

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.07.005

· 基础研究 ·

## NKG2D配体RAE1 $\epsilon$ 对乳腺癌细胞4T1衍生MDSC功能的影响

钱莉, 刘阳, 叶枫, 刘露, 王少卿, 贾筱琴, 傅奕, 龚卫娟, 田芳 (扬州大学医学院 病原生物学与免疫学教研室, 江苏 扬州 225001)

**[摘要]** **目的:** 探讨表达小鼠NKG2D配体之一视黄酸早期转录因子1 $\epsilon$ (retinoic acid early transcript 1 $\epsilon$ , RAE1 $\epsilon$ )的原B淋巴细胞BaF3对乳腺癌细胞株4T1成瘤小鼠来源的髓系抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)功能的影响。**方法:** 以小鼠原B淋巴细胞株BaF3为基础, 构建表达RAE1 $\epsilon$ 的BaF3-RAE1 $\epsilon$ 细胞以及表达空质粒的BaF3-mock对照细胞。通过4T1原位肿瘤模型诱导产生CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>MDSC, 将BaF3-mock细胞和BaF3-RAE1 $\epsilon$ 细胞作为刺激细胞, 分别与脾MDSC共培养, 流式细胞术检测MDSC表面CD40、CD80、F4/80、CD11c的表达和MDSC内活性氧(ROS)的水平; ELISA法检测共培养上清液IL-10、IL-4和IFN- $\gamma$ 的含量; Griess法检测共培养上清液一氧化氮(NO)的浓度。磁珠分选共培养体系中的MDSC, 检测裂解后精氨酸酶的活性; 另外, 将分选后的MDSC与抗CD3/抗CD28抗体活化的脾细胞共培养, CFSE法检测活化的CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞增殖情况。**结果:** 成功获得4T1原位肿瘤模型来源的小鼠脾MDSC。与BaF3-mock细胞相比, BaF3-RAE1 $\epsilon$ 细胞刺激对MDSC分泌IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-10和NO的水平没有明显影响( $P>0.05$ ); 对MDSC表达CD40、CD80、F4/80、CD11c和ROS也没有显著影响( $P>0.05$ )。与BaF3-mock细胞相比, BaF3-RAE1 $\epsilon$ 细胞刺激显著提高MDSC的精氨酸酶活性(156.166 $\pm$ 1.209 vs 110.135 $\pm$ 7.356,  $P<0.01$ ), 并明显增强MDSC对CD8<sup>+</sup>T细胞增殖的抑制作用。**结论:** RAE-1 $\epsilon$ 在体外增强4T1成瘤小鼠来源的MDSC的抑制功能。

**[关键词]** 视黄酸早期转录因子1 $\epsilon$ ; 髓系抑制性细胞; 精氨酸酶; 乳腺癌4T1细胞

**[中图分类号]** R737.9; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)07-0721-06

## Effects of NKG2D ligand RAE1 $\epsilon$ on the function of 4T1 mammary cancer cells-derived MDSC

QIAN Li, LIU Yang, YE Feng, LIU Lu, WANG Shaoqing, JIA Xiaoqin, FU Yi, GONG Weijuan, TIAN Fang (Department of Etio-biology and Immunology, Medical School of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore effect of BaF3 primary B lymphocyte that expresses retinoic acid early transcript 1 $\epsilon$  (RAE1 $\epsilon$ ), ligand of mouse NKG2D, on function of myeloid-derived suppressor cell (MDSC) originated from mouse. **Methods:** Based on mouse primary B lymphocyte BaF3 line, a BaF3-RAE1 $\epsilon$  cell that expressed RAE1 $\epsilon$  and a BaF3-mock control cell with empty plasmid were structured. CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>MDSC was produced through introduction of 4T1 tumor model in situ. Spleen MDSC was respectively co-cultured with BaF3-RAE1 $\epsilon$  cell and BaF3-mock cell that acted as stimulating cells. Flow cytometry assay was used to detect expressions of CD40, CD80, F4/80, CD11c and content of reactive oxygen species (ROS) in the MDSC. ELISA assay was used to test contents of IL-10, IL-4 and IFN- $\gamma$  in supernatant of the co-culture. Concentration of nitric oxide (NO) in the supernatant was examined by Griess assay. Magnetic beads were used to separate the MDSC in the co-culture system, activity of arginase was detected after splitting. In addition, the separated MDSC co-culture with splenocyte activated by anti-CD3/CD28 an-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81373130, No.81001308),江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2010315);扬州大学大学生创新创业训练计划资助项目。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81373130, No.81001308), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2010315), and the Science and Technology Innovation Fund for Undergraduates of Yangzhou University

**[作者简介]** 钱莉(1979-),女,博士,副教授,主要从事肿瘤免疫及免疫调节相关研究, E-mail: qianl@yzu.edu.cn

**[通信作者]** 钱莉(QIAN Li, corresponding author)

**[优先发表]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170616.1743.006.html>

tibody. Proliferation of the activated CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cell was examined by CFSC assay. **Results:** The MDSC of mouse spleen derived from 4T1 in situ tumor model was successfully obtained. Comparing with the BaF3-mock cell, effecting of the BaF3-RAE1 $\epsilon$  cell stimulation on amounts of IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-10 and NO secreted by the MDSC was not significant ( $P>0.05$ ), and on amounts of CD40, CD80, F4/80, CD11c and ROS expressed by the MDSC also not significant ( $P>0.05$ ). Stimulation of the BaF3-RAE1 $\epsilon$  cell did more increase activity of arginase in the MDSC than that of the BaF3-mock cell obviously ( $156.166\pm 1.209$  vs  $110.135\pm 7.356$ ,  $P<0.01$ ), and evidently enhanced inhibitory effect of the MDSC on proliferation of CD8<sup>+</sup> T cell. **Conclusion:** RAE1 $\epsilon$  could enhance inhibitory function *in vitro* of the MDSC derived from 4T1 mouse with tumor.

**[Key words]** retinoic acid early transcript 1 $\epsilon$ ; myeloid-derived suppressor cell; arginase; 4T1 cell of breast cancer

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(7): 721-726. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.07.005]

视黄酸早期转录因子 (retinoic acid early transcript 1 $\epsilon$ , RAE1 $\epsilon$ ) 为小鼠 NKG2D 的配体之一, 表达在多种肿瘤细胞株和肿瘤组织表面<sup>[1]</sup>。NKG2D 配体与 NK 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞表面的 NKG2D 结合后, 能够有效活化 NK 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 在抗肿瘤免疫中起重要作用<sup>[2]</sup>。然而, 肿瘤细胞通过一系列的逃逸机制躲避 NKG2D 介导的杀伤, 如肿瘤细胞产生可溶性的 NKG2D 配体下调 NK 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞表面 NKG2D 的表达水平<sup>[3]</sup>; 肿瘤细胞表面持续表达 NKG2D 配体也会下调杀伤细胞表面 NKG2D 的表达<sup>[4]</sup>。髓系抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) 是一群骨髓来源的异质性细胞, 肿瘤发生时, MDSC 大量扩增并活化, 通过释放精氨酸酶和诱导型一氧化氮合酶等机制抑制宿主的免疫应答, 在肿瘤免疫逃逸中发挥重要的免疫负向调节作用<sup>[5-6]</sup>。小鼠的 MDSC 具有共同的 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> 的表型<sup>[7]</sup>。本课题前期研究中, 将 RAE1 $\epsilon$  表达于小鼠原 B 淋巴细胞株 BaF3 细胞上 (简称 BaF3-RAE1 $\epsilon$  细胞)<sup>[8]</sup>, 发现 BaF3-RAE1 $\epsilon$  成瘤小鼠脾中 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSC 的数量和比例均增多且抑制功能增强<sup>[9]</sup>。本研究进一步探讨 BaF3-RAE1 $\epsilon$  细胞在体外对乳腺癌细胞株 4T1 原位肿瘤模型来源的 MDSC 功能影响, 为阐明 RAE1 $\epsilon$  通过增强 MDSC 的负向调节功能介导免疫逃逸提供更多的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

RBMI 1640 培养基、胎牛血清均购自 Gibco 公司, 荧光标记的抗小鼠 CD40、CD80、CD11c 和 F4/80 抗体均购自 eBioscience 公司, 重组小鼠白细胞介素 3 (rmIL-3) 购自 R&D 公司, CFSE 购自 Invitrogen 公司, 小鼠 CD11b 磁珠购自 BD Biosciences 公司, 精氨酸酶活性检测试剂盒购自 BioAssay 公司, IL-4、IL-10 和

IFN- $\gamma$  的 ELISA 检测试剂盒购自达科为公司, Griess 试剂盒购自 Sigma 公司, 活性氧 (ROS) 检测试剂盒购自碧云天公司。

### 1.2 获取 MDSC

在 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠第四对乳腺处皮下注射  $2\times 10^5$  个 4T1 细胞, 20 d 左右无菌取小鼠脾, 研磨后收集细胞悬液, 用 Tris-NH<sub>4</sub>Cl 溶液裂解红细胞, PBS 洗涤 1 次, 用抗 CD11b 的磁珠进行分选, 流式细胞术检测 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSC 细胞纯度。

### 1.3 BaF3 工程细胞株与 MDSC 共培养

本课题组前期研究<sup>[8-9]</sup>通过基因工程方法将小鼠 RAE1 $\epsilon$  基因克隆至真核表达载体 pVITRO2-mcs, 稳定转染小鼠原 B 淋巴细胞株 BaF3 细胞, 获得高表达 RAE1 $\epsilon$  的 BaF3 细胞 (BaF3-RAE1 $\epsilon$  细胞), 同时将空质粒 pVITRO2-mcs 稳定转染 BaF3 细胞, 获得对照细胞 (BaF3-mock 细胞)。

实验分为单纯 MDSC 组、单纯 BaF3-mock 细胞组、单纯 BaF3-RAE1 $\epsilon$  细胞组、BaF3-mock 细胞+MDSC 组和 BaF3-RAE1 $\epsilon$  细胞+MDSC 组。MDSC 和 BaF3 工程细胞株的比例为 10:1, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养。

### 1.4 流式细胞术检测 BaF3 工程细胞株对 MDSC 表面分子表达的影响

MDSC 和 BaF3 工程细胞株共培养 24 h 后收集细胞, 用 PBS 洗 1 次后重悬于 20  $\mu$ l PBS 中, 加入荧光素标记的小鼠抗体 (CD11b、Gr-1、CD40、CD80、F4/80、CD11c) 至质量浓度 1  $\mu$ g/ml, 4 °C 标记 20 min, PBS 洗 2 次, 重悬于 300  $\mu$ l PBS 中, 流式细胞仪检测 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSC 表面 CD40、CD80、F4/80 和 CD11c 的表达。

### 1.5 ELISA 法检测 BaF3 工程细胞株对 MDSC 细胞因子和一氧化氮 (NO) 分泌的影响

MDSC 和 BaF3 工程细胞株共培养 24 h 后收集培

养液上清, ELISA法检测上清液中IL-4、IL-10和IFN- $\gamma$ 的水平, 具体步骤参照达科为公司ELISA检测试剂盒说明书进行。Griess法检测上清中NO的含量, 具体步骤如下: 取100  $\mu$ l上清与100  $\mu$ l Griess试剂室温孵育10 min, 检测550 nm波长的光密度(D)值, 根据亚硝酸钠标准曲线计算NO浓度。

### 1.6 检测BaF3工程细胞株对MDSC分泌精氨酸酶的影响

MDSC和BaF3工程细胞株共培养24 h后, 用CD11b磁珠分选共培养体系中的MDSC, 裂解后按照BioAssay公司精氨酸酶活性检测试剂盒说明书检测精氨酸酶活性。

### 1.7 检测BaF3工程细胞株对MDSC表达ROS的影响

MDSC和BaF3工程细胞株共培养24 h后, 收集细胞, PBS洗涤后, 用10  $\mu$ mol/L DCFH-DA重悬细胞, 37  $^{\circ}$ C孵育20 min, 用PBS洗涤3次后, 标记CD11b和Gr-1抗体, 标记方法同1.4, 流式细胞仪检测CD11b $^{+}$ Gr-1 $^{+}$  MDSC中DCF的平均荧光强度(MFI)。DCF的MFI与胞内ROS的水平呈正相关。

### 1.8 流式细胞术检测MDSC对活化CD8 $^{+}$ T细胞增殖的影响

MDSC和BaF3工程细胞株共培养24 h后, 用CD11b磁珠分选共培养体系中的MDSC, 备用。BALB/c小鼠脾细胞用CFSE标记后铺至预先包被有1  $\mu$ g/ml抗CD3抗体的96孔圆底板中, 加入1  $\mu$ g/ml可溶性的抗CD28抗体。MDSC与CFSE标记的抗CD3/CD28抗体活化脾细胞按1:1的比例共培养, 在BaF3-RAE1 $\epsilon$ +MDSC组的MDSC与T细胞共培养孔中加500  $\mu$ mol/L nor-NOHA(精氨酸酶抑制剂)。共培养3 d后, 收集细胞, 用荧光素标记的抗CD3和抗CD8抗体标记, 流式细胞仪检测CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T细胞CFSE的表达情况。

### 1.9 统计学处理

采用PRISM5.0统计学软件, 计量数据以表示, 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4T1成瘤小鼠脾来源的MDSC

流式细胞术检测4T1原位成瘤小鼠脾中CD11b $^{+}$ Gr-1 $^{+}$ 的MDSC比例为41%(图1左), 用抗CD11b的磁珠分选后, 流式细胞术检测CD11b $^{+}$ Gr-1 $^{+}$ 的MDSC纯度达到90%(图1右), 说明成功获得了小鼠4T1肿瘤诱导产生的MDSC。

### 2.2 BaF3-RAE1 $\epsilon$ 细胞对MDSC分泌细胞因子没有显著影响

BaF3-mock细胞和BaF3-RAE1 $\epsilon$ 细胞分别与MDSC共培养24 h后, ELISA法检测培养上清中IL-4、IL-10和IFN- $\gamma$ 的分泌情况。结果(图2)显示, BaF3-RAE1 $\epsilon$ +MDSC组MDSC分泌IL-10的水平和BaF3-mock+MDSC组相比没有显著差异( $P > 0.05$ )。并且这两组MDSC分泌IL-4和IFN- $\gamma$ 的水平也没有显著差异(结果未显示)。说明BaF3-RAE1 $\epsilon$ 细胞对MDSC分泌IL-10、IL-4和IFN- $\gamma$ 没有显著影响。

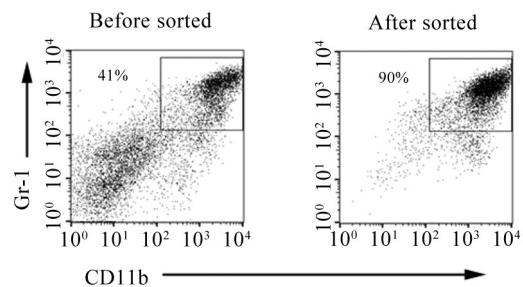


图1 成功获得小鼠4T1肿瘤诱导产生的脾MDSC  
Fig.1 4T1 tumor cells-derived mouse splenic MDSCs were obtained successfully

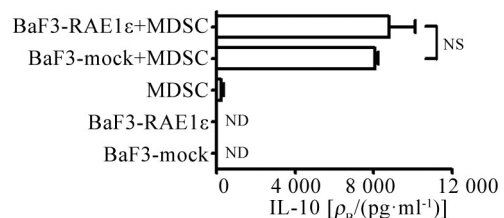


图2 各组MDSC分泌IL-10的水平  
Fig.2 Levels of IL-10 secreted by the MDSCs in various groups

### 2.3 BaF3-RAE1 $\epsilon$ 细胞增高MDSC精氨酸酶活性

BaF3-mock细胞和BaF3-RAE1 $\epsilon$ 细胞分别与MDSC共培养24 h后, 检测MDSC精氨酸酶活性结果(图3A)显示, 与BaF3-mock+MDSC组相比, BaF3-RAE1 $\epsilon$ +MDSC组MDSC的精氨酸酶活性显著升高( $110.135 \pm 7.356$  vs  $156.166 \pm 1.209$ ,  $P < 0.01$ ), 说明BaF3-RAE1 $\epsilon$ 细胞可诱导MDSC精氨酸酶表达上调。

此外, 检测这些组MDSC表达NO和ROS的结果发现, 与BaF3-mock+MDSC组相比, BaF3-RAE1 $\epsilon$ +MDSC组MDSC分泌NO(图3B)和ROS(图3C)水平均没有显著差异( $P > 0.05$ ), 说明BaF3-RAE1 $\epsilon$ 细胞对MDSC分泌NO和ROS没有明显影响。

2.4 BaF3-RAE1ε细胞对MDSC表面分子表达没有明显影响

BaF3- mock 细胞和 BaF3- RAE1ε 细胞分别与 MDSC 共培养 24 h 后, 流式细胞术检测 MDSC 表面 CD40、CD80、F4/80 和 CD11c 的表达结果(图4)显示, 与 BaF3- mock+MDSC 组相比, BaF3-RAE1ε+MDSC 组 MDSC 表面 CD40、CD80、F4/80 和 CD11c 的表达无明显差异。

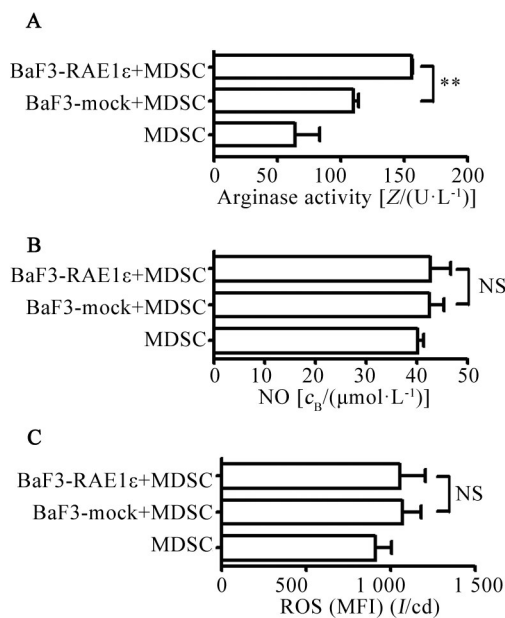


图3 各组 MDSC 的精氨酸酶活性及 NO 和 ROS 浓度  
Fig. 3 Activity of arginase as well as concentrations of NO and ROS in the MDSCs of various groups

2.5 BaF3-RAE1ε细胞促进 MDSC 对 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖的抑制

BaF3- mock 细胞和 BaF3- RAE1ε 细胞分别与 MDSC 共培养 24 h 后, 与 CFSE 标记的抗 CD3/抗 CD28 抗体活化的脾细胞共培养 3 d 后, 流式细胞术检测 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞 CFSE 的表达结果(图5)显示, 与 BaF3- mock+MDSC 组相比, BaF3-RAE1ε+MDSC 组 MDSC 对 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖的抑制作用明显增强。在 BaF3-RAE1ε+MDSC 组的 MDSC 与 T 细胞共培养体系加入精氨酸酶抑制剂 nor-NOHA (BaF3-RAE1ε+MDSC+nor-NOHA 组), 结果(图5)显示, nor-NOHA 可明显降低 MDSC 对 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖的抑制作用。由此说明, BaF3-RAE1ε 细胞通过诱导 MDSC 精氨酸酶表达上调, 促进 MDSC 对 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖的抑制。

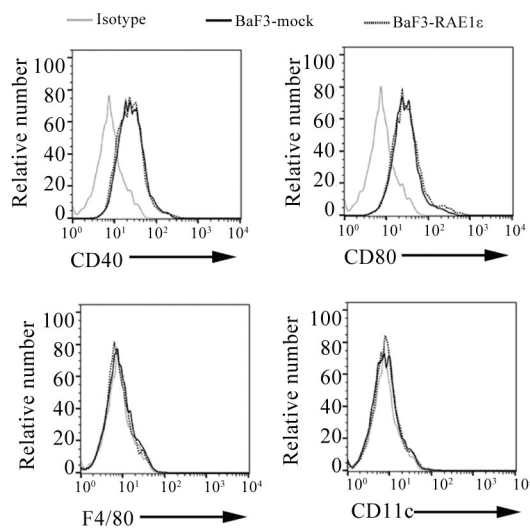


图4 各组 MDSC 表面分子的表达  
Fig. 4 Expressions of surface molecules on the MDSCs in various groups

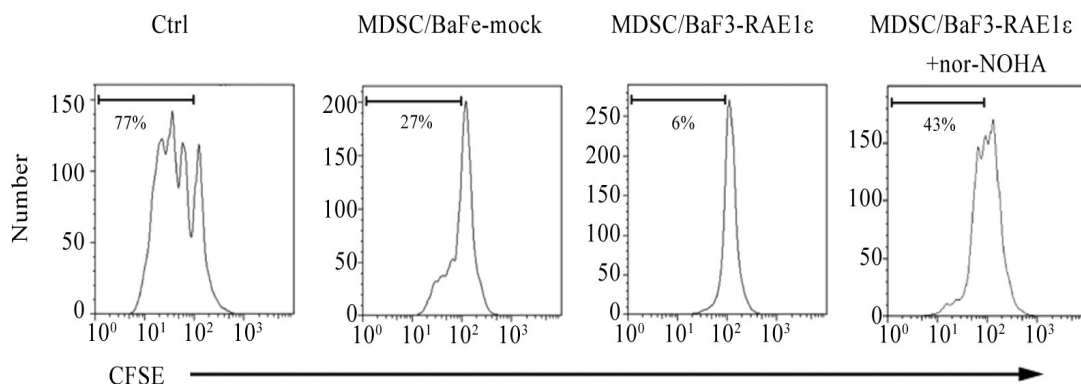


图5 各组 MDSC 对 CD8<sup>+</sup> T 细胞的抑制活性  
Fig. 5 Suppressive activities of the MDSCs for CD8<sup>+</sup> T cell in various groups



### 3 讨论

NKG2D 是 C 型凝集素超家族中的一员, 是由 NK、CD8<sup>+</sup> T 细胞和某些  $\gamma\delta$ T 细胞亚群表达的一种活化型受体<sup>[10]</sup>。NKG2D 配体主要在大多数上皮源性肿瘤细胞上表达, 在正常细胞上极少表达<sup>[2]</sup>。NKG2D 配体与 NKG2D 结合后会给 NK 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞提供活化信号, 促进 NK 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞杀伤效应, 在抗肿瘤免疫中发挥着重要作用<sup>[11-12]</sup>。然而, 肿瘤浸润部位的杀伤细胞通常低表达 NKG2D, 且功能下降。肿瘤细胞可通过多种机制逃逸 NKG2D 通路介导的杀伤效应, 如 NKG2D 配体从肿瘤细胞表面脱落形成可溶性 NKG2D 配体, 可溶性 NKG2D 配体与 NKG2D 结合后促进 NKG2D 的内化和降解, 从而降低效应细胞表面 NKG2D 的表达水平<sup>[3]</sup>; 可溶性 NKG2D 配体能够导致 NK 细胞和 T 细胞表面 CD3 分子  $\zeta$  信号接头蛋白丢失, 抑制 NK 细胞和 T 细胞活化<sup>[13]</sup>。与此相一致, 有研究<sup>[14-15]</sup>报道在侵袭性乳腺癌和卵巢癌中, 可溶性 NKG2D 配体的表达水平与疾病预后呈负相关, 即可溶性 NKG2D 配体表达水平越高, 疾病预后越差。另外, 肿瘤细胞表面持续性 NKG2D 配体的刺激也可下调 NKG2D 的表达, 从而损害效应细胞的杀伤效应<sup>[4]</sup>。

本课题组前期研究<sup>[8-9]</sup>成功构建了表达小鼠 RAE1 $\epsilon$  (NKG2D 的配体之一) 的 BaF3 细胞 (BaF3-RAE1 $\epsilon$  细胞) 及不表达 RAE-1 $\epsilon$  的 BaF3 细胞 (BaF3-mock 细胞) 株, 将 BaF3-mock 细胞和 BaF3-RAE1 $\epsilon$  细胞注射小鼠后发现, 与 BaF3-mock 注射鼠相比, BaF3-RAE1 $\epsilon$  注射鼠脾和外周血中 MDSC 的比例和绝对数均出现了明显的增高; 并且 BaF3-RAE1 $\epsilon$  注射鼠的脾 MDSC 分泌更高水平的 IL-10 和精氨酸酶, 对 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖的抑制作用更为明显。因此, 本研究提出了肿瘤细胞通过表达 NKG2D 配体诱导 MDSC 的产生, 从而参与免疫逃逸的新机制。

然而, 在体外用 BaF3-mock 和 BaF3-RAE1 $\epsilon$  分别刺激结肠癌细胞株 CT26 成瘤小鼠来源的 MDSC 后发现, 与 BaF3-mock 相比, BaF3-RAE1 $\epsilon$  只能诱导高水平 IL-10 的分泌, 而不能诱导精氨酸酶的活性增强<sup>[9]</sup>。本研究认为体内与体外结果不一致的可能性有两个: 一是 BaF3-RAE1 $\epsilon$  在体内间接促进 MDSC 精氨酸酶活性增高; 二是不同肿瘤来源的 MDSC 对 BaF3-RAE1 $\epsilon$  的反应不同。因此, 本研究用 BaF3-RAE1 $\epsilon$  体外刺激乳腺癌细胞株 4T1 成瘤小鼠来源的 MDSC, 检测其功能变化。结果发现, 与 BaF3-mock

细胞相比, BaF3-RAE1 $\epsilon$  细胞可以促进 4T1 成瘤鼠来源的 MDSC 精氨酸酶活性上调, 但不能诱导 IL-10 分泌增高。这一结果提示尽管 BaF3-RAE1 $\epsilon$  具有直接促进 MDSC 高分泌 IL-10 和精氨酸酶的能力, 但不同肿瘤来源的 MDSC 对 BaF3-RAE1 $\epsilon$  的反应不尽相同。已有的研究<sup>[16]</sup>表明, MDSC 可以通过分泌精氨酸酶直接抑制 T 细胞的功能。本研究检测了经 BaF3-RAE1 $\epsilon$  刺激后的 MDSC 对活化 T 细胞增殖的影响, 发现 BaF3-RAE1 $\epsilon$  刺激后的 MDSC 抑制 T 细胞增殖的能力明显增强; 在加入精氨酸酶抑制剂后 MDSC 对 T 细胞的抑制作用下降, 提示确实是精氨酸酶介导了 MDSC 对 T 细胞的负向调节作用。此外, 本研究还检测了 BaF3-RAE1 $\epsilon$  对 4T1 成瘤小鼠来源 MDSC 的表型影响, 结果发现与 BaF3-mock 细胞相比, BaF3-RAE1 $\epsilon$  并没有改变 MDSC 表面 CD40、CD80、F4/80 和 CD11c 分子的表达水平, 这一结果与本课题组前期研究中 BaF3-RAE1 $\epsilon$  成瘤小鼠体内的 MDSC 未发现表型变化的结果是一致的。

总之, 本研究发现表达 NKG2D 配体 RAE1 $\epsilon$  的 BaF3-RAE1 $\epsilon$  细胞在体外能够促进 4T1 原位肿瘤模型来源的 MDSC 精氨酸酶活性上调并增强其对 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖的抑制作用, 为深入研究 NKG2D 配体对不同肿瘤来源的 MDSC 功能影响提供了实验依据。

### [参考文献]

- [1] ZHANG J, BASHER F, WU J D. NKG2D ligands in tumor immunity: two sides of a coin[J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 6: 97: 1-7 [2017-04-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4349182>. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00097.
- [2] LANIER L L. NKG2D receptor and its ligands in host defense[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3 (6): 575-582. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0098.
- [3] GROH V, WU J, YEE C, et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation[J]. *Nature*, 2002, 419 (6908): 734-738. DOI:10.1038/nature 01112.
- [4] OPPENHEIM D E, ROBERTS S J, CLARKE S L, et al. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6 (9): 928-937. DOI:10.1038/ni1239.
- [5] GABRILOVICH D I, NAGARAJ S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9 (3): 162-174. DOI: 10.1038/nri2506.
- [6] 刘秋燕, 曹雪涛. MDSCs 与肿瘤免疫逃逸[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16 (4): 319-324. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.001.
- [7] XIA S, SHA H, YANG L, et al. Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> myeloid-derived suppressor cells suppress inflammation and promote insulin sensitivity

- in obesity [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (26): 23591-23599. DOI: 10.1074/jbc.M111.237123.
- [8] QIAN L, JI M C, PAN X Y, et al. Construction of a plasmid for co-expression of mouse membrane-bound form of IL-15 and RAE-1 $\epsilon$  and its biological activity [J]. *Plasmid*, 2011, 65 (3): 239-245. DOI: 10.1016/j.plasmid.2011.02.004.
- [9] QIAN L, LIU Y, WANG S Q, et al. NKG2D ligand Rael $\epsilon$  induces generation and enhances the inhibitor function of myeloid-derived suppressor cells in mice [J/OL]. *J Cell Mol Med*, 2017, Epub ahead of print[2017-04-26]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.13124/abstract> DOI:10.1111/jcmm.13124.
- [10] RAULET D H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3 (10): 781-790. DOI:10.1038/nri1199.
- [11] CERWENKA A, BARON J L, LANIER L L. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (20): 11521-11526. DOI: 10.1073/pnas.201238598.
- [12] DIEFENBACH A, JENSEN E R, JAMIESON A M, et al. Rael and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity [J]. *Nature*, 2001, 413 (6852): 165-171. DOI:10.1038/35093109.
- [13] HANAOKA N, JABRI B, DAI Z, et al. NKG2D initiates caspase-mediated CD3zeta degradation and lymphocyte receptor impairments associated with human cancer and autoimmune disease [J]. *J Immunol*, 2010, 185 (10): 5732-5742. DOI:10.4049/jimmunol.1002092.
- [14] MADJD Z, SPENDLOVE I, MOSS R, et al. Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma [J/OL]. *Cancer Immunol*, 2007, 7: 17 [2017-04-26]. <http://archive.cancerimmunity.org/v7p17/070817.htm>. PMID: PMC2935745
- [15] MCGILVRAY R W, EAGLE R A, ROLLAND P, et al. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127 (6): 1412-1420. DOI: 10.1002/ijc.25156.
- [16] DE VLAEMINCK Y, GONZALEZ-RASCON A, GOYVAERTS C, et al. Cancer-associated myeloid regulatory cells [J/OL]. *Front Immunol*, 2016, 7 (7): 113: 1-9[2017-04-26]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00113>. DOI:10.3389/fimmu.2016.00113.

[收稿日期] 2017-03-15

[修回日期] 2017-05-13

[本文编辑] 宋关鸿

· 读者·作者·编者·

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》关于抵制学术不端行为的声明

中国广大科技工作者坚持严谨求实、刻苦钻研、勇于创新的科学精神,取得了举世瞩目的科技成果,代表了中国科技工作者的主流。然而,近年来少数科技人员出现了抄袭剽窃、伪造数据、篡改数据、虚假署名、一稿多投等学术不端行为,影响了科技期刊的正常出版工作,给作者及其所在单位甚至我们国家带来非常负面的影响。《中国肿瘤生物治疗杂志》是中国肿瘤生物治疗领域惟一的高级学术刊物,一贯坚持“学术至上,质量第一”的原则,坚决抵制学术不端行为,努力维护学术纯洁性。为维护学术道德、保证期刊质量和学术声誉,本刊特作以下声明:

1. 作者投稿时须作出稿件无学术不端行为的声明。
2. 稿件审查过程中,本刊编辑部将采用“学术不端文献检测系统”,通过大量国内外学术文献的全文比对,对稿件进行学术不端行为的检查。
3. 本刊已加入“《中国学术文献网络出版总库》删除学术不端文献系统”,该系统协助本刊对已发表论文的学术不端行为进行全面复核。
4. 已发表的论文一经查实有学术不端行为,本刊将立即删除,第一时间刊登撤销声明,终止该论文在各相关数据库、文摘库中的传播,尽快消除不良影响。同时,视情节轻重给该文作者以下处理:书面警告,通知作者所在单位,在本领域相关期刊间通报,2年内本刊不刊登有其署名的稿件,相关学术责任人(通信作者)署名的其他稿件延缓审稿和刊登等。

(本刊编辑部)