

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.01.016

· 基础研究 ·

IL-12 诱导肝癌微环境中 NK 细胞活化发挥抗肿瘤作用

周智锋^{1,2}, 江金华⁴, 李洁羽^{1,2}, 陈强^{1,3}, 叶韵斌^{1,2}(1. 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福建 福州 3500014; 2. 福建医科大学 福建省肿瘤医院 肿瘤免疫学研究室, 福建 福州 3500014; 3. 福建医科大学 附属协和医院 肿瘤内科, 福建 福州 3500014; 4. 龙岩市第二医院 肿瘤内科, 福建 龙岩 364000)

[摘要] **目的:**探讨 IL-12 通过诱导肝癌微环境中 NK 细胞活化诱导抗肿瘤的效果。**方法:**NOD/SCID 小鼠皮下注射肝癌 HepG2 细胞,成瘤后腹腔注射人外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL),建立 HCC-huPBL 荷瘤小鼠模型。将荷瘤小鼠随机分为 IL-12 组和 PBS 对照组,瘤内注射 IL-12 后,观测荷瘤小鼠瘤体体积、体重、一般状况的变化,IL-12 瘤内注射后第 30 天 ELISA 法检测荷瘤小鼠肝癌组织微环境中 IL-12、INF- γ 含量以及小鼠外周血中天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)及谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)的含量,免疫组化法检测 IL-12 治疗后肝癌微环境中 NK 细胞活化性受体 NKG2D、NKp44、NKp30、NKp46,以及抑制性受体 KIR2DL3/CD158b、NKG2A/CD159a 的表达。**结果:**第 12、18、24、30 天 IL-12 组荷瘤小鼠瘤体体积均小于 PBS 组[(594.47 \pm 205.51) vs (832.10 \pm 187.49) mm³, (963.61 \pm 427.95) vs (1350.87 \pm 468.23) mm³, (1285.02 \pm 368.56) vs (1975.49 \pm 655.54) mm³, (1903.64 \pm 471.34) vs (2568.77 \pm 784.68) mm³, 均 $P < 0.05$]。IL-12 组小鼠肝癌组织中 IL-12 与 INF- γ 的表达水平均明显高于 PBS 组[(2.96 \pm 1.02) vs (1.35 \pm 0.75) pg/ml, (12.26 \pm 4.11) vs (7.81 \pm 3.46) pg/ml, 均 $P < 0.05$]。IL-12 组与 PBS 组相比,血清 ALT 水平第 7 天显著升高[(73.85 \pm 10.71) vs (41.73 \pm 13.13) U/L; $P < 0.05$],第 14 天达到高峰。IL-12 组治疗后肝癌组织中 NK 细胞活化性受体 NKG2D、NKp44、NKp30 的表达较 PBS 组高($P < 0.05$),NKp46 的表达未见明显升高;而 NK 细胞抑制性受体 CD158b 和 CD159a 表达较 PBS 组低($P < 0.05$)。**结论:**肝癌模型小鼠瘤体内 IL-12 注射可上调瘤组织内 NK 细胞活化性受体、IL-12、INF- γ 的表达,下调抑制性受体的表达,从而抑制小鼠模型中肿瘤的生长。

[关键词] NK 细胞;活化性受体;抑制性受体;IL-12;INF- γ ;移植性肝癌

[中图分类号] R735.7; R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)01-0093-06

IL-12 plays anti-tumor effect by inducing NK cell activation in hepatic carcinoma microenvironment

Zhou Zhifeng^{1,2}, Jiang Jinhua⁴, Li Jieyu^{1,2}, Chen Qiang^{1,3}, Ye Yunbin^{1,2}(1. Key Laboratory of Tumor Translational Medicine in Fujian Province, Fuzhou 350014, Fujian, China; 2. Laboratory of Tumor Immunology, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350014, Fujian, China; 3. Department of Medical Oncology, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350014, Fujian, China; 4. Department of Medical Oncology, Second Hospital of Longyan City, Longyan 364000, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the enhanced anti-tumor effect of IL-12 through inducing NK cell activation in hepatic carcinoma microenvironment. **Methods:** The hepatic carcinoma HepG2 cells were subcutaneously injected into NOD/SCID mice, and human peripheral blood lymphocytes (PBL) were intraperitoneally injected after tumor formation to establish HCC-huPBL tumor-bearing mouse model. The tumor-bearing mice were randomized into IL-12 group and PBS control group. Mice were intratumoral injected with IL-12, and the changes of tumor volume and body weight as well as general conditions of tumor-bearing mice were observed. ELISA assay was performed to examine the expression levels of

[基金项目] 福建省卫生厅青年科研基金项目(No. 2009-2-30);福建省科技厅重点项目(No. 2008I0012)。Project supported by the Science Project for Young Scholars from Health Bureau of Fujian Province (No. 2009-2-30), and the Key Project of Science and Technology Bureau of Fujian Province (No. 2008I0012)

[作者简介] 周智锋(1977-),男,福建省莆田市人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤免疫学方面的研究。E-mail: zzf2004312@qq.com

[通信作者] 叶韵斌(Ye Yunbin, corresponding author), E-mail: zjyunbin@189.cn

IL-12 and INF- γ in the microenvironment of hepatic carcinoma tissues in tumor-bearing mice, and the aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels in peripheral blood of mice 30 days after IL-12 intratumoral injection. Immunohistochemistry assay was used to analyze the expressions of NK-activating receptors: NKG2D, NKp44, NKp30, NKp46, and inhibitory NK receptors: KIR2DL3/CD158b and NKG2A/CD159a in hepatic carcinoma microenvironment after IL-12 treatment. **Results:** On day 12, 18, 24 and 30, the tumor volumes were smaller in the IL-12 group than those in the PBS group ($[594.47 \pm 205.51]$ vs $[832.10 \pm 187.49]$ mm³, $[963.61 \pm 427.95]$ vs $[1350.87 \pm 468.23]$ mm³, $[1285.02 \pm 368.56]$ vs $[1975.49 \pm 655.54]$ mm³, $[1903.64 \pm 471.34]$ vs $[2568.77 \pm 784.68]$ mm³, $P < 0.05$). The expression levels of IL-12 and INF- γ in the IL-12 group were significantly higher than those in the PBS group ($[2.96 \pm 1.02]$ vs $[1.35 \pm 0.75]$ pg/ml, $[12.26 \pm 4.11]$ vs $[7.81 \pm 3.46]$ pg/ml, $P < 0.05$). The serum ALT level significantly increased in the IL-12 group compared to the PBS group on day 7 ($[73.85 \pm 10.71]$ vs $[41.73 \pm 13.13]$ U/L, $P < 0.05$), and reached a peak at day 14. The expressions of NK-activating receptors NKG2D, NKp44 and NKp30 were statistically higher in the IL-12 group than those in the PBS group ($P < 0.05$), the expression level of NKp46 showed no significant up-regulation, while the expression levels of NK inhibitory receptors CD158b and CD159a were decreased compared to the PBS group ($P < 0.05$). **Conclusion:** IL-12 intratumoral injection can up-regulate the expressions of NK-activating receptors, IL-12 and INF- γ , and down-regulate the NK inhibitory receptors in the hepatic carcinoma mouse model, therefore effectively inhibiting the tumor growth in mouse model.

[**Key words**] NK cell; activatory receptor; inhibitory receptor; IL-12; INF- γ ; transplanted hepatic carcinoma

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(1): 93-98]

原发性肝癌是常见恶性肿瘤之一,其病死率居我国恶性肿瘤第2位。尽管针对原发性肝癌的局部治疗取得了较快的发展,但治疗效果仍不显著。近年来,生物治疗已成为继手术、放疗、化疗后肿瘤治疗的第4种模式,并显示出了良好的应用前景。IL-12是一种多功能的细胞因子,主要介导细胞免疫,在诱导辅助性T细胞亚群1(T-helper cell 1, Th1)型细胞的分化中发挥重要调节作用,通过促进INF- γ 的分泌使NK细胞、T细胞大量增殖并增强其细胞毒性,并能单独诱导其他细胞因子生成,从而发挥强大的生物学功能,在炎症及抗肿瘤免疫中扮演着重要的角色^[1]。IL-12自被发现之时起,就因其对NK细胞、T细胞的刺激作用,而受到广泛重视。IL-12全身用药后不良反应较大,如发热、胃肠道反应,淋巴细胞减少及肝功能异常等^[2],一定程度上限制了它的应用,因此IL-12局部用药已成为近年来的研究热点。但IL-12局部用药对肿瘤微环境中NK细胞的作用机制尚不清楚。本课题通过人肝癌小鼠HCC-hu-PBL-NOD/SCID模型瘤内注射IL-12,探究IL-12对肝癌微环境中NK细胞的生物学作用,为肝癌免疫治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人肝细胞癌细胞株HepG2为本科室常规冻存。Matrigel™ Matrix Basement Membrane 购于BD Bio-

sciences公司,DMEM培养基购于美国Invitrogen公司,胎牛血清购于美国Invitrogen公司,DMSO购于美国Sigma公司,GT-T551培养液购于TAKARA BIO公司,IL-12购于PeproTech公司,鼠抗人NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、CD158b、CD159a多克隆抗体购自Abcam公司,即用型免疫组化超敏Ultrasensitive S-P(鼠/兔)试剂盒、柠檬酸盐抗原修复液、DAB显色试剂盒购于迈新公司,ELISA检测INF- γ 试剂盒、小鼠AST及ALT购于R&D公司。

1.2 HCC-hu-PBL-NOD/SCID小鼠模型的建立

40只NOD/SCID雌性小鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司[实验动物合格证为号:SCXK(沪)2007-0005]。小鼠饲养于福建医科大学实验动物中心,严格按照SPF级标准要求饲养。取对数生长期的HepG2细胞,胰酶消化至细胞悬液;在4℃条件下将细胞悬液与Matrigel基质胶按1:1比例混合,使细胞悬液密度达到 1×10^8 /ml,在4℃冰盒中保存、运输,于1h内注射。选取4~6周龄,体重18~20g的NOD/SCID雌性小鼠,对小鼠右侧腋下皮肤进行消毒,用带22G针头的1ml注射器抽取细胞悬液,自右侧肋部腋前线沿冠状面方向进针至皮下,缓慢转动针头,使其方向朝向右腋下,缓慢将细胞悬液注射至小鼠右侧腋部皮下,每只小鼠注射100 μ l,即每只小鼠注射HepG2细胞数量为 1×10^7 个;2周后瘤块体积长至约300 mm³。瘤块体积的测量方法:分别量取瘤块最大径a(mm)和与其垂直的短径b(mm),按公式

$V(\text{mm}^3) = a \times b^2 \times 1/2$ 进行计算。

抽取健康人外周血,肝素抗凝,加入等体积的人淋巴细胞分离液和稀释后的外周血,600 × *g* 离心 20 min,用吸管小心吸出淋巴细胞层,PBS 洗涤,500 × *g* 离心 6 min 2 次,GT-T551 培养液重悬淋巴细胞,调整细胞密度至 $2 \times 10^7/\text{ml}$;注射器抽取细胞悬液,用 22 G 针头将淋巴细胞悬液注射于 NOD/SCID 小鼠腹腔,每只小鼠注射 1 ml。

1.3 肝癌模型小鼠瘤体组织内注射 IL-12

将建立好的 HCC-hu-PBL-NOD/SCID 小鼠模型随机分为 2 组,实验组在第 1、4、7 天分别进行瘤体组织内注射 IL-12,每次注射总量为 100 μl (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$);对照组同样条件注射无菌 PBS 液,每次注射量 100 μl 。

1.4 ELISA 法检测肿瘤微环境 IL-12、INF- γ 及外周血 ALT、AST 含量

第 1、7、14、21 天截尾取小鼠外周血,在第 28 天摘眼球取外周血,用于 ALT、AST 水平检测;第 28 天颈椎脱臼处死小鼠,75% 酒精浸泡小鼠 5 min,无菌条件下剥离瘤块,制成细胞悬液,离心后取上清检测 IL-12、INF- γ 。ELISA 法步骤为设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μl ;样本孔先加待测样本 10 μl ,再加样本稀释液 40 μl ;设空白对照。除空白对照外,标准品孔和样本孔中每孔加入 HRP 标记的检测抗体 100 μl ,用封板膜封住反应孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置 1 min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,重复洗板 5 次,每孔加入底物 A、B 各 50 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50 μl ,15 min 内在 450 nm 波长处测定各孔的 *D* 值。

1.5 免疫组化法检测肝癌微环境中 NK 细胞受体的表达

肝癌组织切片脱蜡、水化,自来水冲洗,柠檬酸抗原修复液高温高压抗原修复,滴加 50 μl 过氧化物酶阻断剂(试剂 A),室温下孵育 10 min,PBS 冲洗,弃去 PBS,滴加正常非免疫动物血清(试剂 B) 50 μl ,室温下孵育 10 min,PBS 冲洗,弃去血清,滴加 1:100 的 NKG2D、CD159a、CD158b、NKp30、NKp44、NKp46 第一抗体,室温下孵育 60 min,PBS 冲洗,弃去 PBS,滴加生物素标记的第二抗体(试剂 C) 50 μl ,室温下孵育 10 min;PBS 冲洗,弃去 PBS,滴加链霉素抗生物素蛋白一过氧化物酶试剂(试剂 D) 50 μl ,室温孵育 10 min,PBS 冲洗,弃去 PBS,滴加新鲜配制的 DAB 显色试剂,在显微镜下观察显色效果,自来水冲洗终止显色,苏木精复染,PBS 冲洗,酒精脱水,中性树胶封固。每批染色均用 PBS 代替一抗作空白对照,正常羊血清代替一抗作阴性对照。

结果判断:细胞核和(或)细胞质出现黄色、棕黄色或棕褐色颗粒者为阳性细胞。免疫组化阳性细胞判定标准,参照 Sulzers 分级法,即阳性反应强度的分级兼染色深浅和阳性细胞所占百分比:(1)着色强度分为 4 级:无阳性着色,0 分;可见浅黄色阳性颗粒,1 分;可见棕黄色阳性颗粒,2 分;可见棕褐色阳性颗粒,3 分。(2)阳性细胞数分 4 级:查 5 个高倍视野,计算 100 个细胞中的阳性百分率,并求出平均值。无阳性细胞着色,0 分;阳性细胞数 < 25%,1 分;阳性细胞数占 25% ~ 50%,2 分;阳性细胞数 > 50%,3 分。免疫组化阳性细胞判定标准为(1)、(2)之和,0 分为阴性(-),1 ~ 2 分为阳性(+),3 ~ 6 分为中度阳性(++),7 ~ 9 分为强阳性(+++)

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 *t* 检验;等级资料进行秩和检验,所有统计均采用双侧分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌模型小鼠的一般情况

肝癌肿瘤内注射 IL-12 或 PBS 后观察发现,2 组小鼠精神状态均较好,饮食正常,毛色有光泽。IL-12 组 15% (3/20) 的小鼠瘤内注射 IL-12 后约 2 d 会出现大便稀软的现象,在注射后约第 6 天完全消失,PBS 组小鼠大便未出现异常。每隔 2 ~ 3 d 对皮下瘤块进行测量,结果(图 1)显示,第 12、18、24、30 天 IL-12 组小鼠瘤体积均小于 PBS 组[(594.47 ± 205.51) vs (832.10 ± 187.49) mm^3 , (963.61 ± 427.95) vs (1350.87 ± 468.23) mm^3 , (1285.02 ± 368.56) vs (1975.49 ± 655.54) mm^3 , (1903.64 ± 471.34) vs (2568.77 ± 784.68) mm^3 ; $P < 0.05$]。

2.2 IL-12 治疗后肝癌组织中 IL-12、INF- γ 的表达

肝癌肿瘤内注射 IL-12 后第 30 天处死小鼠,取出瘤块后检测肿瘤组织中 IL-12、INF- γ 的表达,结果(图 2)显示:IL-12 组小鼠瘤组织上清液中 IL-12、INF- γ 的表达水平明显高于 PBS 对照组[(2.96 ± 1.02) vs (1.35 ± 0.75) pg/ml , $P < 0.05$; (12.26 ± 4.11) vs (7.81 ± 3.46) pg/ml , $P < 0.05$]。

2.3 IL-12 瘤内注射对小鼠肝功能的影响

ELISA 法检测小鼠外周血中 ALT、AST 的含量。结果(图 3)显示,瘤内注射 IL-12 及 PBS 后,第 1 天及第 28 天,IL-12 组与 PBS 组相比,小鼠外周血 ALT 的含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 PBS 组同期对照相比,IL-12 组小鼠外周血 ALT 水平第 7 天

出现上升[(73. 85 ± 10. 71) vs (41. 73 ± 13. 13) U/L; $P < 0. 05$], 并在第 14 天达到高峰, 随后 ALT 水平逐渐恢复正常。

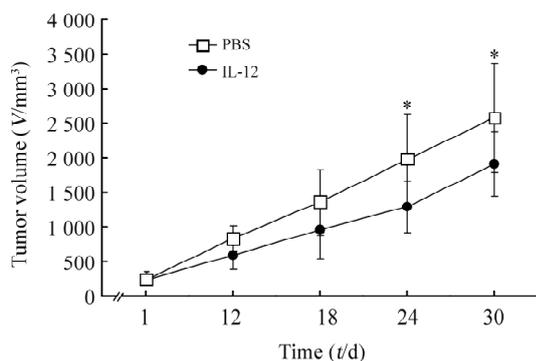


图1 荷瘤小鼠瘤内注射 IL-12 后瘤块体积的变化
Fig.1 Changes of tumor volume after IL-12 intratumoral injection in tumor-bearing mice
 $* P < 0. 05$ vs PBS group

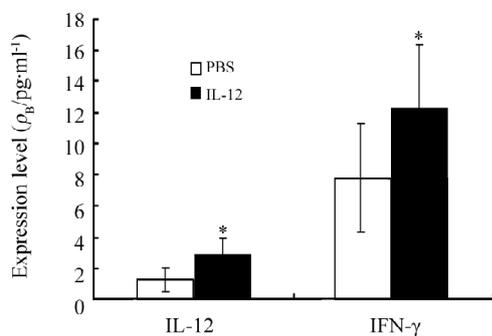


图2 小鼠肿瘤组织中 IL-12、IFN-γ 的表达
Fig. 2 Expressions of IL-12 and IFN-γ in mouse tumor tissues
 $* P < 0. 05$ vs PBS group

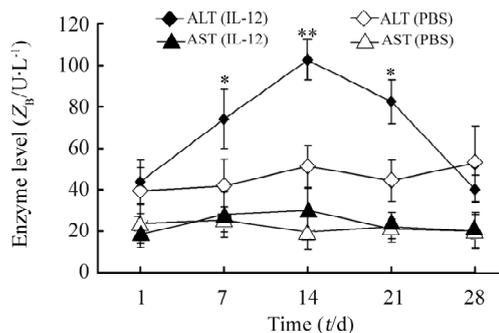


图3 IL-12 瘤内注射对小鼠外周血 ALT、AST 水平的影响
Fig. 3 Effect of IL-12 intratumoral injection on ALT and AST levels in mouse peripheral blood
 $* P < 0. 05$, $** P < 0. 01$ vs ALT (PBS) group

2.4 瘤内注射 IL-12 后肝癌组织中 NK 细胞受体的表达

荷瘤小鼠瘤内分别注射 IL-12 和 PBS, 免疫组化法检测肝癌组织微环境中 NK 细胞活化性受体 NKG2D、NKp44、NKp30、NKp46 及抑制性受体 CD158b、CD159a 的表达。PBS 组 NK 细胞活化性受体 NKG2D、NKp44 及 NKp30 阳性细胞较少, 颜色较淡, IL-12 组治疗后 NK 细胞活化性受体 NKG2D、NKp44、NKp30 的细胞较治疗前增多, 颜色较深, 即阳性反应强度较治疗前增高($P < 0. 05$), 但活化性受体 NKp46 的阳性反应强度未见明显变化($P > 0. 05$)。PBS 组抑制性受体 CD158b 及 CD159a 阳性细胞较多, 颜色较深; IL-12 组 NK 细胞抑制性受体 CD158 b、CD159a 阳性反应强度较治疗前降低($P < 0. 05$), 颜色较淡(表 1, 图 4)。

表 1 荷瘤小鼠瘤内注射 IL-12 后 NK 细胞受体的表达(n)

Tab.1 Expressions of NK cell receptors in tumor-bearing mice after IL-12 intratumoral injection (n)

Group	NKG2D			NKp30			NKp44			NKp46			CD158b			CD159a		
	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
PBS	6	4	0	7	2	1	7	3	0	8	2	0	5	4	1	7	3	0
IL-12	2	5	3	1	7	2	1	5	4	4	4	2	1	6	3	3	3	4
P	<0.05			<0.05			<0.05			>0.05			<0.05			<0.05		

3 讨论

IL-12 是很强的促进 NK 细胞毒性作用的细胞

因子, 不到 1 pmol/L 的 IL-12 就能明显增强 NK 细胞杀伤活性, 而 IL-2 和 IFN-γ 要达到同样效果则至少需要 3 倍以上的浓度^[3]。IL-12 可直接上调 NK

细胞表面 CD2、CD11a、CD56 等黏附分子的表达,从而增强 NK 细胞的杀伤活性^[4]。临床研究^[5]表明,使用 IL-12 治疗可以活化和扩增肿瘤患者外周血的 NK 细胞,产生抗肿瘤效应,在与 IL-12 共培养 12 h 后,可诱使 NK 细胞分泌大量的 IFN- γ 、TNF- α 和 GM-CSF,而与 IL-4 共培养的 NK 细胞则不分泌这些细胞因子。值得一提的是,与 IL-12 共培养的 NK 细胞具有诱导不成熟 DC 分化为成熟 DC 的作用,后者可以与 NK 细胞一起发挥协同性抗肿瘤效应^[6]。与其他生物试剂一样,IL-12 全身用药不良反应较大^[2],所以本研究选择 IL-12 瘤内直接注射。

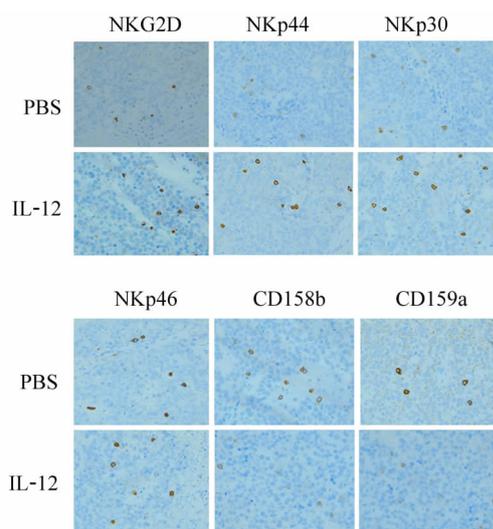


图 4 肝癌组织内注射 IL-12 后 NK 细胞受体的表达(×400)

Fig. 4 Expressions of NK cell receptors in hepatic carcinoma tissues after intratumoral injection of IL-12 (×400)

本实验通过荷瘤 HCC-hu-PBL-NOD/SCID 小鼠瘤内注射 IL-12 和 PBS,结果显示,IL-12 组瘤体积第 12 天明显小于 PBS 组,但 IL-12 组 15%(3/20)荷瘤小鼠注射 IL-12 后第 2 天出现腹泻,PBS 组未见明显不良反应。瘤内注射 IL-12 后荷瘤小鼠外周血 ALT 逐渐上升($P < 0.05$),但随后恢复正常。说明虽然瘤内直接注射 IL-12 能达到治疗目的,仍有一定不良反应,但随后逐渐恢复正常。同时本研究结果显示,IL-12 瘤内注射能上调肿瘤微环境中 NK 细胞 IFN- γ 的合成和分泌,且 IL-12 组中荷瘤小鼠瘤体积较小,因此 IL-12 对肿瘤生长起一定抑制作用。

正常情况下,NK 细胞识别自体细胞表面的 MHC I 类分子,抑制性受体在信号传导平衡中占主导地位^[7],因而不杀伤自体细胞。但肿瘤细胞和病毒感染细胞异常表达 MHC I 类分子,导致相应的

活化性受体作用占主导,促进 NK 细胞活化,释放细胞因子,发挥细胞毒作用^[8]。抑制性受体 CD159a 不仅向 NK 细胞传递抑制信号,而且可封闭 CD16 触发的 SyK 和胞外调节激酶 EPK 的活化信号通路,抑制 NK 细胞的细胞毒性^[9]。NK 细胞表面的活化性受体包括天然细胞毒受体(natural cytotoxicity receptor, NCR): NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、KIR2DS 及其辅助刺激活化性受体等^[10-11]。NKp46 是第一个被识别的 NCR,它选择性表达于所有静息和活化的 NK 细胞^[12];NKp30 选择性表达于部分静息和活化的 NK 细胞^[13];NKp44^[14]与 NKp46 及 NKp30 不同,它只表达在激活的 NK 细胞表面,它们在细胞表面的表达程度与 NK 细胞功能的发挥密切相关。已经证实,NKG2D 和 NCR 在介导的 NK 细胞毒作用中起协同作用。然而,对表面表达低密度 NCR 的 NK 细胞(NCRdull 型)来说,NKG2D 介导的对肿瘤细胞的杀伤作用已经得到证实^[15]。

目前 IL-12 作用于 NK 细胞治疗肝癌,其研究主要在于 NK 细胞数量、杀伤及分泌 IFN- γ 水平等方面^[16],然而 NK 细胞发挥杀伤作用是通过其表面活化性受体与抑制性受体综合作用的结果^[17]。Zhang 等^[18]进行体外实验表明,IL-12 能上调 NKG2D 和穿孔素的表达以提高 NK 细胞的细胞毒作用。本课题以动物体内实验检测人肝癌荷瘤小鼠肿瘤微环境中 NK 细胞受体治疗前后变化,结果显示,经 IL-12 瘤内注射后,表达活化性受体 NKG2D、NKp30 和 NKp44 的 NK 细胞增多,颜色深染,表明这些 NK 细胞在 IL-12 作用下,活化性受体被进一步上调,进而提高 NK 细胞杀伤肿瘤细胞。然而活化性受体 NKp46 治疗前后表达量无明显差异,究其原因可能是由于 NKp46 表达于所有休止期和活化的 NK 细胞,所以即使 IL-12 刺激休止期 NK 细胞成为活化 NK 细胞,但总量是不变的。同时表达抑制性受体 CD158 及 CD159a 的 NK 细胞数量减少,而且颜色淡浅,表示抑制性受体被抑制。当 IL-12 瘤内注射后,活化性受体表达升高,同时抑制性受体的表达降低,活化性受体/抑制性受体的比例升高,导致 NK 细胞抗肿瘤作用增强。

肿瘤微环境中 NK 细胞在杀伤肿瘤细胞的同时和肿瘤细胞之间发生了相互免疫编辑作用^[19],NK 细胞受肿瘤细胞的编辑作用导致其细胞表面 NK 细胞活化性受体表达下降,抑制性受体表达增强,使得 NK 细胞的抗肿瘤效应减弱。采取措施阻断 NK 细胞的抑制性信号通路或增强活化性信号通路是提高 NK 细胞抗肿瘤效应的主要手段。有研究^[20]发现,

头颈部鳞状细胞癌患者,术前给予 rhIL-12(100 ~ 300 ng/kg)瘤内注射,可显著增加肿瘤组织中 CD56⁺ NK 细胞的数量,而且患者生存率提高与大量 IFN- γ 的产生密切相关。本课题采用 IL-12 肝癌模型小鼠瘤内直接注射,使得肿瘤微环境 NK 细胞活化性受体上调,同时抑制性受体下调,IL-12 及 IFN- γ 的合成和分泌明显增加,从而对肿瘤生长起到明显抑制作用。

[参 考 文 献]

- [1] Kerkar SP, Restifo NP. The power and pitfalls of IL-12 [J]. *Blood*, 2012, 119(18): 4096-4097.
- [2] Portielje JE, Kruit WH, Schuler M, et al. Phase I study of subcutaneously administered recombinant human interleukin-12 in patients with advanced renal cell cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(12): 3983-3989.
- [3] Fu X, Liu Y, Li L, et al. Human natural killer cells expressing the memory-associated marker CD45RO from tuberculous pleurisy respond more strongly and rapidly than CD45RO⁻ natural killer cells following stimulation with interleukin-12 [J]. *Immunology*, 2011, 134(1): 41-49.
- [4] Dowell AC, Oldham KA, Bhatt RI, et al. Long-term proliferation of functional human NK cells, with conversion of CD56 (dim) NK cells to a CD56 (bright) phenotype, induced by carcinoma cells co-expressing 4-1BBL and IL-12 [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(5): 615-628.
- [5] Marcenaro E, Della CM, Bellora F, et al. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors [J]. *J Immunol*, 2005, 174(7): 3992-3998.
- [6] Nguyen-Pham TN, Yang DH, Nguyen TA, et al. Optimal culture conditions for the generation of natural killer cell-induced dendritic cells for cancer immunotherapy [J]. *Cell Mol Immunol*, 2012, 9(1): 45-53.
- [7] Charoudeh HN, Schmied L, Gonzalez A, et al. Quantity of HLA-C surface expression and licensing of KIR2DL⁺ natural killer cells [J]. *Immunogenetics*, 2012, 64(10): 739-745.
- [8] Placke T, Örgel M, Schaller M, et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(2): 440-448.
- [9] Morandi F, Ferretti E, Castriconi R. Soluble HLA-G dampens CD94/NKG2A expression and function and differentially modulates chemotaxis and cytokine and chemokine secretion in CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells [J]. *Blood*, 2011, 118(22): 5840-5850.
- [10] Hecht ML, Rosental B, Horlacher T, et al. Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(2): 712-720.
- [11] Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grünebach F, et al. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia; Implications for NKG2D-mediated NK cell responses [J]. *J Immunol*, 2012, 189(3): 1360-1371.
- [12] Glasner A, Ghadially H, Gur C, et al. Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1 [J]. *J Immunol*, 2012, 188(6): 2509-2515.
- [13] Hartmann J, Tran TV, Kaudeer J, et al. The stalk domain and the glycosylation status of the activating natural killer cell receptor NKp30 are important for ligand binding [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(37): 31527-31539.
- [14] Ciccio F, Accardo-Palumbo A, Alessandro R, et al. Interleukin-22 and interleukin-22-producing NKp44⁺ natural killer cells in subclinical gut inflammation in ankylosing spondylitis [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(6): 1869-1878.
- [15] Domaica CI, Fuentres MB, Rossi LE. Tumour-experienced T cells promote NK cell activity through trogocytosis of NKG2D and NKp46 ligands [J]. *EMBO Rep*, 2009, 10(8): 908-915.
- [16] Zabala M, Wang L, Hernandez-Alcoceba R, et al. Optimization of the Tet-on system to regulate interleukin 12 expression in the liver for the treatment of hepatic tumors [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(8): 2799-2804.
- [17] Konjevic G, Jurisic V, Jovic V, et al. Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies [J]. *Immunol Res*, 2012, 52(1/2): 139-156.
- [18] Zhang C, Zhang J, Niu J, et al. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells *via* upregulated expression of NKG2D [J]. *Hum Immunol*, 2008, 69(8): 490-500.
- [19] 梅家转, 周摇健, 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): 86-89.
- [20] van Herpen CM, van der Laak JA, de Vries IJ, et al. Intratumoral recombinant human interleukin-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients modifies locoregional lymph node architecture and induces natural killer cell infiltration in the primary tumor [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(5): 1899-1909.

[收稿日期] 2012 - 09 - 24 [修回日期] 2012 - 11 - 24

[本文编辑] 周玲琳