

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.006

· 基础研究 ·

转基因细胞株 BaF3-mb15-RAE 对 IKDC 功能分子表达的影响

钱莉¹, 陆家辉¹, 秦宏超¹, 芮程磊¹, 陈文艳¹, 贾筱琴¹, 傅奕¹, 龚卫娟¹, 田芳¹, 胡茂志², 季明春¹(1. 扬州大学医学院病原生物学与免疫学教研室, 江苏扬州 225001; 2. 扬州大学测试中心, 江苏扬州 225001)

[摘要] **目的:**探讨单独或共同表达视黄酸早期转录因子 1 ϵ (retinoic acid early transcript 1 ϵ , RAE1 ϵ)和膜型 IL-15 的 B 淋巴细胞 BaF3 对小鼠产生 IFN 的杀伤性 DC (IFN producing killer DC, IKDC) 功能分子表达的影响。**方法:**以小鼠原 B 淋巴细胞株 BaF3 为基础, 分别构建表达膜型 IL-15 的 BaF3-mb15 细胞和表达 RAE1 ϵ 的 BaF3-RAE 细胞及同时表达膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 的 BaF3-mb15-RAE 细胞。通过体外细胞因子诱导产生骨髓来源的小鼠成熟 DC, 将丝裂霉素灭活后的 3 株 BaF3 工程细胞株作为刺激细胞, 分别与 DC 共培养, 流式细胞术检测其对 DC 中 CD11c^{low} B220⁺ NK1.1⁺ IKDC 比例和 DC 表面 CD40、CD80 表达的影响。流式细胞术分选 DC 中的 IKDC, 将丝裂霉素灭活后的 3 株 BaF3 工程细胞株与其共培养 24 h, 流式细胞术检测共培养对 IKDC 表面 CD40、CD80、CD86、NKG2D、MHC II 类分子、CD107a 和 FasL 表达的影响。**结果:**成功获得骨髓来源的小鼠成熟 DC。与 BaF3-mb15 细胞和 BaF3-RAE 细胞相比, BaF3-mb15-RAE 细胞刺激显著提高 DC 中 IKDC 比例[(50.0 ± 5.6)% vs (30.3 ± 8.2)%、(36.0 ± 4.6)%], 并且有效刺激 IKDC 表面 CD40(180.1 ± 28.2 vs 44.7 ± 7.8, 36.0 ± 3.1, $P < 0.01$)和 FasL($P < 0.05$)表达上调; 与 BaF3 细胞和 BaF3-mb15 细胞相比, BaF3-mb15-RAE 细胞有效刺激 IKDC 表面 CD80($P < 0.05$)表达上调, 而 3 株 BaF3 工程细胞刺激均不影响 DC 表面 CD40、CD80 的表达($P > 0.05$); 同时, 3 株 BaF3 工程细胞对 IKDC 表面 CD86、MHC II 类分子、NKG2D 和 CD107a 的表达也没有显著影响($P > 0.05$)。**结论:**RAE-1 ϵ 和膜型 IL-15 协同作用可促进 IKDC 增殖并诱导其高表达 CD40 和 FasL。

[关键词] IL-15; 视黄酸早期转录因子 1 ϵ ; 产生 IFN 的杀伤性 DC; FasL; 肿瘤免疫

[中图分类号] R392.11; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)04-0389-07

Effects of genetically modified pro-B lymphocytes on the expression of functional molecules in interferon-producing killer dendritic cells

Qian Li¹, Lu Jiahui¹, Qin Hongchao¹, Rui Chenglei¹, Chen Wenyan¹, Jia Xiaojin¹, Fu Yi¹, Gong Weijuan¹, Tian Fang¹, Hu Maozhi², Ji Mingchun¹(1. Department of Etiology and Immunology, Medical School of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China; 2. Testing Center of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of murine bone marrow-derived pro-B (BaF3) cells overexpressing membrane-bound form of IL-15 (mbIL-15) and retinoic acid early transcript 1 ϵ (RAE1 ϵ), either each alone or two in combination, on the expression of functional molecules in murine interferon producing killer dendritic cells (IKDCs) *in vitro*. **Methods:** Clones of BaF3 cells overexpressing mbIL-15, RAE1 ϵ or both mbIL-15 and RAE1 ϵ were established and inactivated by mitomycin. Mouse bone marrow mononuclear cells were isolated and induced into mature DCs by GM-CSF and IL-4. Mature DCs were co-cultured with the three mitomycin inactivated-BaF3 derivatives respectively. At 24 and 72 hours after co-culture, the percentage of CD11c^{low} B220⁺ NK1.1⁺ IKDCs and levels of CD40 and CD80 in DCs and levels of CD40, CD80, CD86, NKG2D, MHC class II molecule, CD107a and FasL in IKDCs were determined by flow cytometry.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81001308, No. 81373130, No. 81273214); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2010315); 江苏省大学生创新创业训练计划项目; 扬州大学“新世纪人才工程”资助。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81001308, No. 81373130, No. 81273214), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2010315), the Science and Technology Innovation Foundation for Undergraduates of the Educational Committee of Jiangsu Province, and the New Century Talents Project of Yangzhou University

[作者简介] 钱莉(1979-), 女, 江苏省扬州市人, 博士, 副教授, 主要从事肿瘤免疫及免疫调节相关研究

[通信作者] 钱莉(Qian Li, corresponding author), E-mail: liqianxh@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.006.html>

Results: BaF3 cells overexpressing both mbIL-15 and RAE were more effective than BaF3 cells overexpressing mbIL-15 or RAE alone to stimulate the DC to IKDC conversion ($[50.0 \pm 5.6]\%$ vs $[30.3 \pm 8.2]\%$, $[36.0 \pm 4.6]\%$, $P < 0.05$). IKDCs co-cultured with BaF3 cells overexpressing mbIL-15 and RAE had higher levels of CD40 (180.1 ± 28.2 vs 44.7 ± 7.8 , 36.0 ± 3.1 , $P < 0.01$) and FasL ($P < 0.05$) as compared to IKDCs co-cultured with mbIL-15- or RAE-overexpressing BaF3 cells. IKDCs co-cultured with BaF3 cells overexpressing mbIL-15 and RAE had higher levels of CD80 ($P < 0.05$) as compared to IKDCs co-cultured with BaF3 cells or mbIL-15-overexpressing BaF3 cells. In contrast, co-culture with BaF3 derivatives showed no effects either on CD40 and CD80 expression in DCs ($P > 0.05$) or on CD86, MHC class II molecule, NKG2D and CD107a expression in IKDCs. **Conclusion:** IL-15 combined with RAE1 ϵ may promote the proliferation and CD40 and FasL expression in IKDCs.

[**Key words**] IL-15; retinoic acid early transcript 1 ϵ ; IFN producing killer DC; FasL; tumor immunology

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(4): 389-395]

产生 IFN 的杀伤性 DC (IFN-producing killer DC, IKDC) 是最近发现的一类能够分泌 IFN- γ 并具有杀伤功能的新型 DC 亚群, 小鼠的 IKDC 具有 CD3⁻CD19⁻CD11c^{low}B220⁺NK1.1⁺CD49b⁺Gr1⁻ 表型^[1-2]。IKDC 作为连接抗肿瘤固有免疫应答和适应性免疫应答的“桥梁”和免疫监视的重要效应细胞, 在肿瘤的免疫治疗中有良好的应用前景。但其在体内数量较少, 因此高效扩增 IKDC 并增强其杀伤活性和抗原提呈功能是 IKDC 抗肿瘤免疫治疗的关键因素。研究^[3]表明, IL-15 在 IKDC 的维持和生长中起着关键的作用, 且膜型 IL-15 比可溶性 IL-15 具有更强的生物学活性^[4-6]。IKDC 表面表达 NK2 族成员 D (natural killer group 2D, NKG2D), 并以 NKG2D 依赖的方式杀伤多种肿瘤细胞株^[7]。小鼠 NKG2D 的配体之一为视黄酸早期转录因子 (retinoic acid early transcript 1 ϵ , RAE1 ϵ)^[8]。本课题前期研究^[9-11]中, 将膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 同时表达于小鼠原 B 淋巴细胞株 BaF3 细胞上 (简称为 BaF3-mb15-RAE 细胞), 发现经放射线照射灭活后的 BaF3-mb15-RAE 细胞可以诱导 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞的增殖和活化。本研究进一步探讨 BaF3-mb15-RAE 细胞对 IKDC 的增殖以及与抗原提呈功能和杀伤功能相关表面分子表达的影响, 为研究 BaF3-mb15-RAE 细胞的体内抗肿瘤效应提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞培养

RBMI 1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司, 荧光标记的抗小鼠 NK1.1 和 CD107a 抗体购自 Biolegend 公司, 生物素化的抗小鼠 FasL 抗体以及荧光标记的抗小鼠 NKG2D、B220、CD11c、CD40、CD80、CD86、Ia^b 抗体和链霉亲和素购自 eBioscience 公司, 重组小鼠白细胞介素 3 (rmIL-3) 和 rmGM-CSF 购自 R&D 公司, rmIL-4

购自 Perpro Tech 公司, LPS 购自 Sigma 公司。

小鼠原 B 淋巴细胞株 BaF3 细胞由本实验室保存。BaF3 细胞的培养基为 RBMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、1 ng/ml rmIL-3), 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

1.2 小鼠成熟 DC 的体外诱导培养

无菌取 C57BL/6 小鼠股骨和胫骨, 用注射器反复冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞悬液, 用 Tris-NH₄Cl 溶液裂解红细胞, PBS 洗涤 1 次, 用含 10% FBS、10 ng/ml rmGM-CSF、1 ng/ml rmIL-4 的 RPMI1640 培养基培养 4 d, 弃去悬浮细胞, 仅保留疏松贴壁细胞, 加入含相同浓度 rmGM-CSF、rmIL-4 和 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 培养 5~6 d, 加 10 ng/mL LPS, 继续培养 1~2 d, 用吸管轻轻吹打后收集所有悬浮细胞, 无菌条件下用抗 CD11c 的磁珠进行分选, 即得到成熟 DC。

1.3 BaF3 工程细胞株与 DC 共培养

本课题组前期研究中^[8]在小鼠原 B 淋巴细胞株 BaF3 细胞上分别或者同时表达膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ , 构建了 3 株特定的 BaF3 工程细胞株。简言之, 通过基因工程的方法将膜型 IL-15 基因与小鼠 RAE1 ϵ 基因分别或同时克隆至真核表达载体 pVITRO2-mcs, 构建 3 种重组载体。分别稳定转染 BaF3 细胞, 获得高表达膜型 IL-15 的细胞 (BaF3-mb15 细胞)、高表达 RAE1 ϵ 的细胞 (BaF3-RAE 细胞) 和同时表达膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 的细胞 (BaF3-mb15-RAE 细胞), 用前均用丝裂霉素灭活。

实验分为单纯 DC 组、BaF3 细胞 + DC 组、BaF3-mb15 细胞 + DC 组、BaF3-RAE 细胞 + DC 组和 BaF3-mb15-RAE 细胞 + DC 组。将成熟 DC 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬, 按照 1×10^5 /孔的数量铺入 96 孔板中, DC 和 3 种 BaF3 工程细胞株的比例为 1:1, 每孔液体量为 200 μ l。置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

1.4 流式细胞术检测 BaF3 工程细胞株刺激对 DC 中 IKDC 比例的影响

DC 和 3 种 BaF3 工程细胞株共培养 3 d 后,收集细胞,用预冷的 PBS 洗 1 次,加入荧光素标记的小鼠抗体(APC-CD11c、PE/Cy7-NK1.1、PE-B220)至终质量浓度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 标记 20 min,加入 PBS 洗 2 次,重悬于 200 μl PBS 中,进行流式检测并分析。分析时以低表达 CD11c 的细胞设门,分析 B220⁺ NK1.1⁺ 的 IKDC 占 CD11c^{low} DC 的比例。

1.5 BaF3 工程细胞株与 IKDC 共培养

收集成熟 DC,用不同荧光素标记的抗 CD11c、抗 B220 和抗 NK1.1 抗体染色,流式分选 CD11c^{low} B220⁺ NK1.1⁺ 的 IKDC。将分选的 IKDC 重悬,按 1 $\times 10^5$ /孔的数量铺入 96 孔板中,IKDC 和 BaF3 工程细胞株的比例为 1:1,每孔液体量为 200 μl 。实验分为 IKDC 组、BaF3 细胞 + IKDC 组、BaF3-mb15 细胞 + IKDC 组、BaF3-RAE 细胞 + IKDC 组和 BaF3-mb15-RAE 细胞 + IKDC 组。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养。

1.6 流式细胞术检测 BaF3 工程细胞株对 IKDC 表面功能分子表达的影响

IKDC 和 3 种 BaF3 工程细胞株共培养 24 h 后收集细胞,用预冷的 PBS 洗 1 次后重悬于 100 μl PBS 中,加入荧光素标记的小鼠抗体(CD11c、B220、NK1.1、CD40、CD80、CD86、NKG2D 和 MHC II 类分子抗体)至终质量浓度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 标记 20 min,PBS 洗 2 次,重悬于 200 μl PBS 中,流式细胞仪检测 IKDC 表面 CD40、CD80、CD86、NKG2D 和 MHC II 类分子的表达。

1.7 流式细胞术检测 BaF3 工程细胞株对 DC 表面 CD40 和 CD80 表达的影响

DC 和 3 种 BaF3 工程细胞株共培养 24 h 后收集细胞,用预冷的 PBS 洗 1 次后重悬于 100 μl PBS 中,加入荧光素标记的小鼠抗体(CD11c、CD40、

CD80 抗体)至终质量浓度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 标记 20 min,PBS 洗 2 次,重悬于 200 μl PBS 中,流式细胞术检测 DC 表面 CD40 和 CD80 的表达。

1.8 流式细胞术检测 BaF3 工程细胞株对 IKDC 分泌 CD107a 的影响

IKDC 和 3 种 BaF3 工程细胞株共培养 24 h 后收集细胞,用预冷的 PBS 洗 1 次后重悬于 100 μl PBS 中,加入荧光素标记的小鼠抗体(CD11c、B220、NK1.1、CD107a 抗体)至终质量浓度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 标记 20 min,PBS 洗 2 次,重悬于 200 μl PBS 中,流式细胞术检测 IKDC CD107a 的表达。

1.9 流式细胞术检测 BaF3 工程细胞株对 IKDC 表达 FasL 的影响

IKDC 表面 FasL 的检测采用间接标记法。收集 IKDC 和 3 种 BaF3 工程细胞株共培养 24 h 后的细胞,先加入生物素化的抗小鼠 FasL 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,PBS 洗涤 1 次,加入不同荧光标记的链霉亲和素、CD11c、B220 和 NK1.1 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 标记 20 min,加入 1 ml PBS 洗 2 次,重悬于 200 μl PBS 中,上流式细胞仪检测并分析。

1.10 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPASS 10.0 统计软件,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功获得小鼠骨髓来源的成熟 DC

用抗 CD11c 的磁珠分选经小鼠骨髓诱导扩增而来的 DC,流式细胞术检测 CD11c、CD86 和 MHC II 类分子的表达,结果(图 1)显示,DC 的特异性标志 CD11c (97%)、与抗原提呈功能相关的 MHC II 类分子(91%)及共刺激分子 CD86(88%)在细胞的表面高表达,说明获得小鼠骨髓来源的成熟 DC。

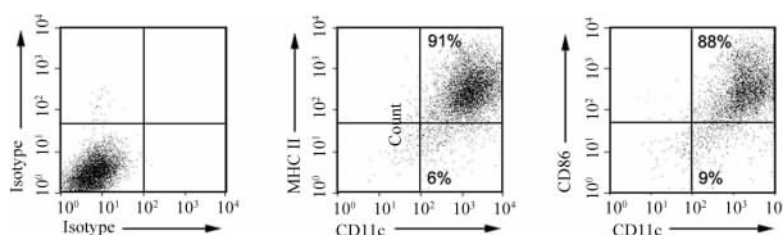


图 1 成功获得小鼠骨髓来源的成熟 DC

Fig. 1 Bone marrow-derived DCs are obtained successfully

2.2 BaF3-mb15-RAE 细胞促进 IKDC 的增殖

3 株 BaF3 工程细胞株分别与小鼠 DC 共培养 3

d,流式细胞术检测 B220⁺ NK1.1⁺ 的 IKDC 占 CD11c^{low} DC 的比例,结果(图 2)显示,与 BaF3、BaF3-

mb15 和 BaF3-RAE 细胞相比, BaF3-mb15-RAE 细胞促进 IKDC 增殖的作用最为明显[(50.0 ± 5.6)% vs (24.3 ± 5.0)% 、(30.3 ± 8.2)% 、(36.0 ± 4.6)% , 均 $P < 0.05$]。

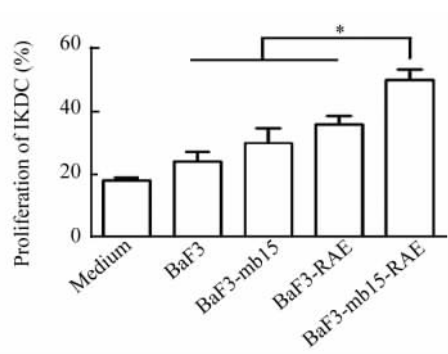


图 2 BaF3-mb15-RAE 细胞促进 IKDC 的增殖

Fig. 2 BaF3-mb15-RAE cells induce the proliferation of IKDC

2.3 BaF3-mb15-RAE 细胞对 IKDC 表面功能分子表达的影响

3 株 BaF3 工程细胞株分别与 IKDC 共培养, 24 h 后流式细胞术检测 IKDC 表面功能分子的表达情况。检测结果(图 3)显示, 3 种 BaF3 工程细胞株对 IKDC 表达 CD86、MHC II 类分子和 NKG2D 均没有明显影响(均 $P > 0.05$)。与 BaF3 组和 BaF3-mb15 组相比, BaF3-mb15-RAE 组与 BaF3-RAE 组 IKDC 表面 CD80 分子的表达显著升高(168.9 ± 15.6、131.7 ± 9.3 vs 97.5 ± 12.3、92.6 ± 10.9, $P < 0.05$), 但后两组间没有显著差异($P > 0.05$)。与 BaF3-mb15 细胞和 BaF3-RAE 细胞相比, BaF3-mb15-RAE 细胞能显著上调 IKDC 表面 CD40 的表达(180.1 ± 28.2 vs 44.7 ± 7.8、36.0 ± 3.1, $P < 0.01$)。由此说明, BaF3-mb15-RAE 细胞可以诱导 IKDC 表面 CD40 和 CD80 表达上调。

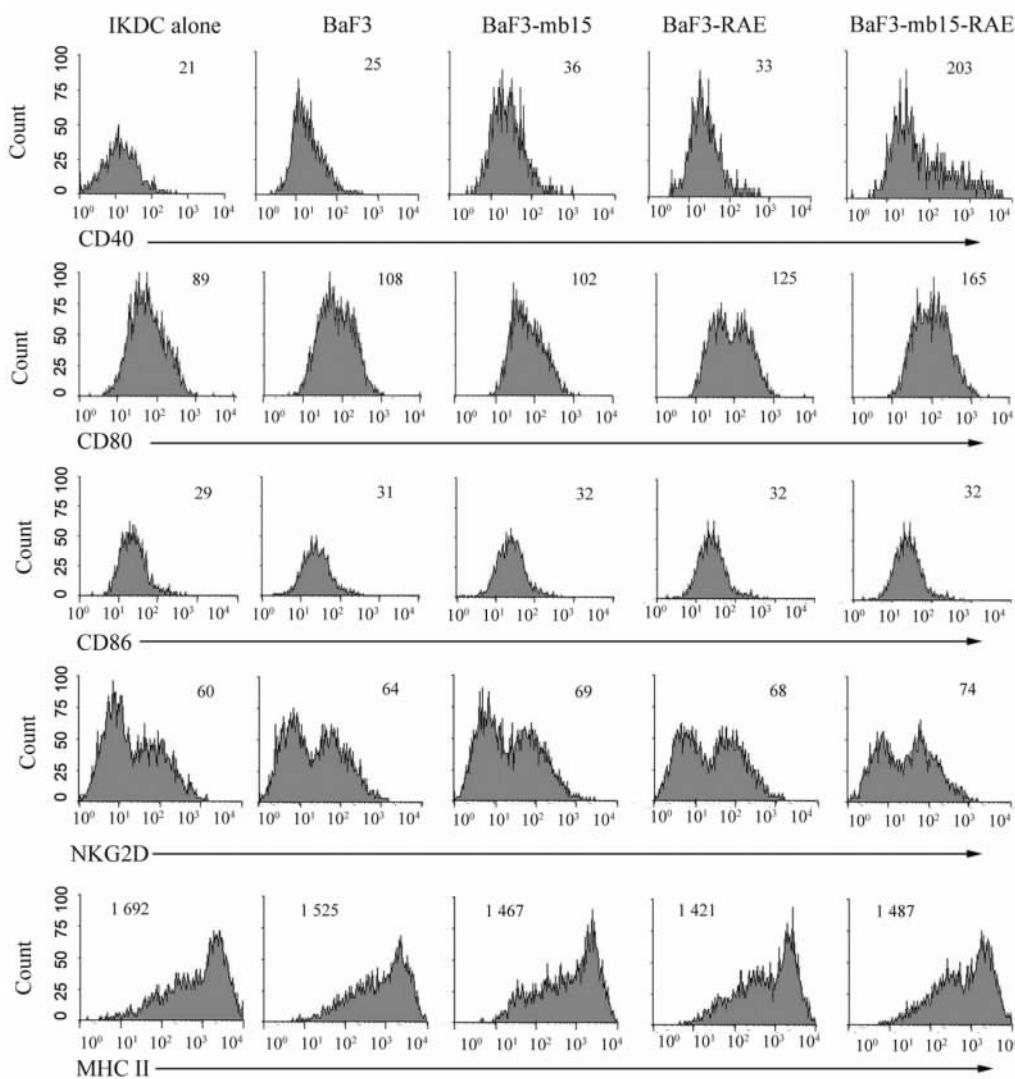


图 3 BaF3-mb15-RAE 细胞对 IKDC 表面分子表达的影响

Fig. 3 Effects of BaF3-mb15-RAE cells on the expression of IKDC surface molecules

2.4 BaF3-mb15-RAE 细胞对 DC 表面 CD40 和 CD80 表达的影响

3 株 BaF3 工程细胞株分别与小鼠 DC 共培养 24 h 后,流式细胞术检测 DC 表面 CD40 和 CD80 的表达情况,检测结果(图 4)显示,BaF3-mb15-RAE 细胞对 DC 表面 CD40 和 CD80 的表达没有明显影响。由此可见,BaF3-mb15-RAE 细胞并非诱导常规 DC,而是特异地诱导 IKDC 表达 CD40 和 CD80 分子。

2.5 BaF3-mb15-RAE 细胞不影响 IKDC 分泌 CD107a

3 株 BaF3 工程细胞株分别与 IKDC 共培养 24

h,流式细胞术检测 IKDC 表面 CD107a 的表达,结果(图 5)显示,与 BaF3 细胞相比,BaF3-mb15 细胞、BaF3-RAE 细胞和 BaF3-mb15-RAE 细胞对 IKDC 释放 CD107a 均没有明显影响。

2.6 BaF3-mb15-RAE 细胞上调 IKDC FasL 的表达

3 株 BaF3 工程细胞株分别与 IKDC 共培养 24 h,流式细胞术检测 IKDC 表面 FasL 的表达情况,结果(图 6)显示,与 BaF3-mb15 细胞和 BaF3-RAE 细胞相比,BaF3-mb15-RAE 细胞刺激 IKDC 表达 FasL 的能力最强(371.3 ± 20.2 vs 269.0 ± 39.4、306.0 ± 19.3, $P < 0.05$)。

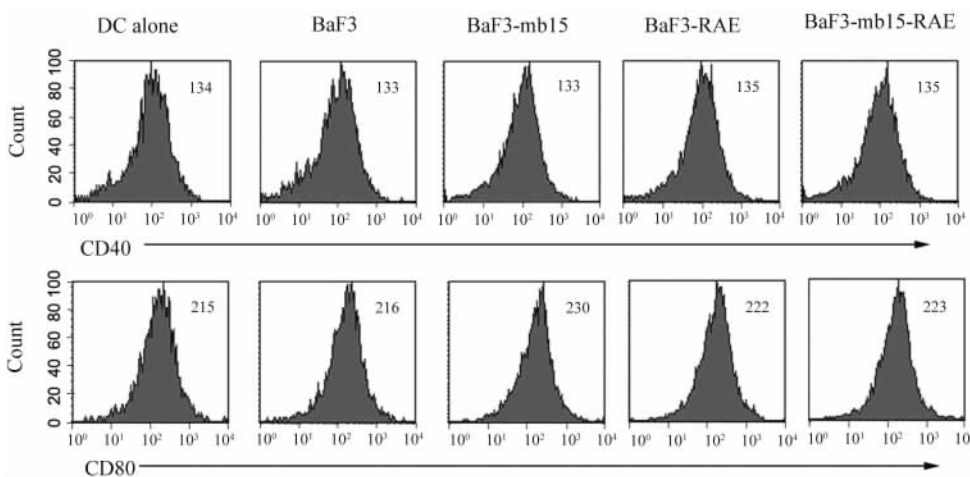


图 4 BaF3-mb15-RAE 细胞对 DC 表面 CD40 和 CD80 的表达没有显著影响

Fig. 4 BaF3-mb15-RAE cells have no significant effect on the expression of CD40 and CD80 on DC

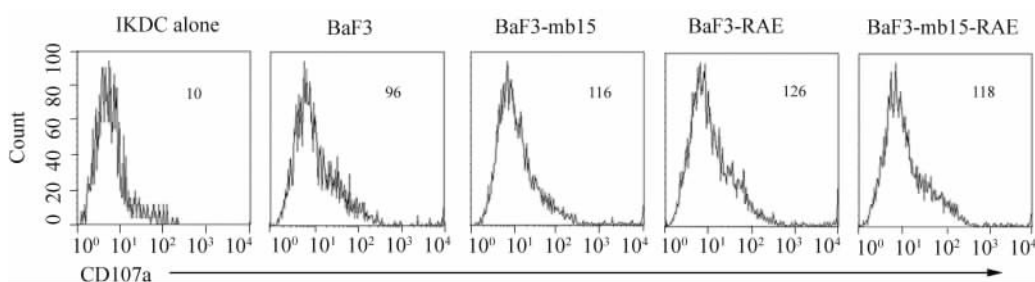


图 5 BaF3-mb15-RAE 细胞不影响 IKDC CD107a 的表达

Fig. 5 BaF3-mb15-RAE cells have no effect on the expression of CD107a on IKDC

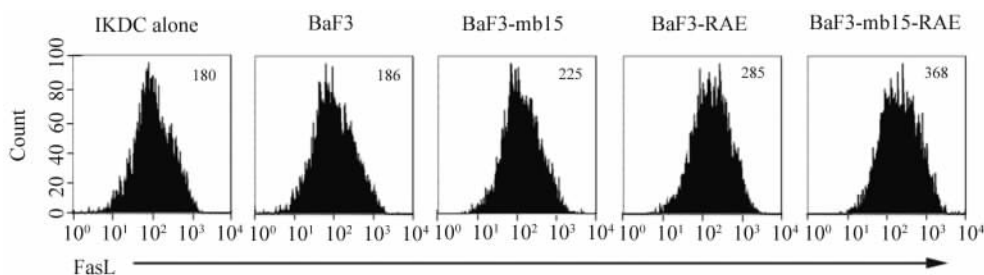


图 6 BaF3-mb15-RAE 细胞提高 IKDC FasL 的表达

Fig. 6 BaF3-mb15-RAE cells increase the expression of FasL on IKDC

3 讨论

DC 能将抗原信息提呈给 T 细胞并通过分泌促炎症因子刺激天然免疫应答^[12-14]。IKDC 兼具 NK 细胞和 DC 的功能^[15]; 与 NK 细胞类似, 可以直接杀伤靶细胞^[16-18]; 在 CpG 的刺激下, IKDC 杀伤功能减弱, 但 MHC II 类分子和共刺激分子的表达增强, 从而获得了与 DC 类似的抗原提呈功能^[19]。IKDC 作为连接抗肿瘤的固有免疫应答和适应性免疫应答的“桥梁”, 在肿瘤的免疫治疗中具有良好的应用前景^[20]。但是, IKDC 在小鼠体内的含量极少, 只占脾脏 CD11c⁺ 细胞的 1%~2% (约 5 000 个) 和骨髓 CD11c⁺ 细胞的 2%^[21], 因此, 如何体外高效扩增 IKDC, 成为基于 IKDC 过继免疫治疗的关键因素。

研究^[3]表明, 用重组细胞因子 IL-15 注射小鼠, 可诱导脾脏中 IKDC 的增殖; 体外用 MS-5 细胞反式提呈重组 IL-15 会促进脾脏或骨髓衍生的 IKDC 出现 10~30 倍的数量增长, 提示 IL-15 在 IKDC 的维持和生长中起着关键的作用。此外, IKDC 表达活化型受体 NKG2D, 并以 NKG2D 依赖的方式杀伤多种肿瘤细胞株^[7]。本课题组前期研究^[10-11]成功构建了共表达小鼠膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 的 BaF3 细胞 (BaF3-mb15-RAE 细胞), 并发现 BaF3-mb15-RAE 细胞在体外可以诱导 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞的增殖和活化。鉴于 IL-15 和 NKG2D 信号通路在促进 IKDC 增殖及杀伤功能方面的重要作用, 本研究将 BaF3-mb15-RAE 细胞作为实验工具用于体外扩增并活化 IKDC。

本研究发现, BaF3-mb15-RAE 细胞刺激后, 骨髓来源的 IKDC 比例明显增高, 提示膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 可以发挥协同作用, 促进 IKDC 的增殖。并且, BaF3-mb15-RAE 细胞能上调 IKDC 表面 CD40 和 CD80 的表达, 并不上调常规 DC 表面 CD40 和 CD80 的表达, 说明 BaF3-mb15-RAE 细胞并非诱导常规 DC, 而是诱导特定的 DC 亚群 IKDC 表达 CD40 和 CD80。CD40 和 CD80 表达上调能否增强 IKDC 提呈肿瘤抗原肽的功能则有待于进一步的研究。

CD107a 即溶酶体相关膜蛋白 1 (lysosome associated membrane protein 1, LAMP-1), NK 细胞通过脱颗粒杀伤靶细胞时, CD107a 可被转运至细胞膜表面。因此, CD107a 的表达可以间接反映 NK 细胞的杀伤活性。IKDC 作为可能的 NK 细胞亚群, 实验中检测了 IKDC 分泌 CD107a 的情况, 结果发现 BaF3-mb15-RAE 细胞对 IKDC 释放 CD107a 没有明显影

响。已知 IKDC 能以 TRAIL 依赖的方式杀伤肿瘤细胞, 本研究发现 BaF3-mb15-RAE 细胞对 IKDC 表达 TRAIL 并没有明显影响 (本文中未显示数据)。FasL 和 TRAIL 同属于 TNF 超家族成员, 均可以诱导靶细胞的凋亡。进一步检测 IKDC 表面 FasL 的表达情况发现, 与 BaF3-mb15 和 BaF3-RAE 细胞相比, BaF3-mb15-RAE 细胞可明显刺激 IKDC 表达 FasL, 提示膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 可以发挥协同作用上调 IKDC 表面 FasL 的表达水平。下一步本课题组将研究 IKDC 能否通过 Fas/FasL 途径增强对肿瘤细胞的杀伤作用。

总之, 本研究证实表达膜型 IL-15 和 RAE1 ϵ 的 BaF3-mb15-RAE 细胞在体外能够诱导 IKDC 增殖并上调 CD40 和 FasL 的表达, 这一结果为进一步研究 BaF3-mb15-RAE 细胞对 IKDC 提呈肿瘤抗原及杀伤功能的影响提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Taieb J, Chaput N, Menard C, et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance [J]. *Nat Med*, 2006, 12 (2): 214-219.
- [2] Chan CW, Crafton E, Fan HN, et al. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity [J]. *Nat Med*, 2006, 12 (2): 207-213.
- [3] Mignot G, Ulrich E, Bonmort M, et al. The critical role of IL-15 in the antitumor effects mediated by the combination therapy imatinib and IL-2 [J]. *J Immunol*, 2008, 180 (10): 6477-6483.
- [4] Kobayashi H, Dubois S, Sato N, et al. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance [J]. *Blood*, 2005, 105 (2): 721-727.
- [5] Burkett PR, Koka R, Chien M, et al. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15R α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8⁺ T cell homeostasis [J]. *J Exp Med*, 2004, 200 (7): 825-834.
- [6] Dubois S, Patel HJ, Zhang M, et al. Preassociation of IL-15 with IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8⁺/CD44^{high} T cells and its antitumor action [J]. *J Immunol*, 2008, 180 (4): 2099-2106.
- [7] Himoudi N, Nabarro S, Buddle J, et al. Bone marrow-derived IFN-producing killer dendritic cells account for the tumoricidal activity of unpulsed dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2008, 181 (9): 6654-6663.
- [8] Stern-Ginossar N, Mandelboim O. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands [J]. *Immunology*, 2009, 128 (1): 1-6.
- [9] Qian L, Ji MC, Pan XY, et al. Construction of a plasmid for co-expression of mouse membrane-bound form of IL-15 and RAE-1 ϵ and its biological activity [J]. *Plasmid*, 2011, 65 (3): 239-245.

- [10] Qian L, Zhang Y, Pan XY, et al. IL-15, in synergy with RAE-1 ϵ , stimulates TCR-independent proliferation and activation of CD8 (+) T cells [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3 (2): 472-476.
- [11] 钱莉, 陆家辉, 傅奕, 等. 膜型 IL-15 联合 RAE-1 ϵ 增强小鼠 NK 细胞的杀伤活性 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18 (6): 611-616.
- [12] Xu H, Cao X. Dendritic cell vaccines in cancer immunotherapy: From biology to translational medicine [J]. *Front Med*, 2011, 5 (4): 323-332.
- [13] Hanke N, Alizadeh D, Katsanis E, et al. Dendritic cell tumor killing activity and its potential applications in cancer immunotherapy [J]. *Crit Rev Immunol*, 2013, 33 (1): 1-21.
- [14] Crespo HJ, Lau JT, Videira PA. Dendritic cells: A spot on sialic acid [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 491. doi: 10.3389/fimmu.2013.00491.
- [15] Shortman K, Villadangos JA. Is it a DC, is it an NK? No, it's an IKDC [J]. *Nat Med*, 2006, 12 (2): 167-168.
- [16] Guimont-Desrochers F, Boucher G, Dong Z, et al. Redefining interferon-producing killer dendritic cells as a novel intermediate in NK-cell differentiation [J]. *Blood*, 2012, 119 (19): 4349-4357.
- [17] Roothans D, Smits E, Lion E, et al. CD56 marks human dendritic cell subsets with cytotoxic potential [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2 (2): e23037.
- [18] Anguille S, Lion E, Tel J, et al. Interleukin-15-induced CD56 (+) myeloid dendritic cells combine potent tumor antigen presentation with direct tumoricidal potential [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (12): e51851.
- [19] Terme M, Mignot G, Ullrich E, et al. The dendritic cell-like functions of IFN-producing killer dendritic cells reside in the CD11b⁺ subset and are licensed by tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (16): 6590-6597.
- [20] Guimont-Desrochers F, Lesage S. Revisiting the prominent anti-tumoral potential of pre-mNK cells [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 446.
- [21] Ullrich E, Ménard C, Flament C, et al. Dendritic cells and innate defense against tumor cells [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008, 19 (1): 79-92.
- [收稿日期] 2014 - 04 - 14 [修回日期] 2014 - 05 - 20
[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

凡临床试验都应在中国临床试验注册中心注册

中国临床试验注册中心(Chinese Clinical Trial Register, ChiCTR)为卫生部下属的国家临床试验注册中心,是世界卫生组织国际临床试验注册协作网一级注册机构(World Health Organization International Clinical Trial Registration Platform Primary Register, WHO ICTRP Primary Register),由卫生部中国循证医学中心和四川大学华西医院等于 2005 年 7 月 25 日正式成立并运行。

全球临床试验注册制度由世界各国政府共同决定由 WHO 领导建立。临床试验注册具有伦理和科学的双重意义,目的是为了尊重和珍惜所有试验参与者的贡献,他们的贡献用于改善全社会的医疗保健,因此,任何临床试验都与公众利益相关。公开临床试验的信息,并将其置于公众监督之下是试验研究者的义务和道德责任。临床试验注册不仅能确保追溯每个临床试验的结果,公开在研试验或试验结果信息还有助于减少不必要的重复研究。

ChiCTR 的宗旨是联合中国和全球的临床医师、临床流行病学家、统计学家、流行病学家和医疗卫生管理者,严格科学地管理中国临床试验信息,提高其质量,为广大医务工作者、医疗卫生服务消费者和政府卫生政策制定者提供可靠的临床试验证据,让医疗卫生资源更好地服务于中国人民和全人类的健康事业。

所有在人体实施的试验均属于临床试验,都应该先注册后实施。凡已注册临床试验都会被授予 WHO ICTRP 全球统一的唯一注册号。

我国众多医学期刊已和中国临床试验注册中心共同建立了临床试验报告发表机制,正在分步实施优先发表、直到只发表具有全球性唯一注册号的临床试验报告。

ChiCTR 接受中国地区及全球的临床试验注册申请,还接受获得 WHO ICTRP 认证的二级注册机构输送的注册资料,并向 WHO ICTRP 中央数据库输送注册信息供全球检索。除注册临床试验外,ChiCTR 以卫生部中国循证医学中心、循证医学教育部网上合作研究中心、中国 Cochrane 中心、英国 Cochrane 中心、四川大学华西医院国际临床流行病学网华西资源与培训中心为人才和技术支持平台,负责指导临床试验设计、中心随机、论文写作、教育培训,推动提高我国临床试验的质量。

通过 ChiCTR 检索入口网址 www.chictr.org, 公众可方便地查询已注册临床试验信息,并与 WHO 全球检索入口链接,可方便地查询全球已注册临床试验。

(本刊编辑部)