

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.012

· 基础研究 ·

IL-12 增强 CIK 细胞对食管癌 EC9706 细胞的杀伤活性

梅家转, 刘桂举, 张晓娟, 赵继智(郑州人民医院 肿瘤内科, 河南 郑州 450003)

[摘要] **目的:**探讨 IL-12 对细胞因子诱导的杀伤 (cytokine-induced killer, CIK) 细胞的表型和 CIK 细胞在体外对食管癌 EC9706 细胞杀伤活性的影响。**方法:**体外分离人外周血单个核细胞,分为两组:对照组以 IFN- γ 、IL-2 和 CD3 单抗诱导培养 CIK 细胞;IL-12 组在对照组基础上加用 IL-12 培养。培养至第 14 天,流式细胞仪检测两组 CIK 细胞的免疫表型;LDH 释放法测定效靶比 20:1、30:1 时两组 CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性;观察效靶比 30:1 时, NKG2D 单抗对两组 CIK 细胞杀伤活性的影响。**结果:**IL-12 组与对照组相比较, CIK 细胞免疫表型的 CD3⁺CD56⁺ 细胞比例[(28.23 ± 1.71)% vs (16.34 ± 0.59)% , $P < 0.05$]、CD3⁺ 细胞及 CD3⁺CD56⁺ 细胞中 NKG2D 的表达[(77.45 ± 2.15)% vs (66.87 ± 0.73)% , (92.94 ± 0.77)% vs (82.18 ± 0.66)% ; 均 $P < 0.05$]、CD3⁺ 细胞中穿孔素的表达[(51.78 ± 0.63)% vs (43.54 ± 0.95)% , $P < 0.05$] 都明显增强; CD3⁺ 细胞颗粒酶 B 表达无明显变化[(26.90 ± 0.67)% vs (26.76 ± 0.33)% , $P > 0.05$]。效靶比 20:1 和 30:1 时, IL-12 组 CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性均较对照组明显增强[(43.92 ± 1.67)% vs (35.34 ± 1.22)% , (55.95 ± 0.88)% vs (43.91 ± 1.10)% ; 均 $P < 0.05$]; 以 NKG2D 单抗阻断后, IL-12 组、对照组 CIK 细胞杀伤活性均明显下降[(19.72 ± 0.56)% vs (55.95 ± 0.88)% , (19.83 ± 1.20)% vs (43.91 ± 1.10)% ; 均 $P < 0.05$]。**结论:**IL-12 能够上调 CIK 细胞 NKG2D 和穿孔素的表达, 从而增强 CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性。

[关键词] 细胞因子诱导的杀伤细胞; NKG2D; 食管癌; IL-12

[中图分类号] R730.51; R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)02-0197-04

IL-12 enhances the cytotoxicity of cytokine-induced killer cells against esophageal carcinoma EC9706 cells

Mei Jiazhuang, Liu Guiju, Zhang Xiaojuan, Zhao Jizhi(Department of Oncology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of IL-12 on the phenotypes of cytokine-induced killer (CIK) cells and the cytolytic activity of CIK cells against human esophageal carcinoma EC9706 cells *in vitro*. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy donors. Two groups were designed: a control group (cells were cultured in the presence of IFN- γ , IL-2 and anti-CD3 antibody) and IL-12 group (cells were cultured in the presence of IFN- γ , anti-CD3 antibody, IL-2 and IL-12). After 14-day culture, the phenotypes of CIK cells in the control and IL-12 groups were analyzed by flow cytometry. The cytotoxic activity of CIK cells on EC9706 cells was measured by LDH releasing assay at effect-to-target (E:T) cell ratios of 20:1, 30:1. The anti-NKG2D monoclonal antibody was added to CIK cells to detect its effect on the cytotoxic activity of CIK cells at E:T ratio of 30:1. **Results:** In comparison to the control group, the proportion of CD3⁺CD56⁺ cells, NKG2D expressions on CD3⁺ and CD3⁺CD56⁺ cells, and perforin expression in CD3⁺ cells were higher in the IL-12 group [(28.23 ± 1.71)% vs (16.34 ± 0.59)% ; [77.45 ± 2.15)% vs [66.87 ± 0.73)% , [92.94 ± 0.77)% vs [82.18 ± 0.66)% ; [51.78 ± 0.63)% vs [43.54 ± 0.95)% ; all $P < 0.05$]. Whereas, no significant change was observed in the granzyme B expression in the CD3⁺ cells [(26.90 ± 0.67)% vs (26.76 ± 0.33)% , $P > 0.05$]. The cytolytic activity of CIK cells against EC9706 cells was increased significantly in the IL-12 group (E:T ratio of 20:1, [43.92 ± 1.67)% vs [35.34 ± 1.22)% ; E:T ratio of 30:1, [55.95 ± 0.88)% vs [43.91 ± 1.10)% , all $P < 0.05$). The cytotoxicity of CIK cells in the IL-12 and the control groups were significantly inhibited by anti-

[基金项目] 河南省科技计划资助项目(No. 201143)。Project supported by the Science and Technology Program of Henan Province (No. 201143)

[作者简介] 梅家转(1966 -),男,河南省郑州市人,博士,主任医师,主要从事肿瘤的生物技术, E-mail:mjzhuang@163.com

[通信作者] 梅家转(Mei Jiazhuang, corresponding author), E-mail:mjzhuang@163.com

NGK2D monoclonal antibody ([19. 72 ± 0. 56]% vs [55. 95 ± 0. 88]% , [19. 83 ± 1. 20]% vs [43. 91 ± 1. 10]% , all $P < 0. 05$). **Conclusion:** IL-12 up-regulates the NGK2D and perforin expressions on CIK cells, enhancing their cytotoxicity against EC9706 cells.

[**Key words**] cytokine-induced killer cell; NGK2D; esophageal carcinoma; IL-12

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 197-200]

以往研究^[1]表明,食管癌 EC9706 细胞表达 NGK2D(natural-killer group 2, member D)的配体 MICA、ULBP2;细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞表面表达 NGK2D 受体,且随着培养时间的延长,CIK 细胞表面 NGK2D 的表达逐渐增强。CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性与 NGK2D 受体表达密切相关,并且依赖于培养时加入的细胞因子种类。体外实验^[2]证实,细胞因子影响 CIK 细胞的表型及其杀伤活性。本研究通过流式细胞术和体外 LDH 杀伤实验观察 IL-12 对 CIK 细胞表型及 CIK 细胞对 EC9706 细胞杀伤活性的影响,旨在探索进一步提高 CIK 细胞抗肿瘤效果的方法。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和细胞株

基因重组人 IL-2 购自辽宁卫星生物制品研究所,IL-12 购自 Pepro Tech 公司,IFN- γ 购自上海克隆生物高技术有限公司,淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品有限公司,RPMI 1640 购自 Gibco 公司,CD3 单抗购自 ProSpec-Tany TechnoGene 公司,FITC-CD4/PE-CD8/PerCP-CD3、FITC-CD56、FITC-颗粒酶 B、PE-穿孔素、APC-CD3 单抗购自 BD 公司,PE-NKG2D、FITC-IgG1、PE-IgG1、NKG2D 单抗购自 R&D 公司。LDH 释放试验试剂盒购自 Promega 公司,流式细胞分析仪购自 BD 公司。人食管癌 EC9706 细胞株由本实验室冻存。

1.2 CIK 细胞的制备

采用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离人外周血单个核细胞,生理盐水洗涤,用 RPMI 1640 液调细胞密度至 5.0×10^6 /ml。对照组加入终浓度为 1 000 U/ml 的 IFN- γ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,加入终浓度为 50 ng/ml 的 CD3 mAb、500 U/ml 的 IL-2,以后每 2~3 d 添加含 IL-2(500 U/ml)的新鲜培养基。IL-12 组,在上述培养条件下,从第 2 天开始至实验前,每天加入 IL-12,使其终质量浓度保持在 10 ng/ml。

1.3 流式细胞术分析 CIK 细胞的表型

培养的第 14 天收集部分 CIK 细胞,用 PBS 洗涤 2 次,计数细胞,用 PBS 调整密度至 1×10^7 /ml。

分别取 100 μl 细胞悬液(1×10^6 个细胞)加入 2 支试管,一支试管内加入 1 μg APC-CD3 单抗、FITC-CD56、PE-NKG2D 单抗,CD3⁺ 细胞设门,流式细胞仪分析 1×10^6 个细胞中 CD3⁺CD56⁺ 阳性细胞数及 CD3⁺ 细胞表面 NGK2D 的表达。另一试管内加入 1 μg APC-CD3 单抗,室温避光孵育 15 min,弃上清,1% 甲醛固定液 500 μl 固定细胞,加入 100 μl 破膜剂,室温避光孵育 15 min;加入 1 μg PE-穿孔素单抗,1 μg FITC-颗粒酶 B 单抗,室温避光孵育 15 min, PBS 洗涤,以 500 μl PBS 重悬细胞;CD3⁺ 细胞设门,流式细胞仪检测 CD3⁺ 细胞内穿孔素、颗粒酶 B 的表达。

1.4 LDH 释放测定法检测 CIK 细胞的杀伤活性

采用 4 h LDH 释放测定法,参照 Cytotox96 非放射性细胞毒性实验(non-radioactive cytotoxicity assay)说明操作^[3],分别检测效靶比 20: 1、30: 1 时 CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤率,并检测 NGK2D 单抗对 CIK 细胞杀伤活性的影响。CIK 细胞杀伤活性(%) = (实验组 D 值 - 靶细胞自然释放组 D 值 - 效应细胞自然释放组 D 值) / (靶细胞最大释放组 D 值 - 靶细胞自然释放组 D 值) $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.5 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组 CIK 细胞杀伤活性的组间比较、CIK 细胞相关分子表达率组间比较采用独立样本 t 检验,单抗阻断实验采用配对样本 t 检验,NKG2D、穿孔素表达与 CIK 细胞杀伤效应相关关系的分析采用 spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IL-12 对 CIK 细胞免疫表型的影响

流式细胞仪检测结果(图 1)显示:培养第 14 天,IL-12 组、对照组 CD3⁺ 细胞在 CIK 群体细胞中的比例均在 95% 以上。IL-12 组的 CD3⁺CD56⁺ 表达率显著高于对照组 [(28.23 \pm 1.71)% vs (16.34 \pm 0.59)% , $P < 0.05$], CD3⁺ 细胞及 CD3⁺CD56⁺ 细胞中 NGK2D 表达均较对照组明显增高

[(66.87 ± 0.73)% vs 77.45 ± 2.15)% , (82.18 ± 0.66)% vs (92.94 ± 0.77)% ; 均 $P < 0.05$],穿孔素表达也显著高于对照组 [(51.78 ± 0.63)% vs

(43.54 ± 0.95)% , $P < 0.05$],但颗粒酶 B 表达无明显差异 ($P > 0.05$)。

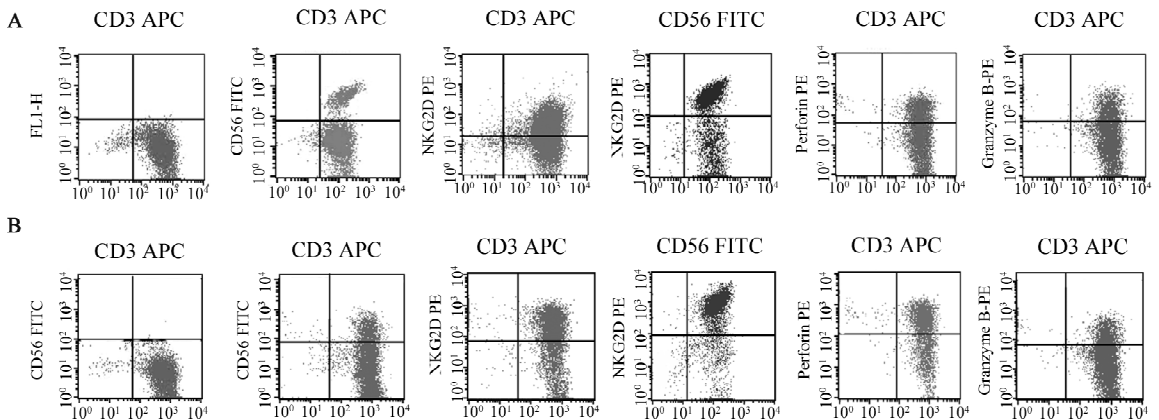


图 1 IL-12 对 CIK 细胞表型的影响

Fig. 1 Effects of IL-12 on the phenotypes of CIK cells

A: Control group; B: IL-12 group

2.2 IL-12 对 CIK 细胞杀伤活性的影响

效靶比 20:1 时,IL-12 组对 EC9706 细胞的杀伤活性明显强于对照组 CIK 细胞 [(43.92 ± 1.67)% vs (35.34 ± 1.22)% , $P < 0.05$];30:1 时,IL-12 组 CIK 细胞杀伤活性也强于对照组 [(55.95 ± 0.88)% vs (43.91 ± 1.10)% , $P < 0.05$]。效靶比 30:1 时,NKG2D 单抗封闭 CIK 细胞表面 NKG2D 分子后,IL-12 组 CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性为 (19.72 ± 0.56)% ,明显低于阻断前的 (55.95 ± 0.88)% ($P < 0.05$);对照组 CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性也明显低于阻断前 [(19.83 ± 1.20)% vs (43.91 ± 1.10)% , $P < 0.05$],但阻断后两组 CIK 细胞的杀伤活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 CIK 细胞 NKG2D、穿孔素的表达和其对 EC9706 细胞的杀伤活性密切相关

Spearman 相关分析表明,CIK 细胞 NKG2D 表达与穿孔素表达显著相关 ($r = 0.829$, $P = 0.042$)。效靶比 20:1、30:1 时,IL-12 作用前后 CIK 细胞表面 NKG2D 表达与其对 EC9706 细胞的杀伤活性均密切相关 (20:1 时 $r = 0.943$, $P = 0.005$; 30:1 时 $r = 0.829$, $P = 0.042$)。

3 讨论

NKG2D-NKG2D 配体信号通路在抗肿瘤免疫中发挥重要作用,NKG2D 表达在 NK 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和

CD8⁺T 细胞表面,是机体免疫细胞抗肿瘤的主要活化性受体^[4-6]。该系统抗肿瘤作用依赖于免疫细胞表面 NKG2D 受体识别肿瘤细胞表面 NKG2D 配体^[7-8]并结合,激活免疫细胞,释放穿孔素、颗粒酶、 γ -干扰素等免疫活性物质,发挥抗肿瘤作用^[9]。

CIK 细胞是外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子共同培养一段时间后获得的异质细胞群。CIK 细胞表达 NKG2D 受体,是 CIK 细胞发挥抗肿瘤作用的关键分子之一^[10-12]。CIK 细胞的杀伤活性主要由 CD3⁺CD56⁺ 细胞介导^[13],但也有学者^[11]认为 CIK 细胞都能发挥抗肿瘤作用。与 NK 细胞相比,CIK 细胞低表达抑制性免疫球蛋白受体,且 CIK 细胞在体外容易大量扩增,便于临床应用^[14-15]。

穿孔素和颗粒酶 B 是 CIK 细胞内重要的抗肿瘤效应分子^[16]。穿孔素是胞质中的细胞毒颗粒,能以钙离子依赖方式在肿瘤细胞膜上形成穿膜通道,导致肿瘤细胞渗透性溶解。颗粒酶 B 是细胞颗粒中最重要的丝氨酸蛋白酶,通过 caspase 依赖途径,直接进入核,以不依赖 caspase 的胞质途径杀伤靶细胞^[17]。

临床应用的 CIK 细胞是以 CD3⁺ 细胞群为主的群体细胞而非纯化的 CD3⁺CD56⁺ 细胞。本研究采用流式细胞术,以 CD3⁺ 细胞设门,分析 CD3⁺ 细胞中 NKG2D、穿孔素和颗粒酶 B 的表达变化,代表群体 CIK 细胞水平。

文献^[18]报道,IL-12 能够促进 T 细胞表面 NKG2D 表达。本研究也证实 IL-12 不仅促进了

CD3⁺CD56⁺细胞扩增,而且上调 CD3⁺CD56⁺细胞 NKG2D 受体、CIK 细胞表面 NKG2D 受体和穿孔素的表达,该类分子是 CIK 细胞发挥抗肿瘤作用的主要免疫活性物质。Spearman 相关分析表明,CIK 细胞 NKG2D 表达与穿孔素表达显著相关($r = 0.829$, $P = 0.042$)。杀伤实验结果表明:CIK 细胞在效靶比 20:1、30:1 时对 EC9706 细胞均具有杀伤活性,加 IL-12 培养进一步增强了对 CIK 细胞的杀伤活性。单抗阻断实验表明,NKG2D 单抗抑制了对照组和 IL-12 组 CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性(下降 50% 以上),NKG2D 单抗阻断后,IL-12 组和对照组 CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性无差异,分析表明 CIK 细胞对 EC9706 细胞的杀伤活性与其细胞表面 NKG2D 表达显著相关,说明 CIK 细胞主要通过 NKG2D 发挥抗肿瘤作用。

Helms 等^[19]通过动物实验证实:单尾静脉输注 CIK 细胞与联合 IL-12 腹腔注射相比,后者抑瘤作用更强,提示 IL-12 能增强 CIK 细胞的抗肿瘤效应。Smyth 等^[20]通过动物实验证实,IL-12 体内抗肿瘤效应是通过 NKG2D 和穿孔素发挥作用的。Lucy 等^[21]采用 IL-12 皮下或静脉注射治疗 48 例平台期多发性骨髓瘤患者,4 例达完全缓解,中位生存达 42.8 个月,无进展生存达 11.4 个月,显示了一定抗肿瘤作用。总之,在常规 CIK 细胞培养的基础上加用 IL-12 有望进一步提高 CIK 细胞的抗肿瘤效果。

[参考文献]

[1] 刘桂举,梅家转,栗敏,等. 细胞因子诱导的杀伤细胞免疫表型及其对 EC9706 细胞杀伤活性的影响 [J]. 郑州大学学报:医学版, 2010, 45(1): 24-27.

[2] 梅家转,刘桂举,李瑞君,等. IL-15 上调 NKG2D 表达对 CIK 细胞杀伤活性的增强效应 [J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(5): 243-245.

[3] 余莉华,曾雅丽,胡亮,等. 支甲斑蝥素联合 IL-12、IL-15 处理增强 PBMC 对 Raja 细胞的杀伤效应 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(5): 472-477.

[4] Bae DS, Hwang YK, Lee JK. Importance of NKG2D-NKG2D ligands interaction for cytolytic activity of natural killer cell [J]. Cell Immunol, 2012, 276(1/2): 122-127.

[5] 韩露,宋江永平,周健,等. NK 细胞杀伤人骨髓瘤 RPMI 8226 细胞的活性及其可能的抑制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(2): 149-154.

[6] Pievani A, Borleri G, Pende D, et al. Dual-functional capability of CD3⁺CD56⁺ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity [J]. Blood, 2011, 118(12): 3301-3310.

[7] Morisaki T, Onishi H, Koya N, et al. Combinatorial cytotoxicity of gemcitabine and cytokine-activated killer cells in hepatocellular

carcinoma via the NKG2D-MICA/B system [J]. Anticancer Res, 2011, 31(7): 2505-2510.

- [8] 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.
- [9] 赵稳兴,杨举伦,李霞,等. 实时荧光定量 PCR 检测淋巴细胞中 NKG2D、穿孔素和颗粒酶 B 基因的表达 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(11): 1108-1110.
- [10] Franceschetti M, Pievani A, Borleri G, et al. Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EMRA lymphocytes [J]. Exp Hematol, 2009, 37(5): 616-628.
- [11] Linn YC, Lau SK, Liu BH, et al. Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell [J]. Immunology, 2009, 126(3): 423-435.
- [12] Mesiano G, Todorovic M, Gammaitoni L, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors [J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(6): 673-684.
- [13] Kim JS, Park YS, Kim JY, et al. Inhibition of human pancreatic tumor growth by cytokine-induced killer cells in nude mouse xenograft model [J]. Immune Netw, 2012, 12(6): 247-252.
- [14] Thanendrarajan S, Kim Y, Schmidt-Wolf I. New adoptive immunotherapy strategies for solid tumours with CIK cells [J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(5): 565-572.
- [15] Laport GG, Sheehan K, Baker J, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2011, 17(11): 1679-1687.
- [16] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [J]. J Cancer, 2011, 2: 363-368.
- [17] Schmidt-Wolf GD, Negrin RS, Schmidt-Wolf IG. Activated T cells and cytokine-induced CD3⁺CD56⁺ killer cells [J]. Ann Hematol, 1997, 74(2): 51-56.
- [18] Ortaldo JR, Winkler-Pickett R, Wigginton J, et al. Regulation of ITAM-positive receptors: Role of IL-12 and IL-18 [J]. Blood, 2006, 107(4): 1468-1475.
- [19] Helms MW, Prescher JA, Cao YA, et al. IL-12 enhances efficacy and shortens enrichment time in cytokine-induced killer cell immunotherapy [J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(9): 1325-1334.
- [20] Smyth MJ, Swann J, Kelly JM, et al. NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer [J]. J Exp Med, 2004, 200(10): 1325-1335.
- [21] Lacy MQ, Jacobus S, Blood EA, et al. Phase II study of interleukin-12 for treatment of plateau phase multiple myeloma (E1A96): A trial of the Eastern Cooperative Oncology Group [J]. Leuk Res, 2009, 33(11): 1485-1489.

[收稿日期] 2012-11-25

[修回日期] 2013-02-28

[本文编辑] 王莹,黄静怡