

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.03.013

## 体外扩增对食管癌患者 NK 细胞表面受体表达及其抑瘤活性的影响

周智锋<sup>1,2</sup>, 柳硕岩<sup>1,3</sup>, 郑庆丰<sup>1,3</sup>, 李洁羽<sup>1,2</sup>, 王枫<sup>1,3</sup>, 叶韵斌<sup>1,2</sup> (1. 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福建 福州 3500014; 2. 福建医科大学教学医院 & 福建省肿瘤医院 肿瘤免疫学研究室, 福建 福州 3500014; 3. 福建省肿瘤医院 胸外科, 福建 福州 3500014)

**[摘要]** **目的:**探讨食管癌患者 NK 细胞扩增前后的受体表达及其对肿瘤细胞的杀伤。**方法:**收集福建省肿瘤医院食管癌患者外周血 20 例,健康供者(对照组)外周血 10 例。NK 细胞培养采用细胞因子(IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-18)组合,流式细胞术检测 NK 细胞免疫表型及其受体(CD56<sup>+</sup>、CD69<sup>+</sup>、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、CD158b、CD159a)的表达,LDH 法检测不同效靶比时 NK 细胞对多种肿瘤细胞株(K562、Raji、Eca-109、TE-1)的杀伤作用。**结果:**与对照组相比,食管癌患者外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 细胞比例以及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞比值明显降低( $P < 0.05$ ),NK 细胞(CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>)及调节性 T 细胞(Treg)比例明显升高( $P < 0.05$ )。经细胞因子 IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-18 组合定向扩增 20 d 后,食管癌患者 NK 细胞比例高达 90% 以上,NK 细胞数扩增达 1 000 倍以上( $P < 0.01$ );而 CD3<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD19<sup>+</sup> B 细胞、Treg 细胞及单核巨噬细胞(CD14<sup>+</sup>)比例均显著降低( $P < 0.01$ ),且食管癌患者与对照组之间无统计学差异( $P > 0.05$ )。经细胞因子体外培养 20 d 后,NK 细胞表面 CD69 及活化性受体(NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46)均明显上调,而抑制性受体(CD158b、CD159a)均明显下调( $P < 0.05$ )。培养 20 d 后,食管癌患者 NK 细胞对肿瘤细胞 K562、Raji、Eca-109、TE-1 的杀伤能力均显著高于培养前[(69.2 ± 5.1)% vs (42.3 ± 3.0)%,(44.6 ± 3.2)% vs (21.1 ± 2.0)%,(69.7 ± 3.9)% vs (50.3 ± 3.5)%,(67.1 ± 4.5)% vs (41.2 ± 3.3)%;均  $P < 0.01$ ]。**结论:**细胞因子 IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-18 组合能有效扩增外周血 NK 细胞并上调其活化性受体的表达、下调抑制性受体的表达,其数量及功能均能满足临床治疗需要。

**[关键词]** NK 细胞;活化性受体;抑制性受体;白细胞介素;肿瘤细胞

**[中图分类号]** R735.1; R730.54; R730.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2013)03-0330-06

## Effect of *in vitro* expansion on expressions of surface receptors and anti-tumor activity of NK cells derived from patients with esophageal cancer

Zhou Zhifeng<sup>1,2</sup>, Liu Shuoyan<sup>1,3</sup>, Zheng Qingfeng<sup>1,3</sup>, Li Jieyu<sup>1,2</sup>, Wang feng<sup>1,3</sup>, Ye Yunbin<sup>1,2</sup> (1. Key Laboratory of Translational Cancer Medicine of Fujian Province, Fuzhou 350014, Fujian, China; 2. Department of Tumor Immunology, Fujian Provincial Tumor Hospital & Teaching Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350014, Fujian, China; 3. Department of Thoracic Surgery, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the expressions of receptors before and after NK cell amplification from patients with esophageal cancer and its cytotoxicity to tumor cells. **Methods:** Peripheral blood was collected from the Fujian Provincial Tumor Hospital, including 20 cases of esophageal cancer patients and 10 cases of healthy donors (control group). NK cells were amplified by combination of IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-18. Cell immunophenotype and NK cell receptor expressions (CD56<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, CD158b and CD159a) were determined by flow cytometry. The cytotoxicity of NK cells to various tumor cell lines (K562, Raji, Eca-109 and TE-1) were detected by lactate dehydrogenase (LDH) assay. **Results:** Compared with the control group, the ratio of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells were significantly lower in the peripheral blood of patients with esophageal cancer ( $P < 0.05$ ), and the ratios of NK cells (CD56<sup>+</sup>) and regulatory T cells (Treg) were significantly higher ( $P < 0.05$ ). The ratio of NK cells (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) increased up to 90%

**[基金项目]** 福建省科技厅重点课题资助项目(No. 2010Y0017, No. 2008I0012)。Project supported by the Key Science Foundation of Science and Technology Bureau of Fujian Province (No. 2010Y0017, No. 2008I0012)

**[作者简介]** 周智锋(1977-),男,福建省莆田市人,硕士,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

after being cultured in combination of IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-18 for 20 days. NK cell count expanded up to 1 000 times ( $P < 0.01$ ). The ratios of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>T cells, B cells (CD19), monocyte-macrophage cells (CD14) and regulatory T cells (T-reg) were in a significant reduction 20 days after culture ( $P < 0.01$ ), with no significant difference between the patients with esophageal cancer and the control group ( $P > 0.05$ ). CD69<sup>+</sup> and NK cell activating receptors (NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46) were significantly increased and the inhibitory receptors (CD158b, CD159a) were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). NK cells derived from patients with esophageal cancer showed significant increase of cytotoxicity on tumor cells K562, Raji, Eca-109 and TE-1 after culture for 20 days compared to those before culture ( $[69.2 \pm 5.1]\%$  vs  $[42.3 \pm 3.0]\%$ ,  $[44.6 \pm 3.2]\%$  vs  $[21.1 \pm 2.0]\%$ ,  $[69.7 \pm 3.9]\%$  vs  $[50.3 \pm 3.5]\%$ ,  $[67.1 \pm 4.5]\%$  vs  $[41.2 \pm 3.3]\%$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The combined cytokines of IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-18 can effectively expand peripheral blood NK cells, up-regulate the expressions of activated receptor and down-regulate the expression of inhibitory receptors. The numbers and functions of the cultured NK cells can both meet the clinical treatment needs.

[ **Key words** ] NK cell; activating receptor; inhibitory receptor; interleukin; tumor cell

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(3): 330-335 ]

目前,传统的治疗手段,如手术和化、放疗等对食管癌的治疗仍无较大进展,5年总的生存率仅为30%左右。食管癌的病因复杂,从免疫学发病机制来看,食管癌患者多伴有免疫抑制,而生物治疗在食管癌的治疗中占据越来越重要地位。应用淋巴因子激活杀伤细胞(lymphokine activated killer cell, LAK细胞)、CD3AK、CIK细胞等进行抗肿瘤研究的报道<sup>[1]</sup>较多,但其总有效率仅在20%~30%,因此,寻找更为有效的杀伤细胞显得非常重要。NK细胞能识别区分正常细胞和肿瘤细胞,因而能时刻发挥免疫监视作用,然而NK细胞只占外周血的10%~15%,所以获得能满足临床需要数量的NK细胞是关键。国内外学者做了多种尝试,但仍存在缺陷,主要表现在NK细胞纯度不高<sup>[2]</sup>、培养成本较大、安全性问题<sup>[3]</sup>等。本课题旨在探讨一种成本较低的培养方法,使其提高NK细胞比例和数量,且对不同肿瘤细胞杀伤活性达到临床治疗要求,并对比了食管癌患者自体及健康志愿者来源的NK细胞数量和活性的差异。

## 1 材料与方 法

### 1.1 标本来源

20例食管癌患者来自福建省肿瘤医院胸外科2011年2月至2012年5月期间住院患者,经胃镜及术后病理确诊,其中鳞癌18例、腺癌2例;TNM分期:I期2例、II期8例、III期10例。所有患者采集外周血前均未进行任何治疗,10例正常对照NK细胞取自健康志愿者。实验中涉及到人外周血标本及临床资料的收集经医院伦理委员会批准,并与患者签署了知情同意书。

### 1.2 细胞株及主要试剂

人白血病细胞K562、伯基特淋巴瘤细胞Raji、食

管癌细胞Eca-109、TE-1均购自中国科学院细胞库,GT-T551培养基购于TaKaRa公司,胎牛血清购于Gibco公司,细胞因子rhIFN- $\gamma$ 、rhIL-1、rhIL-12、rhIL-15、rhIL-18和CD3单抗均购自PeproTech公司,rhIL-2购自北京四环生物制药公司。流式抗体CD3-FITC、CD3-APC、CD56-PE、CD4-PE、CD8-PE、NKG2D-APC、NKp30-APC、NKp44-APC、NKp46-APC、CD158b-PE、CD159a-PE、CD69-PE及Treg检测试剂盒(CD4-Pecy5/CD25-FITC/CD127-PE)购自BD Biosciences公司,NK细胞分选试剂盒购自德国Meltenyi公司,淋巴细胞分离液购自中国医学科学院天津血液研究所,乳酸脱氢酶试剂盒购自Roche公司,ELISA检测试剂盒购自R&D公司。

### 1.3 NK细胞的体外诱导培养

采集肘静脉外周血50 ml,肝素抗凝,1 300  $\times$  g离心10 min,取上层血浆56  $^{\circ}$ C、30 min进行补体灭活备用;沉淀细胞经PBS稀释后,用淋巴细胞分离液分离得PBMC,PBS洗涤2次。IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-18组合培养法:第0天用75 cm<sup>2</sup>培养瓶,加入5%~10%灭活的人自体血清,加细胞因子IL-2(终浓度500 U/ml)、IL-12、IL-15、IL-18(终浓度20 ng/ml),GT-T551培养基加至30 ml;第2天补充上述细胞因子,培养基加至60 ml;第3天细胞转移入培养袋中,补充细胞因子,IL-2(终浓度200 U/ml)、IL-12、IL-15、IL-18(终浓度10 ng/ml),培养基加至300 ml;第5天补充细胞因子,IL-2(终浓度100 U/ml)、IL-12、IL-15、IL-18(终浓度5 ng/ml),培养基加至1 000 ml;第8天补充细胞因子,IL-2(终浓度50 U/ml)、IL-12、IL-15、IL-18(终浓度2.5 ng/ml),培养基加至2 500 ml;第17~20天收获细胞。肿瘤细胞株的培养:K562、Raji、Eca-109和TE-1用含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养液,

于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。

### 1.4 磁珠法分选外周血 NK 细胞

为检测 NK 细胞培养前对食管癌等细胞株的杀伤能力, 取食管癌患者及健康供者各 5 例进行 NK 细胞分选。Ficoll 法分离外周血单个核细胞, 加入生物素标记混合抗体( NK cell biotin antibody cocktail) 孵育 10 min, 离心洗涤, 加入抗生物素磁珠抗体( NK cell microbead cocktail) 孵育 15 min, 离心洗涤, 使用德国 Meltenyi 公司 Vario-MACS 系统过柱, 收集未标记的细胞即为 NK 细胞。流式细胞术检测分选前后 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK 细胞的纯度。

### 1.5 流式细胞术检测 NK 细胞的免疫表型

收集对数生长期的细胞, 调整细胞密度至 5 × 10<sup>6</sup>/ml, 取 50 μl, 标记荧光抗体 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>( NK 细胞)、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>( CD4<sup>+</sup> T 细胞)、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>( CD8<sup>+</sup> T 细胞)、CD4/CD25/CD127( Treg 细胞); NK 细胞表面分子检测以 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 设门, 检测 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NKp30<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NKp44<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NKp46<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> CD159a<sup>+</sup> 细胞比例, 各指标设同型 IgG 阴性对照, 4 °C 避光孵育 30 min 后, PBS 洗 2 次, 流式细胞仪检测, 使用 Cell Quest 软件处理资料, 每个样本均检测 10 000 个细胞。

### 1.6 LDH 法检测 NK 细胞对不同肿瘤细胞株的杀伤

检测培养前食管癌患者与健康志愿者 NK 细胞的杀伤活性, 先进行外周血 NK 细胞的分选, 当细胞纯度达 90% 以上, 应用 LDH 检测试剂盒检测 NK 细胞的杀伤活性。调整 NK 细胞密度至 1 × 10<sup>6</sup>/ml, 以 K562、Raji、Eca-109、TE-1 细胞作为靶细胞, 按 20:1、10:1、5:1、1:1 效靶比加入 96 孔 U 型板中, 终体积

200 μl/孔, 设 3 个复孔。根据说明书设立对照组, 包括只加入靶细胞的自发释放组( SR 靶)、只加入靶细胞并在检测前 40 min 加入 10 ml/L Triton-100 的最大释放组( MR 靶)、只加入效应细胞的自发释放组( SR 效应), 在 37 °C 孵箱中培养 4 h。离心吸出上清, 转移至另一 ELISA 板, 每孔加入 50 μl LDH 反应液。室温避光放置 30 min 后, 测定 492 nm 处光密度( D) 值。细胞杀伤活性( % ) = [ ( 实验孔 D 值 - SR 效应 D 值 - SR 靶 D 值 ) / ( MR 靶 D 值 - SR 靶 D 值 ) ] × 100% 。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计学软件包, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较使用 *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 食管癌患者外周血 NK 细胞的体外扩增

流式细胞术检测结果( 表 1 ) 显示, 培养前食管癌患者外周血中 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T 细胞及 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞比例明显低于健康对照组( P < 0.05 ), NK 细胞( CD56<sup>+</sup> ) 及 Treg 比例明显高于对照组( P < 0.05 )。经细胞因子 IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-18 组合定向扩增 20 d 后, 食管癌患者与健康志愿者 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK 细胞比例高达 90% 以上, NK 细胞数扩增倍数达 1 000 倍以上( P < 0.01 ), 而总 CD3<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD19<sup>+</sup> B 细胞、Treg 及 CD14<sup>+</sup> 单核巨噬细胞比例都明显减少( P < 0.01 ), 且食管癌患者与健康志愿者 NK 细胞之间无明显差异( P > 0.05 )。

表 1 食管癌患者外周血 NK 细胞体外扩增后免疫表型的变化( % )

Tab. 1 Immunophenotype changes after *in vitro* expansion of peripheral blood NK cells from esophageal cancer patients( % )

Cell immunophenotype	0 d esophageal cancer	0 d healthy	20 d esophageal cancer	20 d healthy
CD3 <sup>+</sup>	52.13 ± 2.27	68.71 ± 3.22*	6.20 ± 0.21**	5.63 ± 0.30 <sup>△△</sup>
CD4 <sup>+</sup>	27.56 ± 3.36	35.32 ± 2.31*	2.31 ± 0.13**	2.21 ± 0.13 <sup>△△</sup>
CD8 <sup>+</sup>	26.23 ± 2.04	27.11 ± 2.09	5.20 ± 0.32**	4.81 ± 0.28 <sup>△△</sup>
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0.91 ± 0.12	1.30 ± 0.13*	0.42 ± 0.02	0.47 ± 0.03
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	19.67 ± 3.12	13.21 ± 2.21*	92.30 ± 2.70**	93.10 ± 2.22 <sup>△△</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	1.62 ± 0.50	1.57 ± 0.42	1.31 ± 0.16	1.42 ± 0.03
CD19 <sup>+</sup>	8.04 ± 2.32	7.62 ± 3.11	1.21 ± 0.13**	1.13 ± 0.31 <sup>△△</sup>
CD14 <sup>+</sup>	7.08 ± 1.34	7.65 ± 1.14	0.06 ± 0.02**	0.07 ± 0.01 <sup>△△</sup>
Treg <sup>+</sup>	13.22 ± 3.13	6.08 ± 2.34*	0.03 ± 0.02**	0.02 ± 0.01 <sup>△△</sup>

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs 0 d esophageal cancer; <sup>△△</sup> P < 0.01 vs 0 d healthy

## 2.2 体外培养后 NK 细胞表面不同受体的表达

流式细胞术检测培养后 NK 细胞的活化标志及表面受体表达(表 2),0 d 时食管癌患者 NK 细胞活化标志 CD69 和活化性受体 NKp46、NKp30、NKG2D 的表达水平低于健康供者 NK 细胞( $P < 0.05$ )。但活化性受体 NKp44 培养前无论食管癌患者或健康供者 NK 细胞均低表达,且无统计学差异( $P > 0.05$ )。培养 20 d 时,食管癌患者及健康供者 NK 细胞活化标志 CD69 和活化性受体 NKp46、NKp30、NKG2D 与 0 d 时对比均有不同程度上调( $P < 0.05$ ),而抑制性受体 CD158b、CD159a 均有不同程度下调( $P < 0.05$ );但食管癌患者与健康供者之间无统计学差异( $P > 0.05$ )。值得注意的是,NK 细胞

活化性受体 NKp44 培养 20 d 时升高显著( $P < 0.05$ ),且食管癌患者与健康供者 NK 细胞对比无统计学差异( $P > 0.05$ )。

## 2.3 体外培养后 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用

LDH 法检测结果(表 3)显示,效靶比 20:1 时,不同来源 NK 细胞对肿瘤细胞株 K562、Raji、Eca-109、TE-1 的杀伤能力不同,培养前(即 0 d)食管癌患者 NK 细胞杀瘤能力明显低于健康供者 NK 细胞。培养后 20 d,食管癌患者 NK 细胞杀瘤能力高于 0 d 食管癌患者 NK 细胞( $P < 0.01$ ),健康供者 NK 细胞杀瘤能力也高于 0 d 健康供者 NK 细胞( $P < 0.01$ ),但食管癌患者与健康供者 NK 细胞对比无统计学差异( $P > 0.05$ )。

表 2 体外培养后 NK 细胞表面受体的表达(%)

Tab. 2 Expressions of surface receptors in NK cells after *in vitro* culture(%)

NK cell receptor	0 d		20 d	
	Esophageal	Healthy	Esophageal	Healthy
CD69 <sup>+</sup>	52.6 ± 4.2	66.3 ± 6.3 <sup>*</sup>	97.0 ± 3.1 <sup>**</sup>	98.1 ± 2.3 <sup>△△</sup>
NKD2D <sup>+</sup>	72.0 ± 5.3	87.9 ± 7.2 <sup>*</sup>	95.2 ± 3.7 <sup>**</sup>	96.2 ± 3.0 <sup>△△</sup>
NKp30 <sup>+</sup>	26.3 ± 2.3	35.6 ± 5.1 <sup>*</sup>	62.2 ± 2.7 <sup>**</sup>	65.6 ± 3.6 <sup>△△</sup>
NKp44 <sup>+</sup>	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	24.6 ± 2.2 <sup>**</sup>	23.2 ± 1.2 <sup>△△</sup>
NKp46 <sup>+</sup>	42.3 ± 3.2	51.3 ± 4.3 <sup>*</sup>	73.6 ± 3.3 <sup>**</sup>	74.3 ± 4.2 <sup>△△</sup>
CD158b <sup>+</sup>	79.3 ± 4.8	67.5 ± 3.6 <sup>*</sup>	58.2 ± 3.0 <sup>**</sup>	57.0 ± 2.3 <sup>△△</sup>
CD159a <sup>+</sup>	31.2 ± 2.3	20.3 ± 1.6 <sup>*</sup>	10.3 ± 2.1 <sup>**</sup>	9.1 ± 1.5 <sup>△△</sup>

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 d esophageal cancer; <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  vs 0 d healthy

表 3 体外培养后 NK 细胞对不同肿瘤细胞株的杀伤作用(%)

Tab. 3 Cytotoxicity of NK cells after *in vitro* culture on various tumor cell lines(%)

Cell type	0 d		20 d	
	Esophageal	Healthy	Esophageal	Healthy
K562	42.3 ± 3.0	56.1 ± 2.3 <sup>*</sup>	69.2 ± 5.1 <sup>**</sup>	67.2 ± 4.5 <sup>△△</sup>
Raji	21.1 ± 2.0	33.3 ± 2.6 <sup>*</sup>	44.6 ± 3.2 <sup>**</sup>	46.8 ± 2.3 <sup>△△</sup>
Eca-109	50.3 ± 3.5	59.1 ± 2.8 <sup>*</sup>	69.7 ± 3.9 <sup>**</sup>	72.2 ± 3.1 <sup>△△</sup>
TE-1	41.2 ± 3.3	55.3 ± 3.4 <sup>*</sup>	67.1 ± 4.5 <sup>**</sup>	65.2 ± 3.6 <sup>△△</sup>

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 d esophageal cancer; <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  vs 0 d healthy

## 3 讨论

细胞免疫在抗肿瘤免疫中具有主导性作用。本研究中 CD3<sup>+</sup> T 细胞比例在食管癌患者中明显低于

正常群体,刘江惠等<sup>[4]</sup>认为,这是由于 T 细胞活化过程中,肿瘤抗原通过抗原提呈机制趋化外周血 T 细胞向肿瘤组织聚集而引起。CD4<sup>+</sup> T 及 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 细胞比例也低于正常群体,有研究<sup>[5]</sup>表明,

CD4<sup>+</sup>T 细胞在免疫反应中扮演重要角色, 参与 CD8<sup>+</sup> CTL 细胞的活化, 与肿瘤负荷和患者预后相关。调节性 T 细胞( regulatory T cell, Treg )是免疫抑制性细胞, 正常情况下维持机体免疫稳态, 然而肿瘤患者多伴有 Treg 增高<sup>[6]</sup>, 本研究中食管癌患者外周血 Treg 细胞比例增加, 从另一方面说明食管癌患者处于免疫抑制状态。NK 细胞在食管癌患者中高于正常人群, 罗霁华等<sup>[7]</sup>认为可能是由于肿瘤细胞的刺激使免疫系统生成更多的 NK 细胞以抵抗肿瘤。

Rosenberg 等为首应用 IL-2 活化的 LAK 细胞为主的肿瘤生物治疗, 发现其主要发挥抗肿瘤作用的主要效应细胞是 NK 细胞<sup>[8]</sup>。但到目前为止, 体外大量扩增 NK 细胞及体内有效激活 NK 细胞极为困难, 真正开展自体及异体 NK 细胞临床应用的病例还很少, 阻碍了 NK 细胞在肿瘤治疗中的临床应用。目前 NK 细胞培养方法不尽相同, 主要包括以下几个方面: (1) 来源: Spanholtz 等<sup>[9]</sup>先从脐带血提取造血干细胞, 再定向诱导扩增 NK 细胞, 但由于脐带血来源较外周血困难, 而且存在伦理问题。Berg 等<sup>[10]</sup>先从外周血直接纯化 NK 细胞, 再扩增已纯化 NK 细胞, 虽然 NK 细胞纯度得到提高, 但增加工作量及成本。本研究只要采集外周血 50 ml, 无需纯化, 体外培养后 NK 细胞纯度及数量就能满足一个疗程的治疗需要; (2) 饲养层细胞: Sutlu 等<sup>[11]</sup>将 EB 病毒感染的淋巴细胞用作饲养细胞, 扩增效率、NK 细胞纯度与杀伤活性均较高, 但缺点是培养体系中仍需要饲养细胞的参与, 存在安全性问题。随着生物技术的发展, 现在已较少使用饲养细胞, 更侧重于细胞因子的组合用于 NK 细胞的体外扩增; (3) 培养基及容器: 无血清培养基 Cell Gro SCGM、AIM V 等价格昂贵, 本研究使用无血清培养基 GT-T551 及封闭式培养袋, 既经济又能达到大量扩增 NK 细胞的目的。

随着细胞因子研究和制备技术的发展, 合理应用不同细胞因子可有效扩增目的细胞。本研究尝试了一种经济可行的细胞因子组合( 即 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 组合 ), 培养出的 NK 细胞能同时满足纯度高和数量多要求。每种细胞因子浓度随着培养时间延长逐渐递减, 以减少成本。IL-2 是一种多功能的细胞因子, 能够激活、诱导 NK 细胞增殖, 是体外 NK 细胞扩增体系中最早也是最常用的细胞因子<sup>[12]</sup>。IL-12 是功能最强的促进 NK 细胞杀伤活性的细胞因子, 不到 1 pmol/L 浓度的 IL-12 就能明显增强 NK 细胞的杀伤活性<sup>[13]</sup>, 而 IL-2 和 IFN- $\gamma$  要达到同样效果则至少需要 3 倍以上的浓度。IL-15 与 IL-2 都可与 IL-2 受体复合体的  $\beta$ 、 $\gamma$  链结合, 故在生物学

效应上有许多相似之处, 两者都能在体外诱导 NK 细胞的增殖, 并提高 NK 细胞的细胞毒活性, 可以产生协同作用<sup>[14]</sup>。IL-18 是一种相对于 IL-2 副作用小的细胞因子, 可以诱导 NK 细胞和 T 细胞分泌 IFN- $\gamma$ , 促进 NK 细胞的增殖和活化<sup>[15]</sup>。随着培养时间及培养液量的增加, 细胞因子终浓度逐渐减少, 结果证明这样既可有效扩增 NK 细胞、节约成本, 又能减少负反应, 扩增后的 NK 细胞( CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> )比例 20 d 时高 90% 以上, NK 细胞数扩增 1 000 倍以上。

NK 细胞的功能取决于其表面抑制性受体和活化性受体所传递信号的整合<sup>[16-18]</sup>。本研究培养 20 d 后 NK 细胞活化性受体( NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46 )均有不同程度上调, 抑制性受体( CD158b、CD159a )明显下调。CD69 属于 C 型凝集素超家族, 是 NK 细胞信号传递复合体基因家族的一员, 可活化 NK 细胞和 T 细胞, 增强细胞毒活性促炎性细胞因子的产生<sup>[19-20]</sup>。本研究中食管癌患者 NK 细胞 CD69 细胞比例与健康供者相比明显降低, 说明其 NK 细胞活化不足, 难以发挥抗肿瘤免疫监视作用。经 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 组合培养的后 NK 细胞, 其表面 CD69 分子明显增高。

本研究培养前食管癌患者 NK 细胞杀瘤能力明显低于健康供者, 培养 20 d 后食管癌患者或健康供者 NK 细胞杀瘤能力增高, 且食管癌患者与健康供者 NK 细胞无差异。结果提示, NK 细胞对肿瘤的杀伤能力与 NK 细胞表面活化标志 CD69 及受体密切相关, 即 NK 细胞表面活化标志 CD69 及活化性受体表达高, 抑制性受体表达低, NK 细胞对食管癌细胞株杀伤能力强。

K 细胞被称为“人体抵抗癌细胞和病毒感染的第一道防线”, 但由于外周血中 NK 细胞含量少, 体外高效扩增 NK 细胞成为 NK 细胞临床治疗中的关键问题之一。本研究经 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 组合培养 20 d 后, NK 活化标志 CD69 及活化性受体表达增高, 抑制性受体表达降低, NK 细胞对食管癌等细胞株杀伤能力强, 而且食管癌患者来源 NK 细胞与健康供者来源 NK 细胞杀伤活性间无统计学差异, 提示 NK 细胞可以来源于食管癌患者自体或健康供者。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Toomey PG, Vohra NA, Ghansah T, et al. Immunotherapy for gastrointestinal malignancies [ J ]. Cancer Control, 2013, 20( 1 ): 32-42.

- [ 2 ] Suck G, Koh MB. Emerging natural killer cell immunotherapies: Large-scale *ex vivo* production of highly potent anticancer effectors [ J ]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2010, 3( 3 ): 135-142.
- [ 3 ] Williams DP. Toxicophores: investigations in drug safety [ J ]. *Toxicology*, 2006, 266( 1 ): 1-11.
- [ 4 ] 刘江惠, 李建涛, 贺宇彤, 等. 食管癌贲门癌患者 T 淋巴细胞、NK 细胞免疫功能检测及意义 [ J ]. *中国老年学杂志*, 2010, 30( 6 ): 729-731.
- [ 5 ] Appay V, Van Lier RA, Sallusto F, et al. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues [ J ]. *Cytometry A*, 2008, 73( 11 ): 975-983.
- [ 6 ] Foza C, Longu F, Contini S, et al. Patients with early-stage myelodysplastic syndromes show increased frequency of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127( low ) regulatory T cells [ J ]. *Acta Haematol*, 2012, 128( 3 ): 178-182.
- [ 7 ] 罗霁华, 程明刚, 汪小娟, 等. 食管癌患者 NK 细胞和 T 淋巴细胞免疫功能检测及临床意义研究 [ J ]. *临床和实验医学杂志*, 2011, 10( 11 ): 817-818.
- [ 8 ] Phillips JH, Lanier LL. Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytotoxicity [ J ]. *J Exp Med*, 1986, 164( 3 ): 814-825.
- [ 9 ] Spanholtz J, Preijers F, Tordoir M, et al. Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process [ J ]. *PLoS One*, 2011, 6( 6 ): e20740-e20750.
- [ 10 ] Berg M, Lundqvist A, Jr Mccoy P, et al. Clinical-grade *ex vivo*-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells [ J ]. *Cytotherapy*, 2009, 11( 3 ): 341-355.
- [ 11 ] Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: Current insights and future prospects [ J ]. *J Intern Med*, 2009, 266( 2 ): 154-181.
- [ 12 ] Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy [ J ]. *Immunity*, 2013, 38( 1 ): 13-25.
- [ 13 ] Luedke E, Jaime-Ramirez AC, Bhawe N, et al. Cetuximab therapy in head and neck cancer: Immune modulation with interleukin-12 and other natural killer cell-activating cytokines [ J ]. *Surgery*, 2012, 152( 3 ): 431-440.
- [ 14 ] Lund H, Boysen P, Dean GA, et al. Interleukin-15 activated bovine natural killer cells express CD69 and produce interferon-gamma [ J ]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 150( 1/2 ): 79-89.
- [ 15 ] Ni J, Miller M, Stojanovic A, et al. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors [ J ]. *J Exp Med*, 2012, 209( 13 ): 2351-2365.
- [ 16 ] 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.
- [ 17 ] 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.
- [ 18 ] Rosental B, Hadad U, Brusilovsky M, et al. A novel mechanism for cancer cells to evade immune attack by NK cells: The interaction between NKp44 and proliferating cell nuclear antigen [ J ]. *Oncoimmunology*, 2012, 1( 4 ): 572-574.
- [ 19 ] Roussev RG, Dons Koi BV, Stamatkin C, et al. Preimplantation factor inhibits circulating natural killer cell cytotoxicity and reduces CD69 expression: Implications for recurrent pregnancy loss therapy [ J ]. *Reprod Biomed Online*, 2013, 26( 1 ): 79-87.
- [ 20 ] Clausen J, Vergeiner B, Enk M, et al. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells [ J ]. *Immunobiology*, 2003, 207( 2 ): 85-93.

[ 收稿日期 ] 2013 - 01 - 25

[ 修回日期 ] 2013 - 03 - 20

[ 本文编辑 ] 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》被 DOAJ 收录

《开放存取期刊指南》(Directory of Open Access Journals, DOAJ)由瑞典隆德大学图书馆主任 Lars 教授于 2003 年创办, DOAJ 的目标是建设成为全面覆盖全球科技学术界开放存取( open access, OA )期刊的门户网站。迄今为止, DOAJ 共收录全世界 119 个国家的 9 480 种 OA 期刊, 其中收录中国 OA 期刊 45 种。

目前, 《中国肿瘤生物治疗杂志》已被 DOAJ 正式收录。本刊被 DOAJ 收录后, 可以更广泛和更方便地向全球读者展示本刊的全部学术论文, 有利于扩大本刊的显示度和影响力; 也有利于向全世界宣传我国肿瘤生物治疗领域的研究成果, 从而促进中外学术交流和肿瘤防治事业的发展。

( 本刊编辑部 )