

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.003

· 基础研究 ·

体外扩增人脐带血来源的 NK 细胞对食管癌细胞的促凋亡作用

连晶瑶^{a,b}, 李红^{△a}, 黄岚^a, 李玉^a, 邹亮燕^a, 王纯耀^b, 张毅^{a,b,c} (郑州大学 a. 第一附属医院 生物细胞治疗中心; b. 第一临床学院; c. 生命科学学院, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的:** 建立体外扩增人脐带血来源的 NK 细胞的方法, 并研究其对多株人食管癌细胞系和食管癌患者原代肿瘤细胞的杀伤作用。 **方法:** 分离人脐带血单个核细胞, 加入放射线灭活的人白血病 K562 细胞及 IL-2、IL-15、IL-18 细胞因子体外扩增培养 2 周, 诱导 NK 细胞。采用流式细胞术检测 NK 细胞的扩增效果及其产生的 IFN- γ 等细胞因子杀伤靶细胞 K562 的能力, 并检测体外扩增的人脐带血来源 NK 细胞对多种食管癌细胞系和食管癌患者原代肿瘤细胞凋亡的影响。 **结果:** 利用放射线灭活的 K562 细胞联合多种细胞因子, 可以有效的扩增人脐带血来源的 NK 细胞。体外培养 2 周后 NK 细胞比率可达 80% 左右, 并对靶细胞 K562 有明显促凋亡作用。此外, 体外扩增的人脐带血来源 NK 细胞能够促进 6 株人食管癌细胞系和食管癌患者原代肿瘤细胞的凋亡。 **结论:** 本研究建立了体外扩增人脐带血 NK 细胞的方法, 并证实这些 NK 细胞对食管癌细胞的促凋亡作用, 可能为食管癌的免疫治疗提供新的手段。

[关键词] 食管癌; 人脐带血; NK 细胞; 肿瘤细胞

[中图分类号] R735.1; R730.51

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)02-0117-05

Promoting apoptosis effect of natural killer cell amplificated *ex vivo*, which derived from human umbilical cord blood, on esophageal cancer cells

LIAN Jingyao^{a,b}, LI Hong^a, HUANG Lan^a, LI Yu^a, ZOU Liangyan^a, WANG Chunyao^b, ZHANG Yi^{a,b,c} (a. Biological Cytotherapy Center of the 1st Affiliated Hospital, b. The 1st Clinical College; c. The College of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for amplification *ex vivo* of natural killer (NK) cells derived from human umbilical cord blood and to investigate cytotoxic effect of the NK cell on multiple cell lines of human esophageal cancer and primary generation tumor cells of the patients with esophageal cancer. **Methods:** Human cord blood mononuclear cells (CBMC) were isolated and, irradiated inactivation human leukemia K562 cell and IL-2, IL-15, IL-18 cytokines were added into to amplify NK cells in culture *ex vivo* for 2 weeks. Amplification results of the NK cells and killing ability of secreted cytokines IFN- γ and so on against the target K562 cell were detected by Flow cytometry assay. Effect of NK cell amplificated *ex vivo* from human umbilical cord blood on apoptosis of various esophageal cancer cell lines and primary generation cancer cell of the patients with esophageal cancer were examined. **Results:** Irradiated inactivation K562 cell combined with multiple cytokines can effectively amplified NK cell derived from human umbilical cord blood. After culture *ex vivo* for 2 weeks, percentage of the NK cell can reach about 80% and had obviously promoting apoptosis of the K562 cell. In addition, amplification *ex vivo* NK cell derived from human umbilical cord blood can promote apoptosis of the 6 cell lines of human esophageal cancer and the primary generation cancer cell of the patients with esophageal cancer. **Conclusion:** In the study, the method of amplification *ex vivo* of NK cells derived from human umbilical cord blood was successfully established. The promoting apoptosis effect of the NK cells on esophageal cancer cells might be confirmed. It could provide a novel approach for immunotherapy of esophageal cancer.

[Key words] esophageal cancer; human umbilical cord blood; natural killer cell; cytotoxicity

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(2): 117-121. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.003]

[基金项目] 河南省基础与前沿技术计划基金资助项目(No. 142300410387.0)。Project supported by the Foundation of Basic Science and Frontier Technology Research Program of Henan Province(No. 142300410387.0)

[作者简介] 连晶瑶(1990 -), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫研究, E-mail: jingyao725@163.com; 李红(1971 -), 女, 硕士, 主要从事免疫肿瘤的研究, E-mail: honglj967873@hotmail.com。△共同第一作者

[通信作者] 张毅(ZHANG Yi, corresponding author), 博士, 教授, 主要从事肿瘤免疫治疗的临床研究, E-mail: yizhang@zzu.edu.cn

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170120.1117.012.html>

食管癌是一种严重威胁人类健康的常见恶性肿瘤,我国食管癌的发病率和病死率均居世界首位,5年生存率不足20%,迫切需要新的治疗手段^[1]。近年来,肿瘤免疫治疗作为一种新的抗肿瘤治疗手段,已在多种恶性肿瘤治疗中显示良好前景,并逐渐成为肿瘤综合治疗的重要组成部分^[2-3]。NK细胞是人体免疫系统中固有的主要淋巴细胞,在机体抵抗病毒感染和清除肿瘤细胞的免疫防御中发挥重要功能^[4]。NK细胞在体外和体内实验中能够有效杀伤恶性黑色素瘤和肾癌等多种肿瘤细胞,并且利用NK细胞治疗肿瘤患者的临床试验已在进行中^[5]。NK细胞占外周血淋巴细胞的10%~20%,如何在体外培养体系快速地获得大量活化的NK细胞是临床应用NK细胞治疗恶性肿瘤的关键。本课题通过体外大量扩增人脐带血来源的NK细胞,并检测了对不同食管癌细胞系和食管癌患者原代肿瘤细胞的促凋亡作用,初步探索NK细胞对食管癌的免疫治疗方法。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人白血病细胞株K562购自中国科学院细胞库,人食管癌细胞株EC109、EC9706、EC1、TE1、TE7和KYSE70来自本实验室。小鼠抗人CD3、CD56、IFN- γ 、颗粒酶B、上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EPCAM)、CD45等荧光标记抗体以及相应的同型对照抗体购自美国BioLegend公司,重组人IL-2购自北京双鹭药业股份有限公司,重组人IL-15和IL-18购自美国PeproTECH公司,淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品公司。RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司,GT-T561培养基购自日本宝日医公司。FACSCantoII流式细胞仪购自美国BD公司。

1.2 健康人脐带血的来源与采集

脐带血由郑州大学第一附属医院产科提供,并经医院伦理委员会批准,无菌采集于健康足月剖宫产的产妇。胎儿娩出后立即用止血钳断脐,常规消毒胎盘侧脐带,无菌条件下行脐静脉穿刺,抽取20 ml脐带血,用肝素抗凝。

1.3 NK细胞的体外诱导培养

新鲜的肝素抗凝脐带血,离心分离后获得的血清经56℃灭活备用。用淋巴细胞分离液分离出脐带血单个核细胞(cord blood mononuclear cell, CBMC), PBS洗涤2次。细胞计数后,用含5%自体血清的GT-T561培养基,调整细胞密度为 2×10^6 个/ml,接种于24孔板中,(每孔 2×10^6 个细胞)。随后加入IL-2

(1 000 U/ml)、IL-15(10 ng/ml)、IL-18(20 ng/ml)和100 Gy放射线照射灭活的K562细胞(1×10^5 个),37℃、5%CO₂条件下培养,维持细胞生长密度 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml,每3 d补液并补充IL-2(1 000 U/ml),2周后收获细胞,计数并检测细胞活性。

1.4 NK细胞表型分析

收集体外培养的NK细胞,加入荧光标记的小鼠抗人CD3、CD56抗体,4℃避光染色30 min,流式细胞仪检测NK细胞比例,取NK细胞比例达90%以上的标本进行后续实验。

1.5 NK细胞表达细胞因子的检测

收集体外培养的NK细胞,加入荧光标记的抗CD3、CD56抗体,4℃避光染色20 min。固定、破膜后,加入荧光标记的抗人IFN- γ 、颗粒酶B等抗体,室温染色20 min,流式细胞仪检测。同型抗体标记作为阴性对照。

1.6 原代肿瘤细胞的制备

人食管癌肿瘤组织由郑州大学第一附属医院胸外科提供,并经医院伦理委员会批准。无菌条件下取新鲜肿瘤组织,置于培养皿中,去除无用组织,剪成3~4 mm左右的碎块,PBS洗2遍。用0.25%胰酶重悬组织碎块,37℃水浴锅中消化15~20 min,待组织块呈絮状物,加入含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基,吹打数次后,用100目滤网过滤,离心弃上清,将细胞沉淀重悬于RPMI 1640完全培养基备用。收集新鲜制备的原代食管癌细胞,加入荧光标记的小鼠抗人EPCAM、CD45等抗体和7-AAD, FACSCantoII流式细胞仪检测原代肿瘤细胞的比例和活性。

1.7 NK细胞杀伤靶细胞的测定

用羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酶(CFSE)染色标记K562和食管癌细胞株等靶细胞,CFSE终浓度为5 μ mol/L,37℃避光孵育15 min。充分洗涤靶细胞后,按不同的效靶比与体外培养的NK细胞(NK细胞比例高于85%)混合并重悬于含5%自体血清的GT-T561培养基,置于5%CO₂培养箱中孵育5 h后,收集细胞,加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)后立刻在流式细胞仪上检测靶细胞的凋亡比例。将原代食管癌细胞与脐带血来源NK细胞混合(效靶比为10:1),37℃、5%CO₂孵育4 h,用EPCAM和CD45标记肿瘤细胞,PI标记凋亡细胞,流式细胞仪检测NK介导的靶细胞凋亡。

1.8 统计学处理

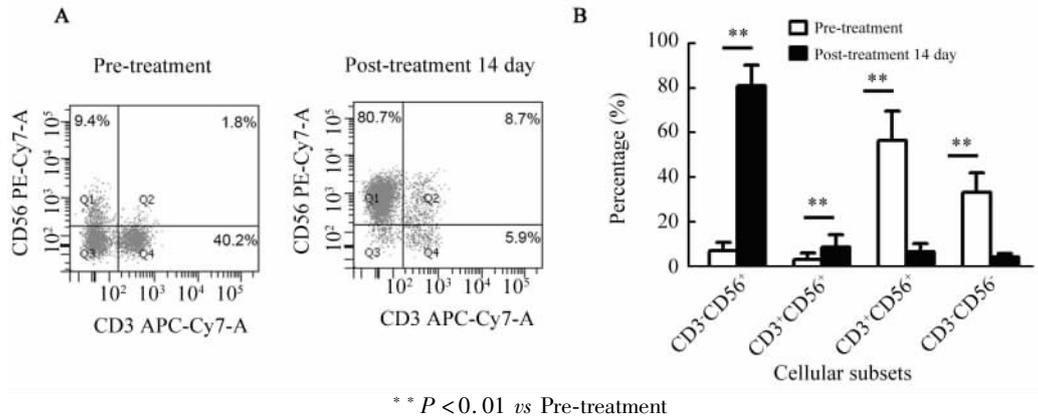
采用SPSS 11.0的统计学软件包,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$

表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体外选择性扩增脐带血来源 NK 细胞的比例明显提高

10 份健康脐带血来源的单个核细胞经过 2~3 周的体外培养, 锥虫蓝染色细胞活力在 95% 以上, 细胞总数扩增 38~93 倍。流式细胞仪检测 NK 细胞的比例达到 80% 左右, 与培养前样本相比, 各细胞亚群的变化均有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1)。



A: Representative flow cytometry data; B: Statistical analysis of flow cytometry data

图 1 人脐带血单个核细胞体外选择性扩增 14 d 后的细胞表型的变化

Fig. 1 Phenotypic changes of human cord blood mononuclear cells after the *ex-vivo* amplification for 14 days

2.2 体外扩增脐带血来源 NK 细胞提高 IFN- γ 和颗粒酶 B 的表达水平

细胞的促凋亡作用

利用细胞内因子染色和流式细胞术, 检测了体外培养的 NK 细胞分泌细胞因子的能力。结果(图 2)表明, 在 PMA 与离子霉素刺激下, 体外培养的 NK 细胞表达 IFN- γ 和颗粒酶 B 的水平明显提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

利用 CFSE 标记靶细胞 K562, 用流式细胞术检测了体外扩增的 NK 细胞对 K562 细胞的促凋亡作用。在不同效靶 (E/T) 比的条件下, 体外扩增的脐带血来源 NK 细胞导致 K562 细胞明显凋亡 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 3), 并显示剂量依赖趋势。

2.4 体外扩增脐带血来源的 NK 细胞能够促进多种食管癌细胞株的凋亡

选取脐带血体外培养 14 d 后 NK 细胞比例达 90% 以上的标本, 检测 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。在效靶比为 10:1 (E/T = 10) 外扩增的脐带血 NK 细胞对多种食管癌细胞系, 包括 EC109、EC9706、EC1、TE1、TE7、KYSE70 等, 表现出明显的杀伤作用 ($P < 0.01$, 图 4)。

2.5 脐带血来源 NK 细胞能够促进食管癌患者原代肿瘤细胞的凋亡

从新鲜的人食管癌组织中, 通过胰酶消化法获得原代肿瘤细胞。流式细胞术检测证实原代肿瘤细胞的表型特征 (EPCAM⁺/CD45⁻), 但该方法获得的原代肿瘤细胞有 30% 左右的死亡细胞, 显示为 7-AAD 染色阳性 (图 5)。结果显示脐带血来源的 NK 细胞对原代食管癌细胞也有显著促凋亡作用 ($P < 0.01$)。

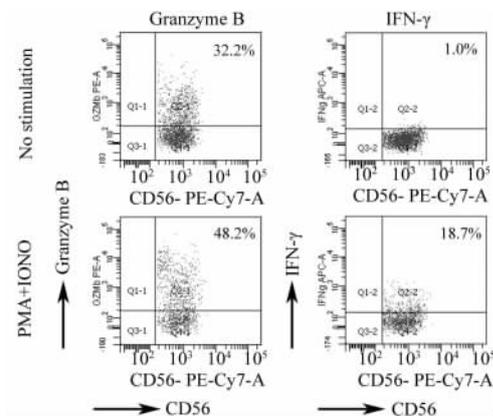


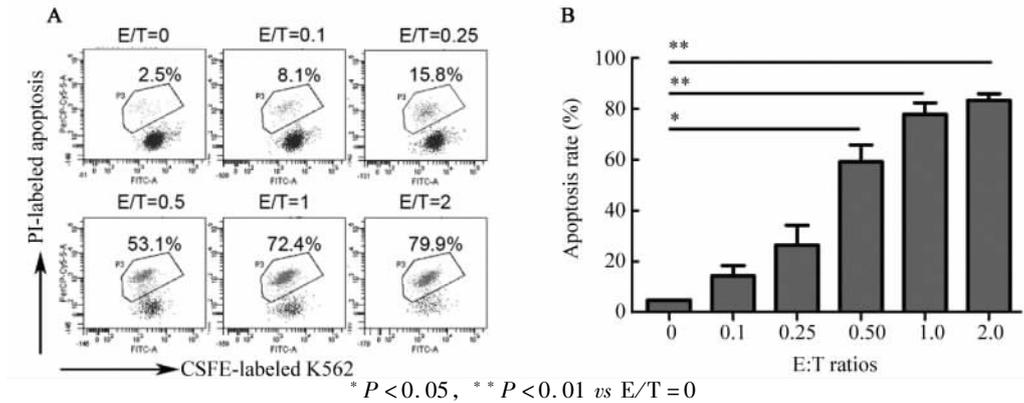
图 2 体外扩增 14 d 人脐带血来源 NK 细胞提高 IFN- γ 和颗粒酶 B 水平

Fig. 2 Levels of IFN- γ and granzyme B improved by CBMC-derived NK cells after *ex-vivo* amplification for 14 days

2.3 体外扩增脐带血来源 NK 细胞能增强对 K562

3 讨论

NK 细胞是天然免疫的重要效应细胞, 不需要



A: Representative flow cytometry data; B: Statistical analysis of flow cytometry data
图 3 人脐带血来源 NK 细胞对 K562 细胞的促凋亡作用

Fig. 3 Promoting apoptosis effect of CBMC-derived NK cells on the K562 cells

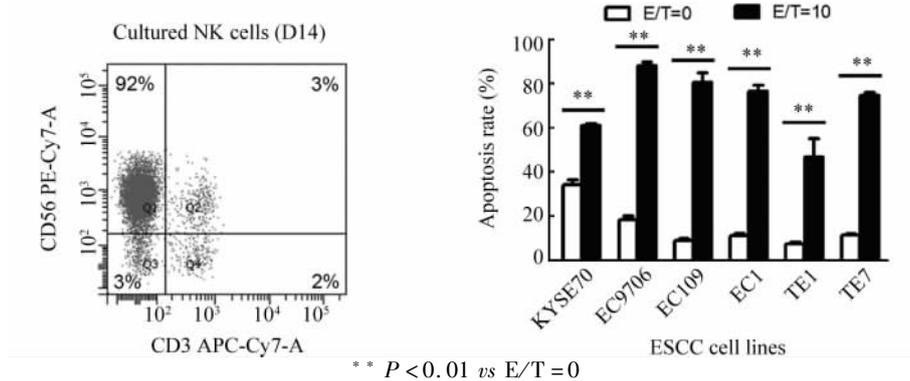


图 4 人脐带血来源 NK 细胞对人食管癌细胞系的促凋亡作用

Fig. 4 Promoting apoptosis effect of CBMC-derived NK cells on different human esophageal cancer cell lines

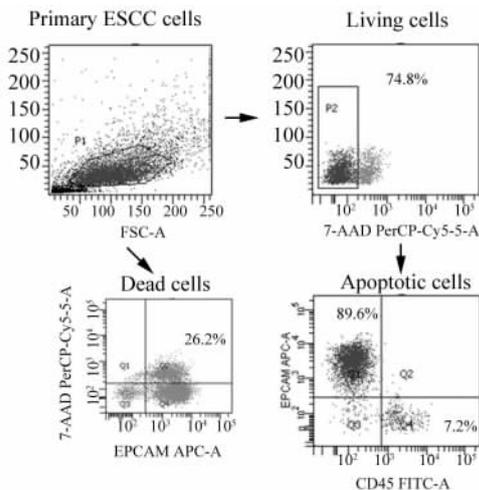


图 5 人脐带血来源 NK 细胞对食管癌患者原代肿瘤细胞的促凋亡作用

Fig. 5 Promoting apoptosis effect of CBMC-derived NK cells against primary cancer cells of the patients with esophageal carcinoma

预先致敏,能以非 MHC 限制性的方式杀伤肿瘤细胞,参与机体抗肿瘤的第一道防线^[6]。近年来,NK 细胞的抗肿瘤功能已有较多报道^[7-8],NK 细胞能够有效杀伤白血病、肾癌、恶性黑色素瘤等肿瘤细胞。此外,NK 细胞功能缺陷与黑色素瘤、前列腺癌、结肠癌等多种恶性肿瘤的发生和进展相关^[9-10]。目前,过继回输 NK 细胞治疗血液系统肿瘤和恶性实体瘤的临床研究已在进行中^[11]。建立体外大量扩增 NK 细胞的方法,是过继回输 NK 细胞治疗的关键技术和研究热点。

IL-2、IL-15 等多种细胞因子可以在体外刺激 NK 细胞有效扩增^[12]。体外扩增的 NK 细胞具有良好的细胞毒性,杀伤肿瘤细胞的作用比扩增前显著增强^[13]。自体外周血是体外扩增 NK 细胞的主要来源,获得的 NK 细胞有较强的杀伤能力,无排异反应、安全性好。但部分中晚期癌症患者无法耐受采集外周血,并且细胞表面 MHC-I 类分子表达可能抑制 NK 细胞的杀伤作用,限制了自体来源 NK

细胞的临床应用。同种异体来源的NK细胞在体外扩增能力强,并且可以避免肿瘤细胞表面MHC-I类分子介导的抑制性信号,表现出更强的抗肿瘤作用^[14]。但同种异体来源的淋巴细胞回输,可能存在免疫排斥的潜在危险。脐带血来源的淋巴细胞,具有增殖能力旺盛、免疫原性低等优点,已成为体外扩增NK细胞的一个重要来源^[15]。本研究建立了利用饲养细胞和多种细胞因子体外选择性扩增脐带血来源NK细胞的方法,简便易行,成本低,具有较好的临床推广应用前景。

本研究在体外扩增的脐带血来源NK细胞,不仅具有较高的NK细胞比例和数量,而且表现出良好的体外抗肿瘤功能,脐带血来源的NK细胞分泌不仅能分泌IFN- γ 和颗粒酶B等细胞因子,而且可以有效促进靶细胞K562的凋亡。有临床研究^[16]显示,体外扩增的自体NK细胞可能使中晚期食管癌患者获益,并且临床疗效与肿瘤组织中MICA的表达相关。但有关NK细胞对食管癌细胞的直接杀伤作用的研究,特别是对食管癌患者肿瘤细胞杀伤作用的研究还较少。本研究证实了脐带血来源的NK细胞对多种食管癌细胞系都有明显的杀伤作用,提示脐带血来源的NK细胞可能对不同的食管癌细胞具有广泛的促凋亡作用。更重要的是本研究建立了检测体外扩增的NK细胞对食管癌患者原代肿瘤细胞的方法,并证实了NK细胞对食管癌患者肿瘤细胞的杀伤能力。这种方法可能为临床精准筛选合适的NK细胞治疗食管癌患者提供实验证据,并可能推广到其他肿瘤和细胞治疗的患者筛选中。

综上所述,脐带血来源的NK细胞可以在体外高效扩增,不仅增加了NK细胞的数量,而且扩增后NK细胞对食管癌细胞具有明显的促凋亡作用。NK细胞上某些分子通过与靶细胞上的受体结合^[17],引起靶细胞的凋亡,本研究体系中NK细胞杀伤食管癌细胞的确切分子机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] PENNATHUR A, GIBSON M K, JOBE B A, et al. Oesophageal carcinoma[J]. *Lancet*, 2013, 381(9864):400-412. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60643-6.
- [2] KIRKWOOD J M, BUTTERFIELD L H, TARHINI A A, et al. Immunotherapy of cancer in 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(5):309-335. DOI:10.3322/caac.20132.
- [3] SONDAK V K, MCARTHUR G A. Adjuvant immunotherapy for cancer: the next step[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(5):478-480. DOI:10.1016/S1470-2045(15)70162-2.
- [4] VIVIER E, TOMASELLO E, BARATIN M, et al. Functions of natural killer cells[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(5):503-510.

DOI:10.1038/ni1582.

- [5] IGARASHI T, WYNBERG J, SRINIVASAN R, et al. Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells[J]. *Blood*, 2004, 104(1):170-177. DOI:10.1182/blood-2003-12-4438.
- [6] STOJANOVIC A, CERWENKA A. Natural killer cells and solid tumors[J]. *J Innate Immun*, 2011, 3(4):355-364. DOI:10.1159/000325465.
- [7] YAN Y, STEINHERZ P, KLINGEMANN H G, et al. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(11):2859-2868.
- [8] 邵阳, 杨富强, 郑军华, 等. 体外扩增肾癌患者自体NK细胞及其对人肾细胞癌786-O细胞的杀伤[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(6):643-647. DOI:10.3872/j.issn.1007385X.2012.06.014.
- [9] PASERO C, GRAVIS G, GUERIN M, et al. Inherent and tumor-driven immune tolerance in the prostate microenvironment impairs natural killer cell antitumor activity[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(8):2153-2165. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-1965.
- [10] HALAMA N, BRAUN M, KAHLERT C, et al. Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(4):678-689. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-2173.
- [11] PIETRA G, MANZINI C, RIVARA S, et al. Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(6):1407-1415. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-2544.
- [12] YANG Y, LIM O, KIM T M, et al. Phase I study of random healthy donor-derived allogeneic natural killer cell therapy in patients with malignant lymphoma or advanced solid tumors[J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(3):215-224. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-15-0118.
- [13] 李晓红, 马健, 汪菲菲, 等. 体外扩增高纯度的人外周血来源的NK细胞的研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15(2):373-377. DOI:10.3969/j.issn.1009-2137.2007.02.032.
- [14] FUJISAKI H, KAKUDA H, SHIMASAKI N, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(9):4010-4017. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-08-3712.
- [15] IGARASHI T, WYNBERG J, SRINIVASAN R, et al. Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells[J]. *Blood*, 2004, 104(1):170-177. DOI:10.1182/blood-2003-12-4438.
- [16] 周智锋, 柳硕岩, 郑庆丰, 等. NKG2D配体在中晚期食管癌患者术后NK细胞免疫治疗中的作用[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(22):1373-1377. DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.20130898.
- [17] von STRANDMANNE E P, SHATNYEVA O, HANSEN H P. NKp30 and its ligands: emerging players in tumor immune evasion from natural killer cells[J]. *Ann Transl Med*, 2015, 3(20):314. DOI:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.08.

[收稿日期] 2016-09-08

[修回日期] 2016-12-31

[本文编辑] 王映红