

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.010

· 基础研究 ·

淋巴细胞 - 肿瘤细胞形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构的特征及意义

于晓敏¹, 杨忠¹, 王颖^{2▲}, 王小宁¹ (1. 复旦大学 生命科学院, 上海 200433; 2. 上海交通大学医学院 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

[摘要] **目的:**探究淋巴细胞和肿瘤细胞形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构的特征及意义。**方法:**以人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 与人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构为研究模型,采用流式细胞术分析淋巴细胞钻入肿瘤细胞形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构的特征。利用流式分选技术分选出小鼠脾淋巴细胞与 PLC/PRF/5 细胞形成的 cell-in-cell 胞内嵌合结构,利用平板克隆形成实验检测 cell-in-cell 胞内嵌合结构对 PLC/PRF/5 细胞生物学行为的影响。**结果:**4 h 和 8 h 时,以 CD3/CD28 抗体活化的 PBMC 对 PLC/PRF/5 细胞的伸入率分别为(15.75 ± 1.28)%、(13.49 ± 1.23)%,明显高于未活化 PBMC 的伸入率(10.56 ± 0.57)%、(11.38 ± 0.97)%; $P < 0.05$];且活化的 PBMC 在 4 h 时的伸入率明显高于未活化 PBMC 在 8 h 时的伸入率($P < 0.05$)。小鼠脾淋巴细胞伸入 PLC/PRF/5 细胞形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构后,PLC/PRF/5 细胞的克隆形成率明显高于未形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构的 PLC/PRF/5 细胞[(32.25 ± 2.32)% vs (21.92 ± 2.02)% , $P < 0.05$]。**结论:**活化后 PBMC 伸入 PLC/PRF/5 细胞形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构的比率升高、时间提前,同时形成胞内嵌合结构的肿瘤细胞在体外克隆形成能力增强。

[关键词] cell-in-cell 胞内嵌合结构;PLC/PRF/5 细胞;PBMC;流式分选;克隆形成

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)06-0621-07

Characterization of cell-in-cell structure formed between lymphocyte and tumor cell and its biological significance

YU Xiao-min¹, YANG Zhong¹, WANG Ying^{2▲}, WANG Xiao-ning¹ (1. School of life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. Shanghai Institute of Immunology, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective:** To study the characterization of the cell-in-cell structure formed between heterotypic cells and its biological significance. **Methods:** By establishing flow cytometry-based analysis and sorting methodology, the formation of heterotypic cell-in-cell structures between human liver cancer PLC/PRF/5 cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was characterized. Based on this step, a method of sorting the cell-in-cell structures and obtaining the cell-in-cell structures formed between mouse splenocytes and PLC/PRF/5 cells was established. Further analysis of the biological characteristic changes of the PLC/PRF/5 cells via plate colony formation assay showed the effect of the cell-in-cell structure formation on PLC/PRF/5 cells. **Results:** At 4 h and 8 h, the ratio of the cell-in-cell structures formed by activated PBMCs to PLC/PRF/5 tumor cells were apparently higher than that in the inactivated PBMC group (4 h: [15.75 ± 1.28]% vs [10.56 ± 0.57]%, $P < 0.05$; 8 h: [13.49 ± 1.23]% vs [11.38 ± 0.97]%, $P < 0.05$). Besides, the ratio of activated PBMC group at 4 h was still significantly higher than that in the inactivated PBMC group at 8 h ($P < 0.05$). The colony formation ratio of the sorted cell-in-cell structures formed by mouse splenocytes into PLC/PRF/5 cells was significantly higher than that of PLC/PRF/5 cells ([32.25 ± 2.32]% vs [21.92 ± 2.02]%, $P < 0.05$). **Conclusion:** The ratio of cell-in-cell structures formed between activated PBMCs and PLC/PRF/5 cells is higher than that of the

[基金项目] 上海市科委基金资助项目(No. 10JC1401200)。Project supported by the Foundation of Shanghai Science and Technology Committee (No. 10JC1401200)

[作者简介] 于晓敏(1987-),女,山东省临沂市人,硕士生,主要从事肿瘤学方面的研究。E-mail: xiaomin-yu@163.com

[通信作者] 王小宁(WANG Xiao-ning, corresponding author), E-mail: xwang88@gmail.com; 王颖(WANG Ying, corresponding author), E-mail: ywang@sibs.ac.cn. ▲共同通信作者

inactivated PBMCs, reaching the highest ratio in shorter time. Meanwhile, tumor cells in cell-in-cell structures show an increased colony formation ability *in vitro*.

[**Key words**] cell-in-cell structure; PLC/PRF/5 cell; PBMC; FACS sorting; colony formation

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(6): 621-627]

Cell-in-cell 胞内嵌合结构早在 1860 年已经有报道^[1],是指一个活细胞进入另一个活细胞内,并在宿主细胞内表现出生理活动的现象。Cell-in-cell 胞内嵌合结构可以在同种细胞间形成,也可以在异种细胞(如:肿瘤细胞与淋巴细胞)间形成,两种类型的胞内嵌合结构随后分别在多种病理情况下被发现^[2-4],但是其生理学和病理学意义长期以来未能得到解释。在国内,王小宁领导的团队在 30 年前观察到自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)可以进入肿瘤细胞,对肿瘤细胞进行杀伤,同时肿瘤细胞也可以反过来杀伤 NK 细胞^[5-6]。上述现象提示 cell-in-cell 胞内嵌合结构可能是 NK 细胞杀伤肿瘤细胞的新途径,更有意思的是肿瘤细胞对 NK 细胞的“吞噬”并反向清除 NK 细胞有可能成为肿瘤逃脱免疫杀伤的途径之一。不同于 Overholtzer 等^[7]在 2007 年报道的同种肿瘤细胞间形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构后,内化细胞的死亡是溶酶体介导的、多种蛋白酶参与的溶细胞作用。王珊等^[8]发现 NK 细胞进入肿瘤细胞后的死亡途径是 caspase 参与的细胞凋亡途径,并且发现 Ezrin 在 cell-in-cell 胞内嵌合结构形成中起着重要的作用。

目前研究 cell-in-cell 胞内嵌合结构的手段主要以形态学观察为主,通过细胞免疫荧光和细胞组织化学等方法对其形态特征进行详细的描述,该方法能全面了解 cell-in-cell 胞内嵌合结构形成过程中多种分子的参与和改变,但是对于深入研究 cell-in-cell 胞内嵌合结构的形成机制及其对宿主细胞生物学行为的影响,上述两种方法显然不能满足需要,为此建立其他的研究手段成为解析上述科学问题的前提。由于 cell-in-cell 胞内嵌合结构是两种细胞共孵育后所形成的特殊细胞结构,本研究以人肝癌肿瘤细胞株 PLC/PRF/5 与外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构为研究模型,将两种细胞分别采用不同的荧光染料标记后共孵育,首次采用流式细胞技术分析淋巴细胞钻入肿瘤细胞形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构的特征。在此技术基础上,利用流式分选技术分选出小鼠脾淋巴细胞与 PLC/PRF/5 形成的 cell-in-cell 胞内嵌合结构,分选获得的细胞进一步利用平板

克隆形成实验探索 cell-in-cell 胞内嵌合结构对肿瘤细胞生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞

靶细胞人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 购自 ATCC,保存于上海市免疫学研究所,其在含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液中于 5% CO₂ 和 37 °C 常规培养;效应细胞 PBMC 来自于健康志愿者外周血经 Ficoll-hypaque 密度梯度离心法分离获得。小鼠脾淋巴细胞(splenocyte)利用常规 Ficoll-hypaque 密度梯度离心法分离自 4~6 周 BALB/c 清洁级小鼠。

RPMI 1640 培养液、DMEM 高糖培养液、胎牛血清、活细胞染料 CellTracker™ Red CMTPX 和 CellTracker™ Green CMFDA 购于 Invitrogen 公司, anti-human CD3/CD28 抗体购自 eBioscience 公司,4% 多聚甲醛购于北京鼎国昌盛生物公司,戊二醛购自 Sigma 公司,快速吉姆萨(Giemsa)染液购自南京建成科技有限公司,DAPI 染液和抗荧光淬灭剂购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 CD3/CD28 抗体体外协同活化 PBMC^[9-10]

将抗 2 μg/ml CD3 单克隆抗体稀释于 PBS 中,按 200 μl/孔加入 96 孔平底板中,4 °C 包被过夜后,将 PBS 和 CD3 抗体混合液轻轻吸出,并用无菌 PBS 洗包被孔 1~2 遍,去除多余抗体。计数新鲜分离的 PBMC,用 RPMI 1640 完全培养基重悬,并调整密度为 1 × 10⁶/ml;细胞悬液按 200 μl/孔直接加到已包被有 CD3 抗体的孔中,并加入 CD28 抗体至终浓度为 5 μg/ml,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中,刺激培养 24 h 后收集细胞。

1.3 CellTracker 活细胞染色法分别标记靶细胞及效应细胞

人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 标记 CellTracker™ Red CMTPX。细胞培养贴壁后去除培养基, PBS 冲洗 1 次,加入无血清培养基 DMEM 及 CellTracker™ Red 染料(终浓度为 2.5 μmol/L); 37 °C、5% CO₂ 培养箱中避光孵育 30~45 min;吸掉培养液,加入 37 °C 预热的 DMEM 完全培养液 500 μl, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中避光孵育 30~45 min,重复 2 次洗涤多余染液;DMEM 完

全培养液培养待用。

PBMC 及小鼠脾淋巴细胞标记 CellTracker™ Green CMFDA。收集细胞, PBS 洗 1 遍, 用不含血清的 RPMI 1640 重悬细胞, 使细胞密度达到 2×10^6 /ml。加入 CellTracker™ Green 染料至终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$; 37°C 、5% 的 CO_2 培养箱中避光孵育 30 ~ 45 min; 离心 $400 \times g$, 5 min, PBS 洗 3 次; 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬培养待用。

1.4 吉姆萨染色法观察淋巴细胞-肿瘤细胞 cell-in-cell 胞内嵌合结构的形态

提前 4 h 将人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 按每孔 2×10^4 个细胞铺于 24 孔板中, 细胞贴壁后, 按效靶比 5:1 加入 PBMC, 共孵育 4 h 后, 吸掉培养液, 冷 PBS 轻轻冲洗 2 次, 2.5% 戊二醛 4°C 固定 20 min。每孔加入 1 ~ 2 滴吉姆萨染液中的 1 号染液, 摇晃均匀, 染色 1 min, 然后加入 2 倍体积的 2 号染液, 摇晃均匀染色 5 min; 吸掉染液, 加 PBS 保持细胞湿润, 倒置显微镜观察。

1.5 荧光显微镜观察淋巴细胞-肿瘤细胞 cell-in-cell 胞内嵌合结构的形态

专用爬片泡酸过夜, 用前蒸馏水清洗干净, 95% 乙醇浸泡, 用时灼烧灭菌, 提前放置于 24 孔板中。将标记 CellTracker™ Red 的人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 胰蛋白酶消化, 计数, 每孔 2×10^4 个铺于加入玻片的孔中, 待细胞贴壁后, 按效靶比 5:1 加入 CellTracker™ Green 染色的 PBMC, 相互作用 4 h 后, 冷 PBS 轻轻冲洗 2 次, 4% 多聚甲醛避光固定 15 min, PBS 冲洗 3 次; 取出玻片, 加 DAPI 染液染色 3 min, PBS 轻轻冲洗 3 次, 抗荧光淬灭剂一滴加在干净载玻片上, 将细胞爬片反置于其上, 指甲油封片, 荧光显微镜镜检。

1.6 流式细胞术检测淋巴细胞-肿瘤细胞 cell-in-cell 胞内嵌合结构的形成

将已标记 CellTracker™ Red 的 PLC/PRF/5 细胞消化、计数, 铺于 24 孔板中, 5×10^4 个/孔, 提前 4 h 使其贴壁; 按效靶比分别为 1:1、2:1、5:1 加入已标记 CellTracker™ Green 的 PBMC, 并设定时间梯度 2、4、8 和 12 h, 反应体系培养基为 $500 \mu\text{l}$, 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱内孵育; 移去培养基, 冷 PBS 洗 2 次, 洗掉附着的 PBMC; 消化细胞, $200 \times g$ 离心 5 min, PBS 洗涤一次, 用含 1% 多聚甲醛的 PBS 重悬, 收集至流式管中, 避光 4°C 保存, 待检测。经 FACS Calibur 流式细胞仪和 Cell Quest 软件, CellTracker™ Red CMTPIX 可经 PE 或/PE-Texas Red-A 通道获取数

据, Cell Tracker™ Green CMFDA 可经 FITC 通道获取数据。每管检测至少 10 000 个细胞, 获得的数据用 Flowjo 软件分析。并设立空白组: 未染色肿瘤细胞和 PBMC; 单标组: 未经共孵育但已标记活细胞染料的肿瘤细胞和 PBMC; 实验组: 经过不同时间共同孵育的肿瘤细胞和 PBMC。

1.7 细胞平板克隆形成实验检测 cell-in-cell 胞内嵌合结构的形成对靶细胞增殖能力的影响

为检测 cell-in-cell 胞内嵌合结构的形成对靶细胞增殖能力的影响, 本实验利用流式分选的方法将人肝癌细胞 PLC/PRF/5 与小鼠脾淋巴细胞形成的 cell-in-cell 胞内嵌合结构分选出来, 与未形成此结构的 PLC/PRF/5 细胞作对比。将流式分选获得的细胞分为两组, 分别是: ①形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构的 PLC/PRF/5⁺ 脾淋巴细胞; ②没有形成 cell-in-cell 嵌合结构的 PLC/PRF/5 (分选)。

将三组细胞悬液作梯度倍数稀释, 每组细胞分别以每孔 100、200 和 400 个细胞的梯度密度分别接种含 2 ml 37°C 预温培养液的 6 孔板中, 轻轻转动, 使细胞分散均匀。置 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度的细胞培养箱中培养 2 ~ 3 周。当培养板中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。弃去上清液, 用 PBS 小心浸洗 2 次。每孔加 4% 多聚甲醛 0.5 ml 固定细胞 15 min, 然后弃固定液, 加适量吉姆萨染色液染 10 ~ 30 min, 吸掉染色液, PBS 轻轻浸洗一次, 空气干燥。将培养板倒置并叠加一张带网格的透明胶片, 在显微镜(低倍镜)下计数大于 10 个细胞的克隆数, 最后计算克隆形成率。克隆形成率(%) = (克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$

1.8 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Graphpad Prim 5.0 软件分析, 组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PBMC 与肿瘤细胞形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构的形态学特征

将新鲜分离的 PBMC 和肿瘤细胞 PLC/PRF/5 共孵育 4 h 后, 采用吉姆萨染色观察淋巴细胞钻入 PLC/PRF/5 后形成的 cell-in-cell 嵌合结构形态, 如图 1 所示, 箭头所指即为钻入到 PLC/PRF/5 细胞质的淋巴细胞, 淋巴细胞染色较深, 且核质比较大, 可以清楚地辨认出来。

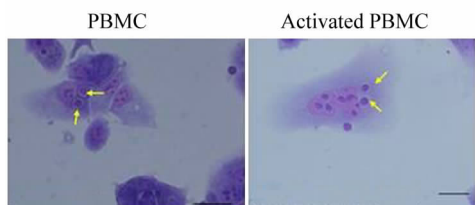


图 1 吉姆萨染色检测淋巴细胞 - 肿瘤细胞形成 cell-in-cell 嵌合结构(×1 000)
 Fig. 1 The cell-in-cell structure of lymphocytes and tumor cells stained by Giemsa (×1 000)

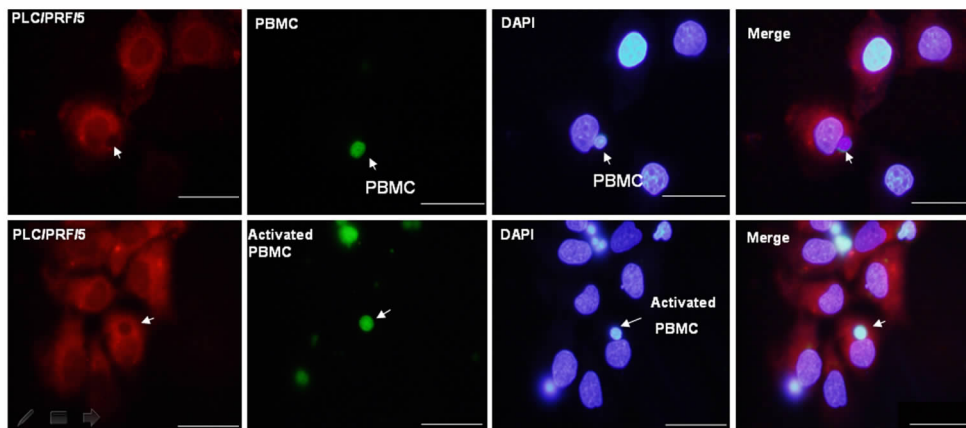


图 2 荧光染色检测淋巴细胞 - 肿瘤细胞形成 cell-in-cell 嵌合结构(bar: 50 μm)
 Fig. 2 Fluorescent staining of the cell-in-cell structure between lymphocytes and tumor cells (bar: 50 μm)

2.2 淋巴细胞 - 肿瘤细胞 cell-in-cell 嵌合结构的动态特征

将新鲜分离的 PBMC 和肿瘤细胞分别标记不同的荧光染料后共孵育, 采用流式细胞术分析不同孵育时间与不同细胞比例情况下肿瘤细胞与淋巴细胞形成 cell-in-cell 结构的比例, 获得其动力学变化。如图 3 所显示的结果, 在流式细胞结果图中可以将混合细胞经孵育后分为两群, 一群为单色的肿瘤细胞, 还有一群则为双色的肿瘤-淋巴细胞形成的 cell-in-cell 结构, 随着孵育时间的延长, 双色的 cell-in-cell 结构的比例逐渐增加; 同时随着淋巴细胞在共孵育中比例的增高, cell-in-cell 结构的比例逐渐升高。观察了共孵育 2、4、8 和 12 h 的钻入比例(如表 1 所示), 可以发现将 PBMC 与肿瘤细胞共孵育 8 h 后, 钻入率已达到最高[(12.19 ± 1.15)%]($P < 0.05$, 表 1)。

2.3 活化后 PBMC 与 PLC/PRF/5 细胞形成 cell-in-cell 嵌合结构的动态特征

将 PBMC 经抗 CD3 和抗 CD28 抗体活化后的细胞与细胞进行共孵育, 并在不同时间和不同比例测定 cell-in-cell 嵌合结构的比例, 如图 4 所示, 随着孵

育时间的延长, 双色的 cell-in-cell 嵌合结构的比例逐渐增加; 同时随着 PBMC 在共孵育中比例的增高, cell-in-cell 嵌合结构的比例也逐渐升高。观察了共孵育 2、4、8 和 12 h 的钻入比例(表 2), 由表 2 所示, 将活化 PBMC 与肿瘤细胞共孵育 4 h 后, 钻入率已达到最高[(15.57 ± 1.28)% , $P < 0.05$], 以后的比例则是逐渐下降。

表 1 PBMC 与 PLC/PRF/5 细胞形成 cell-in-cell 结构的比例($\bar{x} \pm s$, %)

Tab. 1 Cell-in-cell structure ratio formed by PBMC and PLC/PRF/5 cells($\bar{x} \pm s$, %)

Time (t/h)	Effect cell: Target cell		
	1:1	2:1	5:1
2	4.81 ± 1.27	7.86 ± 1.42	9.78 ± 0.70
4	6.04 ± 0.80	9.75 ± 0.90	10.56 ± 0.57
8	7.51 ± 1.30*	11.51 ± 1.08*	12.19 ± 1.15*
12	7.13 ± 0.73	10.39 ± 0.92	11.03 ± 1.75

* $P < 0.05$ vs 2 h groups

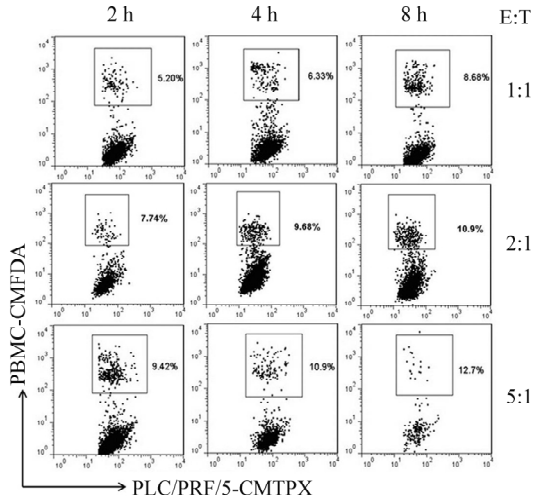


图3 PBMC 钻入 PLC/PRF/5 细胞形成 cell-in-cell 结构的动态变化

Fig. 3 Kinetic of cell-in-cell structure formed between PBMC and PLC/PRF/5 cells

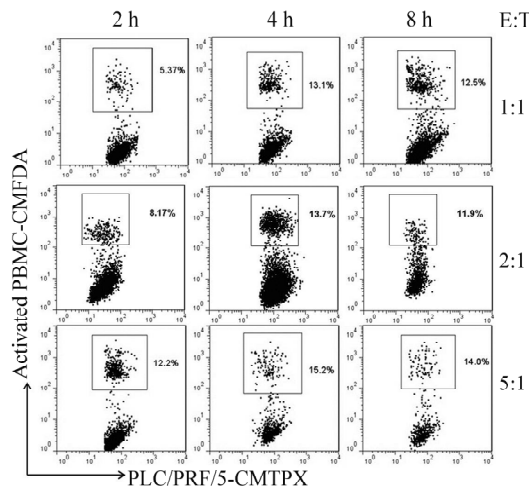


图4 活化的 PBMC 钻入 PLC/PRF/5 细胞形成 cell-in-cell 结构的动态变化

Fig. 4 Kinetic of cell-in-cell index formed between activated-PBMC and PLC/PRF/5 cells

2.4 活化后 PBMC 伸入 PLC/PRF/5 细胞形成 cell-in-cell 的比率明显升高

实验结果(表2,图5)显示,4 h 时,活化的 PBMC 对 PLC/PRF/5 细胞的伸入率为(15.75 ± 1.98)%,明显高于未活化 PBMC 的伸入率(10.56 ± 0.57)%($P < 0.05$);8 h 时,活化的 PBMC 对 PLC/PRF/5 细胞的伸入率为(13.82 ± 1.71)%,高于未活化 PBMC 形成率的(12.19 ± 1.15)%;并且,活化的 PBMC 在 4 h 时的伸入率明显高于未活化 PBMC 在 8 h 时的伸入率($P < 0.05$)。以上说明,

活化后 PBMC 伸入 PLC/PRF/5 细胞形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构的比率明显升高,且活化后 PBMC 伸入 PLC/PRF/5 细胞的达到最高比率的时间提前,也反映出其伸入能力的提升。

表2 活化的 PBMC 与 PLC/PRF/5 细胞形成 cell-in-cell 结构的比例($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.2 Cell-in-cell structure ratio formed by activated-PBMC and PLC/PRF/5 cells($\bar{x} \pm s, \%$)

Time (t/h)	Effect cell : Target cell		
	1:1	2:1	5:1
2	5.9 ± 0.30	8.57 ± 0.63	12.52 ± 1.22
4	12.72 ± 0.4**	14.46 ± 0.68**	15.57 ± 1.98**
8	12.67 ± 0.32	12.44 ± 0.51	13.82 ± 1.71
12	9.31 ± 1.32	10.68 ± 0.85	9.42 ± 0.67

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 2 h groups

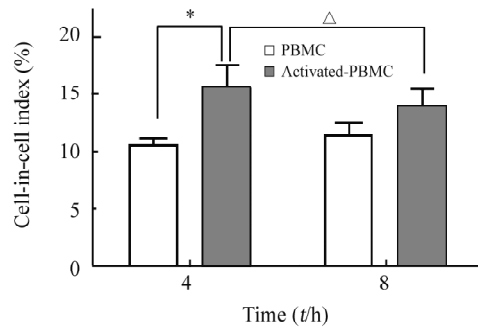


图5 活化与未活化 PBMC 在 PLC/PRF/5 细胞中的伸入率比较

Fig. 5 Comparison of cell-in-cell index of activated-PBMC or PBMC into PLC/PRF/5 cells

* $P < 0.05$ vs PBMC; $\Delta P < 0.05$ activated PBMC at 8 h

2.5 形成 cell-in-cell 嵌合结构后 PLC/PRF/5 细胞生物学行为的改变

为检验胞内嵌合结构是否会导致肿瘤细胞生物学行为的改变,本研究利用平板克隆形成实验将流式分选获得的细胞进行克隆形成能力的比较。脾淋巴细胞伸入后形成胞内嵌合结构的 PLC/PRF/5 细胞的克隆形成率为(32.25 ± 2.32)%,明显高于未形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构的肝癌细胞 PLC/PRF/5 克隆形成率的(21.92 ± 2.02)%($P < 0.05$)。提示肿瘤细胞和淋巴细胞形成胞内嵌合结构后,可影响肿瘤细胞 PLC/PRF/5 的生物学行为,特别是增殖行为。

3 讨论

淋巴细胞伸入运动^[1]是一种古老又新奇的生物学现象, 虽然与淋巴细胞的吞噬作用、周边运动相似, 但又有本质区别^[6]。淋巴细胞伸入运动是淋巴细胞接近其他细胞并主动内陷入靶细胞中, 并且淋巴细胞在靶细胞胞质中呈现出细胞活性, 可进行细胞分裂, 有时甚至能从靶细胞中完整地逃逸出来^[11]。淋巴细胞是机体免疫系统的主要细胞群体, 作为机体排除异己的武器, 其“一举一动”都备受学者关注。

正常淋巴细胞进出肿瘤细胞的现象非常常见, 但其生物学意义仍不明确。在正常生理状况下, 这种现象可能与淋巴细胞分化、成熟和信号传递有关; 如未成熟 T 淋巴细胞进入胸腺上皮细胞形成的胸腺抚育细胞(nurse cell)被认为是 T 细胞发育分化的途径和机制之一^[12]; 而在肿瘤发展过程中, 淋巴细胞的伸入运动则代表了机体免疫系统与肿瘤细胞的相互作用, 既可作为淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的一种方式, 又有可能是肿瘤逃避宿主免疫监视的一种途径。本研究中, PBMC 经 CD3/CD28 抗体协同刺激活化 24 h 后对肿瘤细胞的伸入率明显提高。研究^[13]表明, CD3/CD28 抗体协同刺激后 PBMC 分泌的 IL-17A 在 6 h 内即出现明显增加, 并在 24 h 内呈继续增高的趋势。IL-17 在宿主防御以及各种自身免疫性疾病发病中起到了重要的作用, 并且能通过诱导趋化因子招募树突状细胞及杀伤性效应细胞至肿瘤位置, 从而间接起到抗肿瘤的作用^[14]。据报道^[15], CD3/CD28 抗体共刺激 PBMC 24 h 后可显著增强 Fas/FasL、穿孔素、TGF- β 1 和颗粒酶 B 等基因的表达。淋巴细胞伸入肿瘤细胞后, 可能通过在肿瘤细胞内释放穿孔素、颗粒酶 B 杀伤肿瘤细胞^[5, 15]; 也有证据^[15]表明, CD3、CD28 抗体共刺激细胞后, PBMC 中 NK 细胞、CTL 细胞明显增多, 而 NK 细胞、CTL 细胞在机体肿瘤免疫中起着关键作用。NK 细胞在体内针对肿瘤细胞不需特异抗原的刺激, 肿瘤靶细胞的表面结构可直接诱发 NK 细胞的免疫反应^[5]。因此, PBMC 活化后 cell-in-cell 的形成率明显升高, 可能是淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的一种作用方式。

也有些研究人员认为, 靶细胞以形成 cell-in-cell 结构这一类似于自噬的方式从效应细胞中获得营养, 以抵抗营养缺乏的恶性环境。如研究黑素瘤 cannibalism 现象^[16-19]时发现, 黑素瘤组织切片中和胸水中 T 细胞能够进入黑素瘤细胞内, 当黑素瘤细

胞生存环境改变或营养匮乏时, cannibalism 现象发生的比率增大, 因此认为 T 细胞进入黑素瘤的 cannibalism 现象可能是肿瘤细胞主动摄取营养的一个过程^[20]。Overholtzer 等^[7]在研究乳腺癌细胞时发现, 当细胞脱离细胞外基质时容易形成 cell-in-cell 结构, 并且内在化的细胞最终经历死亡, 认为这是肿瘤细胞清除死亡细胞并为存活细胞提供营养的方式。而且 cell-in-cell 的形成导致肿瘤细胞多核现象发生, 进而形成染色体异倍体, 增加肿瘤细胞恶性程度^[21]。在本研究中, PBMC 经抗体活化后, 分泌 IL-17A 增加, 而 IL-17 可通过诱导 IL-6 活化 STAT3 途径, 上调抗凋亡、促生长和促血管生成等基因的表达, 促进肿瘤生长^[14], 因此 cell-in-cell 的形成也可能是肿瘤细胞借助淋巴细胞达到逃避免疫监视的方式。

本研究采用分选后得到的含有小鼠脾淋巴细胞的 cell-in-cell 胞内嵌合结构的 PLC/PRF/5 细胞进行平板克隆形成实验, 虽然培养 3 d 后, 肿瘤细胞 PLC/PRF/5 内的淋巴细胞大都消失, 但 cell-in-cell 的形成还是对 PLC/PRF/5 细胞产生了重要的影响。形成 cell-in-cell 胞内嵌合结构的 PLC/PRF/5 细胞的克隆形成能力高于未形成 cell-in-cell 的 PLC/PRF/5 细胞, 提示肿瘤细胞和淋巴细胞形成胞内嵌合结构后, 可影响肿瘤细胞的生物学行为, 特别是增殖行为, 这在一定程度上表明, 肿瘤细胞的恶性程度有所提高^[22]。导致这种现象产生的其中一个原因可能是由于淋巴细胞的存在, 使得肿瘤细胞的分裂发生障碍, 从而靶细胞出现多核现象(在研究^[21]中也有发现), 增加了细胞染色体的不稳定性, 最终导致异倍体的形成, 而具体原因还需要进一步分析探讨。

本研究利用活细胞荧光染料标记细胞, 通过流式细胞仪分析淋巴细胞对肿瘤细胞的伸入率, 告别了传统的利用显微镜人工计数的方式, 使结果更加客观、准确, 并且为后续流式细胞分选技术奠定了基础。并且不同种系淋巴细胞-靶细胞的作用体系建立, 加之流式细胞分选技术的应用, 使 cell-in-cell 结构能够分选出来并富集, 为后续实验研究 cell-in-cell 形成的分子机制建立了技术基础。在淋巴细胞伸入运动的研究中, 还有很多问题等待解决, 如淋巴细胞伸入肿瘤细胞的分子机制; 淋巴细胞在伸入肿瘤细胞后, 双方细胞出现了不同的命运, 那么调控双方命运的机制是什么等等。相信随着细胞分子生物学和免疫学技术的不断发展, 以及对上述问题的深入研究, 人们会很快掌握淋巴细胞伸入运动的规律,

并对其调控,用来帮助进行疾病的治疗及细胞分子生物学的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Humble JG, Jayne WH, Pulvertaft RJ. Biological interaction between lymphocytes and other cells [J]. Br J Haematol, 1956, 2 (3): 283-294.
- [2] Lyons DJ, Gantam A, Clark J, et al. Lymphocyte macrophage interactions: Peripolexis of human alveolar macrophages [J]. Eur Respir J, 1992, 5(1): 59-66.
- [3] Müller W, Dahmen HG. Lymphocytes within glial cells (“Emperipolesis”) in a case of a granular cell tumor [J]. Acta Neuropathol, 1978, 44(2): 163-165.
- [4] Finkelstein Y, Malik Z, Kopolovic J, et al. Characterization of smoking-induced nasopharyngeal lymphoid hyperplasia [J]. Laryngoscope, 1997, 107(12pt 1): 1635-1642.
- [5] 王小宁,李文简. 在单细胞水平上研究杀伤细胞与肿瘤的相互作用 [J]. 第一军医大学学报, 1986, 6(4): 273-280.
- [6] 杨介钻,王小宁. 淋巴细胞的伸入运动 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(4): 235-238.
- [7] Overholtzer M, Mailleux A, Mouneimne G, et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion [J]. Cell, 2007, 131(5): 966-979.
- [8] Wang S, Guo Z, Xia P, et al. Internalization of NK cells into tumor cells requires ezrin and leads to programmed cell-in-cell death [J]. Cell Res, 2009, 19(12): 1350-1362.
- [9] 沈关心,周汝麟,主编. 现代免疫学实验技术 [M]. 第 2 版. 武汉:湖北科学技术出版社, 2002: 398-400.
- [10] Garlie NK, LeFever AV, Siebenlist RE, et al. T cells coactivated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer [J]. J Immunother, 1999, 22(4): 336-345.
- [11] Overholtzer M, Brugge JS. The cell biology of cell-in-cell structures [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(10): 796-809.
- [12] Pezzano M, Samms M, Martinez M, et al. Questionable thymic nurse cell [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2001, 65(3): 390-403.
- [13] 王敏,姚欣,黄茂. 雷公藤甲素对外周血单个核细胞白细胞介素 17A 分泌的影响 [J]. 南京医科大学学报, 2010, (3): 316-318.
- [14] 施沛青,朱书,钱友存. IL-17 的信号传导及功能研究 [J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(4): 345-357.
- [15] 周佩军,王祥慧,唐孝达,等. 抗 CD3 与抗 CD28 单克隆抗体共刺激对淋巴细胞免疫活化基因 mRNA 表达的影响 [J]. 中国器官移植杂志, 2000, 21(1): 35-37.
- [16] Kojima S, Sekine H, Fukui I, et al. Clinical significance of “cannibalism” in urinary cytology of bladder cancer [J]. Acta Cytol, 1998, 42(6): 1365-1369.
- [17] Ohsaki H, Haba R, Matsunaga T, et al. ‘Cannibalism’ (cell phagocytosis) does not differentiate reactive renal tubular cells from urothelial carcinoma cells [J]. Cytopathology, 2009, 20(4): 224-230.
- [18] Yang YQ, Li JC. Progress of research in cell-in-cell phenomena [J]. Anat Rec, 2012, 295(3): 372-377.
- [19] Fais S. Cannibalism: A way to feed on metastatic tumors [J]. Cance Lett, 2007, 258(2): 155-164.
- [20] Lugini L, Matarrese P, Tinari A, et al. Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells [J]. Cance Res, 2006, 66(7): 3629-3638.
- [21] Krajcovic M, Johnson NB, Sun Q, et al. A non-genetic route to aneuploidy in human cancers [J]. Nat Cell Biol, 2010, 13(3): 324-330.
- [22] Plumb JA. Cell sensitivity assay: Clonogenic assay [J]. Methods Mol Med, 2004, 88(5): 159-164.

[收稿日期] 2012-06-21

[修回日期] 2012-11-02

[本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1)生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2)各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMRI*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3)限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind III*、*BamH I*、*Sal I* 等。(4)各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数 \bar{x} 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5)各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外),例如长度 *l*、面积 *A* (或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M_r*、物质的量浓度 *c_B* 等。(6)化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。(7)数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8)英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)