

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.005

· 基础研究 ·

膜型 IL-15 联合 RAE-1 ϵ 增强小鼠 NK 细胞的杀伤活性

钱莉¹, 陆家辉¹, 傅奕², 郑月娟³, 佟大可⁴, 龚卫娟¹, 潘兴元¹, 季明春¹ (1. 扬州大学医学院 病原生物学与免疫学教研室, 江苏 扬州 225001; 2. 扬州大学医学院 生物化学教研室, 江苏 扬州 225001; 3. 上海中医药大学 免疫学与病原生物学教研室, 上海 200433; 4. 第二军医大学 附属长海医院骨科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 探讨视黄酸早期转录因子 1 ϵ (retinoic acid early transcript 1 ϵ , RAE-1 ϵ) 和膜型 IL-15 对小鼠 NK 细胞杀伤功能的影响。方法: 前期研究以小鼠原 B 淋巴细胞株 BaF3 为基础构建了 3 株 BaF3 工程细胞株, 即表达膜型 IL-15 的 BaF3/mb15 细胞、表达 RAE-1 ϵ 的 BaF3/RAE 细胞和同时表达膜型 IL-15 和 RAE-1 ϵ 的 BaF3/mb15/RAE 细胞。将 γ 射线灭活后的 3 株 BaF3 工程细胞株作为刺激细胞, 分别刺激小鼠 NK 细胞。流式细胞术检测刺激后 NK 细胞表面分子的表达, 胞内染色法检测 NK 细胞穿孔素和颗粒酶 B 的分泌, 流式细胞术检测 NK 细胞对小鼠淋巴瘤 YAC1 细胞的杀伤活性。结果: 与 BaF3/mb15 和 BaF3/RAE 细胞相比, BaF3/mb15/RAE 细胞可有效上调 NK 细胞表面 CD25、CD44、FasL 和 CD107a 的表达, 但对穿孔素和颗粒酶 B 的分泌没有明显刺激作用。当效靶比为 20:1 时, BaF3/mb15、BaF3/RAE 和 BaF3/mb15/RAE 细胞刺激后 NK 细胞对靶细胞 YAC1 的杀伤率分别为 (39.7 \pm 2.9)%、(45.3 \pm 2.3)% 和 (59.0 \pm 6.9)%, 均高于 BaF3 组的 (28.3 \pm 1.5)% ($P < 0.01$), 且 BaF3/mb15/RAE 组高于 BaF3/mb15 和 BaF3/RAE 组 ($P < 0.05$)。结论: 膜型 IL-15 联合 RAE-1 ϵ 可促进 NK 细胞活化并增强 NK 细胞的杀伤活性。

[关键词] 膜型 IL-15; 视黄酸早期转录因子 1 ϵ ; NK 细胞; CD107a; 淋巴瘤; YAC1 细胞

[中图分类号] R730.5; R733.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0611-06

Membrane-bound IL-15 combined with RAE-1 ϵ enhances cytotoxicity of mouse NK cells

QIAN Li¹, LU Jia-hui¹, FU Yi², ZHENG Yue-juan³, TONG Da-ke⁴, GONG Wei-juan¹, PAN Xing-yuan¹, JI Ming-chun¹ (1. Department of Pathogen Biology and Immunology, Medical School of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China; 2. Department of Biochemistry, Medical School of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China; 3. Department of Immunology and Pathogen Biology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 4. Department of Orthopaedics, Affiliated Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of membrane-bound IL-15 in combination with retinoic acid early transcript 1 ϵ (RAE1 ϵ) on cytotoxicity of NK cells. **Methods:** Three derivatives of mouse pro-B lymphocyte cell line BaF3, expressing membrane-bound IL-15 (termed BaF3/mb15), or RAE1 ϵ (termed BaF3/RAE), or both membrane-bound IL-15 and RAE1 ϵ (termed BaF3/mb15/RAE) were respectively constructed in the previous study. Mouse NK cells were isolated and stimulated with irradiated BaF3 derivatives. Phenotype analysis of NK cells was performed by flow cytometry. Meanwhile, perforin and granzyme B expressions were detected in NK cells by intracellular staining; the cytotoxicity of NK cells against YAC1 lymphoma target cells was evaluated by flow cytometry. **Results:** NK cells stimulated with BaF3-mb15-RAE cells expressed higher levels of CD25, CD44, FasL and CD107a compared to NK cells stimulated with BaF3/mb15 or BaF3/RAE cells. However, BaF3-mb15-RAE cells showed no effects on perforin and granzyme B production of NK cells. When the effector to target ratio was 20:1, the cytotoxicity rates of BaF3/mb15-stimulated NK cells, BaF3/RAE-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81001308, No. 30800182, No. 31100619); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2010315); 上海市教委晨光计划资助项目(No. 11CG48)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81001308, No. 30800182, No. 31100619), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2010315), and the "Chen-guang Program" of Shanghai Municipal Education Commission (No. 11CG48)

[作者简介] 钱莉(1979-), 女, 江苏省扬州市人, 博士, 讲师, 主要研究方向为肿瘤免疫及免疫调节。E-mail: liqianxh@163.com

[通信作者] 钱莉(QIAN Li, corresponding author), E-mail: liqianxh@163.com

stimulated NK cells and BaF3/mb15/RAE-stimulated NK cells against YAC1 cells were $(39.7 \pm 2.9)\%$, $(45.3 \pm 2.3)\%$ and $(59.0 \pm 6.9)\%$, respectively, and significantly increased compared with that of BaF3-stimulated NK cells ($[28.3 \pm 1.5]\%$, $P < 0.01$). Furthermore, BaF3/mb15/RAE-stimulated NK cells exhibited higher cytotoxicity on YAC1 cells than BaF3/mb15-stimulated or BaF3/RAE-stimulated NK cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** IL-15 combined with RAE1 ϵ promotes the activation and cytotoxicity of NK cells.

[**Key words**] membrane-bound IL-15; retinoic acid early transcript 1 ϵ ; NK cell; CD107a; lymphoma; YAC1 cell

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(6): 611-616]

NK 细胞在机体的抗肿瘤和免疫监视等方面发挥着重要的作用,但在体内的数量较少,因此,如何高效扩增 NK 细胞并增强其杀伤活性是 NK 细胞为基础的抗肿瘤免疫治疗的基础^[1-2]。IL-15 是 NK 细胞的生长因子,且膜型 IL-15 比可溶性 IL-15 具有更强的生物学活性^[3-5]。NK2 族成员 D (natural killer group 2D, NKG2D) 是 NK 细胞表面的活化型受体,与相应配体结合后可以诱导 NK 细胞的活化^[6]。小鼠 NKG2D 的配体之一为视黄酸早期转录因子 1 ϵ (retinoic acid early transcript 1 ϵ , RAE-1 ϵ)^[7]。本课题前期研究^[8]中,将膜型 IL-15 和 RAE-1 ϵ 同时表达于小鼠原 B 淋巴细胞株 BaF3 细胞上(简称为 BaF3/mb15/RAE 细胞),发现经放射线照射灭活后的 BaF3/mb15/RAE 细胞可以诱导 NK 细胞增殖并且高分泌 IFN- γ 。本研究进一步探讨 BaF3/mb15/RAE 细胞对 NK 细胞表面分子表达、细胞毒性颗粒释放和杀伤功能的影响,为研究 BaF3/mb15/RAE 细胞的体内抗肿瘤效应提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞株

RBMI 1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司,抗小鼠 NK1.1 磁珠购自 Miltenyi Biotec 公司,荧光标记的抗小鼠 NK1.1 和 CD107a 购自 Biolegend 公司,生物素化的抗小鼠 FasL 抗体以及荧光标记的抗小鼠 NKG2D、CD3、CD25、CD44、CD69、穿孔素、颗粒酶 B 抗体和链霉亲和素购自 eBioscience 公司,重组小鼠白细胞介素 3 (mIL-3) 购自 R & D 公司。CFSE 标记试剂盒购自 Invitrogen 公司,胞内染色的试剂盒购自 BD 公司。小鼠原 B 淋巴细胞株 BaF3 和小鼠淋巴瘤细胞 YAC1 均由本室冻存。BaF3 细胞的培养基为 RBMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清、1 ng/ml 的 mIL-3),YAC1 细胞的培养基为 RBMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清),均置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

1.2 免疫磁珠法分选小鼠 NK 细胞

无菌分离 C57BL/6 小鼠脾脏,用无菌针芯研磨

脾脏,经 400 目钢网过滤并收集单细胞,Tris-NH₄Cl 裂解红细胞,PBS 洗涤 2 遍后,加入抗小鼠 NK1.1 磁珠,4 °C 孵育 15 min 后用 PBS 洗 1 遍,经免疫磁珠分选柱收集 NK1.1⁺ 细胞于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液。经流式细胞仪检测,磁珠分选的 NK1.1⁺ 细胞的纯度 >95%。

1.3 BaF3 工程细胞株刺激 NK 细胞

本课题前期研究^[8]中,在小鼠原 B 淋巴细胞 BaF3 上分别或者同时表达膜型 IL-15 和 RAE-1 ϵ ,构建了 3 株特定的 BaF3 工程细胞株,分别称为 BaF3/mb15 细胞、BaF3/RAE 细胞和 BaF3/mb15/RAE 细胞,用前均用 γ 射线灭活。实验分为单纯 NK 细胞组、BaF3 细胞 + NK 细胞组、BaF3/mb15 细胞 + NK 细胞组、BaF3/RAE 细胞 + NK 细胞组和 BaF3/mb15/RAE 细胞 + NK 细胞组。将纯化的 NK 细胞按 1×10^5 /孔的密度铺入 96 孔板中,NK 细胞和 γ 射线灭活后的 3 种 BaF3 工程细胞株的比例为 1:1,置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

1.4 流式细胞术检测 BaF3 工程细胞株对 NK 细胞表面分子表达的影响

用 γ 射线灭活后的 BaF3 工程细胞株刺激 NK 细胞 24 h 后,收集细胞,用预冷的 PBS 洗 1 遍后重悬于 100 μ l PBS 中,加入荧光素标记的小鼠抗体 (FITC-CD3、PE/Cy7-NK1.1、PE-CD25、PE-CD44、PE-CD69、PE-NKG2D、PE-CD107a) 至终质量浓度 1 μ g/ml。4 °C 标记 20 min,加入 1 ml PBS 洗 2 遍,重悬于 200 μ l PBS 中,进行流式检测并分析。分析时以 CD3⁻NK1.1⁺ 代表 NK 细胞,后续研究中 NK 细胞均指 CD3⁻NK1.1⁺ 的 NK 细胞。NK 细胞表面 FasL 的检测采用间接标记法:收集细胞后,先用生物素化的抗小鼠 FasL 抗体 4 °C 孵育 20 min,PBS 洗涤 1 遍,加入 APC 标记的链和亲霉素,4 °C 标记 20 min,加入 1 ml PBS 洗 2 遍,重悬于 200 μ l PBS 中,流式细胞仪检测并分析。

1.5 流式细胞标记法检测 BaF3 工程细胞株刺激后 NK 细胞对 YAC1 细胞的杀伤活性

参考 Kim 等^[9]的方法用流式细胞标记法检测

NK 细胞靶细胞的裂解。将 NK 细胞按不同密度铺入 96 孔板中,分别加入射线灭活后 BaF3、BaF3/mb15、BaF3/RAE 和 BaF3/mb15/RAE 细胞,每孔中 NK 细胞和 BaF3 工程细胞株的比例为 1:1,刺激 24 h 后,加入 CFSE 标记(2 μ mol/L,37 $^{\circ}$ C 10 min)的 YAC1 细胞作为靶细胞,YAC1 细胞的密度为 1×10^4 /孔,同时设只有 YAC1 细胞的对照组。4 h 后,收集细胞,用 7-AAD 标记,检测并分析。杀伤率(%)=(实验组 CFSE $^+$ 7-AAD $^+$ 细胞 - 对照组 CFSE $^+$ 7-AAD $^+$ 细胞)/CFSE $^+$ 细胞) $\times 100\%$ 。

1.6 胞内染色法检测 BaF3 工程细胞株刺激后 NK 细胞穿孔素和颗粒酶 B 的表达

用 γ 射线灭活后的 BaF3 工程细胞株刺激 NK 细胞 18 h 时,加入刺激剂 PMA(50 ng/ml)和 ionomycin(500 ng/ml)激活 NK 细胞,1 h 后加高尔基体阻断剂阻止穿孔素和颗粒酶 B 分泌至细胞外。刺激 24 h 时,收集细胞,用预冷的 PBS 洗 1 遍后重悬于 100 μ l PBS 中,加入 FITC-CD3、PE/Cy7-NK1.1 或 APC-NK1.1(终质量浓度 1 μ g/ml),室温避光孵育 20 min,PBS 洗涤 1 遍后,每管加入 150 μ l 固定/破膜液,4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min 后,用破膜缓冲液洗涤

1 遍,加入 PE-穿孔素或 PE/Cy7-颗粒酶 B,4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,用破膜缓冲液洗涤 1 遍,重悬于 200 μ l 破膜缓冲液中,流式细胞仪检测并分析穿孔素和颗粒酶 B 的表达。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPASS 10.0 统计软件,用 t 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BaF3/mb15/RAE 细胞促进 NK 细胞的活化

实验结果(图 1)显示,与 BaF3 细胞相比,BaF3/mb15 细胞对 NK 细胞表面 CD25 和 CD44 的表达没有明显影响,而 BaF3/RAE 和 BaF3/mb15/RAE 细胞均可刺激 NK 细胞高表达 CD25 和 CD44,且 BaF3/mb15/RAE 细胞的刺激作用最明显($P < 0.01$)。3 种 BaF3 工程细胞株对 NK 细胞表面 CD69 和 NKG2D 的表达水平均没有明显影响。由此可见,3 种 BaF3 工程细胞株中,BaF3/mb15/RAE 细胞刺激 NK 细胞活化的能力最强。

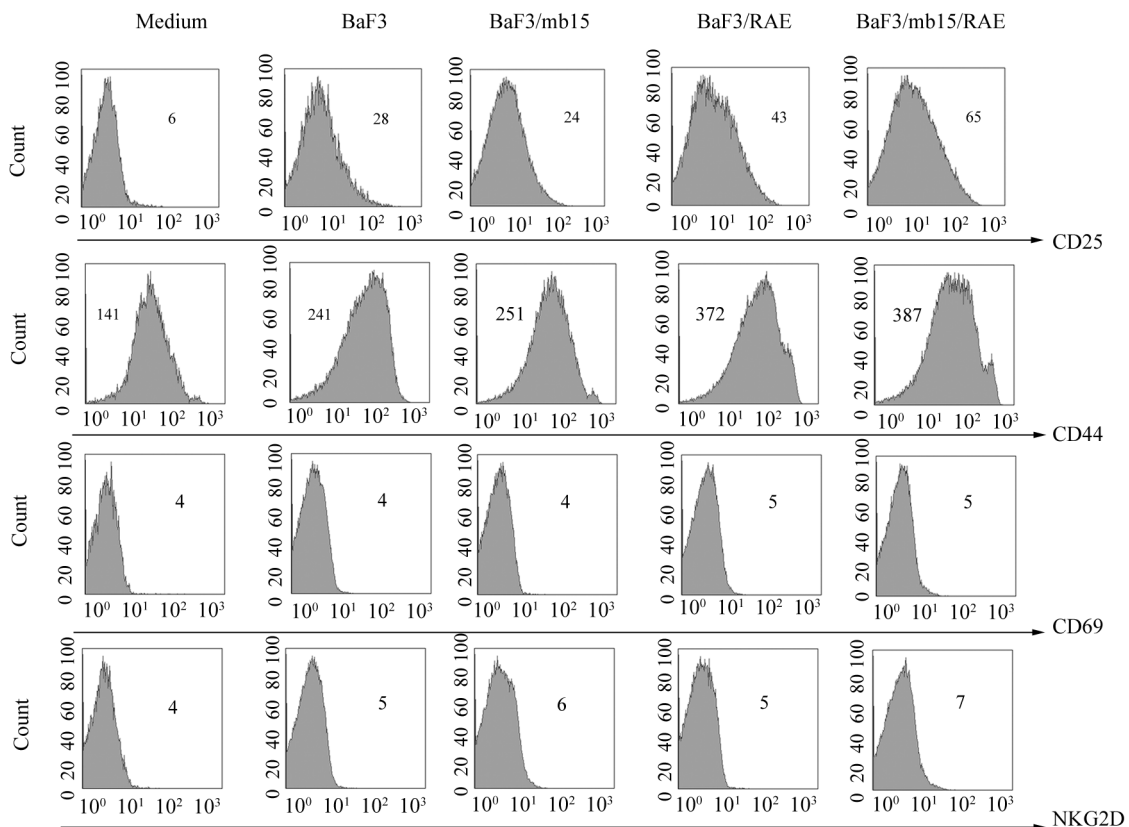


图 1 BaF3/mb15/RAE 细胞对 NK 细胞表面分子表达的影响

Fig. 1 Effects of BaF3/mb15/RAE cells on surface molecule expression of NK cells

2.2 BaF3/mb15/RAE 细胞增强 NK 细胞的杀伤力
 当效靶比为 20:1 时, BaF3/mb15、BaF3/RAE 和 BaF3/mb15/RAE 细胞刺激后的 NK 细胞对靶细胞的杀伤率均高于 BaF3 组 [(39.7 ± 2.9)%、(45.3 ± 2.3)%、(59.0 ± 6.9)% vs (28.3 ± 1.5)% , $P < 0.01$]。且 BaF3/mb15/RAE 组高于 BaF3/mb15 和 BaF3/RAE 组 ($P < 0.05$)。效靶比为 10:1 时, BaF3/mb15、BaF3/RAE 和 BaF3/mb15/RAE 细胞刺激后的 NK 细胞对靶细胞的杀伤率也高于 BaF3 组 [(30.1 ± 3.1)%、(31.6 ± 1.5)%、(41.6 ± 7.2)% vs (21.3 ± 1.7)% , $P < 0.01$], 但 BaF3/mb15/RAE 组与 BaF3/mb15 组和 BaF3/RAE 组相比, 差异无统计学意义 (图 2, $P > 0.05$)。由此可见, BaF3/mb15/RAE 细胞刺激后的 NK 细胞对靶细胞的杀伤效应明显增强。

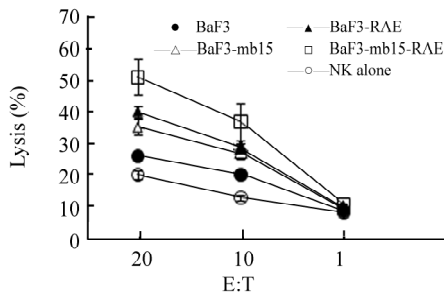


图 2 BaF3/mb15/RAE 细胞刺激后 NK 细胞增强对 YAC1 细胞的杀伤活性
Fig.2 BaF3/mb15/RAE cells-stimulated NK cells increased cytotoxicity to YAC1 cells
 * $P < 0.05$ vs BaF3-mb15 group or BaF3-RAE group

2.3 BaF3/mb15/RAE 细胞对 NK 细胞分泌穿孔素和颗粒酶 B 的影响

用 γ 射线灭活后的 BaF3 工程细胞株刺激 NK 细胞 24 h 后, 胞内染色法检测 NK 细胞分泌穿孔素和颗粒酶 B 的情况。结果 (图 3) 表明, 与 BaF3 细胞相比, BaF3/mb15 细胞、BaF3/RAE 细胞和 BaF3/mb15/RAE 细胞对 NK 细胞释放穿孔素和颗粒酶 B 均没有明显影响。由此可见, BaF3/mb15/RAE 细胞不能刺激 NK 细胞分泌穿孔素和颗粒酶 B。

2.4 BaF3/mb15/RAE 细胞诱导 NK 细胞表达 FasL
 流式术检测 NK 细胞表面 FasL 的表达情况, 结果 (图 4) 发现, 与 BaF3 细胞相比, BaF3/mb15 细胞对 NK 细胞表面 FasL 的表达没有明显影响, 而 BaF3/RAE 细胞和 BaF3/mb15/RAE 细胞均可刺激 NK 细胞表达 FasL, 且 BaF3/mb15/RAE 细胞的刺激作用最为明显 ($P < 0.01$)。由此可见, BaF3/mb15/RAE 细胞可以诱导 NK 细胞表达 FasL。

2.5 BaF3/mb15/RAE 细胞促进 NK 细胞表达 CD107a
 最近研究^[10-12]提示, CD107a 是 NK 细胞活化的重要标记, 可以作为 NK 细胞裂解靶细胞的指标。将 γ 射线灭活后的 BaF3 工程细胞株刺激 NK 细胞 24 h 后, 检测 NK 细胞表面 CD107a 的表达情况, 结果 (图 5) 发现, BaF3/mb15/RAE 细胞刺激后, CD107a⁺ NK 细胞的比例明显高于 BaF3 组、BaF3/mb15 组、BaF3/RAE 组 (45% vs 19%、25%、27% , $P < 0.01$)。由此可见, BaF3/mb15/RAE 细胞能够诱导 NK 细胞表达 CD107a。

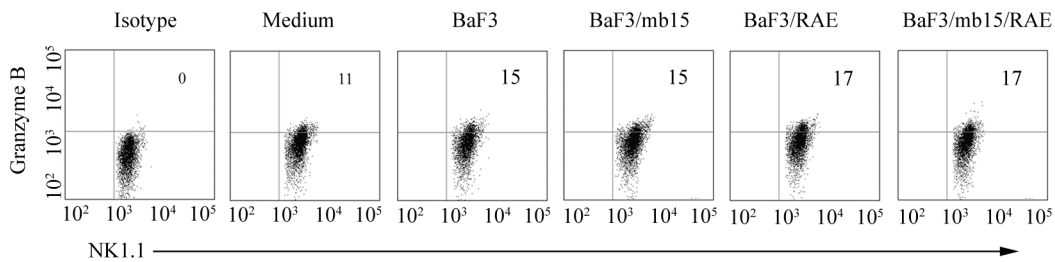


图 3 BaF3/mb15/RAE 细胞对 NK 细胞颗粒酶 B 分泌的影响
Fig.3 Effect of BaF3/mb15/RAE cells on granzyme B secretion by NK cells

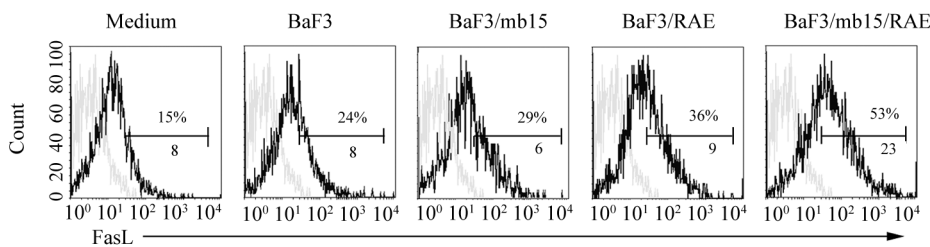


图 4 BaF3/mb15/RAE 细胞对 NK 细胞表面 FasL 表达的影响
Fig.4 Effect of BaF3/mb15/RAE cells on expression of FasL on surface of NK cells

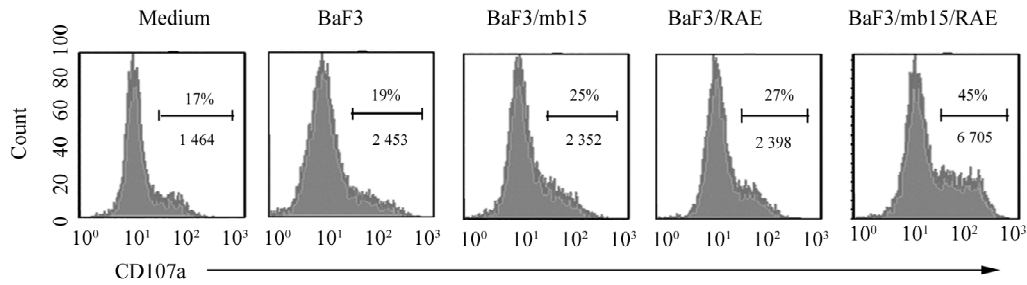


图5 BaF3/mb15/RAE 细胞对 NK 细胞表面 CD107a 表达的影响

Fig. 5 Effect of BaF3/mb15/RAE cells on expression of CD107a on surface of NK cells

3 讨论

NK 细胞作为体内重要的固有免疫细胞,在抗肿瘤的免疫监视和免疫治疗中发挥着重要的作用。因此,如何促进 NK 细胞的增殖、提高 NK 细胞的抗肿瘤活性决定着以 NK 细胞为基础的肿瘤免疫治疗的效果。近年来,国内外的学者在如何体外大量扩增并活化人 NK 细胞方面进行了各种尝试和探索,如用可溶性 IL-2、IL-12、IL-15 等细胞因子体外扩增人外周血 NK 细胞^[13],或者将可溶性 IL-15 从基因水平改造为膜型 IL-15,与共刺激分子 4-1BBL 基因同时转染肿瘤细胞株 K562,得到共表达膜型 IL-15 和 4-1BBL 的 K562 细胞株,用于体外刺激 NK 细胞,使 NK 细胞得到大量的扩增^[14]。也有在此基础上,再转入膜型 IL-18,构成共表达 4-1BBL 和膜型 IL-15、IL-18 的 K562 细胞株用于体外扩增 NK 细胞,获得了纯度高、活性好的 NK 细胞^[15]。由于人体实验的限制,上述的各种扩增方法均在体外进行,这种以共表达膜型细胞因子和共刺激分子的肿瘤细胞株为刺激细胞,体外建立起来的扩增和活化 NK 细胞的方法应用于体内是否同样有效,还需要通过动物实验来进一步验证。

NKG2D 是一类重要的活化型受体,属于 II 型跨膜 C 型凝集素样受体,在所有的 NK 细胞,大多数 NK 细胞 T 细胞、某些 $\gamma\delta$ T 细胞亚群、人类 CD8⁺ T 细胞、小鼠活化的 CD8⁺ T 细胞上均有表达^[16]。NKG2D 可以结合多种与 MHC I 类分子类似的蛋白。在人类,这些蛋白主要有两类:一是 MHC I 类链相关的 A/B 分子(MHC class I chain-related molecules A/B, MIC-A/B),另一个是巨细胞病毒 UL16 结合蛋白(UL16-binding proteins, ULBP)家族,包括 ULBP1-4 和 REA1G 5 个成员。在小鼠,这些蛋白包括 RAE1、H60 和 MULT-1。尽管不同的 NKG2D 配体之间的同源性很低(如 ULBP 和 MIC 蛋白的同

源性 <20%),但所有的 NKG2D 配体都能结合和活化 NKG2D 受体^[17]。利用 NKG2D 配体活化 NKG2D,可以直接诱导 NK 细胞活化,促进 NK 细胞分泌细胞因子,增强 NK 细胞的杀伤活性。

膜型细胞因子和 NKG2D 配体-NKG2D 信号通路在活化和增强 NK 细胞杀伤功能方面发挥着重要的作用,因此,本研究构建了共表达小鼠膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ (小鼠 NKG2D 的配体)的 BaF3 细胞(BaF3/mb15/RAE 细胞)。前期研究^[8]发现,BaF3/mb15/RAE 细胞在体外可以诱导 NK 细胞增殖并促进 NK 细胞高分泌 IFN- γ 。本研究继续探讨其在体外对 NK 细胞表面分子表达、细胞毒性颗粒释放和杀伤活性的影响。

CD25 即低亲和力的 IL-2 受体,主要表达于活化的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和巨噬细胞表面^[18],可作为上述细胞活化的指标。本实验结果显示,BaF3/RAE 细胞和 BaF3/mb15/RAE 细胞都可以诱导 NK 细胞 CD25 表达增高,且 BaF3/mb15/RAE 细胞的作用要强于 BaF3/RAE 细胞,提示膜型 IL-15 可以增强 RAE1 ϵ 对 NK 细胞的活化效应。CD44 作为细胞表面重要的黏附分子,广泛表达在多种免疫细胞表面。CD44 触发可活化小鼠 NK 细胞 T 细胞和 T 细胞,增强 NK 细胞的杀伤活性^[19]。本实验结果显示,BaF3/RAE 细胞和 BaF3/mb15/RAE 细胞均可刺激 NK 细胞高表达 CD44,但这两种细胞刺激后 NK 细胞表达 CD44 的水平没有明显差别,说明 RAE1 ϵ 能够诱导 NK 细胞表达 CD44,但膜型 IL-15 并没有表现出明显的联合效应。

CD107a 又称为溶酶体相关膜蛋白 1(lysosome associated membrane protein1, LAMP-1),NK 细胞通过脱颗粒杀伤靶细胞时,CD107a 可被转运至细胞膜表面。因此,检测细胞膜表面 CD107a 的表达可以间接反映 NK 细胞的杀伤活性。本实验结果显示,BaF3/mb15/RAE 细胞刺激后,CD107a⁺ NK 细胞的

比例明显高于 BaF3/mb15 刺激和 BaF3/RAE 刺激组。此外,与 BaF3/mb15 细胞刺激和 BaF3/RAE 细胞刺激组相比, BaF3/mb15/RAE 细胞刺激后的 NK 细胞对靶细胞 YAC1 的杀伤能力最强。以上的结果均提示,膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 可以发挥联合作用,增强 NK 细胞的杀伤活性。

穿孔素和颗粒酶 B 是和细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞杀伤靶细胞的重要效应分子^[20]。穿孔素能在靶细胞膜上形成跨膜通道,导致靶细胞渗透性溶解。颗粒酶 B 是丝氨酸蛋白酶,进入靶细胞后可激活 caspases 链锁反应,引起靶细胞 DNA 的降解,从而杀伤靶细胞。但本研究中 BaF3/mb15/RAE 细胞对 NK 细胞释放穿孔素和颗粒酶 B 并没有明显影响,提示膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 对 NK 细胞杀伤活性的增强可能并不是通过刺激 NK 细胞释放穿孔素和颗粒酶 B 实现的。除了穿孔素和颗粒酶 B 途径以外, NK 细胞还可以通过 FasL-Fas 途径诱导靶细胞的凋亡。本研究结果显示, BaF3/RAE 细胞和 BaF3/mb15/RAE 细胞均可刺激 NK 细胞表达 FasL,且 BaF3/mb15/RAE 细胞的刺激作用最为明显。因此膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 可以发挥联合作用上调 NK 细胞表面 FasL 的表达水平,膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 对 NK 细胞杀伤功能的增强作用可能是由 FasL-Fas 途径所介导的。

总之,本研究证实表达膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 的 BaF3/mb15/RAE 细胞在体外能够诱导 NK 细胞活化,并增强 NK 细胞的杀伤活性。这一结果为进一步研究 BaF3/mb15/RAE 细胞体内对 NK 细胞的影响及其抗肿瘤效应提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Meazza R, Azzarone B, Orengo AM, et al. Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: Perspectives for immunotherapy [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011: 861920.
- [2] Geller MA, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(12): 1445-1459.
- [3] Kobayashi H, Dubois S, Sato N, et al. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance [J]. *Blood*, 2005, 105(2): 721-727.
- [4] Burkett PR, Koka R, Chien M, et al. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15R α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8⁺ T cell homeostasis [J]. *J Exp Med*, 2004, 200(7): 825-834.
- [5] Dubois S, Patel HJ, Zhang M, et al. Preassociation of IL-15 with IL-15R alpha-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.
- [6] González S, López-Soto A, Suarez-Alvarez B, et al. NK G2D ligands: Key targets of the immune response [J]. *Trends Immunol*, 2008, 29(8): 397-403.
- [7] Champsaur M, Lanier LL. Effect of NK G2D ligand expression on host immune responses [J]. *Immunol Rev*, 2010, 235(1): 267-285.
- [8] Qian L, Ji MC, Pan XY, et al. Construction of a plasmid for co-expression of mouse membrane-bound form of IL-15 and RAE-1 ϵ and its biological activity [J]. *Plasmid*, 2011, 65(3): 239-245.
- [9] Kim GG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, et al. A novel multiparametric flow cytometry-based cytotoxicity assay simultaneously immunophenotypes effector cells: Comparisons to a 4 h ⁵¹Cr-release assay [J]. *J Immunol Methods*, 2007, 325(1/2): 51-66.
- [10] Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity [J]. *J Immunol Methods*, 2004, 294(1/2): 15-22.
- [11] Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, et al. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity [J]. *Cell Immunol*, 2009, 254(2): 149-154.
- [12] 周忠海, 陈复兴, 吕小婷, 等. 人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞 CD107a 的表达变化与细胞毒活性的关系 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(3): 301-305.
- [13] Klingemann HG and Martinson J. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications [J]. *Cytotherapy*, 2004, 6(1): 15-22.
- [14] Imai C, Iwamoto S, Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells [J]. *Blood*, 2005, 106(1): 376-383.
- [15] 黄庆生, 李琦, 黄勇, 等. 人 NK 细胞体外高效扩增的实验研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(12): 1167-1169, 1173.
- [16] Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NK G2D [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(9): 737-744.
- [17] Stern-Ginossar N, Mandelboim O. An integrated view of the regulation of NK G2D ligands [J]. *Immunology*, 2009, 128(1): 1-6.
- [18] Zola H. Markers of cell lineage, differentiation and activation [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2000, 14(3): 218-219.
- [19] Larkin J, Renukaradhya GJ, Sriram V, et al. CD44 differentially activates mouse NK T cells and conventional T cells [J]. *J Immunol*, 2006, 177(1): 268-279.
- [20] Tamang DL, Redelman D, Alves BN, et al. Induction of granzyme B and T cell cytotoxic capacity by IL-2 or IL-15 without antigens: Multiclonal responses that are extremely lytic if triggered and short-lived after cytokine withdrawal [J]. *Cytokine*, 2006, 36(3/4): 148-159.

[收稿日期] 2011-09-20

[修回日期] 2011-10-30

[本文编辑] 王莹