

去甲斑蝥素联合 IL-12、IL-15 处理增强 PBMC 对 Raja 细胞的杀伤效应

余莉华¹, 曾雅丽², 胡亮杉³, 贺艳杰³, 黄宇贤³, 宋朝阳³, 郭坤元³ (1. 南方医科大学珠江医院 儿科, 广东 广州 510282; 2. 韶关粤北人民医院 儿科, 广东 韶关 512000; 3. 南方医科大学珠江医院 血液科, 广东 广州 510282)

创新点评: 中药抗癌药物去甲斑蝥素增强 PBMC 对淋巴瘤的杀伤

去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)是我国自行研制的一种新型抗癌药物,系由中药斑蝥体内的主要抗癌成分斑蝥素去除 1、2 位甲基后经人工合成,目前主要用于肺癌、肝癌、食道癌等癌症的临床治疗,尤其在晚期肿瘤的治疗中具有良好的应用前景。既往关于 NCTD 在肿瘤细胞中的研究,主要与抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、抗侵袭转移和抑制血管形成相关,但 NCTD 在人 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞株中的过继免疫治疗作用及相关机制的研究,尚未见有报道。

本期刊登的余莉华等的研究论文,采用锥虫蓝拒染法、LDH 释放法和流式细胞术等方法,从细胞免疫的角度探讨了细胞因子 IL-2、IL-15 激活的人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)对 NCTD 处理后的 Raji 细胞的杀伤效应及其作用机制。研究发现,未活化的 PBMC 不能杀伤 Raji 细胞,但可显著杀伤 NCTD 处理后的 Raji 细胞;当 PBMC 经 IL-2、IL-15 激活后,可更有效地杀伤 NCTD 处理后的 Raji 细胞。因此认为,NCTD 与细胞因子 IL-2、IL-15 联合作用能明显增强 PBMC 对 Raji 细胞的杀伤。此外,进一步研究发现,此杀伤作用与 NCTD 上调 Raji 细胞表面 ULBP2 的表达和 IL-2、IL-15 上调 PBMC 表面 NKG2D 的表达相关。

该研究探讨了 NCTD 联合细胞因子在淋巴瘤过继细胞免疫治疗中的作用及其机制,为高度侵袭性淋巴瘤的免疫治疗提供了新的临床治疗思路。

首都医科大学附属北京儿童医院
血液病中心副主任、教授、博士生导师



[摘要] **目的:**探讨细胞因子 IL-2、IL-15 激活的人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)对去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)处理后的人 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞的杀伤效应及其可能机制。**方法:**锥虫蓝拒染法检测 NCTD 对 Raji 细胞和 PBMC 细胞增殖的影响;LDH 释放法检测 IL-2、IL-15 激活后的 PBMC 对 K562 细胞和 Raji 细胞的杀伤;流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测 IL-2、IL-15 诱导后 PBMC 表面 NKG2D 的表达,以及 NCTD 作用前后 Raji 细胞表面 NKG2D 配体(MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3)的表达。**结果:**NCTD 抑制 Raji 细胞的增殖,具有剂量、时间依赖性($P < 0.05$),但对 PBMC 增殖无影响($P > 0.05$)。在效靶比为 10:1、20:1 时,IL-2、IL-15 激活的 PBMC 对 K562 细胞的杀伤率较未激活的 PBMC 明显增高[(52.42 ± 3.89)% vs (15.82 ± 5.12)%,(79.55 ± 9.22)% vs (27.67 ± 3.66)%, $P < 0.05$];PBMC 对 NCTD 处理后 Raji 细胞杀伤率较未经 NCTD 处理的 Raji 细胞明显增高[(23.63 ± 6.20)% vs (5.04 ± 1.25)%,(41.80 ± 4.09)% vs (8.59 ± 2.19)%; $P < 0.05$],且 IL-2、IL-15 激活的 PBMC 对 NCTD 处理后 Raji 细胞的杀伤率较 NCTD 处理前明显提高[(38.97 ± 2.76)% vs (13.19 ± 3.67)%,(63.09 ± 7.30)% vs (19.89 ± 4.15)%; $P < 0.05$]。激活后 PBMC 表面 NKG2D 表达率升高[(44.91 ± 5.85)% vs (25.28 ± 7.69)%, $P < 0.05$]。NCTD 作用后 Raji 细胞表面 NKG2D 的配体 ULBP2 表达显著升高[(12.69 ± 3.99)% vs (1.03 ± 0.42)%, $P < 0.05$],而其他配体 MICA、MICB、ULBP1、ULBP3 的表达无明显变化($P > 0.05$)。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30973454)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30973454)

[作者简介] 余莉华(1985-),女,广东省韶关市人,硕士,住院医师,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究。E-mail: eveylh@yahoo.com.cn

[通信作者] 郭坤元(GUO Kun-yuan, corresponding author), E-mail: gzyuan@pub. Guangzhou. gd. cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120926.0850.002.html>

结论: NCTD 联合细胞因子 IL-2、IL-15 处理能增强 PBMC 对 Raji 细胞的杀伤效应,其机制与 NCTD 上调 Raji 细胞表面 ULBP2 表达和细胞因子上调 PBMC 表面 NKG2D 表达有关。

[关键词] 去甲斑蝥素; IL-2; IL-15; 淋巴瘤; Raji 细胞; NKG2D; NKG2D 配体; ULBP2

[中图分类号] R733.4; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0472-06

Combining norcantharidin with IL-2 and IL-15 enhances the cytotoxicity of PBMC on Raji cells

YU Li-hua¹, ZENG Ya-li², HU Liang-shan³, HE Yan-jie³, HUANG Yu-xian³, SONG Chao-yang³, GUO Kun-yuan³
(1. Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China; 2. Department of Pediatrics, Yuebei People's Hospital of Shaoguan, Shaoguan 512000, Guangdong, China; 3. Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the cytotoxicity and the underlying mechanisms of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) activated by IL-2 and IL-15 on human Burkitt lymphoma Raji cells after being treated by norcantharidin (NCTD). **Methods:** Trypan blue assay was used to detect the inhibitory effect of NCTD on Raji cells and PBMC. The cytotoxic effects of PBMC activated by IL-2 and IL-15 against K562 cells and Raji cells were analyzed by LDH releasing assay. The expression of NKG2D on the surface of PBMC activated by IL-2 and IL-15 was assayed by flow cytometry (FCM). The expressions of NKG2D ligands (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3) on Raji cells were assayed by FCM before and after NCTD treatment. **Results:** NCTD inhibited the proliferation of Raji cells significantly in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$), on the contrary, it showed no significant effect on PBMC proliferation ($P > 0.05$). The cytotoxic rates of IL-2 and IL-15 activated PBMC on K562 cells were more than that of inactivated PBMC when the ratio of effect/target (E:T) were 10:1 and 20:1 ($[52.42 \pm 3.89]\%$ vs $[15.82 \pm 5.12]\%$, $[79.55 \pm 9.22]\%$ vs $[27.67 \pm 3.66]\%$, $P < 0.05$), respectively. The cytotoxic rates of inactivated PBMC against Raji cells after being treated by NCTD were increased compared with untreated Raji cells ($[23.63 \pm 6.20]\%$ vs $[5.04 \pm 1.25]\%$, $[41.80 \pm 4.09]\%$ vs $[8.59 \pm 2.19]\%$, $P < 0.05$) with E:T of 10:1 and 20:1 respectively. Meanwhile, the cytotoxic rates of PBMC after being activated by IL-2 and IL-15 on NCTD-treated Raji cells were also increased compared with that of untreated PBMC ($[38.97 \pm 2.76]\%$ vs $[13.19 \pm 3.67]\%$, $[63.09 \pm 7.30]\%$ vs $[19.89 \pm 4.15]\%$, $P < 0.05$). The expression of NKG2D on PBMC activated by IL-2 and IL-15 was increased compared with untreated PBMC ($[44.91 \pm 5.85]\%$ vs $[25.28 \pm 7.69]\%$, $P < 0.05$). The expressions of NKG2D ligands on Raji cells, especially ULBP2 were up-regulated ($[12.69 \pm 3.99]\%$ vs $[1.03 \pm 0.42]\%$, $P < 0.05$) after being treated by NCTD, while no significant changes were found in other ligands ($P > 0.05$). **Conclusion:** Combining NCTD with IL-2 and IL-15 can increase the cytotoxicity of PBMC on Raji cells, which may be related with NCTD-increased expression of ULBP2 on Raji cell surface and cytokine-increased expression of NKG2D on PBMC surface.

[Key words] norcantharidin; IL-2; IL-15; lymphoma; Raji cell; NKG2D; NKG2D ligand; ULBP2

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 472-477]

去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)是斑蝥素去甲基化人工合成的衍生物,是天然的丝/苏氨酸磷酸酶 PP1 及 PP2A 抑制剂^[1]。目前研究显示,NCID 能抑制多种肿瘤细胞株的增殖^[2];在体内抑制肿瘤细胞的同时,不降低外周血中的白细胞数量,没有明显的骨髓抑制作用,使得其在抗肿瘤中体现了特有的优势^[3]。由于单纯免疫细胞治疗在大多数肿瘤患者中未取得如体外实验那样高的杀伤效应,如何使肿瘤细胞对免疫细胞杀伤变得敏感,是目前肿瘤免

疫治疗的热点问题之一。Raji 细胞是从 Burkitt 淋巴瘤患者体内分离出的细胞株,经多次传代培养形成无限细胞系,其在 Burkitt 淋巴瘤的研究中具有代表性,广泛应用于基础研究中^[4]。已有研究^[5-6]表明,Raji 细胞能抵抗同种异体 NK 细胞的杀伤作用。因此,寻找可能调节 Raji 细胞对机体免疫细胞杀伤敏感性的药物具有十分重大的意义。本实验检测经 NCTD 作用后的 Raji 细胞对由 IL-2、IL-15 诱导的人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear

cell, PBMC) 杀伤敏感性的变化, 并研究其可能的机制, 探讨提高过继细胞免疫治疗疗效的方法, 为新的免疫治疗方案提供思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

NCTD 购自贵州壹佰公司, 0.4% 锥虫蓝染液购自美国 Gibco 公司, RPMI 1640 液体培养基购自北京 Hyclone 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) 购自武汉博士德公司, Ficoll-hypaque 淋巴细胞分离液购自天津 TBD 公司。LDH 杀伤活性检测试剂盒(non-radioactive cytotoxicity assay) 购自美国 Promega 公司, rIL-2、rIL-15 购自美国 Protech 公司。PE 标记的鼠抗人 NKG2D、鼠抗人 MICA(IgG2B)、鼠抗人 MICB(IgG2B)、鼠抗人 ULBP1(IgG2A)、鼠抗人 ULBP2(IgG2A)、鼠抗人 ULBP3(IgG2A)、IgG2B 和 IgG2A 同型对照的山羊抗小鼠 IgG 均购自美国 R&D 公司。酶标仪 ELX-800 购自美国 Bio-Tek 公司, 流式细胞仪购自美国 BD 公司。人 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞株和人慢性粒细胞白血病 K562 细胞株为珠江医院血液科实验室冻存细胞株。

1.2 Raji 细胞和 K562 细胞的培养

Raji 细胞和 K562 细胞分别培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 每 2~3 d 传代 1 次, 实验所用细胞均处于对数生长期。

1.3 IL-2、IL-15 激活的 PBMC 的制备

取健康志愿者外周血, 密度梯度分离 PBMC, PBS 洗 2 次, 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。后分两部分, 一部分继续培养, 另一部分在第 2 天使用含 20 ng/ml rhIL-15、500 U/ml rhIL-2 和 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养, 隔日半量换液, 并补充细胞因子, 至第 5 天即可用于后续实验。

1.4 锥虫蓝拒染法检测 NCTD 对细胞增殖影响

分别取对数生长期 Raji 细胞和 PBMC, 5×10^5 /孔接种于 12 孔板, 分别加入终质量浓度为 0.15、0.31、0.63、1.25、2.50 μg/ml 的 NCTD 作用 48 h, 各设置 3 个复孔, 以生理盐水作为对照。分别在 24、48、72 h 收集细胞悬液; 离心后($1\ 000 \times g$, 5 min) 用 100 μl 培养基重悬细胞, 吸取 10 μl 细胞悬液加入 10 μl 锥虫蓝染液中, 混匀染色, 已染色细胞计数, 3 min 内计数完毕。细胞抑制率(%) = (对照组存活细胞数 - 实验组存活细胞数) / 对照组存活细胞总

数 $\times 100\%$ 。

1.5 LDH 法检测 PBMC 对细胞的杀伤

取对数生长期 Raji 和 K562 细胞, 分别接种于 25 cm² 培养瓶中, 加入 0.5 μg/ml 的 NCTD 培养 48 h, 以生理盐水为对照组, 锥虫蓝法计数活细胞。取各组 Raji 和 K562 细胞为靶细胞, 用 IL-2、IL-15 激活前后的 PBMC 为效应细胞, 按 LDH 杀伤活性检测试剂盒说明书操作, 按不同效靶比(10:1、20:1) 加入 96 孔板, 各组均设 3 个复孔, 于 37 °C、5% CO₂ 培养 4 h, 在容积纠正组和靶细胞最大释放组中, 每孔提前 45 min 加入 10 μl 裂解液。离心($3\ 000 \times g$, 5 min) 后小心吸取每孔上清至另一 96 孔平底酶标板中, 每孔加 50 μl LDH 底物反应液, 室温避光放置 30 min, 随后在每孔中加入 50 μl 终止液终止反应。以 ELX-800 酶标仪测波长 492 nm 处 D 值。PBMC 杀伤率(%) = (杀伤实验组 D 值 - 靶细胞自发释放组 D 值 - 效应细胞自发释放组 D 值) / (靶细胞最大释放组 D 值 - 靶细胞自发释放组 D 值) $\times 100\%$ 。

1.6 FCM 检测 PBMC 表面 NKG2D 的表达

收集 IL-2、IL-15 诱导前后 PBMC(2×10^6 /ml), PBS 洗 2 次, 按 10 μg/ml 分别加入 PE 标记的鼠抗人 NKG2D 抗体, 4 °C 30 min; 再加入含 5% 胎牛血清的 PBS 洗 2 次($1\ 000 \times g$, 5 min), 加入 300 μl PBS 重悬。以同型 IgG 抗体做阴性对照, 流式细胞术检测 1×10^4 个细胞的 NKG2D 表达率。

1.7 FCM 检测 Raji 细胞表面 NKG2D 配体的表达

将对数生长期 Raji 细胞, 经 0.5 μg/ml NCTD 作用 48 h 后, 收集约 7×10^6 个细胞, 并设培养基对照组。含 5% 胎牛血清的 PBS 洗 2 次($1\ 000 \times g$, 5 min), 将 1×10^7 /ml 的细胞悬液分装至 7 个 EP 管中, 每管 100 μl。加入鼠抗人单抗 MICA(IgG2B)、MICB(IgG2B)、ULBP1(IgG2A)、ULBP2(IgG2A)、ULBP3(IgG2A)、同型对照 IgG2B 和 IgG2A 各 10 μl, 4 °C 避光孵育 30 min。用含 5% 胎牛血清的 PBS 洗 2 次($1\ 000 \times g$, 5 min), 100 μl PBS 重悬细胞, 加入 PE 标记的山羊抗小鼠 IgG, 4 °C 避光孵育 30 min。用 PBS 洗涤 2 次($1\ 000 \times g$, 5 min), 300 μl PBS 重悬细胞。上机检测, 分析 1×10^4 个细胞中阳性细胞的百分率。

1.8 统计学处理

所有实验均重复 3 次。应用 SPSS13.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, NCTD 对细胞的增殖抑制和 PBMC 对细胞的杀伤使用析因设计资料的方差分析, NKG2D 及其配体表达的比较使用 *t* 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NCTD 对 Raji 细胞、PBMC 增殖的影响

质量浓度为 0.15、0.31、0.63、1.25、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 NCTD 作用 48 h,对 Raji 细胞增殖的抑制率分别为 $(19.05 \pm 1.67)\%$ 、 $(37.07 \pm 4.75)\%$ 、 $(58.22 \pm 6.87)\%$ 、 $(73.47 \pm 4.71)\%$ 和 $(92.11 \pm 2.75)\%$,其 IC_{50} 为 0.47 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。同样质量浓度的 NCTD 作用于 PBMC,对 PBMC 的增殖无影响,也没有观察到有毒性作用。

实验选择 NCTD 对 Raji 细胞作用 IC_{50} 附近的值 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为后续实验的作用剂量。

2.2 IL-2、IL-15 激活的 PBMC 高效杀伤 K562 细胞

经 IL-2、IL-15 激活的 PBMC 在效靶比为 10:1、20:1 时对 K562 细胞的杀伤率比未激活的 PBMC 高 $[(52.42 \pm 3.89)\% \text{ vs } (15.82 \pm 5.12)\%, (79.55 \pm 9.22)\% \text{ vs } (27.67 \pm 3.66)\%]; P < 0.05$,表 1]。结果提示,激活 PBMC 的杀伤效应明显优于未激活的 PBMC。

2.3 IL-2、IL-15 激活的 PBMC 对 NCTD 作用前后 Raji 细胞的杀伤

Raji 细胞对未经激活的 PBMC 存在天然抵抗,NCTD 处理可提高 Raji 对 PBMC 的敏感性。在效靶比为 10:1、20:1 时,PBMC 对 NCTD 处理

后的 Raji 细胞的杀伤率较处理前明显提高 $[(23.63 \pm 6.20)\% \text{ vs } (5.04 \pm 1.25)\%, (41.80 \pm 4.09)\% \text{ vs } (8.59 \pm 2.19)\%]; P < 0.05$ 。且经 IL-2、IL-15 激活后,PBMC 杀伤活性进一步提高,IL-2、IL-15 激活后 PBMC 对 NCTD 处理后 Raji 细胞的杀伤率较 NCTD 处理前明显提高 $[(19.89 \pm 4.15)\% \text{ vs } (13.19 \pm 3.67)\%, (63.09 \pm 7.30)\% \text{ vs } (38.97 \pm 2.76)\%]; P < 0.05$ 。结果说明,NCTD 能明显提高 Raji 细胞对 IL-2、IL-15 激活后 PBMC 的杀伤敏感性,且激活后 PBMC 的杀伤效应明显优于未激活的 PBMC ($P < 0.05$,表 2)。

表 1 IL-2、IL-15 激活的 PBMC 对 K562 细胞的杀伤率 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 1 Cytotoxic rates of PBMC against K562 cells after being activated by IL-2 and IL-15 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Group	E:T		Total
	10:1	20:1	
Inacti-PBMC	15.82 \pm 5.12	27.67 \pm 3.66	21.74 \pm 7.61
Acti-PBMC	52.42 \pm 3.89*	79.55 \pm 9.22*	65.98 \pm 16.15*

* $P < 0.05$ vs inacti-PBMC

表 2 IL-2、IL-15 激活的 PBMC 对 NCTD 作用前后 Raji 细胞的杀伤率 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 2 Cytotoxic rates of PBMC activated by IL-2 and IL-15 against Raji cells before and after NCTD treatment ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Group	Inacti-PBMC (E:T)		Acti-PBMC (E:T)	
	10:1	20:1	10:1	20:1
Control	5.04 \pm 1.25	8.59 \pm 2.19	13.19 \pm 3.67	19.89 \pm 4.15
NCTD	23.63 \pm 6.20*	41.80 \pm 4.09*	38.97 \pm 2.76*	63.09 \pm 7.30* Δ

* $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs inactivated PBMC

2.4 IL-2、IL-15 激活前后 PBMC 表面 NKG2D 的表达

如图 1 所示,IL-2、IL-15 激活后的 PBMC 表面活化性受体 NKG2D 的表达率较激活前明显升高 $[(44.91 \pm 5.85)\% \text{ vs } (25.28 \pm 7.69)\%, P < 0.05]$ 。

2.5 NCTD 作用前后 Raji 细胞 NKG2D 配体的表达

NKG2D 配体主要包括有 MICA/B 和 ULBP1~3。NCTD 作用 Raji 细胞 48 h 后,Raji 细胞表面免疫激活物 ULBP2 的表达显著升高 $[(12.69 \pm 3.99)\% \text{ vs } (1.03 \pm 0.42)\%, P < 0.05]$,

余配体 MICA、MICB、ULBP1 及 ULBP3 的表达无明显变化 ($P > 0.01$,表 3)。

3 讨论

随着肿瘤综合治疗日益深入临床,过继细胞免疫治疗(adoptive cellular immunotherapy, ACI)作为一种新兴治疗方案广泛地用于肿瘤治疗临床^[7]。肿瘤 ACI 是通过输注具有抗肿瘤活性的功能性免疫细胞,直接杀伤或激发机体免疫反应杀伤肿瘤细胞,达到治疗肿瘤的目的^[8]。

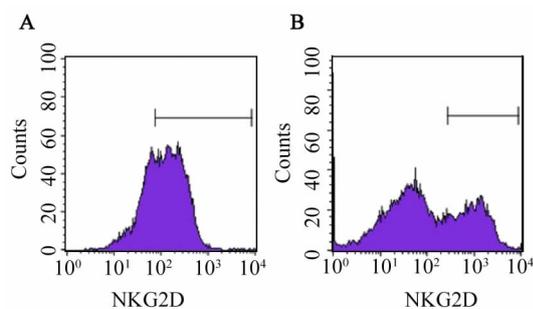


图 1 IL-2、IL-15 激活前后 PBMC 表面 NKG2D 的表达($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Fig.1 Expression of NKG2D on PBMC before and after IL-2 and IL-15 treatment($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

A: PBMC; B: PBMC activated by IL-2, IL-15

表 3 NCTD 作用前后 Raji 细胞 NKG2D 配体的表达($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 3 Expression of NKG2D ligands on Raji cells before and after NCTD treatment($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Group	MICA	MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3
Control	0.50 ± 0.26	0.63 ± 0.38	1.40 ± 0.89	1.03 ± 0.42	0.67 ± 0.35
NCTD	0.70 ± 0.20	1.40 ± 1.13	3.57 ± 1.70	12.69 ± 3.99*	1.60 ± 1.23

* $P < 0.05$ vs control

实验结果显示,未激活 PBMC 对 Raji 细胞的杀伤率低于 10%,即使增加效靶比亦不能增加杀伤率 ($P > 0.05$)。经 IL-2、IL-15 诱导后, PBMC 的杀伤效应虽有所提高,但仍比较弱,在效靶比为 10:1、20:1 时,杀伤率也分别只有 (13.19 ± 3.67)% 和 (19.89 ± 4.15)%。同样条件下,激活后 PBMC 对 K562 细胞的杀伤率高达 (52.42 ± 3.89)% 和 (79.55 ± 9.22)%。故可推测, Raji 细胞不仅对未经激活的免疫细胞存在抵抗,对活化免疫细胞的杀伤亦呈抵抗状态。研究^[5-6]发现, Raji 细胞株能逃逸同种异体 NK 细胞免疫杀伤,原因主要是与 Raji 细胞表面高表达 HLA I 类分子、极低表达免疫激活物 NKG2D 的配体 MICA/B 和 ULBP1 ~ 3 有关,因此抑制性信号占主导地位,不能激活免疫杀伤细胞,造成免疫细胞杀伤无能。然而, IL-2、IL-15 激活前后的 PBMC 杀伤经过 NCTD 预处理过的 Raji 细胞,其杀伤率均明显增高 ($P < 0.05$),且经过激活的 PBMC 杀伤效应明显优于未经激活的 PBMC ($P < 0.05$)。结果提示,原本对免疫细胞产生抵抗的 Raji 细胞,经过 NCTD 预处理后,其能被免疫细胞识别,并激发免疫细胞对其进行杀伤。

免疫细胞在杀伤肿瘤时,需要肿瘤细胞表达免

疫激活物,从而激发其杀伤功能。因此,有必要调控肿瘤细胞,使其表达一些免疫激活物,激发活化免疫细胞的杀伤性能^[12-13]。NKG2D 是 NK 细胞特征性的活化性受体之一^[14],其可表达在 NK 细胞、CD8⁺ αβT 细胞、γδT 细胞、NKT 细胞和活化的巨噬细胞表面^[15];其可识别其配体 MHC- I 类链相关分子 A 或 B (MHC class I chain-related molecule A or B; MICA, MICB) 以及人巨细胞病毒蛋白 UL16 的结合蛋白分子 (human cytomegalovirus glycoprotein UL16-binding protein; ULBP1, ULBP2, ULBP3)^[16]。NKG2D 与这些配体结合即足以刺激像 NK 细胞等免疫细胞的活化,并能克服抑制性受体的强势信号,使得其发挥对靶细胞的细胞毒效应,并作为协同刺激信号促进 αβT 细胞和 γδ 细胞的活化,从而增强其杀伤效应^[17-18]。研究^[19]发现, IL-2、IL-15 联合培养是获得纯度较高、细胞毒活性较强的 NK 细胞的有效方法,同时亦提高了免疫细胞表面 NKG2D 的表达。本实验分离的 PBMC,经过 IL-2、IL-15 激活后,其表面 NKG2D 表达明显上调 [(25.28 ± 7.69)% vs (44.91 ± 5.85)% , $P < 0.05$]。研究^[13,20]还表明,药物能提高肿瘤细胞表面 NKG2D 配体的表达,不同药物诱导不同肿瘤细胞的 NKG2D 配体表达不

目前 ACI 主要应用于中晚期肿瘤患者,尤其是不能耐受手术、放化疗的患者^[9]。虽然 ACI 在临床应用的安全性已得到证实,但仍存在许多问题,其中最突出的为 ACI 在大多数肿瘤患者中未取得如体外实验中那样高的杀伤效应。其原因在于肿瘤细胞缺乏免疫原性,不能被免疫细胞识别、杀伤;同时未经激活的免疫细胞对肿瘤细胞产生耐受,不能很好地发挥免疫监视作用^[10-11]。本实验拟使用细胞因子激活免疫细胞,杀伤经过 NCTD 预处理后的 Raji 细胞,试图从这两个方面打破肿瘤耐受环节,促使 Raji 细胞被杀伤清除。

同。本结果显示,0.5 $\mu\text{g/ml}$ NCTD 能提高 Raji 细胞表面 ULBP2 的表达 ($P < 0.05$),其余配体 MICA、MICB、ULBP1、ULBP3 表达无明显变化 ($P > 0.05$)。故可推测,上调的 Raji 细胞表面的 ULBP2 与激活的 PBMC 表面的 NKG2D 结合,活化 NK 细胞等免疫细胞,传递活化性信号,克服 HLA I 分子传递的抑制性信号,从而激活免疫细胞,分泌特定的细胞因子和 IFN- γ ,激动免疫细胞的杀伤效应,达到清除肿瘤细胞的目的^[22]。

NCTD 是否还影响 Raji 细胞表面其他受体的表达,如外源性凋亡通路中的 Fas/FasL、TRAIL/TRAIL-R 等,使得免疫细胞在杀伤 Raji 细胞的同时诱导其发生凋亡,而不引起周围组织炎症性反应^[13,23],这些问题还需进一步深入探讨。

综上所述,NCTD 既抑制 Raji 细胞增殖,又可诱导 Raji 细胞表达免疫激活物 ULBP2,激发免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤。因此,NCTD 可与细胞因子激活的 PBMC 组合成新的过继细胞免疫治疗方案杀伤高度侵袭性淋巴瘤,为这一类肿瘤的临床治疗提供新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Hill TA, Stewart SG, Gordon CP, et al. Norcantharidin analogues: Synthesis, anticancer activity and protein phosphatase 1 and 2A inhibition [J]. *Chem Med Chem*, 2008, 3(12): 1878-1892.
- [2] Li Y, Ge Y, Liu FY, et al. Norcantharidin, a protective therapeutic agent in renal tubulointerstitial fibrosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 361(1/2): 79-83.
- [3] Deng L, Tang S. Norcantharidin analogues: A patent review (2006-2010) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2011, 21(11): 1743-1753.
- [4] de Jong D, Balague PO. The molecular background of aggressive B cell lymphomas as a basis for targeted therapy [J]. *J Pathol*, 2011, 223(2): 274-282.
- [5] Hasenkamp J, Borgerding A, Wulf G, et al. Resistance against natural killer cell cytotoxicity: Analysis of mechanisms [J]. *Scand J Immunol*, 2006, 64(4): 444-449.
- [6] 周健,梅家转,郭坤元,等. Raji 细胞逃逸 NK 细胞免疫杀伤机制的初步探讨 [J]. *免疫学杂志*, 2008, 24(4): 369-372.
- [7] Fuji S, Kapp M, Grigoleit Gu, et al. Adoptive immunotherapy with virus-specific T cells [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011, 24(3): 413-419.
- [8] Pegram HJ, Kershaw MH, Darcy PK. Genetic modification of natural killer cells for adoptive cellular immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2009, 1(4): 623-630.
- [9] Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, et al. Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(10): 3516-3527.
- [10] Grupp SA, June CH. Adoptive cellular therapy [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2011, 344: 149-172.
- [11] 蔡和花. 白血病过继免疫治疗的研究进展 [J]. *国际儿科学杂志*, 2011, 38(3): 248-250, 257.
- [12] 黄宇贤,郭坤元. 肿瘤生物治疗的新模式:分子靶向-过继性细胞免疫治疗 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(3): 243-249.
- [13] Hu L, Cao D, Li Y, et al. Resveratrol sensitized leukemia stem cell-like KG-1 α cells to cytokine-induced killer cells-mediated cytotoxicity through NKG2D ligands and TRAIL receptors [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(7): 516-526.
- [14] Textor S, Fiegler N, Arnold A, et al. Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2 [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(18): 5998-6009.
- [15] Zhu J, Huang X, Yang Y. NKG2D is required for NK cell activation and function in response to E1-deleted adenovirus [J]. *J Immunol*, 2010, 185(12): 7480-7486.
- [16] Obeidy P, Sharland AF. NKG2D and its ligands [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(12): 2364-2367.
- [17] Zafirova B, Wensveen FM, Gulin M, et al. Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(21): 3519-3529.
- [18] Huang B, Sikorski R, Sampath P, et al. Modulation of NKG2D-ligand cell surface expression enhances immune cell therapy of cancer [J]. *J Immunother*, 2011, 34(3): 289-296.
- [19] Decot V, Voillard L, Latger-Cannard V, et al. Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: Comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression [J]. *Exp Hematol*, 2010, 38(5): 351-362.
- [20] Wang YP, Zhang C, Niu JF, et al. Expression and significance of NKG2D ligands in 13 tumor cell lines [J]. *Ai Zheng*, 2008, 27(3): 243-248.
- [21] Cimmino F, Scoppettuolo MN, Carotenuto M, et al. Norcantharidin impairs medulloblastoma growth by inhibition of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *J Neurooncol*, 2012, 106(1): 59-70.
- [22] Park MJ, Bae JH, Chung JS, et al. Induction of NKG2D ligands and increased sensitivity of tumor cells to NK cell-mediated cytotoxicity by hematoporphyrin-based photodynamic therapy [J]. *Immunol Invest*, 2011, 40(4): 367-382.
- [23] Yildiz R, Benekli M, Buyukberber S, et al. The effect of bevacizumab on serum soluble FAS/FASL and TRAIL and its receptors (DR4 and DR5) in metastatic colorectal cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(10): 1471-1476.

[收稿日期] 2012-06-03

[修回日期] 2012-08-18

[本文编辑] 韩丹,周玲琳