

不同条件下 NK 细胞在小鼠黑色素瘤内的浸润

嵇晶晶,包颖兰,于常华,崔 凤,吕慧芳,徐玉清

Infiltration by NK Cells in Melanoma under Different Conditions

Ji Jing-jing, Bao Ying-lan, Yu Chang-hua, Cui Feng, Lv Hui-fang, Xu Yu-qing

Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Abstract: **Objective** To compare the infiltration in melanoma models and cytotoxicity of natural killer cells activated by dendritic cells, IL-2 and IL-15. **Methods** Inoculating B16 Melanoma cells in C57BL/6 mice's back to establish subcutaneous models. NK cells labeled by DAPI were injected via the lateral tail vein. DC, IL-2 and IL-15 were given respectively. Tumor tissues were removed at different times after injection and processed for electron microscope and fluorescence microscope. Cytotoxicity was detected by MTT assay. **Results** Cytotoxicity of NK cells cultured with DCs was enhanced. NK cells had higher cytotoxicity when NK/DC ratio was 1:1 than when it was 10:1 ($P < 0.05$). NK cells and DCs were identified through electron microscope and necrosis of target cells was observed. Infiltration of NK cells was dose and time-dependent. More NK cells accumulated in tumors but not significantly when DCs were given compared to IL-2 or IL-15. **Conclusion** NK cells can be activated by DCs without exogenous cytokines. The activation between NK cells and DCs were related to their dose ratio.

Key words: NK; DC; IL-2; IL-15; Fluorescence Microscope

摘 要: **目的** 比较 DC 及 IL-2、IL-15 维持 NK 细胞体内活性的作用效果。 **方法** DAPI 标记的 NK 细胞输入负瘤小鼠体内,同时分别给予 DC、IL-2 及 IL-15,不同时间取肿瘤组织,荧光显微镜及电镜观察; MTT 法测 NK 杀伤活性。 **结果** DC 可增强 NK 杀伤活性, NK/DC 为 1:1 时 NK 细胞杀伤活性强于 NK/DC 为 10:1 时 ($P < 0.05$)。肿瘤组织内 NK 分布呈时间及剂量相关性, DC 组 NK 浸润数量多于 IL-2 组及 IL-15 组,但无明显差异 ($P > 0.05$)。 **结论** 24 小时内 DC 可维持并促进 NK 细胞活性,无需依赖外源性细胞因子。NK 与 DC 的相互作用与剂量相关。

关键词: NK; DC; IL-2; IL-15; 荧光显微镜

中图分类号: R739.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2007)06-0432-03

0 引言

NK 细胞 (natural killer cell, NK) 可直接杀伤肿瘤和病毒感染的靶细胞,对宿主自身正常细胞无杀伤作用。细胞因子 IL-2 及 IL-15 可调节其杀伤及分泌功能。DC 细胞 (dendritic cell, DC) 是机体内最强的抗原提呈细胞,可表达共刺激分子,分泌细胞因子,诱导初始免疫应答。NK 细胞通过直接作用或生物信号间的协同作用活化 DC, DC 又可促进 NK 分泌功能,诱导 CTL 反应^[1], 在肿瘤免疫治疗中发挥重要作用。本研究通过比较 IL-2、IL-15 及 DC 与 NK 细胞的作用效果,寻求 NK 细胞在肿瘤免疫治疗中发挥最佳效应的适用途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

rhIL-2 购自北京远策药业有限公司; rmIL-15, rmIL-4, rmGM-CSF 购自英国 Peprotech EC 公司; Dynabeads M450-CD8 购自美国 Dynal Biotech 公司; 4,6-联脒-2-苯基吲哚 DAPI, 购自美国 Sigma 公司。

1.2 动物模型的建立

C57BL/6 小鼠, 雄性, 18~22 g, 8~12 周龄 (购自哈医大二院动物实验中心)。培养小鼠黑色素瘤细胞株 B16 (购自上海坤肯细胞库), 小鼠背部皮下注射。

1.3 NK 细胞的体外培养及标记

将 C57BL/6 小鼠处死, 取出脾脏制成单细胞悬液, 裂解红细胞, 洗涤后置于 RPMI1640 培养基中, 加 rhIL-2 至 6 000 IU/ml, 于 37℃, 5%CO₂ 恒温培养箱中培养。第 3 天加入 Dynabeads 于 4:1 共同作用 20 min, 去除 CD8⁺ 细胞^[2]。加入新鲜 RPMI1640

收稿日期: 2007-01-05; 修回日期: 2007-02-26

基金项目: 黑龙江省攻关项目重点课题 GB05C401-03

作者单位: 150086 哈尔滨医科大学附属第二医院肿瘤内科

作者简介: 嵇晶晶 (1982-), 女, 硕士, 主要从事肿瘤的生物治疗

培养基,隔日给 rhIL-2。第 6、7 天加入 DAPI 50 mg/ml 于恒温培养箱中培养 3 h 后收集贴壁细胞备用。

1.4 DC 的体外培养

将 C57BL/6 小鼠处死,取四肢骨髓制成单细胞悬液,裂解红细胞,洗涤后置于 RPMI1640 培养基中,加入 10ng/ml rmGM-CSF,10ng/ml rmIL-4,于恒温培养箱中培养^[3]。隔天半量换液,培养 6~8 天收集细胞备用。

1.5 MTT 法测 NK 细胞杀伤活性

靶细胞为 B16 细胞。分四组: NK 细胞对照组; NK + IL-2 (1 000 IU/ml) 组; NK + IL-15 (10μg/ml) 组; NK + DC 组,NK 与 DC 比分别为 10 1,1 1,1 10。效靶比 5 1,10 1,20 1,设立效应细胞对照孔 (E),靶细胞对照孔 (T),反应孔 (E + T),每组设三个复孔,测定的 OD 值取三孔均值,按以下公式计算:

$$\text{NK 细胞杀伤活性}(\%) = (1 - \frac{4 \times \text{OD}_{E+T} - \text{OD}_E}{\text{OD}_T}) \times 100\%$$

1.6 黑色素瘤皮下模型内 NK 表达的测定

将 5 × 10⁶ 个 DAPI 标记的 NK 细胞通过鼠尾静脉注入负瘤小鼠体内,分别给予不同剂量的 IL-2,IL-15 及 DC,于 6h,12h,24h 将鼠处死,取瘤组织,做冰冻切片,荧光显微镜下观察;部分经 3 %戊二醛固定电镜观察。

1.7 统计学分析

应用 SPSS 统计软件处理数据,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 NK 细胞杀伤活性的比较

效靶比为 20 1 时实验组 NK 细胞的杀伤活性均强于对照组。NK DC 为 1 1 时,杀伤活性较 10 1 时有显著增强 (*P* < 0.05),而再加大 DC 的剂量杀伤率未见增强。NK DC 为 1 1 时 NK 杀伤活性较 IL-2 组及 IL-15 组有所提高,但无统计学意义 (*P* > 0.05),见表 1。

表 1 NK 细胞杀伤活性的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

Group (n=3)	E/ T 5 1	E/ T 10 1	E/ T 20 1
NK	14.80 ±4.9	23.81 ±4.38	32.54 ±3.88
NK + IL-2	26.43 ±4.23	29.34 ±4.07	46.49 ±3.08
NK + IL-15	31.52 ±5.77	40.10 ±3.44	51.44 ±2.79
NK DC 10 1	15.96 ±4.84	19.16 ±4.65	33.01 ±6.95
NK DC 1 1	38.35 ±3.54	43.29 ±3.26	55.22 ±2.57
NK DC 1 10	29.96 ±5.19	33.70 ±3.81	52.58 ±3.24

2.2 电镜观察结果

镜下肿瘤细胞周围可见 NK 细胞和 DC 细胞,

见图 1。DC 表面有较多树突状突起,胞质内有溶酶体颗粒,细胞器较少,胞核形状不规则。NK 表面有少量指状突起,胞质较多,细胞核呈卵圆形,核内染色质丰富,异染色质多分布在边缘。肿瘤细胞体积较大,约 30~40μm,细胞表面可见密集分布的微绒毛,胞质内有较多的线粒体。图 1 可见 DC 的伪足正伸入瘤细胞体内,DC 突起与瘤细胞质膜融合。靶细胞线粒体肿胀,胞质中出现空泡变性,核染色质破碎,最终溶解坏死。荧光显微镜下,肿瘤组织内可见淡蓝色荧光的 DAPI 标记的 NK 细胞,见图 2。

2.3 NK 细胞在肿瘤组织内的浸润与时间的相关性,见图 3。NK 细胞在肿瘤组织内的浸润呈时间依赖性。

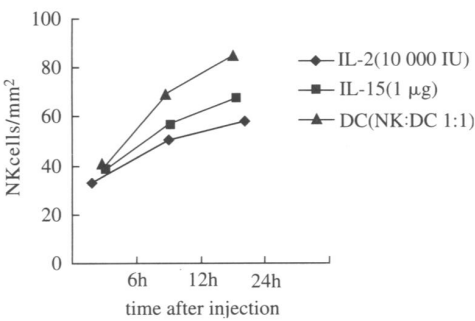


图 3 NK 细胞在肿瘤组织的浸润与时间的关系

2.4 NK 细胞在肿瘤组织内的浸润与剂量的关系,见图 4。

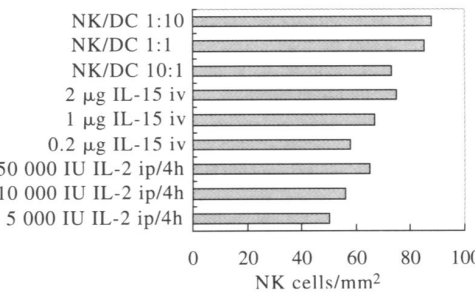


图 4 NK 细胞在肿瘤组织内的浸润呈剂量相关性

Statistical analysis: 5 000IU IL-2 vs 50 000IU IL-2 : *P* < 0.05; 0.2 μg IL-15 vs 2 μg IL-15: *P* < 0.05; NK DC 1 1 vs NK DC 10 1 : *P* < 0.05; NK DC 1 1 vs NK DC 1 10 : *P* > 0.05

3 讨论

NK 细胞是大颗粒淋巴细胞,可与肿瘤细胞直接接触,通过穿孔素依赖机制介导靶细胞溶解坏死。在实验中观察到 NK 细胞可浸润到肿瘤组织内。有研究发现在肺、肝等脏器的转移瘤中也可见 NK 聚集,且要多于正常组织。Yang Qin^[2] 在实验中发现 NK 细胞在肿瘤组织内的浸润受到肿瘤组织形态的

影响,疏松的肿瘤组织更适合于 NK 细胞的浸润。NK 细胞静脉注入 5 天后,观察到肺转移瘤有所缩小。腹腔内注射 NK 细胞及 PEG-IL-2 可观察到腹腔内转移瘤较前缩小,而肺转移瘤则无明显变化。看来,NK 细胞主要依赖于相互接触来识别并消灭靶细胞。

以往的研究认为,NK 细胞的存活与活化需要依赖于细胞因子。长期培养的骨髓基质细胞上清中含有 IL-15,而未检测到 IL-2,故 IL-2 可能仅参与外周血 NK 细胞的发育,而 IL-15 极有可能是造血干细胞分化为 NK 细胞的天然调节因子^[4]。那细胞因子的存在是 NK 细胞存活的必需条件么?我们的实验结果表明,无外源性细胞因子时 DC 可促进 NK 杀伤活性,观察 24 小时内,诱导 NK 细胞转移到肿瘤组织内,杀伤肿瘤细胞,且其作用效果与细胞因子相似。Ferlazzo 等^[5]将 DC 与外周血来源的 NK 细胞共同培养 7 天,发现 NK 细胞有增殖,而且检测到 IFN- γ 的分泌。将 DC 与 IL-2 激活的 NK 细胞共同培养,可得到类似结果。故将 NK 与 DC 共同培养,可维持并促进 NK 细胞活性,而无需依赖外源性细胞因子。

NK 与 DC 共同培养,比例不同作用效果也不同。实验结果表明,NK 与 DC 的低比率可增强 DC 细胞的功能,而大剂量 NK 反而抑制其相互作用。一方面,NK 细胞分泌 IFN γ 可促进 DC 细胞成熟,另一方面,NK 细胞可杀伤非成熟 DC 细胞(iDC)^[6],其溶解杀伤作用受到 NKp30 受体的调解。故 NK 细胞与 DC 细胞按适当比例混合共同培养才可以发挥最佳免疫效应。

Kim 发现与 NK 细胞共同培养时,肿瘤细胞致敏的 DC 细胞比未经处理的 DC 细胞分泌更多的 IFN γ ^[7],IFN γ 在抗肿瘤反应中起重要作用。预先

接种肿瘤细胞致敏的 DC 可激活 NK 细胞,引发 CTL 应答,抑制肿瘤细胞的转移。在去除 NK 细胞的负瘤小鼠体内接种预先致敏的 DC,肿瘤细胞的转移未受抑制。由此可见,在 DC 引起的抗肿瘤免疫应答中,NK 细胞是必不可少的,将 NK 与 DC 疫苗结合将是肿瘤免疫治疗研究的一个新方向。

(本文图 1,2 见插页 2)

参考文献:

- [1] Kalinski P, Mailliard RB, Giermasz A, et al. Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5(10):1303-1315.
- [2] Yang Q, Hokland ME, Bryant JL, et al. Tumor-localization by adoptively transferred, interleukin-2-activated NK cells leads to destruction of well-established lung metastasis[J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(4):512-519.
- [3] Son YI, Egawa S, Tatsumi T, et al. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells[J]. *J Immunol Methods*, 2002, 262(1-2):145-157.
- [4] Vosshenrich CA, Ranson T, Samson SI, et al. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo[J]. *J Immunol*, 2005, 174(3):1213-1221.
- [5] Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, et al. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells[J]. *J Exp Med*, 2002, 195(3):343-351.
- [6] Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor[J]. *Blood*, 2005, 106(2):566-571.
- [7] Kim A, Noh YW, Kim KD, et al. Activated natural killer cell-mediated immunity is required for the inhibition of tumor metastasis by dendritic cell vaccination[J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36(5):428-443.

[编辑:刘红武;校对:张 麟]

肝癌新生血管的形态学异常及其临床意义

(正文见 449 页)

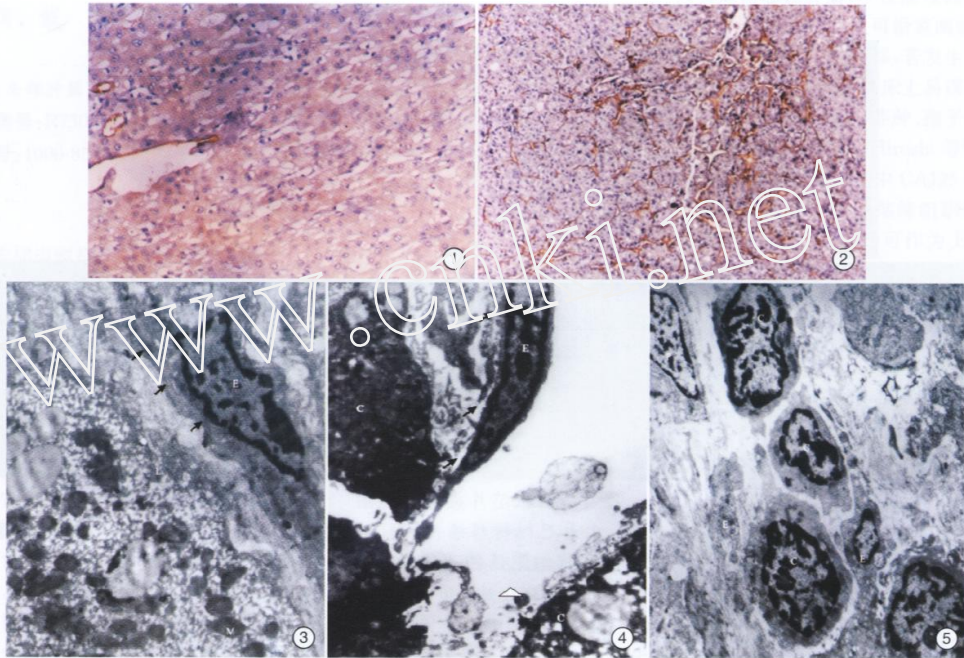


图 1 癌旁肝组织中 CD34 的表达(SABC × 400)

图 2 HCC 组织中 CD34 的表达(SABC × 400)

图 3 癌旁肝组织微血管超微结构(× 8000) E: 内皮细胞; L: 肝细胞; M: 线粒体; ↑: 基底膜

图 4 HCC 组织微血管超微结构(× 6000) E: 内皮细胞; C: 癌细胞; ↑: 基底膜; △: 内皮细胞连接中断

图 5 HCC 组织微血管内微血栓形成(× 5000) E: 内皮细胞; C: 癌细胞; P: 血管周细胞

不同条件下 NK 细胞在小鼠黑色素瘤内的浸润

(正文见 432 页)

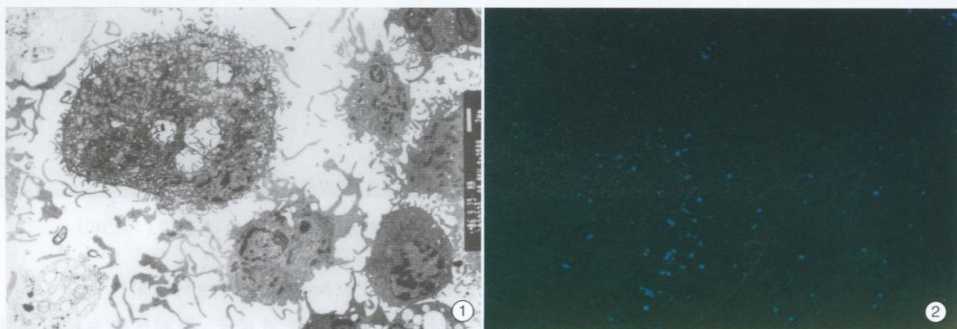


图 1 NK 细胞及 DC 聚集在靶细胞周围, 靶细胞溶解坏死(透射电镜 × 2500)

图 2 荧光显微镜下可见 NK 细胞分布在肿瘤组织内部(免疫荧光法 × 100)