

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.06.004

· 基础研究 ·

## IL-2 + IL-15 组合培养方案对乳腺癌患者外周血中 NK 细胞体外扩增的效果

王晓梦<sup>1,2</sup>, 于津浦<sup>1,2</sup>, 李慧<sup>1,2</sup>, 于文文<sup>1,2</sup>, 任秀宝<sup>1,2</sup>, 曹水<sup>1,2</sup>▲ (1. 天津医科大学 附属肿瘤医院 生物治疗科, 天津 300060; 2. 天津医科大学 附属肿瘤医院 天津市肿瘤免疫与生物治疗重点实验室, 天津 300060)

**[摘要]** **目的:**观察 IL-2 + IL-15 组合体外培养方案对于 NK、NKT 和 T 细胞亚群的比例、表型、杀伤肿瘤细胞活性与黏附活性的影响,并初步探讨其作用机制。**方法:**采集天津医科大学附属肿瘤医院生物治疗科 2012 年 5 月至 2012 年 7 月期间收治的 5 例乳腺癌患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),用 IL-2 + IL-15 联合培养方案进行培养,观察培养 15 d 后细胞的扩增倍数和淋巴细胞亚群比例变化,流式细胞术检测细胞免疫表型、细胞表面受体的表达,LDH 释放法和 CD107a 释放法检测不同细胞亚群对于 HLA 匹配或不匹配的靶肿瘤细胞系的杀伤活性,活细胞工作站检测总扩增产物对于不同靶肿瘤细胞系的黏附作用。**结果:**与扩增前相比,IL-2 + IL-15 培养方案扩增 15 d 后,NK 细胞[(36.74 ± 17.10)% vs (16.34 ± 3.12)% ,  $P < 0.05$  ],NKT 细胞[(24.88 ± 12.34)% vs (4.06 ± 2.05)% ,  $P < 0.05$  ]比例显著增加,CD4<sup>+</sup> T 细胞和 Treg 细胞比例显著降低( $P < 0.05$ ),CD8<sup>+</sup> T 细胞比例显著升高( $P < 0.05$ );NK 细胞表面活化受体 NKp30[(92.38 ± 7.19)% vs (32.14 ± 17.64)% ,  $P < 0.05$  ],NKp44[(74.26 ± 16.28)% vs (1.94 ± 1.60)% ,  $P < 0.05$  ],NKG2D [(98.58 ± 1.28)% vs (66.50 ± 24.84)% ,  $P < 0.05$  ]的表达率均显著升高,CD16 表达率显著降低[(85.12 ± 7.66)% vs (95.60 ± 2.53)% ,  $P < 0.05$  ];NKT 细胞、T 细胞表面活化受体 DNAM-1 和 NKG2D 明显升高( $P < 0.05$ )。总扩增产物、NK 细胞和 NKT 细胞对 HLA 不匹配的靶肿瘤细胞的杀伤率均显著高于 HLA 匹配靶细胞系的杀伤( $P < 0.05$ );在共孵育至 84 min 时,与 HLA 匹配的靶肿瘤细胞系相比,总扩增产物细胞与 HLA 不匹配的靶细胞系黏附结合数目显著增多[(4.80 ± 0.53) vs (2.25 ± 0.35)个,  $P < 0.05$  ]。**结论:**IL-2 + IL-15 组合方案在扩增 NK 细胞的同时,也能够有效扩增 NKT 细胞,即可以扩增 CD56<sup>+</sup> 细胞群。并且,扩增产物主要以不受 HLA 限制的 NK 细胞杀伤活性为主来杀伤肿瘤细胞。

**[关键词]** IL-2;IL-15;NK 细胞;扩增;乳腺癌

**[中图分类号]** R737.9;R730.51

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)06-0654-07

## Effect of combinatorial culture protocol (IL-2 and IL-5) on the proliferation of NK cells in the peripheral blood of breast cancer patients *in vitro*

Wang Xiaomeng<sup>1,2</sup>, Yu Jinpu<sup>1,2</sup>, Li Hui<sup>1,2</sup>, Yu Wenwen<sup>1,2</sup>, Ren Xiubao<sup>1,2</sup>, Cao Shui<sup>1,2</sup>▲ (1. Department of Biotherapy, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China; 2. Key Laboratory of Cancer Immunology and Biotherapy of Tianjin City, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China)

**[Abstract]** **Objective:**To observe the effect of culture with IL-2 and IL-15 *in vitro* on the proportion, the cell phenotype, the cytotoxic activity against tumor cells and the adhesion activity of NK cells, NKT cells and T cells subsets, and to discuss the possible mechanism. **Methods:** Five patients with breast cancer were obtained in the Department of Biotherapy, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital from May 2012 to July 2012, and PBMCs of those patients were isolated by and cultured with the NK cells proliferation scheme contained IL-2 + IL-5. The cell expansion fold and

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 项目)资助项目(No.2012CB9333004);国家自然科学基金资助项目(No.81072159);天津医科大学附属肿瘤医院临床试验专项基金资助项目(No.11L01)。Project supported by the National Key Basic Research Development Program (973 Program) of China (No.2012CB9333004), the National Natural Science Foundation of China(No.81072159), and the Special Foundation for Clinical Trial of Cancer Hospital Affiliated to Tianjin Medical University(No.11L01)

**[作者简介]** 王晓梦(1988-),女,山东省滨州市人,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗的基础和临床研究。E-mail: wxmdream1@163.com

**[通信作者]** 任秀宝(Ren Xiubao, corresponding author), E-mail: rwziyi@yahoo.com;曹水(Cao Shui, co-corresponding author), E-mail: caoshui@yahoo.com。▲为共同通信作者

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20131202.1522.004.html>

the proportion of different lymphocyte subsets were observed after cultured by IL-2 and IL-15 for 15 d. The changes of the cell immunophenotype and cell surface receptors were detected by flow cytometry. The anti-tumor cytotoxicity against HLA-match or HLA-mismatch cancer cells among three lymphocyte subsets were measured using LDH cytotoxicity assay and CD107a release assay. Adhesion between the total expansion products and HLA-match or HLA-mismatch tumor cells was detected by Live Cell Station. **Results:** After expansion by IL-2 + IL-15 for 15 days, compared with preamplification, the proportions of NK cells ( $[36.74 \pm 17.10]\%$  vs  $[16.34 \pm 3.12]\%$ ,  $P < 0.05$ ) and NKT cells ( $[24.88 \pm 12.34]\%$  vs  $[4.06 \pm 2.05]\%$ ,  $P < 0.05$ ) were significantly increased; the proportions of  $CD4^+$ T cells and Treg cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the proportions of  $CD8^+$ T cells were significantly increased ( $P < 0.05$ ); the expressions of surface activation receptors NKp30 ( $[92.38 \pm 7.19]\%$  vs  $(32.14 \pm 17.64)\%$ ,  $P < 0.05$ ), NKp44 ( $[74.26 \pm 16.28]\%$  vs  $[1.94 \pm 1.60]\%$ ,  $P < 0.05$ ) and NKG2D ( $[98.58 \pm 1.28]\%$  vs  $(66.50 \pm 24.84)\%$ ,  $P < 0.05$ ) expressed on NK cells were increased significantly, while CD16 was obviously decreased ( $[85.12 \pm 7.66]\%$  vs  $[95.60 \pm 2.53]\%$ ,  $P < 0.05$ ); the activation receptors DNAM-1 and NKG2D expressed on both NKT cells and T cells were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The killing rates of total expansion cells, NK cells and NKT cells against HLA-mismatched tumor cells were significantly higher than those against HLA-matched tumor cells ( $P < 0.05$ ). In the 84th minute of co-incubation, the adherent number of total expansion cells combined to HLA-mismatched tumor cells were significantly higher than that of HLA-matched tumor cells ( $[4.80 \pm 0.53]$  vs  $[2.25 \pm 0.35]$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Not only NK cells but also NKT cells can be amplified by cultured with IL-2 and IL-15, indicating that it can be used to expand  $CD56^+$  cells. Expansion products kill the tumor cells mainly by the NK cells killing activity without HLA-restricted.

[ **Key words** ] IL-2; IL-15; NK cell; expansion; breast cancer

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(6): 654-660 ]

自然杀伤(natural killer, NK)细胞作为非特异性免疫的重要效应细胞,在抗肿瘤临床应用中的安全性和有效性得到了肯定<sup>[1]</sup>。但是正常人体外周血中的NK细胞数量较少,仅占外周血的淋巴细胞的10%~20%<sup>[2]</sup>。在体外通过细胞因子的刺激来培养可进行相对大规模的NK细胞制备。已知许多细胞因子,如IL-2、IL-7、IL-15、IL-18等,单独或组合均能有效地诱导、刺激特定的NK细胞增殖和促进其分化成熟,其中IL-2和IL-15的作用尤为明显<sup>[3-5]</sup>。本课题组前期工作<sup>[6]</sup>针对4种高效的NK细胞体外扩增方案,分别从扩增倍数、细胞表型以及杀伤活性等方面进行了研究,认为IL-2+IL-15的细胞因子组合在体外可以高效稳定地扩增NK细胞。但是,IL-2和IL-15在整个培养过程中对于各个细胞亚群的比例、各个细胞亚群免疫表型和活化受体的影响及其作用机制尚不清楚<sup>[7]</sup>。因此,本研究观察IL-2+IL-15组合培养方案对培养物中细胞亚群的比例、细胞免疫表型、细胞表面活化受体的表达以及不同细胞亚群对不同靶细胞系杀伤活性的影响,并初步探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 资料

选取天津医科大学附属肿瘤医院生物治疗科

2012年5月至7月期间收治的5例乳腺癌患者,中位年龄52岁(50~55岁)。根据2009年国际抗癌联盟(International Union Against Cancer, UICC)制定的手术病理分期标准进行分期,5例患者的病理分期均属IV期。采集5例患者的标本均征得患者或家属同意,并签署知情同意书。

### 1.2 主要试剂

无血清培养基(GT-T551)购自日本TaKaRa公司,IL-2和IL-15购自美国PeproTech公司,FITC标记CD45Ro、CD45Ra抗体及同型对照IgG2 $\alpha$ ,PE标记的CD25、CCR7抗体及同型对照IgG2 $\alpha$ ,PerCP标记的CD3、CD4、CD45抗体,APC标记的CD127、NKp30、NKp44、NKG2D、CD16抗体及同型对照IgG1,647标记的NKp46、DNAM-1及其同型对照IgG1,PE-Cy5-CD3抗体、PE-CD4抗体、FITC-CD8抗体均购自美国Biolegend公司,FITC-CD3抗体、PE-CD16<sup>+</sup>56抗体、PerCP-CD45抗体购自美国BD公司,LDH试剂盒和DNA提取试剂盒购自美国Promega公司,CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK磁珠分选试剂盒(NK Cell Isolation Kit II,包括荧光标记抗体、磁珠)、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKT磁珠分选盒、PanT磁珠分选盒、miniMACS磁珠分选系统、分离柱(MS Column)均购自德国Miltenyi公司,HLA-A SPSS-PCR反应试剂购自Olerup公司。乳腺癌细胞系(SKBR3、MDA-MB-231、MDA-435、MCF-7、T47D、

ZR75-1)、卵巢癌细胞系 SKOV3 和肺癌细胞系 A549 由本实验室保存。

### 1.3 NK 细胞的体外扩增与分选

采集 5 例乳腺癌患者外周富集血各 4 ml, 采用 Ficoll 法分离出外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), PBS 洗涤 4 次, 加入无血清培养基, 调整细胞密度为  $1.0 \times 10^6$  个/ml。加入细胞因子 IL-2 (10 ng/ml) 和 IL-15 (50 ng/ml), 每隔 3 d 换液一次(半量换液), 补充所需的刺激因子和培养液, 使培养液中细胞因子浓度保持不变, 连续培养 15 d。计数扩增产物并进行免疫磁珠分选:(1) NK 细胞和 T 细胞分选, 每  $1 \times 10^7$  个细胞加 40  $\mu$ l 的缓冲液和 10  $\mu$ l 的 NK 细胞标记抗体混合物或 T 细胞生物素微型磁珠混合物, 4  $^{\circ}$ C 培育 10 min。每  $1 \times 10^7$  个细胞再加 30  $\mu$ l 的缓冲液和 20  $\mu$ l 的 NK 细胞微型磁珠混合物(T 细胞生物素标记抗体混合物), 4  $^{\circ}$ C 培育 15 min, 用缓冲液洗涤细胞, 加 500 ml 缓冲液重悬。入 MACS 分选柱, 流出的细胞即为富含 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的 NK 细胞或 T 细胞。(2) NKT 细胞分选的步骤同前, 每  $1 \times 10^7$  个细胞加 40  $\mu$ l 的缓冲液和 10  $\mu$ l 的 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT 细胞生物素标记抗体混合物, 4  $^{\circ}$ C 培育 10 min。每  $1 \times 10^7$  个细胞加 40  $\mu$ l 的缓冲液和 10  $\mu$ l 的 NKT 细胞微型磁珠混合物, 4  $^{\circ}$ C 培育 15 min, 缓冲液洗涤后再加 500 ml 重悬, 入 MACS 分选柱。流出的细胞每  $1 \times 10^7$  个细胞加 40  $\mu$ l 的缓冲液和 10  $\mu$ l 的 CD56 微型磁珠, 4  $^{\circ}$ C 孵育 15 min。再次用缓冲液洗涤细胞, 加 500 ml 缓冲液重悬, 磁珠分选方法同上。但此次分选柱上的细胞为富含 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 的 NKT 细胞, 快速推出这部分细胞, 对其进行计数并计算活细胞比例, 备用。

### 1.4 流式细胞术检测扩增细胞的表型

分别收集培养第 0、5、10、15 天的细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/ml, 加入 CD3 PE-Cy5/CD4-PE/CD8-FITC、FITC-CD45Ro、FITC-CD45Ra、PerCP-CD45 和 PE-CCR7 抗体标记 T 细胞亚群; 加入 PerCP-CD4、PE-CD25 和 APC-CD127 抗体标记 Treg 细胞; 加入 CD3-FITC/CD16<sup>+</sup>56<sup>-</sup>-PE/CD45-PerCP 抗体标记 NK、NKT 细胞亚群; 加入 APC-NKp30、APC-NKp44、APC-NKG2D、APC-CD16、647-NKp46 和 647-DNAM-1 抗体检测细胞表面受体的表达; 加入 FITC-IgG1、APC-IgG1、647-IgG1、FITC-Mouse IgG2 $\alpha$  和 PE-Mouse IgG2 $\alpha$  抗体作为对照进行免疫分型检测。

### 1.5 SSP-PCR 检测乳腺癌患者 DNA 的 HLA-A 位点

取 5 例乳腺癌患者外周血各 100  $\mu$ l, 按 DNA 提

取试剂盒说明书操作, 进行 DNA 的提取。用 SSP-PCR 法检测各组 DNA 的 HLA-A 表型, 将依 HLA-A 试剂盒说明书配制好的反应体系以 10  $\mu$ l/孔加入相应的带有引物的 24 孔板中进行 PCR。PCR 产物经琼脂糖凝胶在 85 V 电压下进行 15 min 电泳后, 紫外线灯下观察结果, 使用凝胶成像系统拍照记录结果。

### 1.6 LDH 释放法检测扩增后各细胞亚群的杀伤活性

经 IL-2 + IL-15 组合 NK 细胞体外培养方案扩增得到的细胞或分选出的 NK 细胞、NKT 细胞、T 细胞亚群作为效应细胞, 调整其密度至  $4 \times 10^6$  个/ml。根据 HLA 配型结果筛选不同肿瘤细胞系作为靶细胞, 调整其密度至  $1 \times 10^5$  个/ml。取 96 孔圆底培养板, 每个样本做 3 个复孔, 按效靶比 40:1 加入效应细胞与靶细胞, 并设效应细胞自然释放对照孔(每孔 100  $\mu$ l 效应细胞 + 100  $\mu$ l 培养液)、最大和最小靶细胞对照孔(每孔 100  $\mu$ l 靶细胞 + 100  $\mu$ l 培养液)、本底和体积纠正孔(每孔 200  $\mu$ l 培养液)。将培养板放置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培育 4 h, 在最大孔和体积纠正孔内加入 20  $\mu$ l 裂解缓冲液。30 min 后离心, 每孔吸取 50  $\mu$ l 上清到相应平底培养板, 避光条件下加入 50  $\mu$ l 反应底物, 室温避光 20 ~ 30 min, 待各孔液体颜色转深时加终止液 50  $\mu$ l/孔。将 96 孔板置于酶标仪中, 检测 492 nm 波长处的光密度(D)值。

$$\text{杀伤率}(\%) = \frac{(D_{\text{实验孔}} - D_{\text{效应细胞自然释放孔}} - D_{\text{靶细胞自然释放孔}} + D_{\text{本底纠正孔}})}{(D_{\text{靶细胞最大释放孔}} - D_{\text{靶细胞自然释放孔}} - D_{\text{体积纠正孔}} + D_{\text{本底纠正孔}})} \times 100\%$$

### 1.7 CD107a 释放法检测扩增后各细胞亚群的杀伤活性

经 IL-2 + IL-15 组合 NK 细胞体外培养方案扩增得到的细胞或分选出的 NK 细胞、NKT 细胞、T 细胞亚群作为效应细胞, 调整其密度至  $4 \times 10^6$  个/ml。根据 HLA 配型结果筛选不同肿瘤细胞系作为靶细胞, 调整其密度至  $1 \times 10^5$  个/ml。按效靶比为 40:1 混合加入 96 孔板中, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 4 h 后收集细胞, 加入 PerCP/cy5.5-CD107a 抗体, 采用流式细胞仪检测其释放值。

### 1.8 活细胞工作站检测总扩增产物与乳腺癌细胞的黏附作用

分别取 1 ml 密度为  $4 \times 10^5$  个/ml 的扩增细胞和密度为  $1 \times 10^4$  个/ml 的肿瘤细胞(根据 HLA 匹配与否筛选的肿瘤细胞系), 一同加入共聚焦培养皿中孵育 2 h, 每隔 12 min 采用活细胞工作站计算每个扩增细胞表面黏附的肿瘤细胞的数目, 取其均值进行统计分析。

### 1.9 统计学处理

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS17.0 统计软件分析,组间比较采用 *t* 检验或方差分析(One-way ANOVA),以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IL-2 + IL-15 组合扩增方案对 NK、NKT、T 细胞亚群的影响

采用组合扩增方案培养 15 d 后,扩增细胞总数、NK 细胞数、NKT 细胞数、T 细胞数均明显增加,分别为扩增前的  $(37.60 \pm 26.31)$ 、 $(89.60 \pm 57.17)$ 、 $(257.01 \pm 149.73)$ 、 $(37.18 \pm 16.8)$  倍。与扩增前相比,扩增 15 d 后的 NK 细胞  $[(36.74 \pm 17.10)\% \text{ vs } (16.34 \pm 3.12)\%, P < 0.05]$ 、NKT 细胞  $[(24.88 \pm 12.34)\% \text{ vs } (4.06 \pm 2.05)\%, P < 0.05]$  的比例显著增加;对 T 细胞亚群而言,CD4<sup>+</sup> T 细胞和 Treg 细胞比例显著降低 ( $P < 0.05$ ),CD8<sup>+</sup> T 细胞比例显著升高 ( $P < 0.05$ ),CD3<sup>+</sup> T、CD45RA<sup>+</sup> T、CD45RO<sup>+</sup> T 细胞的比例无显著差异(图 1、2)。

### 2.2 IL-2 + IL-15 组合扩增方案对于细胞表面受体表达的影响

流式细胞术检测结果显示,与 0 d 相比,体外培养 15 d 后 NK 细胞表面活化受体 NKp30  $[(92.38 \pm 7.19)\% \text{ vs } (32.14 \pm 17.64)\%, P < 0.05]$ 、NKp44  $[(74.26 \pm 16.28)\% \text{ vs } (1.94 \pm 1.60)\%, P < 0.05]$  和 NKG2D  $[(98.58 \pm 1.28)\% \text{ vs } (66.50 \pm 24.84)\%, P < 0.05]$  的表达均显著升高,CD16 表达显著降低  $[(85.12 \pm 7.66)\% \text{ vs } (95.60 \pm 2.53)\%, P < 0.05]$ ; NKT 细胞表面活化受体 DNAM-1 和 NKG2D 的表达明显升高 ( $P < 0.05$ ); T 细胞表面活化受体 DNAM-1 和 NKG2D 的表达显著升高 ( $P < 0.05$ ),余受体表达的差异无统计学意义(图 3、4、5)。

### 2.3 5 例乳腺癌标本的 HLA-A 位点

应用 SSP-PCR 法检测 5 例患者标本的 HLA-A 位点,分别为 HLA-A 11/70、HLA-A 02/30、HLA-A 11/11、HLA-A 30/31 和 HLA-A 02/24。不同靶细胞系的 HLA-A 检测结果见表 1。

### 2.4 IL-2 + IL-15 培养对产物 NK、NKT、T 细胞亚群杀伤活性的影响

根据患者 HLA-A 位点的不同,分别选择 HLA-A 匹配或者不匹配的靶细胞系进行杀伤活性的检测。

2.4.1 LDH 释放法检测杀伤活性 总扩增产物对于 HLA-A 不匹配的靶细胞系杀伤活性显著高于对 HLA-A 匹配靶细胞系的杀伤  $[(57.54 \pm 5.72)\% \text{ vs } (24.62 \pm 3.20)\%, P < 0.05]$ 。NK 细胞  $[(47.02 \pm$

$4.47)\% \text{ vs } (22.78 \pm 6.40)\%, P < 0.05]$ 、NKT 细胞  $[(34.63 \pm 3.36)\% \text{ vs } (21.08 \pm 9.53)\%, P < 0.05]$  对于 HLA 不匹配靶细胞系的杀伤活性明显高于 HLA 匹配的靶细胞系。T 细胞亚群对于 HLA 匹配靶细胞系的杀伤活性显著高于 HLA 不匹配靶细胞系  $[(30.82 \pm 8.15)\% \text{ vs } (11.90 \pm 6.80)\%, P < 0.05]$  (图 6)。

2.4.2 CD107a 释放法检测杀伤活性 为了验证 LDH 释放法检测扩增产物杀伤活性的结果,进一步检测扩增产物在杀伤不同靶细胞系时 CD107a 的表达。总扩增产物在杀伤 HLA 不匹配的靶细胞系时 CD107a 的表达显著高于对 HLA 匹配靶细胞系的杀伤  $(45.11 \pm 8.31)\% \text{ vs } (31.20 \pm 9.20)\%, P < 0.05]$ 。与杀伤 HLA 匹配的靶细胞系时 CD107a 的表达相比,NK 细胞和 NKT 细胞在杀伤 HLA 不匹配的靶细胞系时 CD107a 的表达显著增高 ( $P < 0.05$ ),而 T 细胞亚群杀伤 HLA 不匹配和匹配的靶细胞系的差异无统计学意义(图 6)。

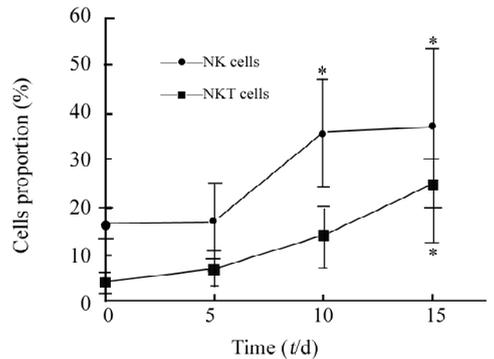


图 1 IL-2 + IL-15 方案体外培养增加 NK、NKT 细胞的比例

Fig. 1 Proportions of NK cells and NKT cells were increased by cultured with IL-2 and IL-15

\*  $P < 0.05$  vs 0 d group

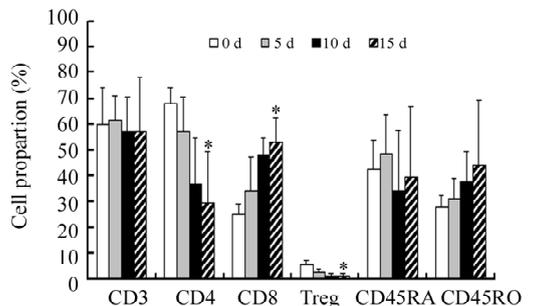


图 2 IL-2 + IL-15 方案体外培养对 T 细胞亚群的影响

Fig. 2 Influence of culture with the scheme of IL-2 + IL-15 on the T cells subsets

\*  $P < 0.05$  vs 0 d group

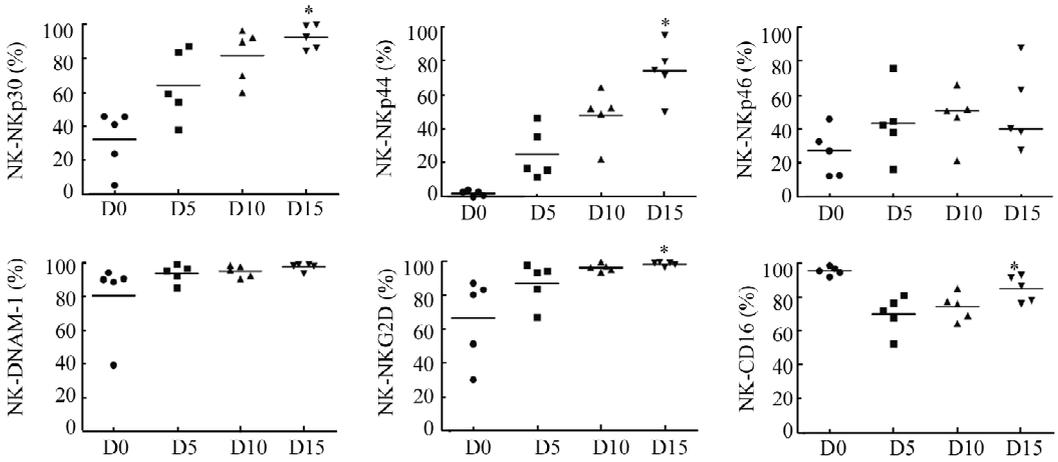


图 3 IL-2 + IL-15 方案体外培养 15 d 后 NK 细胞表面活化受体的比例

Fig. 3 Proportions of activated receptors expressed on NK cells subsets after expansion by IL-2 and IL-15 for 15 d  
\*  $P < 0.05$  vs D 0 group

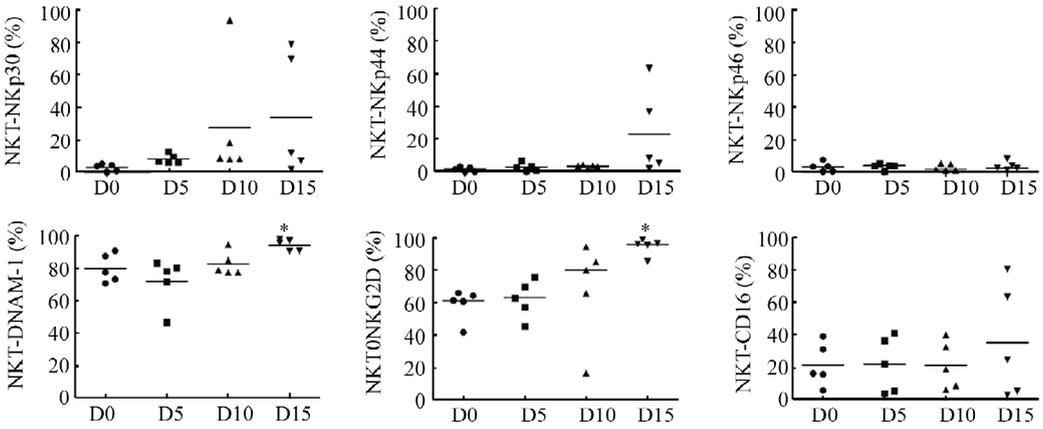


图 4 IL-2 + IL-15 方案体外培养 15 d 后 NKT 细胞表面活化受体的比例

Fig. 4 Proportions of activated receptors expressed on NKT cells subsets after expansion by IL-2 and IL-15 for 15 d  
\*  $P < 0.05$  vs D 0 group

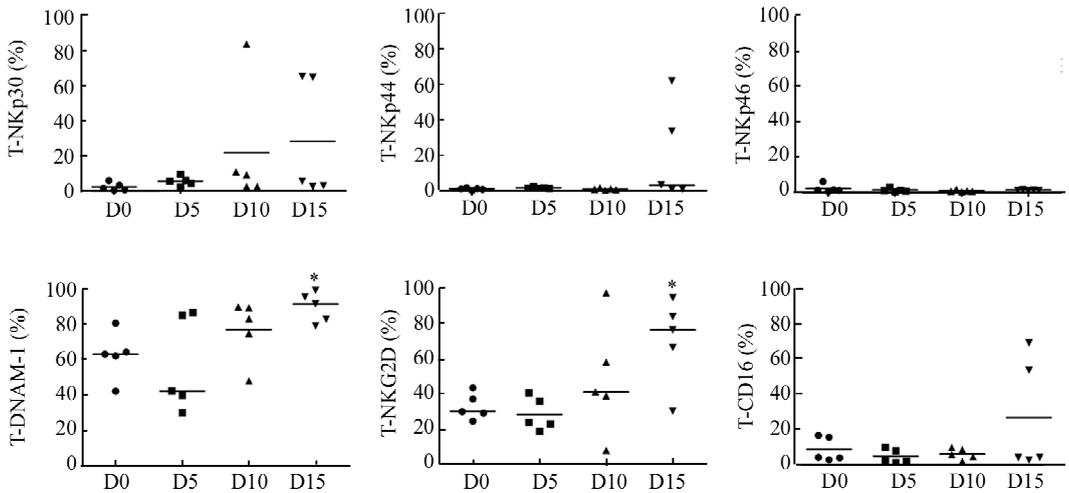
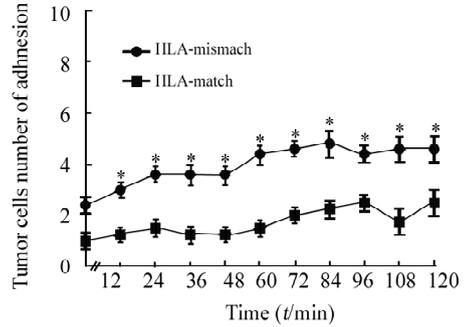


图 5 IL-2 + IL-15 方案体外培养 15 d 后 T 细胞表面活化受体的比例

Fig. 5 Proportions of activated receptors expressed on T cells subsets after expansion by IL-2 and IL-15 for 15 d  
\*  $P < 0.05$  vs D 0 group

**表 1 不同靶细胞系 HLA-A 分析结果**  
**Tab. 1 Results of HLA-A analysis for cancer cell lines**

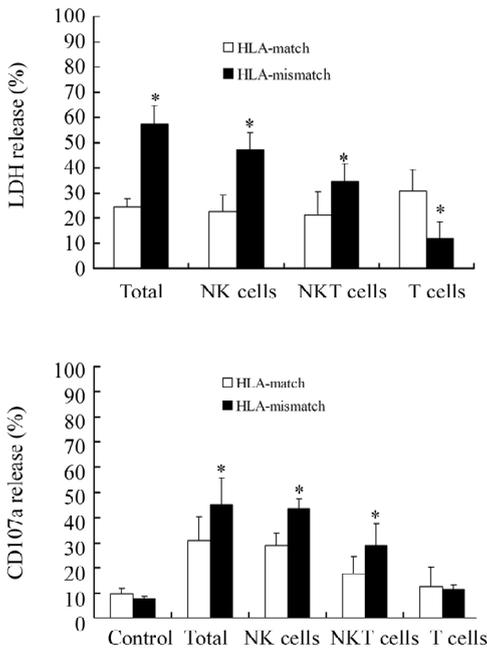
Cancer cell lines	HLA-A
MDA-MB-231	02/01
SKBR-3	11
MDA-435	02/01
MCF-7	24/24
A549	25/30
SKOV3	02/01
ZR-75-1	11/01
T47D	68



**图 7 IL-2 + IL-15 方案体外培养 15 d 后 扩增细胞黏附靶肿瘤细胞的数量**

**Fig. 7 The number of tumor cells adhered to expansion cells after expansion by IL-2 + IL-15 for 15 d**

\*  $P < 0.05$  vs HLA-match group



**图 6 IL-2 + IL-15 培养产物对 3 个细胞亚群杀伤活性的影响**

**Fig. 6 Influence of culture with IL-2 + IL-15 on the cytotoxicity of the three subsets**

\*  $P < 0.05$  vs HLA-match group

**2.5 IL-2 + IL-15 组合扩增方案对细胞间黏附作用的影响**

活细胞工作站检测扩增产物细胞表面黏附的肿瘤细胞数目,显微镜下随机挑选 5 个视野,计数扩增细胞与肿瘤细胞黏附数目,取其均值。进行实验的 2 h 内,总扩增产物细胞与 HLA 不匹配的靶细胞系之间的黏附细胞数目始终显著高于 HLA 匹配的靶细胞系的数目。在培养 84 min 时,与 HLA 匹配的靶细胞系相比,总扩增产物细胞结合 HLA 不匹配靶细胞系数目显著增多 [ ( 4.80 ± 0.53 ) vs ( 2.25 ± 0.35 ) 个,  $P < 0.05$  ] ( 图 7 )。

**3 讨论**

近年来,基于 NK 细胞的肿瘤过继性细胞免疫治疗取得了较大的进展<sup>[8-9]</sup>,NK 细胞的体外大规模扩增成为研究热点<sup>[10-11]</sup>。研究<sup>[12-13]</sup>发现,IL-2 和 IL-15 在 NK 细胞的培养过程中,不仅可以促进 NK 细胞的增殖分化,同时也可以促进 NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等细胞因子和趋化因子,产生协同促进的作用,增强其抗癌活性。本研究发现,IL-2 + IL-15 组合的 NK 细胞体外扩增方案在扩增过程中可以显著提高 NK、NKT 细胞的比例,同时降低 T 细胞亚群中的 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 Treg 细胞比例,以及升高 CD8<sup>+</sup> T 细胞比例(  $P < 0.05$  )。

NK 细胞的生物学活性受到细胞表面受体的调节,在杀伤肿瘤的过程中,可以通过提高细胞表面活化受体 ( NKp30、NKp44、NKp46<sup>[14]</sup>、NKG2D 和 DNAM-1<sup>[15]</sup> ) 的表达来阻断抑制受体 ( KIR、LIR、NKG2A/CD94<sup>[21-22]</sup> ) ,从而影响 NK 细胞的杀伤活性。为了进一步探究 IL-2 和 IL-15 增强 NK 细胞抗癌活性的机制,本研究利用流式细胞术检测了不同细胞亚群表面受体在培养过程中的变化。在整个 IL-2 + IL-15 培养过程中,NK 细胞表面活化受体 NKp30、NKp44、NKG2D、NKT 细胞和 T 细胞表面活化受体 DNAM-1、NKG2D 均显著升高 ( 均  $P < 0.05$  ) 。NKp30、NKp44 和 NKp46 对启动 NK 细胞的杀伤活性具有协同作用。其中,NKp30 和 NKp46 表达于所有成熟 NK 细胞表面,是启动 NK 细胞杀伤功能的关键性受体。NKp44 只表达在激活的 NK 细胞表面,通过 KAPAP/DAPI2 中的 ITAM 传递活化信号<sup>[16]</sup>。NKG2D 主要表达在所有的 NK 细胞表

面、大多数 CIK 细胞表面、 $\gamma\delta$  T 细胞, 人类  $CD8^+$  T 细胞, 活化的鼠  $CD8^+$  T 细胞以及  $CD4^+$  T 细胞表面<sup>[17]</sup>。当 NKG2D 与相应配体结合后, 传递活化信号, 与 DAPI0 和 DAPI2 形成激活免疫受体复合物, 可增强抗肿瘤活性<sup>[18]</sup>。在人体内, DNAM-1 可正常表达于 T 细胞、NK 细胞、单核细胞和部分 B 淋巴细胞<sup>[19]</sup>, 当与特异性配体 Nectin-5 或 Nectin-2 结合后, 因其自身的酪氨酸磷酸化而增强 NK 细胞介导的杀瘤活性<sup>[20]</sup>。故在体外培养过程中, IL-2 和 IL-15 不仅增加了 NK 细胞的比例和数量, 同时通过上调 NK 和 NKT 细胞表面多种活化受体来进一步增加扩增产物的活性, 从而增强其对肿瘤的杀伤作用。

本研究对扩增产物杀伤肿瘤的机制进行了初步探讨, 分别采用 LDH 释放法和 CD107a 释放法对扩增产物的杀伤活性进行检测。LDH 释放法检测到扩增产物在杀伤靶肿瘤细胞系的过程中, 扩增产物对于 HLA 不匹配的靶细胞系的杀伤活性显著高于 HLA 匹配的靶肿瘤细胞系, 其杀伤机制主要以不受 HLA 限制的 NK 细胞的杀伤活性为主。其 CD107a 释放实验和活细胞工作站对黏附作用的检测也得到了相似的结论, 扩增产物的杀瘤活性主要是源于 NK 细胞非特异性的杀伤活性为主。

综上所述, IL-2 + IL15 组合 NK 细胞体外扩增方案能够有效扩增 NK 细胞和 NKT 细胞, 显著提高其表面活化受体的表达, 从而增强其对肿瘤细胞的杀伤活性。实验证实, 总扩增产物主要是以不受 HLA 限制的 NK 细胞杀伤活性为主来发挥其杀伤肿瘤细胞的作用。本研究对 NK 细胞体外扩增的培养方案的培养效率, 以及对各个细胞亚群的影响和作用机制进行了初步探讨, 为其在临床的应用提供了实验基础。

## 【参考文献】

- Ma Y, Zhang Z, Tang L, et al. Cytokine-induced killer cells in the treatment of patients with solid carcinomas: A systematic review and pooled analysis [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(4): 483-493.
- Zamai L, Ponti C, Mirandola P, et al. NK cells and cancer [J]. *J Immunol*, 2007, 178(7): 4011-4016.
- Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 287-320.
- Jakobisiak M, Golab J, Lasek W. Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(2): 99-108.
- Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: Immunotherapy for cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13(2): 169-183.
- 王晓梦, 李玲, 于津浦, 等. 四种 NK 细胞体外扩增方案的比较 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2013, 20(3): 336-341.
- Klingemann HG, Martinson J. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications [J]. *Cytotherapy*, 2004, 6(1): 15-22.
- Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive cell transfer therapy [J]. *Semin Oncol*, 2007, 34(6): 524-531.
- 任秀宝, 于津浦. 肿瘤免疫治疗疗效评价的新标准 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(4): 351-354.
- Salagianni M, Baxevasis CN, Papamichail M, et al. New insights into the role of NK cells in cancer immunotherapy [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(2): 205-207.
- Geller MA, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(12): 1445-1459.
- Roberti MP, Barrio MM, Bravo AI, et al. IL-15 and IL-2 increase Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity against triple negative breast cancer cell lines expressing EGFR [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 130(2): 465-475.
- Vacca P, Martini S, Garelli V, et al. NK cells from malignant pleural effusions are not anergic but produce cytokines and display strong antitumor activity on short-term IL-2 activation [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(2): 550-561.
- Brusilovsky M, Rosental B, Shemesh A, et al. Human NK cell recognition of target cells in the prism of natural cytotoxicity receptors and their ligands [J]. *J Immunotoxicol*, 2012, 9(3): 267-274.
- Biassoni R, Cantoni C, Falco M, et al. Human natural killer cell activating receptors [J]. *Mol Immunol*, 2000, 37(17): 1015-1024.
- Bottino C, Biassoni R, Millo R, et al. The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering [J]. *Hum Immunol*, 2000, 61(1): 1-6.
- Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(10): 781-790.
- Zompi S, Hamerman JA, Ogasawara K, et al. NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAPI2 or Syk family kinases [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(6): 565-572.
- Shibuya A, Campbell D, Hannum C, et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes [J]. *Immunity*, 1996, 4(6): 573-581.
- Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Onoda Y, et al. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112) [J]. *Int Immunol*, 2004, 16(4): 533-538.
- Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: Lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations [J]. *Immunology*, 2011, 132(3): 315-325.
- Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: Regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR) [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(23): 2211-2220.

【收稿日期】 2013-06-26

【修回日期】 2013-10-25

【本文编辑】 黄静怡