此,NK-92细胞治疗的安全性是令人关注的问题。对NK-92细胞进行放射线照射,诱导其迟发性凋亡,既消除了NK-92细胞增殖成瘤的潜在危险,又在一定时间内保留了杀瘤活性,藉此时期的NK-92细胞治疗肿瘤是一种有效的方法^[11]。本研究中,经400cGy剂量照射后NK-92细胞没有继续扩增,且呈进行性下降趋势,同时照射后一段时间内对HeLa细胞仍具有杀伤活性,提示用合适剂量照射后的NK-92细胞来治疗宫颈癌是行之有效也是安全的,从而为宫颈癌的生物治疗提供了一种新的方法。

参考文献:

- [1] Gong J H, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells[J]. *Leukemia*, 1994, 8 (4) : 652-658.
- [2] Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, et al. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4 (11) : 2859-2868.
- [3] Tam YK, Miyagawa B, Ho VC, et al. Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell line NK-92[J]. *J Hematother*, 1999, 8 (3) : 281-290.
- [4] Tam YK, Miyagawa B, Ho VC, et al. Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell line NK-92[J]. *J Hematother*, 1999, 8(3) : 281-290.
- [5] 陈纲,凌斌,祝怀平,等. NK-92细胞对人卵巢癌细胞体外杀伤活性[J]. *安徽医科大学学报*, 2004, 39 (2) : 90-93.
- [6] 凌斌,陈纲,祝怀平,等. 照射后NK-92细胞对人卵巢癌细胞杀伤活性的研究[J]. *现代妇产科进展*, 2004, 13(4) : 251-254.
- [7] Tam YK, Maki G, Miyagawa B, et al. Characterization of genetically altered, interleukin-2 independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10 (8) : 1359-1373.
- [8] 凌斌,王波. 宫颈癌患者预后相关因素研究进展[J]. *国外医学·妇产科学分册*, 1997, 24(5) : 281-283.
- [9] Basse P, Herberman RB, Nannmark U, et al. Accumulation of adoptively transferred adherent, lymphokine-activated killer cells in murine metastases[J]. *J Exp Med*, 1991, 174 (2) : 479-488.
- [10] Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al. Prospective randomized trial of highdose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85 (8) : 622-632.
- [11] Tonn T, Becker S, Esser R, et al. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92[J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10 (4) : 535-544.

[编辑:贺文;校对:杨卉]