

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.012

· 基础研究 ·

## IL-2、IL-15 增强免疫编辑后 NK 细胞 NKG2D 的表达及其对鼻咽癌 CNE2 细胞的杀伤活性

梅家转<sup>1</sup>, 刘桂举<sup>1</sup>, 冯睿婷<sup>1</sup>, 郭坤元<sup>2\*</sup> (1. 郑州人民医院 肿瘤内科, 河南 郑州 450003; 2. 南方医科大学 珠江医院 血液科, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的: 观察 IL-2、IL-15 对免疫编辑后 NK 细胞 NKG2D 的表达及其对鼻咽癌 CNE2 细胞杀伤活性的影响。方法: 抗 CD56 磁珠纯化 NK 细胞后分为 4 组: (1) 编辑前 NK 细胞组: 加入 100 U/ml IL-2; (2) 单纯编辑组: NK 细胞与 CNE2 细胞 10:1 混合, 加入 100 U/ml IL-2; (3) IL-2 再培养组: 纯化编辑后的 NK 细胞, 加入 1 000 U/ml IL-2; (4) IL-15 再培养组: 纯化编辑后的 NK 细胞, 加入 10 ng/ml IL-15。24 h 后, 流式细胞仪检测各组 NK 细胞表面 NKG2D 的表达; LDH 释放测定法测定效靶比 20:1 时各组 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性。结果: 编辑前 NK 细胞组、单纯编辑组、IL-2 再培养组、IL-15 再培养组 NK 细胞表面 NKG2D 的表达率分别为 (97.63 ± 0.83)%、(53.50 ± 1.25)%、(94.47 ± 1.00)%、(98.07 ± 0.21)%。IL-2、IL-15 再培养组 NK 细胞 NKG2D 的表达分别比单纯编辑组有显著的增加 ( $P < 0.01$ ), 该 4 组 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性分别为 (35.90 ± 3.27)%、(4.70 ± 2.30)%、(31.70 ± 3.56)%、(40.18 ± 2.94)%。IL-2 再培养组、IL-15 再培养组明显提高编辑后 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性 ( $P < 0.01$ ), IL-15 的作用强于 IL-2。结论: 高剂量 IL-2、IL-15 可以上调免疫编辑后 NK 细胞表面 NKG2D 的表达, 恢复编辑后 NK 细胞对鼻咽癌细胞 CNE2 的杀伤活性, IL-15 的作用强于 IL-2。

[关键词] 鼻咽肿瘤; 自然杀伤细胞; NKG2D 配体; 免疫编辑; IL-2; IL-15

[中图分类号] R739.63; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)04-0379-04

## IL-2 and IL-15 up-regulate NKG2D expression and enhance cytotoxicity of edited-NK cells against nasopharyngeal carcinoma cells

MEI Jia-zhuan<sup>1</sup>, LIU Gui-ju<sup>1</sup>, FENG Rui-ting<sup>1</sup>, GUO Kun-yuan<sup>2</sup> (1. Department of Oncology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan, China; 2. Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of IL-2 and IL-15 on the expression of NKG2D and the cytotoxicity of edited-NK cells against human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2. **Methods:** NK cells were purified by anti-CD56 MACS and were divided into four groups: non-edited-NK cells group (NK cells treated with 100 U/ml IL-2), edited-NK cells group (NK cells co-cultured with CNE2 cells at a ratio of 10:1 and then treated with 100 U/ml IL-2), edited-NK cells retreated with 1 000 U/ml IL-2 group, and edited-NK cells retreated with 10 ng/ml IL-15 group. Expression of NKG2D in each group was determined by FACS 24 h later. Cytotoxicity of NK cells against CNE2 cells (NK:CNE2 being 20:1) was measured by LDH releasing assay. **Results:** The expression of NKG2D in non-edited-NK cells, edited-NK cells, edited-NK cells retreated with IL-2, and edited-NK cells retreated with IL-15 were (97.63 ± 0.83)%, (53.50 ± 1.25)%, (94.47 ± 1.00)%, and (98.07 ± 0.21)%, respectively. The expression of NKG2D on edited-NK cells retreated with IL-2 or IL-15 was significantly increased than that on edited-NK cells ( $P < 0.01$ ). The cytotoxicity of non-edited-NK cells, edited-NK cells, edited-NK cells retreated with IL-2, and edited-NK cells retreated with IL-15 against CNE2 cells were (35.90 ± 3.27)%, (4.70 ± 2.30)%, (31.70 ± 3.56)% and (40.18 ± 2.94)%, respectively. The cytotoxicity of edited-NK cells was significantly enhanced after retreated with IL-2 or IL-15 ( $P < 0.01$ ), with those retreated with IL-15 being stronger than those retreated with IL-2. **Conclusion:** High dose IL-2 and IL-15 can up-regulate the expression of NKG2D on edited-NK cells and restore their cytotoxicity against CNE2 cells, with the efficacy of IL-15 stron-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.30471663)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.30471663)

[作者简介] 梅家转(1966-),男,河南省郑州市人,博士,主任医师,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究。E-mail:mjzhu@163.com

\* 通信作者(Corresponding author)。E-mail:gzyuan@pub.guangzhou.gd.cn

ger than that of IL-2.

[ **Key words** ] nasopharyngeal neoplasms; natural killer cell; NKG2D ligand; immunoedit; IL-2; IL-15

[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16(4): 379-382 ]

肿瘤免疫编辑学说<sup>[1-2]</sup>认为机体的免疫系统和肿瘤细胞之间存在着相互作用,免疫系统重塑肿瘤细胞的抗原性,肿瘤细胞改变免疫效应细胞的抗肿瘤效应。NKG2D 是介导 NK 细胞杀伤活性的主要活化性受体,靶细胞表面 NKG2D 的配体与 NK 细胞表面 NKG2D 结合可以激活 NK 细胞杀伤表达 NKG2D 配体的肿瘤细胞<sup>[3]</sup>。本课题前期研究<sup>[4-5]</sup>表明人鼻咽癌细胞 CNE2 表达 NKG2D 配体,NK 细胞通过 NKG2D-配体信号通路杀伤 CNE2 细胞。NK 细胞和 CNE2 细胞共培养 24 h 后,NK 细胞受 CNE2 细胞的编辑,表面 NKG2D 表达明显下降,编辑后的 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性明显下降。体外研究<sup>[6-9]</sup>表明,细胞因子( IL-2、IL-12、IL-15 )能调节 NK 细胞活化性受体的表达,提高 NK 细胞杀伤活性。本研究观察细胞因子 IL-2、IL-15 能否增强编辑后 NK 细胞表面 NKG2D 表达,以及恢复编辑后 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

NK 细胞分离缓冲液(磷酸盐缓冲液,pH 7.2,含 0.5% BSA 和 2 mmol/L EDTA)及 CD56 MicroBeads 购自 Miltenyi Biotec 公司,RPMI1640 购自 Gibco 公司,淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂,IL-2 购自上海华新公司,NK 细胞杀伤活性检测试剂盒购自 Promega 公司,流式细胞仪购自 coulter 公司,抗 NKG2D 单克隆抗体购自 BD 公司。人鼻咽癌细胞株 CNE2 由本实验室冻存。

### 1.2 NK 细胞的分离纯化<sup>[10]</sup>

采用常规密度梯度离心法分离 3 例健康人外周血单个核细胞,PBS 洗涤 2 次,计数细胞,CD56 MicroBeads 作细胞阳性分选,获得的 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞即为 NK 细胞。

### 1.3 细胞培养

抗 CD56 磁珠纯化 NK 细胞后分为 4 组,分别为(1)编辑前 NK 细胞组:加入 100 U/ml IL-2;(2)单纯编辑组:NK 细胞与 CNE2 细胞 10:1 混合,加入 100 U/ml IL-2;(3)IL-2 再培养组:纯化编辑后的 NK 细胞加入 1 000 U/ml IL-2;(4)IL-15 再培养组:纯化编辑后的 NK 细胞加入 10 ng/ml IL-15。培养基为 RPMI 1640 完全培养基,以上细胞培养 24 h

后,用于下述实验。

### 1.4 FCM 检测 NK 细胞表面 NKG2D 的表达

采用间接标记法检测各组 NK 细胞表面 NKG2D 的表达。抗 CD56 磁珠纯化各组 NK 细胞,PBS 洗涤后,计数细胞,分管,按 1 μg/10<sup>6</sup> 细胞分别加入抗 NKG2D 单抗,4 ℃ 孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次,以 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG1 二抗 4 ℃ 孵育 30 min,PBS 洗涤,同型 IgG1 作为阴性对照抗体,流式细胞术分析样本中 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞中阳性细胞数,计算表达率。

### 1.5 NK 细胞杀伤活性测定<sup>[10]</sup>

采用 4 h LDH 释放测定法,测定效靶比 20:1 时,各组 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性。

### 1.6 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间的比较采用单向方差分析法,组间多重比较采用 LSD 法, $P < 0.05$  提示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IL-2、IL-15 上调编辑后 NK 细胞表面 NKG2D 的表达

流式细胞术检测显示(图 1):编辑前 NK 细胞组、单纯编辑组、IL-2 再培养组、IL-15 再培养组 NK 细胞表面 NKG2D 的表达率分别为(97.63 ± 0.83)%、(53.50 ± 1.25)%、(94.47 ± 1.00)%、(98.07 ± 0.21)% ,经单向方差分析显示,组间差异有统计学意义( $F = 1702.532, P = 0.000$ ),IL-2、IL-15 再培养组分别与单纯编辑组相比差异均有统计学意义( $P = 0.000, P = 0.000$ ),IL-2 再培养组与 IL-15 再培养组相比差异有统计学意义( $P = 0.001$ ),IL-15 再培养组与编辑前 NK 细胞组相比差异无统计学意义( $P = 0.743$ )。结果显示,NK 细胞经肿瘤细胞编辑后,NKG2D 受体明显下降( $P < 0.01$ ),高剂量 IL-2、IL-15 可以上调编辑后 NK 细胞表面 NKG2D 的表达( $P < 0.01$ ),IL-15 的作用较 IL-2 强。

### 2.2 IL-2、IL-15 恢复编辑后 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性

LDH 释放实验检测结果显示,编辑前 NK 细胞、单纯编辑组、IL-2 再培养组、IL-15 再培养组 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性分别为(35.90 ±

3.27)%、(4.70 ± 2.30)%、(31.70 ± 3.56)%、(40.18 ± 2.94)%，组间比较差异有统计学意义( $F = 85.253, P = 0.000$ )。IL-2 再培养组、IL-15 再培养组分别与编辑前 NK 细胞组相比差异无统计学意义( $P = 0.131, P = 0.124$ )，IL-2 再培养组与 IL-15 再

培养组相比差异有统计学意义( $P = 0.009$ )。说明 NK 细胞经肿瘤细胞编辑后，对 CNE2 细胞的杀伤活性明显下降( $P < 0.01$ )，高剂量 IL-2、IL-15 可恢复编辑后 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性，IL-15 的作用较 IL-2 强。

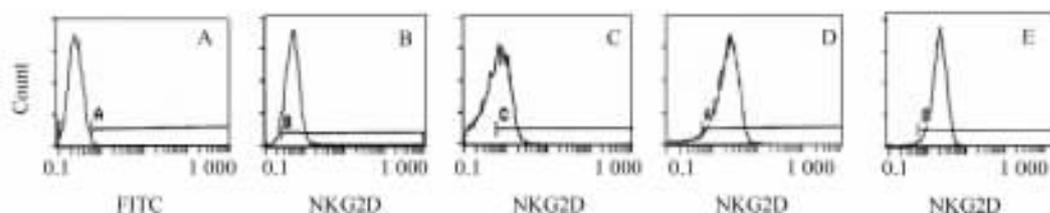


图1 流式细胞仪检测各组 NK 细胞 NKG2D 的表达

Fig.1 Expression of NKG2D on NK cells in different groups as detected by FACS

A: Control; B: Non-edited-NK cells; C: Edited-NK cells; D: Edited-NK cells re-treated with IL-2; E: Edited-NK cells re-treated with IL-15

### 3 讨论

肿瘤的免疫治疗是建立在免疫系统的监视功能之上，即免疫系统能够识别肿瘤细胞并将其摧毁。但对于肿瘤患者而言，其体内的免疫细胞失去了杀伤肿瘤细胞的能力，这种现象归因于肿瘤的免疫编辑。肿瘤免疫编辑学说<sup>[11-12]</sup>认为在肿瘤的发展过程中，免疫系统和肿瘤细胞之间存在着相互作用。免疫细胞杀灭肿瘤细胞的同时，一部分肿瘤细胞在免疫系统的压力下，改变自身的免疫原性，最终逃逸了免疫细胞的攻击。同样肿瘤细胞在改变自身免疫原性的同时影响着免疫细胞的功能，导致免疫细胞不能杀伤肿瘤细胞。增强肿瘤细胞的免疫原性或/和重新调整机体免疫系统的功能，打破肿瘤细胞与免疫细胞之间的免疫编辑状态来提高机体的抗肿瘤效应是肿瘤免疫治疗的主要手段。

NK 细胞是机体内重要的抗肿瘤免疫效应细胞<sup>[13]</sup>，NK 细胞对靶细胞的杀伤与其细胞表面的受体和靶细胞表面的配体密切相关。NKG2D 是介导 NK 细胞杀伤活性的主要活化性受体<sup>[14]</sup>，也是肿瘤细胞与 NK 细胞之间发生免疫编辑的靶点<sup>[15]</sup>。本课题前期的研究也证实<sup>[4,5]</sup> NK 细胞通过 NKG2D-配体途径杀伤 CNE2 细胞，NK 细胞在杀灭 CNE2 细胞的同时，双方发生了免疫编辑，编辑后的 NK 细胞表面 NKG2D 表达明显下降，对 CNE2 细胞的杀伤活性明显下降，CNE2 细胞受 NK 细胞的编辑，其细胞表面 NKG2D 活化性配体表达下降，导致编辑后的 CNE2 细胞对 NK 细胞的杀伤敏感性下降。

目前发现很多药物能诱导肿瘤细胞表面特定分子的表达，增强肿瘤细胞对免疫细胞杀伤的敏感性。研究表明<sup>[16]</sup>体内给予全反式维甲酸可以提高急性早幼粒细胞白血病患者体内肿瘤细胞表面 NKG2D 配体的表达，增强 NK 细胞的杀伤活性。前期的研究表明<sup>[17-18]</sup>  $AS_2O_3$  提高  $CD34^+$  白血病细胞 NKG2D 配体表达及 NK 杀伤活性；苹果酸舒尼替尼诱导耐药鼻咽癌细胞高表达 NKG2D 配体，增加了 NK 细胞对其杀伤的敏感性。上述研究表明抗肿瘤药物的应用能提高肿瘤细胞的免疫原性，再次激发抗肿瘤免疫效应。

Konjević 的研究<sup>[19]</sup>表明恶性黑色素瘤患者体内的 NK 细胞受肿瘤细胞的编辑，其细胞表面的活化性受体 NKG2D 表达下降，NK 细胞的杀伤活性降低，如果体外事先用 IL-2、干扰素孵育患者的外周血单个核细胞，可以恢复 NK 细胞的活性。提示即使肿瘤患者体内的免疫细胞受到肿瘤细胞的编辑作用，仍然可以通过体外改造免疫细胞，恢复其杀伤功能。

IL-2、IL-15、IL-12、IL-18 是活化 NK 细胞最常用的细胞因子，IL-15 和 IL-2 均通过 IL-2R 发挥作用<sup>[20]</sup>。本研究观察了不同剂量的 IL-2 和 IL-15 对编辑后 NK 细胞 NKG2D 受体表达的影响，发现 1 000 U/ml IL-2 和 10 ng/ml IL-15 能发挥最大效应。编辑前 NK 细胞组、单纯编辑组加入含 100 U/ml IL-2 培养基，目的是维持 NK 细胞的生长，本研究发现 100 U/ml IL-2 对 NKG2D 的表达无影响(资料未显示)。本研究表明高剂量的 IL-2、IL-15 能提

高编辑后 NK 细胞表面 NKG2D 的表达, 恢复了被编辑后 NK 细胞对 CNE2 细胞的细胞毒活性, IL-15 的作用明显强于 IL-2。本研究结果和 Konjević 的研究<sup>[19]</sup>有相同的意义, 即细胞因子可以恢复编辑后 NK 细胞的功能。

Sutherland<sup>[21]</sup>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, 结合本研究, 认为 IL-2, IL-15 均可用于肿瘤患者的治疗。目前有很多有关患者自身单个核细胞在体外经不同细胞因子诱导激活重新回输给患者治疗肿瘤的报道。上述过程实际上是对患者体内受编辑的免疫细胞在体外重新激活的过程, 符合肿瘤免疫编辑指导下的免疫治疗理论。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6 ( 11 ): 836-848.
- [ 2 ] Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape [ J ]. *Immunology*, 2007, 121( 1 ): 1-14.
- [ 3 ] Coudert JD, Held W. The role of the NKG2D receptor for tumor immunity [ J ]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16( 5 ): 333-343.
- [ 4 ] 梅家转, 郭坤元, 魏红梅. NKG2D 介导 NK 细胞对鼻咽癌细胞杀伤作用的体外研究 [ J ]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34( 4 ): 233-236.
- [ 5 ] 郭坤元, 梅家转, 姚开泰. 人鼻咽癌细胞株 CNE2 对 NK 细胞 KIR/NKG2D 受体免疫编辑作用及 NK 细胞杀伤功能的影响 [ J ]. *第一军医大学学报*, 2007, 27( 3 ): 247-249.
- [ 6 ] Zhang C, Zhang J, Niu J, *et al.* Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation [ J ]. *Cytokine*, 2008, 42 ( 1 ): 128-136.
- [ 7 ] Boyiadzis M, Memon S, Carson J, *et al.* Up-regulation of NK cell activating receptors following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation under a lymphodepleting reduced intensity regimen is associated with elevated IL-15 levels [ J ]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008, 14( 3 ): 290-300.
- [ 8 ] Zhang C, Zhang J, Niu J, *et al.* Hum Immunol. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D [ J ]. *Hum Immunol*, 2008, 69( 8 ): 490-500.
- [ 9 ] de Rham C, Ferrari-Lacraz S, Jendly S, *et al.* The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors [ J ]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9( 6 ): R125.
- [ 10 ] 梅家转, 郭坤元, 魏红梅, 等. 不同肿瘤细胞表面 MICA 的表达及 NK 细胞杀伤活性的研究 [ J ]. *中国免疫学杂志*, 2007, 23( 1 ): 37-40.
- [ 11 ] 梅家转, 周 健, 郭坤元, 自然杀伤细胞与肿瘤细胞之间的免疫编辑 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15( 1 ): 86-88.
- [ 12 ] Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH, *et al.* Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression [ J ]. *Semin Cancer Biol*, 2007, 17( 4 ): 275-287.
- [ 13 ] 田志刚. 基于 NK 细胞的肿瘤免疫治疗研究进展 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16( 1 ): 2-5.
- [ 14 ] González S, López-Soto A, Suarez-Alvarez B, *et al.* NKG2D ligands: key targets of the immune response [ J ]. *Trends Immunol*, 2008, 29( 8 ): 397-403.
- [ 15 ] Wiemann K, Mittrücker HW, Feger U, *et al.* Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses *in vivo* [ J ]. *J Immunol*, 2005, 175( 2 ): 720-729.
- [ 16 ] Poggi A, Catellani S, Garuti A, *et al.* Effective *in vivo* induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate [ J ]. *Leukemia*, 2009, 23 ( 4 ): 641-648.
- [ 17 ] 牛新清, 胡亮杉, 郭坤元, 等. AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 CD34<sup>+</sup> 白血病细胞 NKG2D 配体表达及 NK 杀伤活性的影响 [ J ]. *中国免疫学杂志*, 2008, 24( 6 ): 509-517.
- [ 18 ] 黄宇贤, 郭坤元, 王 杨, 等. 苹果酸舒尼替尼诱导高表达三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 的耐药鼻咽癌细胞高表达 NKG2D 配体 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15( 4 ): 311-315.
- [ 19 ] Konjević G, Mirjacić Martinović K, Vuletić A, *et al.* Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients [ J ]. *Clin Exp Metastasis*, 2007, 24( 1 ): 1-11.
- [ 20 ] Chrul S, Polakowska E, Szadkowska A, *et al.* Influence of interleukin IL-2 and IL-12<sup>+</sup> IL-18 on surface expression of immunoglobulin-like receptors KIR2DL1, KIR2DL2, and KIR3DL2 in natural killer cells [ J ]. *Mediators Inflamm*, 2006 ( 4 ): 469-457.
- [ 21 ] 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.

[ 收稿日期 ] 2009-04-18

[ 修回日期 ] 2009-06-15

[ 本文编辑 ] 韩 丹