

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.05.010

· 基础研究 ·

K562 工程细胞联合 IL-2 扩增方案对人 NK 细胞扩增和活化的效果

叶琳洁¹, 黄庆生¹, 李琦¹, 张明杰¹, 马旭东², 杨慧¹, 师俊玲¹ (1. 西北工业大学生命学院 陕西省空间生物实验模拟技术重点学科实验室, 陕西 西安 710072; 2. 福建医科大学附属漳州市医院 血液科, 福建 漳州 363000)

[摘要] **目的:**评价新建立的 K562 工程细胞联合 IL-2 扩增方案对人 NK 细胞扩增和活化的效果。**方法:**采集健康志愿者和肿瘤患者的外周血 PBMC 并分离 NK 细胞,采用前期构建的 K562 工程细胞(将 IL-15、4-1BBL 和 IL-18 在白血病 K562 细胞上进行跨膜表达获取)联合 IL-2 培养方案对 NK 细胞进行扩增和活化,以流式细胞术检测 NK 细胞的扩增效果和 NK 细胞表面受体表达水平,CCK-8 法检测扩增后 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性和 ADCC 活性,CCK-8 法检测在培养方案扩增末期加入 TKD 多肽对 NK 细胞的活化效果。**结果:**对于健康志愿者的 NK 细胞,新建立扩增培养方案可使 NK 细胞在 PBMC 中的比例提高至(93 ± 3)%;使 NK 细胞中活化性受体 NKG2D、CD94、NKp30、NKp44 和 NKp46 的比例分别提高 60%、40%、20%、40% 和 63%,而抑制性受体的表达变化不大;扩增后 NK 细胞对白血病细胞 K562、肺癌细胞 A549、肝癌细胞 SMMU-7721 和乳腺癌细胞 MCF-7 的杀伤活性分别提高了 19%、29%、26% 和 28%,其 ADCC 活性从(33 ± 5.6)% 上升至(65 ± 12)%;方案中增加 TKD 可使 NK 细胞的杀伤活性从(86 ± 4)% 提高至(96 ± 2)%。对于肿瘤患者的 NK 细胞,新扩增方案使其在 PBMC 的比例提高至(90.0 ± 8.0)%,其对 K562 细胞的杀伤活性提高了 17% 左右。**结论:**K562 工程细胞联合 IL-2 扩增方案可高效扩增 NK 细胞,明显激活其杀伤活性,扩增和活化的 NK 细胞可满足临床治疗的需要。

[关键词] 自然杀伤细胞;细胞毒活性;抗体依赖性细胞介导的细胞毒活性;体外扩增;活化性受体;抑制性受体

[中图分类号] R730.3; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)05-0537-06

Effects of target cell overexpression of IL-15, 4-1BBL and IL-18 combine with IL-2 on NK cell activation and cytotoxicity during *ex vivo* expansion

Ye Linjie¹, Huang Qingsheng¹, Li Qi¹, Zhang Mingjie¹, Ma Xudong², Yang Hui¹, Shi Junling¹ (1. Shaanxi Province Key Laboratory for Space Biosciences & Biotechnology, College of Life Sciences, Northwestern Polytechnic University, Xi'an 710072, Shaanxi, China; 2. Department of Hematology, Fujian Medical University-Affiliated Zhangzhou Hospital, Zhangzhou 363000, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effects of K562 cells overexpression of IL-15, 4-1BBL and IL-18 combined with IL-2 *ex vivo* expansion on NK cell activation and cytotoxicity. **Methods:** K562 cells were engineered to overexpress IL-15, 4-1BBL and IL-18 on the cell membrane. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were prepared from venous blood collected from both healthy volunteers and cancer patients. NK cells were purified from PBMCs and expanded *ex vivo* by co-culture with engineered K562 cells in the presence of IL-2 and/or Hsp70 peptide (TKD) for 21 days. The purity and surface marker expression of the expanded NK cells were analyzed by flow cytometry. The cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of the expanded NK cells were assessed by a Cell Counting Ki-8-based colorimetric assay. **Results:** In the cell preparations from healthy subjects, *ex vivo* expansion for 3 weeks by co-culture with engineered K562 cells in the presence of IL-2 and/or TKD increased the purity of NK cells to (93 ± 3)%, increased the proportion of cells expressing killer activation receptors, NKG2D, CD94, NKp46, NKp30, and NKp44, by 60%, 40%, 20%, 40%, and 63% respectively with no effect on the proportion of cells expressing inhibitory receptors (CD158b, NKBI and NKAT2), increased the ADCC by 32%, and increased the cytotoxicity against K562, A549, 7721, MCF

[基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目(No. 2014JM4171)。Project supported by the National Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No. 2014JM4171)

[作者简介] 叶琳洁(1990-),女,浙江省台州市人,硕士生,主要从事肿瘤免疫学方面的研究,E-mail:yezih_100@126.com

[通信作者] 黄庆生(Huang Qingsheng, corresponding author),E-mail:huangqingsheng1963@aliyun.com

tumor cells by 19%, 29%, 26% and 28% respectively. In the cell preparations from cancer patients, *ex vivo* expansion induce the percentage of NK cells increase to $(90.0 \pm 8.0)\%$ and the cytotoxicity against K562 cells by 17%. **Conclusion:** Co-culture with engineered K562 cells overexpressing IL-15, 4-1BBL and IL-18 in the presence of IL-2 and/or TKD may offer an effective approach to expand the NK cell population *ex vivo* and enhance the NK cell cytotoxicity.

[**Key words**] natural killer cell (NK cell); cytotoxicity; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); *ex vivo* expansion; activation receptor; inhibitive receptors

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(5): 537-542]

人自然杀伤(natural killer, NK)细胞依靠自身表面活化性受体与肿瘤细胞表面配体之间的作用,可不受主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制,识别 MHC-I 类分子不表达或表达下调的肿瘤细胞并对其进行有效地清除和杀伤^[1]。NK 细胞独特的抗肿瘤免疫功能已受到广泛的重视,并被越来越多地应用到肿瘤的过继免疫治疗当中^[2]。

由于 NK 细胞在 PBMC 中所占比例很少(5% ~ 10%)^[3],加上由常规方法分离获得的 NK 细胞处于非活化状态,因而建立一种有效的体外激活与扩增的方法是开展 NK 细胞免疫治疗的基础与关键所在。目前常规使用 IL-2、IL-15 和 IL-18 等对 NK 细胞进行体外扩增和激活^[4-8]。课题组前期研究^[9]中,将 IL-15、4-1BBL 和 IL-18 等在白血病 K562 细胞上进行跨膜表达制备的 K562 工程细胞,将此细胞加入培养体系,可使 NK 细胞扩增约 500 倍。

本研究采用前期建立的高效扩增方法,对来自健康志愿者和肿瘤患者的 NK 细胞进行扩增,观察扩增活化前后 NK 细胞的活化性和抑制性受体的表达情况、杀伤肿瘤细胞的细胞毒活性和抗体依赖的细胞介导的细胞毒(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)活性,为进一步完善 NK 细胞的制备技术和促进其在临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

采集福建省漳州市第一医院普通外科、肿瘤科于 2012 年 1 月至 2012 年 12 月期间收治的 10 例肿瘤患者,其中男性 6 例、女性 4 例,中位年龄 59 岁(38 ~ 70 岁),肝癌 3 例、肺癌 3 例、卵巢癌 2 例、直肠癌 2 例。根据临床分期标准进行分期,10 例肿瘤患者的病理分期均为 II-III 期。所有患者在采集外周血前均未经放、化疗处理,也未进行任何药物治疗。8 例正常对照外周血取自健康志愿献血者,其中男、女各 4 例,中位年龄 38 岁(24 ~ 49 岁)。采集 10 例肿瘤患者的标本经福建省漳州市第一医院伦

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

人白血病细胞株 K562、肺癌细胞株 A549、肝癌细胞株 SMMC-7721 和乳腺癌细胞株 MCF-7 均为本实验室保存。流式荧光检测抗体 NKG2D、CD94、NKp30、NKp44、NKp46、CD158b、NKB1、NKAT2 及抗 CD3 和 CD56 的抗体均购自美国 BD 公司。具有激活 NK 细胞活性的 TKD 短肽由美国 FDA/CBER 实验室合成,ADCC 实验所用的靶细胞 Vero 细胞、WNV 病毒和抗 WNV 单克隆抗体均由美国 FDA/CBER 实验室提供,NK 杀伤靶细胞的活性检测采用日本同仁化学研究所 Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒进行检测,淋巴细胞分离液及 NK 细胞分离试剂盒均购自天津灏洋生物制品科技有限公司(TBD)。

1.3 健康志愿者 NK 细胞的分离和体外扩增

扩增前静息 NK 细胞的获得采用 CD-56 磁珠分离法,从 PBMC 中分离 NK 细胞的方法参照 NK 细胞分离试剂盒说明书进行操作。NK 细胞的体外扩增参照文献[8]的方法进行,即采用淋巴细胞分离液从外周血中分离 PBMC,细胞计数后以 1:1 的比例加入经辐照灭活的刺激物 K562 工程细胞(将 IL-15、4-1BBL 和 IL-18 等 NK 细胞活化因子在白血病 K562 细胞膜上进行跨膜表达,制备具有刺激人 NK 细胞体外高效扩增功效的“膜蛋白复合物”,简称为 K562-GM),用含有 200 IU IL-2 和 10% 人血浆的 1640 培养液于 37 °C 培养 21 d,培养期间换液 4 次。

1.4 流式细胞术测定健康志愿者 NK 细胞标志物及表面受体

采用 PE 标记的 CD56 和 FITC 标记的 CD3 荧光抗体对经过 21 d 体外培养的 NK 细胞进行染色,利用流式细胞术对扩增后的 NK 细胞进行分析,确认 NK 细胞(CD56⁺CD3⁻)的纯度;同时,分别采用 PE 标记的抗 CD94、NKG2D、NKp46、NKp30、NKp44、CD158b、CD158a、NKB1 和 NKAT2 的荧光抗体对 NK 细胞进行染色,采用流式细胞术检测扩增前后 NK 细胞表面受体的表达情况,确定扩增的 NK 细胞

表面受体表达阳性细胞的比例。

1.5 CCK-8 法测定健康志愿者 NK 细胞的肿瘤杀伤活性

将 K562 细胞、A549 细胞、SMMC-7721 细胞和 MCF 细胞分别接种至 96 孔板,使细胞数量每孔 2×10^5 个,每孔再加入 100 μl 扩增前(磁珠分离)的 NK 细胞(1×10^6 个)或经过体外扩增培养的 NK 细胞(1×10^6 个),使效靶比为 5:1。同时设置单独含 NK 细胞的实验孔和单独含靶细胞的实验孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 下 CO_2 培养箱孵育 4 h 后,每孔加入 20 μl CCK-8 试剂(CCK-8 试剂包含 WST-8,该试剂可被活细胞内的线粒体脱氢酶还原成有色的甲瓖,通过记录光密度值来反应活细胞的数量)。37 $^{\circ}\text{C}$ 下 CO_2 培养箱继续孵育 2 h 后,450 nm 波长测定各孔光密度(D)值,根据以下公式计算 NK 细胞杀伤率^[10]:杀伤率(%) = $\{1 - [D_{(e+t)} - D_e] / D_t\} \times 100\%$;其中 D_e 为单纯效应细胞孔即 NK 细胞孔的 D 值; D_t 为单纯靶细胞孔即 K562 细胞孔的 D 值; D_{e+t} 为效应细胞加靶细胞孔的 D 值。

1.6 CCK-8 法测定健康人 NK 细胞的 ADCC 活性

将 Vero 细胞接种于 96 孔培养板,生长至 70% 单层时,接种含有 100 个半数组织培养感染剂量(tissue culture infective dose 50, TCID_{50})的西尼罗河病毒 100 μl ,48 h 后加入抗西尼罗河病毒单克隆抗体 10 μl (含 2 μg IgG)^[11]。随后对照组中每孔加入 100 μl 磁珠分离的 NK 细胞(1×10^6 个),实验组中每孔加入 100 μl 体外扩增的 NK 细胞(1×10^6 个),37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱 6 h 后,每孔再加入 20 μl CCK-8 试剂,继续培养 2 h,450 nm 波长测定 D 值,同上方方法计算 NK 细胞的杀伤率。

1.7 TKD 对 NK 细胞杀伤作用的影响

将经过 21 d 扩增的 NK 细胞分为 2 组,一组培养液中掺入 TKD 短肽(14 肽),使其终浓度为 100 ng/ml;另一组作为空白对照。作用 48 h 后同 1.6 中方法计算 NK 细胞的杀伤率。

1.8 肿瘤患者 NK 细胞的体外扩增和杀伤活性的检测

无菌采集 10 位肿瘤患者外周抗凝血 100 ml,淋巴细胞分离液分离 PBMC,同上方方法扩增活化 NK 细胞并检测 NK 细胞的纯度及杀伤活性。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用 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 新方法对健康志愿者外周血 NK 细胞体外扩增的效果

流式细胞术检测结果(图 1)显示,8 例健康自愿者 PBMC 细胞,经过高效扩增新方法 21 d 培养后,NK 细胞($\text{CD}56^+ \text{CD}3^-$)占总细胞的(93 \pm 3)%。

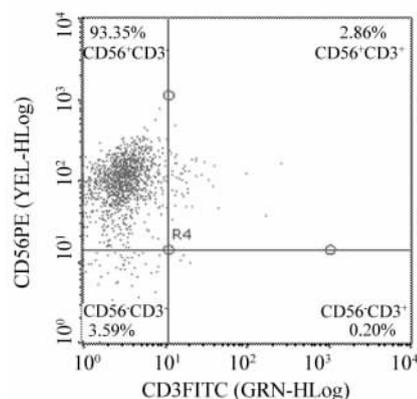


图 1 流式细胞术分析健康志愿者 NK 细胞新方法扩增后的纯度

Fig. 1 Purity of NK cells of healthy volunteers amplified in a new way analyzed by flow cytometry

2.2 新方法扩增后 NK 细胞活化性及抑制性受体的变化

流式细胞术分析结果(图 2)表明,新方法扩增后 NK 细胞中活化性受体 NKG2D、CD94、NKp30、NKp44 和 NKp46 的阳性率分别提高了 60%、40%、20%、40% 和 63%;抑制性受体 CD158b、NKB1 和 NKAT2 阳性率有所降低,但没有统计学意义。

2.3 新方法扩增后提高了 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性

NK 细胞杀伤活性检测结果(图 3)提示,扩增前健康人 NK 细胞对肿瘤细胞 K562、A549、7721 和 MCF 的杀伤活性分别为(70 \pm 15)%、(18 \pm 6)%、(35 \pm 8)% 和(43 \pm 12)% ,而扩增后 NK 细胞对这几种肿瘤细胞的杀伤活性分别为(89 \pm 6)%、(47 \pm 7)%、(61 \pm 6)% 和(71 \pm 8)% ,即扩增激活后 NK 细胞对这 4 种肿瘤细胞的杀伤活性分别提高了 19%、29%、26% 和 28%。

2.4 新方法扩增后提高了 NK 细胞的 ADCC 活性

采用 CCK-8 法对 8 份扩增前后的 NK 细胞对经 WNV 感染的 Vero 细胞进行 ADCC 杀伤实验,扩增前的 NK 细胞(由磁珠分离法从 PBMC 中获得)对感

染病毒 Vero 细胞杀伤活性为(33 ± 5.6)% ,新方法扩增后的 NK 细胞对感染病毒 Vero 细胞杀伤活性

升至(65 ± 12)% ,即扩增后 NK 细胞的 ADCC 活性提高了 32% 。

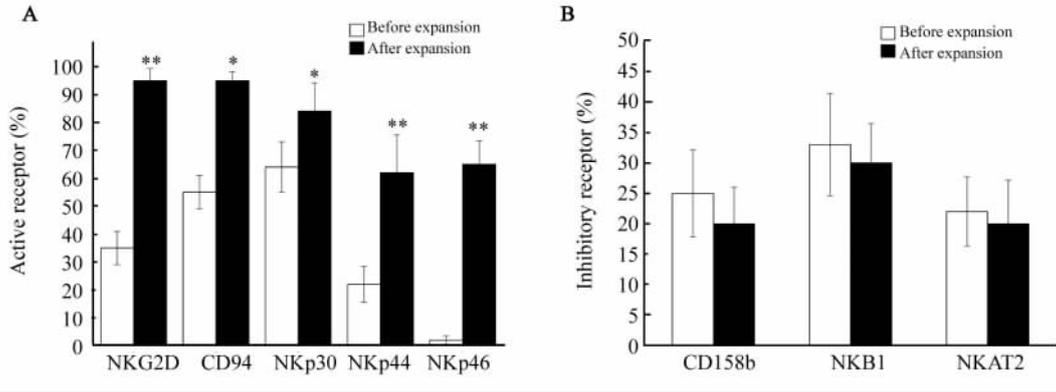


图 2 新方法扩增前后 NK 细胞表面受体阳性率变化(n = 8, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Receptors expression of NK cells before and after new method expansion(n = 8, $\bar{x} \pm s$)

A: Positive rate of NK cells active receptors before and after expansion;
B: Positive rate of NK cells inhibitive receptors before and after expansion
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs before expansion

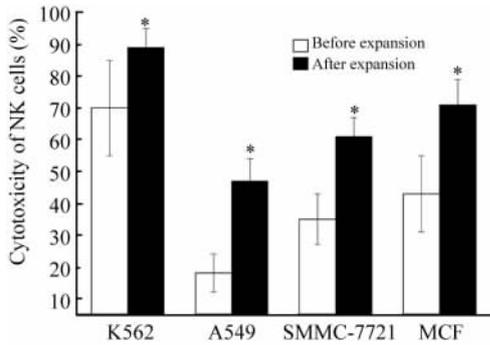


图 3 扩增前后 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤率

Fig. 3 Cytotoxicity of NK cells against tumor cells before and after *ex vivo* expansion

* P < 0.05 vs before expansion

2.5 TKD 增强了 NK 细胞的杀伤活性

PBMC 在体外扩增 21 d 后,再加入 TKD 进行刺激。结果证明,在扩增过程中添加 TKD 能进一步刺激 NK 细胞,其中 TKD 组的杀伤活性为(95.67 ± 2.52)% ,对照组的杀伤活性为(86 ± 4)% 。TKD 添加组中 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性与对照组相比提高了 9.67% 。

2.6 肿瘤患者 NK 细胞扩增和激活的效果

流式细胞术检测结果(图 4)显示,10 例肿瘤患者的 PBMC 经扩增后 NK 细胞比例平均达到(90.02 ± 8.01)% 。以其中一位卵巢癌术后患者为

例:由 100 ml 外周血中共分离到 1 × 10⁸ 个 PBMC,按照前述方法 37 °C 扩增培养 21 d 后进行细胞计数,细胞总数约为 4.3 × 10⁹ 个;经流式细胞术分析后测得 NK 细胞(CD56⁺ CD3⁻)细胞的比例为 93.59% 。10 例肿瘤患者 NK 细胞扩增前对 K562 细胞的杀伤率为(55.37 ± 4.8)% ,扩增后 NK 细胞的杀伤率为(72.05 ± 3.9)% (n = 10),扩增后肿瘤患者 NK 细胞的杀伤活性提高了 17% 左右。

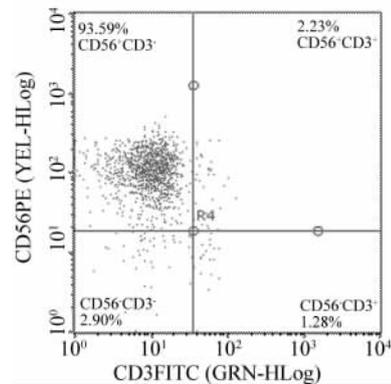


图 4 肿瘤患者 NK 细胞扩增后纯度的流式分析

Fig. 4 Purity of expanded NK cells from tumor patient analyzed by flow cytometry

3 讨论

过继免疫治疗是指将具有特异免疫力的致敏淋

巴细胞(如 NK 细胞、杀伤性 T 细胞等)或致敏淋巴细胞的产物(如转移因子和免疫核糖核酸等)输给肿瘤患者,使其获得抗肿瘤免疫力的治疗方法^[12]。过继免疫治疗已被美国国家癌症研究委员会确立为继外科手术、放射疗法和化学药物治疗之后的第四种疗法。NK 细胞由于其天然且高效的肿瘤杀伤活性受到了广泛的研究和关注,成为过继免疫治疗中除杀伤性 T 细胞之外非常良好的细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞,目前已被用于如乳腺癌、淋巴瘤、直肠癌、结肠癌、肝癌、胃癌、胶质瘤等许多常见肿瘤的过继免疫治疗中^[13-15]。制备高纯度的 NK 细胞还可用于异体的免疫细胞治疗^[16]。然而针对一个患者开展过继免疫治疗并想取得较好的疗效,所需的 NK 细胞数目至少要达到 1×10^8 个^[16],而 NK 细胞本身在外周血中所占的比例较低,因此难以获得足够数量的 NK 细胞已成为限制其临床应用的主要瓶颈。

制备人 NK 细胞的方法主要有两种:一是采用抗体并通过磁珠分离法,直接从 PBMC 中分离 NK 细胞;此法可以快速获得 NK 细胞,但由于 NK 细胞在 PBMC 中的比例很少,所得 NK 细胞的数目不多,只适用于小规模制备 NK 细胞及分析性研究。二是体外扩增法,通过一些特殊细胞因子的刺激,使 PBMC 中的 NK 细胞在体外得到扩增。IL-15 和 IL-18 因其对 NK 细胞的发育与增殖的重要调控作用被广泛用于 NK 细胞的扩增与培养当中^[6-7]。同时研究发现,细胞膜上表达的 IL-15 比可溶状态下的 IL-15 刺激 NK 细胞生长的效果更好,这可能与膜表面表达的 IL-15 比其可溶状态更容易被 NK 细胞所捕获,并与 NK 细胞表面受体结合的效率更高有关^[9]。人 4-1BB(CD137)分子又被称为淋巴细胞激活诱导的受体(receptor induced by lymphocyte activation, RILA),是一种 II 型跨膜蛋白,主要由胞外区、跨膜区和胞质内区三部分所组成。4-1BB 分子的配体为 4-1BBL,同为 II 型跨膜糖蛋白,主要表达在抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)如 B 细胞、巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)上。4-1BB 和 4-1BBL 这对共刺激分子的相互作用可提高 NK 细胞的杀伤活性,在 NK 细胞介导免疫应答过程中起十分重要的调控作用。TKD 是来源于细胞膜热激蛋白 70 的短肽(aa450-463),并且是 HSP70 蛋白的表面抗原决定位,其氨基酸顺序为 TKDNNLLGRFELSG,具有多种免疫刺激活性^[19-21]。

综合以上因素,本实验采用基因工程方法,为国内首次将 IL-15、IL-18 和 4-1BBL 分子表达于 K562

细胞表面,构建了能够有效刺激人 NK 细胞体外增殖与活化的 K562 工程细胞。然后以 K562 工程细胞联合 IL-2 培养人 PBMC 21 d 后,能使其中的 NK 细胞扩增 500 多倍, NK 细胞纯度达 90% 以上。与其他扩增方法相比较,扩增出的 NK 数量更大,纯度更高(可溶性细胞因子混合法扩增 NK 细胞纯度为 80%^[22])。同时,扩增获得的 NK 细胞处于较好的活化状态,针对几种肿瘤细胞(K562、A549、SMMC-7721 和 MCF-7)均有较好的杀伤活性,且 NK 细胞的 ADCC 活性显著增加。扩增后 NK 细胞活化性受体 NKG2D、CD94、NKp46、NKp30 和 NKp44 表达阳性率均有显著增加,而抑制性受体 CD158b、NKB1 和 NKAT2 的阳性率变化不大。另外本扩增培养方法对肿瘤患者的 NK 细胞也有较好的扩增和活化效果,能够显著提高肿瘤患者 NK 细胞的细胞毒活性,能满足 NK 细胞临床应用上的需求。总之,本研究建立的 NK 细胞体外高效扩增方法为深入开发 NK 细胞的抗肿瘤免疫治疗临床应用提供了重要的实验支持。

[参考文献]

- [1] Caligiuri MA. Human natural killer cells [J]. *Blood*, 2008, 112(3): 461-469.
- [2] Malmberg KJ, Bryceson YT, Carlsten M, et al. NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(10): 1541-1552.
- [3] Trinchieri G. Biology of natural killer cells [J]. *Adv Immunol*, 1989, 47: 187-376.
- [4] Koehl U, Esser R, Zimmermann S, et al. Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children [J]. *Klin Padiatr*, 2005, 217(6): 345-350.
- [5] Luhm J, Brand JM, Koritke P, et al. Large-scale generation of natural killer lymphocytes for clinical application [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2002, 11(4): 651-657.
- [6] Klingemann HG, Martinson J. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications [J]. *Cytotherapy*, 2004, 6(1): 15-22.
- [7] Imai C, Iwamoto S, Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells [J]. *Blood*, 2005, 106(1): 376-383.
- [8] 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.
- [9] 黄庆生,李琦,黄勇,等. 人 NK 细胞体外高效扩增的实验研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(12): 1167-1169.
- [10] Chen Y, Wang Y, Zhuang Y, et al. Mifepristone increases the cytotoxicity of uterine natural killer cells by acting as a glucocorticoid

- antagonist via ERK activation [J]. PLoS ONE, 2012, 7: e36413.
- [11] Jonjić S, Babić M, Polić B, et al. Immune evasion of natural killer cells by viruses [J]. Curr Opin Immunol, 2008, 20(1): 30-38.
- [12] Klingemann HG. Natural killer cell-based immunotherapeutic strategies [J]. Cytotherapy, 2005, 7(1): 16-22.
- [13] 刘恋, 李进. 自然杀伤细胞过继免疫治疗的新进展 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(4): 380-383.
- [14] Bachanova V, Miller JS. NK cells in therapy of cancer [J]. Crit Rev Oncog, 2014, 19(1/2): 133-141.
- [15] 陶家龙, 邱玉华, 庄志祥, 等. CD137 单抗联合 IL-15 体外扩增 NK 细胞及其对肺癌细胞的杀伤活性 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(5): 594-598.
- [16] Mimura K, Kamiya T, Shiraiishi K, et al. Therapeutic potential of highly cytotoxic natural killer cells for gastric cancer [J]. Int J Cancer, 2014, 135(6): 1390-1398.
- [17] Leung W. Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(13): 3390-3400.
- [18] Laptewa N, Szmania SM, van Rhee F, et al. Clinical grade purification and expansion of natural killer cells [J]. Crit Rev Oncog, 2014, 19(1/2): 121-132.
- [19] Hromadnikova I, Pirkova P, Sedlackova L. Influence of in vitro IL-2 or IL-15 alone or in combination with Hsp-70-derived 14-mer peptide (TKD) on the expression of NK cell activatory and inhibitory receptors [J/OL]. Mediators Inflamm, 2013[2014-03-01]. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/405295>.
- [20] Stangl S, Gross C, Pockley AG, et al. Influence of Hsp70 and HLA-E on the killing of leukemic blasts by cytokine/Hsp70 peptide-activated human natural killer (NK) cells [J]. Cell Stress Chaperones, 2008, 13(2): 221-230.
- [21] Multhoff G, Pfister K, Gehrman M, et al. A 14 mer hsp70 peptide stimulates natural killer(NK) cell activity [J]. Cell Stress Chaperones, 2001, 6(4): 337-344.
- [22] 周智锋, 李洁羽, 陈明水, 等. 细胞因子组合体外扩增人 NK 细胞的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 2(3): 193-197.
- [收稿日期] 2014-04-15 [修回日期] 2014-07-17
- [本文编辑] 阮芳铭

· 科技动态 ·

皮肤成纤维细胞通过分泌 Cyp26b1 酶来抑制肥大细胞进而维持皮肤屏障的稳态

细胞在各种应激状态(机械力、渗透压、氧化及炎症等)下,释放大量的 ATP 到细胞外,从而通过细胞表面的嘌呤受体 P2X7 活化肥大细胞。活化肥大细胞分泌大量的白三烯 B4 和趋化因子 CXCL1、MCP1 等,趋化中性粒细胞和单核细胞,进而形成炎症。

2012 年 Hiroshi Kiyon 教授课题组发现,在 TNBS 诱导的小鼠肠炎中,细胞外 ATP 通过 P2X7 活化肥大细胞在肠炎的发生中起到了至关重要的作用。同时发现一个有趣的现象:大肠、小肠、肺和腹腔等部位的肥大细胞都高表达 P2X7,然而皮肤中的肥大细胞不表达 P2X7。因此研究者开始思考和解答为什么皮肤中的肥大细胞不表达 P2X7。

首先研究者将正常的骨髓来源肥大细胞(BMMS)注入缺失肥大细胞的 KitW-sh/W-sh 小鼠皮下,发现皮下注射的肥大细胞 P2X7 的表达明显降低,说明皮肤微环境降低了 P2X7 的表达。研究者进而分离了大肠、小肠、肺和皮肤的成纤维细胞,分别与 BMMS 共培养,发现只有与皮肤成纤维细胞共培养的 BMMS 中 P2X7 的表达明显降低。一旦将皮肤成纤维细胞从共培养体系中去掉或者替换为大肠成纤维细胞,P2X7 的表达开始升高。通过 Transwell 培养体系,证明皮肤成纤维细胞分泌的可溶性因子抑制了肥大细胞 P2X7 的表达。

对皮肤成纤维细胞和大肠成纤维细胞进行基因表达谱的差异分析,发现皮肤成纤维细胞高表达维甲酸降解酶 Cyp26b1(细胞色素 P450 同工酶超家族成员)。Cyp26b1 酶的抑制剂 liarozole(利阿唑)能够促进与皮肤成纤维细胞共培养的肥大细胞表达 P2X7;当加入 RA 时,同样能促进肥大细胞表达 P2X7。因此 Cyp26b1 酶通过控制 RA 浓度来调控肥大细胞 P2X7 的表达。

口服 RA 可以促进小鼠皮肤肥大细胞高表达 P2X7,诱导小鼠皮肤炎症的形成,当加入 liarozole 时,RA 诱导的皮炎会明显加重。缺失肥大细胞的小鼠和 P2X7 缺陷小鼠经口服 RA 无法诱导皮炎的形成。因此,P2X7 在 RA 诱导的小鼠皮炎中起到了至关重要的作用。

皮肤直接与外界病原体接触,皮肤表面的抗菌肽能够抵制病原体的入侵,从而形成了皮肤屏障。研究者进一步证明,皮肤表面的病原微生物对于 RA 诱导的皮炎也是必需的,其通过 TLR2 活化免疫细胞,使免疫细胞合成大量的抗菌肽。当 RA 的浓度升高,可以活化激肽释放酶,将抗菌肽降解为 LL37 肽段,LL37 肽段作为 P2X7 的另一个配体,与 ATP 共同活化肥大细胞。

总之,该研究结果表明了皮肤成纤维细胞通过抑制肥大细胞的活化来维持皮肤微环境的稳态。在人类的疾病中发现摄入大量的维生素 A 会加重皮肤炎症,该文也为此提供了解释。

[李志清 摘译,刘书逊 审阅. Kurashima Y, Amiya T, Fujisawa K, et al. Immunity, 2014, 40(1): 530-541]