

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.28.006

文章编号: 1005-8982 (2018) 28-0033-06

临床研究 · 论著

## 细胞因子预处理对体外扩增 NK 细胞活性的影响 \*

申重阳<sup>1</sup>, 幸倚帆<sup>2</sup>, 谭小虎<sup>2</sup>, 陈勇军<sup>2</sup>

(1. 成都中医药大学 基础医学院, 四川 成都 611137; 2. 成都康景生物科技有限公司, 四川 成都 611130)

**摘要: 目的** 采集健康志愿者和肿瘤患者的外周血单个核细胞 (PBMCs) 进行自然杀伤细胞 (NK) 的扩增培养, 培养过程中白细胞介素 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 以不同组合及不同方式添加, 探究体外培养 NK 细胞的细胞因子最佳组合和添加方式。**方法** 根据细胞因子组合及添加方式的不同, 将 NK 培养分为 3 组。A 组: IL-2+IL-15 组, B 组: IL-2+IL-12+IL-15+IL-18 组, C 组: IL-12+IL-15+IL-18 预处理 /IL-2 组。培养过程中第 7 天和第 14 天分别取样统计各组细胞因子培养后的细胞数量, 并使用流式细胞仪检测 NK 细胞表面分子表达; 将 NK 细胞与 K562 细胞共培养, 然后 ELISA 测定 NK 细胞的 IFN- $\gamma$  释放量, CFSE/7-AAD 法检测 NK 细胞的杀伤活性。**结果** 3 组不同的培养方式所得细胞的扩增倍数差异无统计学意义, 随着培养时间的增加, NK 细胞的比例也逐渐上升, 3 组间 NK 细胞比例差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。NK 细胞表面 CD25 (IL-2R  $\alpha$ ) 的表达情况比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), C 组的阳性率高于 A 和 B 组。IFN- $\gamma$  的释放量和 NK 细胞的体外杀伤活性一致, 均为 C 组高于 A 和 B 组。对肿瘤患者的 NK 细胞, C 组的细胞因子添加方式也能很好的进行扩增 (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞比例大于 50%)。**结论** C 组中的细胞因子预处理方式能够高效扩增 NK 细胞, 与 A 或 B 组联合添加的方式比较, 该方式能显著激活 NK 细胞的杀伤活性。

**关键词:** 外周血单个核细胞; 自然杀伤细胞; 细胞因子预处理

**中图分类号:** R392.12

**文献标识码:** A

## Pretreatment with cytokines promotes cytotoxic activity of NK cells\*

Chong-yang Shen<sup>1</sup>, Yi-fan Xing<sup>2</sup>, Xiao-hu Tan<sup>2</sup>, Yong-jun Chen<sup>2</sup>

(1. School of Basic Medical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 611137, China; 2. Chengdu Konjin Co., Ltd, Chengdu, Sichuan 611130, China)

**Abstract: Objective** To obtain the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors and tumor patients and culture natural killer (NK) cells with addition of IL-2, IL-12, IL-15 and IL-18 in various combinations and different ways so as to explore a more effective method for the *in vitro* expansion of NK cells.  
**Methods** Three groups of cytokine combinations and treatment patterns were established for expansion of NK cells from PBMCs, including the group A (IL-2+IL-15), the group B (IL-2+IL-12+IL-15+IL-18), and the group C (pretreatment with IL-12+IL-15+IL-18 followed by IL-2 treatment). The total cell expansion fold and proportion of NK subsets were detected on the 7th and 14th day. Meanwhile, the CD25 expression of NK cells was examined by flow cytometry. Then the IFN- $\gamma$  production and cytotoxicity of NK cells were determined by ELISA and CFSE/7-AAD staining respectively.  
**Results** The expansion fold had no significant difference among the 3 groups. The proportion of NK cells was increasing during the expansion process, which showed a similar pattern among the 3 groups ( $P > 0.05$ ). However, a progressive increase of CD25<sup>+</sup> NK cells was observed in the groups C compared to the group A and the group B ( $P < 0.05$ ). The pretreatment with IL-12, IL-15 and IL-18 for 16 h in cultures clearly stimulated more IFN- $\gamma$  secretion by NK cells and enhanced NK-mediated cytotoxicity. In addition, NK cells of the

收稿日期: 2018-03-25

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81603478); 成都中医药大学校基金 (No: ZRQN1612)

[通信作者] 陈勇军, E-mail: 157044501@qq.com; Tel: 18782902660

tumor patients could also be efficiently expanded using pretreatment method (the proportion of NK cells was over 50%). **Conclusions** Cytokine pretreatment method can induce highly proliferative responses and enhance NK-mediated cytotoxicity compared with the classical protocols

**Keywords:** PBMCs; natural killer cell; cytokine pretreatment

自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 是机体重要的免疫细胞, 约占外周血单个核细胞总数的 10% ~ 20%, 主要分布在外周血、淋巴结、脾、骨髓中, 可以通过多种趋化因子作用迁移到炎症部位。NK 细胞可以不依赖于树突状细胞的抗原递呈作用, 清除 MHC-I 分子阴性的肿瘤细胞以及被病毒感染的细胞。因此 NK 细胞逐渐成为肿瘤免疫治疗领域的热点, 用于控制肿瘤细胞的生长和转移<sup>[1]</sup>。然而由于缺乏有效的 NK 细胞体外扩增手段, 影响 NK 细胞在肿瘤过继细胞免疫治疗中的治疗效果。因此, 应用更加有效的方法提高 NK 细胞的数量及活性是临床急需解决的问题。

目前常用的 NK 细胞体外扩增方式为使用多种细胞因子的联合刺激。白细胞介素 (interleukin, IL) IL-2+IL-15 的联合刺激是体外扩增 NK 细胞的常用方案, IL-15 可以维持 NK 细胞的分化和扩增, 抵抗 IL-2 介导的 NK 细胞凋亡<sup>[2-3]</sup>。IL-2 可以促进 NK 前体细胞和 NK 成熟细胞的生长, 增加 NK 细胞分泌的细胞溶解酶的表达量, 增强 NK 细胞毒性<sup>[4]</sup>。此外, IL-12 和 IL-18 也常用于 NK 细胞的体外培养。不同于 IL-2 和 IL-15, IL-12 通过促进 NK 细胞释放干扰素  $\gamma$  (interferon gamma, IFN- $\gamma$ ) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ), 从而达到抑制肿瘤血管新生以及通过肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 和细胞凋亡因子配体 (fas ligand, FasL) 介导肿瘤细胞凋亡的效果<sup>[5]</sup>; IL-18 能够通过上调 NK 细胞表面 IL-12 受体 (IL-12 receptor, IL-12R) 的表达, 增强 IL-12 效果<sup>[6-7]</sup>。然而如何优化细胞因子组合方式、添加时间点进而使得 NK 细胞的体外扩增达到最佳效果, 现有的研究并没有一致的结论<sup>[8-10]</sup>。本研究选取 IL-2、IL-12、IL-15 和 IL-18 4 种细胞因子的 3 种不同组合和添加方式, 对健康志愿者或肿瘤患者的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 进行体外培养, 并分析所得 NK 细胞的扩增倍数、细胞表型以及对肿瘤细胞的杀伤活性, 以找到一种最有效的 NK 细胞体外培养方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

RPMI 1640 培养基和胎牛血清 (FBS) 购自美国

Thermo Fisher 公司, ALyS505NK-AC、ALyS505NK-EX 培养基和 CD16 抗体购自日本株式会社细胞科学研究所, rhIL-2、rhIL-12、rhIL-15、rhIL-18 购自美国 Pepro Tech 公司, 流式抗体 CD3-FITC、CD25-PE、CD45-PerCP、CD56-PE 购自美国 BD Biosciences 公司, CFSE 购自日本同仁化学研究所, 7-AAD 购自美国 Bio Legend 公司, 淋巴细胞分离液购自天津市瀚洋生物制品科技有限责任公司, 肿瘤细胞株 K562 购自上海中科院细胞库, ELISA 试剂盒购自美国 eBioscience 公司。

### 1.2 细胞培养

健康志愿者 5 例, 年龄 26 ~ 43 岁。霍奇金淋巴瘤患者 2 例, 年龄分别为 46 岁和 59 岁。采集外周血 50 ml, 使用淋巴细胞分离液分离 PBMCs。使用 NK 细胞培养基进行培养, 细胞因子添加方式如下: A 组 (IL-2+IL-15 联合添加), 第 1 天, 用 CD16 抗体包被的 T25 培养瓶进行培养, 加入 7 ml NK 细胞初始培养基 (含 10% 灭活人自体血清的 ALyS505NK-AC 培养基, 并加入 rhIL-2 1 000 u/ml、rhIL-15 20 ng/ml); 每 3 天补液, 第 14 天, 收集细胞进行后续表型和功能实验。B 组 (IL-2+IL-12+IL-15+IL-18 联合添加), 其他操作过程与 A 组相同, rhIL-12 添加浓度为 10 ng/ml, rhIL-18 添加浓度为 50 ng/ml。C 组 (IL-12+IL-15+IL-18 预处理 /IL-2): 先使用细胞因子 rhIL-12 (10 ng/ml) + rhIL-18 (50 ng/ml) + rhIL-15 (1 ng/ml) 预处理 16 h, 然后 PBS 洗涤 2 次, 之后再按照与 A 组相同的方式进行后续培养, 只添加 rhIL-2 (1 000 u/ml)。

肿瘤细胞株 K562 用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液, 于 37℃, 5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 1.3 检测细胞表型

收集培养 7 和 14 d 的各组 NK 细胞, 将细胞浓度调为  $1 \times 10^7$  个 /ml, 标志荧光抗体 CD3-FITC、CD45-PerCP、CD56-PE, 各组设同型 IgG 阴性对照, 4℃避光孵育 30 min 后, PBS 漂洗 2 次, 然后使用流式细胞仪进行检测分析。对于 CD25 的检测, 细胞孵育 CD25-PE 荧光抗体, 方法同上。

### 1.4 ELISA 检测 IFN- $\gamma$ 的释放

取培养 14 d 后的 NK 细胞作为效应细胞, K562 细

胞为靶细胞,按照 10 : 1 的比例在 96 孔板中进行共培养, 每组 NK 细胞做 3 个复孔。共培养 24 h 后收集培养上清, 按照试剂盒说明书操作方法进行检测。

### 1.5 NK 体外杀伤 K562 肿瘤细胞实验

NK 细胞培养至第 14 天时, 收集细胞进行 CFSE 标记。主要操作步骤如下: 收集 NK 细胞并计数, 使用 CFSE 标记缓冲液 (生理盐水 +1% FBS) 洗涤 1 次, 并重悬细胞 (细胞密度为  $1 \times 10^7$  个/ml); 加入 CFSE (终浓度为 200 nmol), 置于 37℃ 细胞培养箱孵育 15 min, 生理盐水洗涤 2 次, 并用 NK 细胞培养基重悬细胞。在 6 孔板中加入 0.5 ml K562 细胞 ( $1 \times 10^5$  个/孔), 然后按比例 (5 : 1、10 : 1 和 20 : 1) 加入标记好的 NK 细胞 (总体积为 1 ml), 同时设置只有 NK 细胞或 K562 细胞的对照孔, 置于培养箱共培养 4 h。

收集共培养的细胞, 使用 7-AAD 染色法检测 K562 细胞的死亡率, 主要操作如下: 离心收集细胞, 弃上清, 加入 100  $\mu$ l 染色缓冲液重悬细胞, 然后加入 5  $\mu$ l 7-AAD 混匀, 室温避光放置 15 min。同时设置不加 7-AAD 的阴性对照。然后加入 400  $\mu$ l 染色缓冲液, 使用流式细胞仪进行检测。

### 1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 方差分析差异有统计学意义后, 再采用 LSD-*t* 检验进行两两比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞因子预处理对 NK 细胞扩增能力的影响

分别在细胞培养过程中的第 7 天和第 14 天取样, 离心弃上清, 加入适量 PBS 重悬后用血细胞计数板计数。计数统计结果见图 1A 所示, 在第 7 天时,

A、B、C 组中细胞扩增倍数分别为 ( $25.726 \pm 5.057$ )、( $26.156 \pm 6.106$ ) 和 ( $29.471 \pm 7.616$ ), 各组间差异无统计学意义 ( $F = 0.313, P = 0.743$ )。第 14 天时, 3 组细胞扩增倍数分别为 ( $92.637 \pm 10.522$ )、( $104.939 \pm 12.414$ ) 和 ( $114.361 \pm 15.825$ ), 虽然 C 组的细胞扩增倍数略高于 A 和 B 组, 但是组间差异无统计学意义 ( $F = 2.073, P = 0.207$ )。由于现有的 NK 体外扩增方法得到的细胞除了 NK 以外, 还有一定数量的 T 细胞和 NKT 细胞, 因此使用流式细胞仪的方法检测样品中 CD3 和 CD56 的表达情况, 并对其中 NK 细胞 (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) 比例进行了统计学分析, 结果显示随着培养时间的延长, 各组培养方式下 NK 细胞比例也不断增加, 第 7 天时 NK 细胞比例分别为 ( $31.048 \pm 4.428$ )%、( $37.965 \pm 2.560$ )% 和 ( $40.277 \pm 5.229$ )%, 第 14 天时 NK 细胞比例分别为 ( $54.375 \pm 6.803$ )%、( $57.033 \pm 6.773$ )% 和 ( $62.697 \pm 6.232$ )% (见图 1B), 但是各组间 NK 细胞比例差异无统计学意义 ( $F = 3.879$  和  $1.241, P = 0.083$  和  $0.354$ )。以上结果表明, 细胞因子预处理的培养方式 (C 组) 能较好的扩增 NK 细胞, 与传统培养方式 (A 和 B 组) 的扩增能力相当。

### 2.2 细胞因子预处理对 NK 细胞活性的影响

在第 7 天时取样进行流式细胞仪检测, 细胞因子预处理的方式 C 组可以提高 CD25 (IL-2R $\alpha$ ) 的表达 (阳性率为 69.1%), 而 A 和 B 组培养方式几乎不能诱导 CD25 的表达 (见图 2A)。ELISA 检测 NK 细胞与靶细胞 (K562) 共培养后上清中 IFN $\gamma$  的释放情况, 结果显示各组细胞的 IFN $\gamma$  释放量分别为 ( $43.2 \pm 8.7$ )、( $63.4 \pm 10.3$ ) 和 ( $137.4 \pm 17.5$ ) ng/ml, 经单因素方差分析各组间差异有统计学意义 ( $F = 32.490, P = 0.001$ )。进一步两两比较表明, 与 A 和 B 组比较, C 组中细胞 IFN $\gamma$  释放量较多 ( $t = 6.982$  和  $5.151$ ,

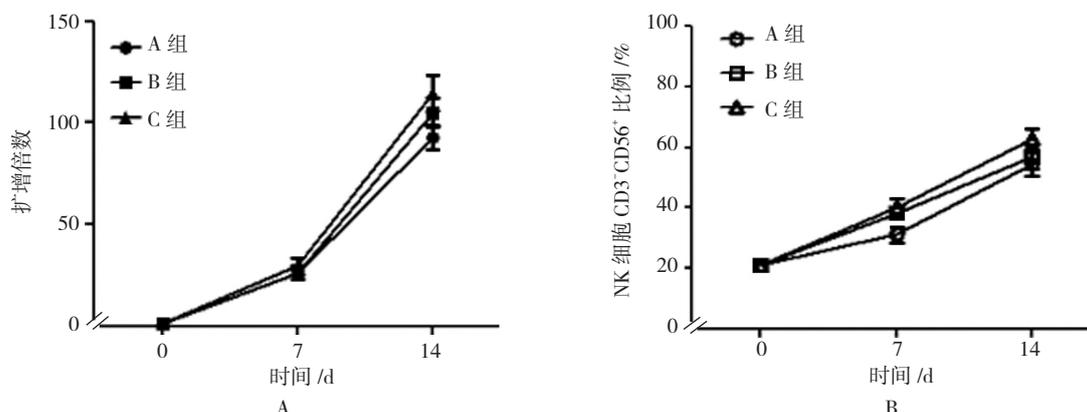


图 1 3 种培养方式的扩增倍数和 NK 细胞比例

$P=0.002$  和  $0.007$ ), 而 A 和 B 组细胞间  $IFN\ \gamma$  释放量无明显变化 ( $t=2.609, P=0.060$ ) (见图 2B)。

### 2.3 细胞因子预处理对 NK 细胞杀伤能力的影响

采用体外杀伤实验进一步证实 NK 细胞的活性。首先, 使用 CFSE 标记效应细胞 (Effector, E), 结果显示 200 nmol 的 CFSE 可以很好的标记 NK 细胞 (阳性率为  $>99\%$ ), 并且几乎不会对 NK 细胞产生毒性 (见图 3A)。然后, 将标记过的 NK 细胞与靶细胞 K562 (Target, T) 按照 5 : 1、10 : 1 和 20 : 1 的比例共培养, 并通过 7-AAD 染色的方法统计 K562 细胞的死亡率, C 组的 NK 细胞杀伤 K562 细胞的流式细胞仪检测结果见图 3B (E : T=5 : 1)。对各组细胞在不同比例下的杀伤结果进行统计学分析, 显示预处理方式得到

的 NK 细胞的杀伤能力最强, 各比例下的杀伤率分别为  $(27.967 \pm 9.434)\%$ 、 $(65.233 \pm 9.069)\%$  和  $(82.967 \pm 6.804)\%$ , 并且在 10 : 1 和 20 : 1 的比例时, 各组细胞杀伤率之间差异有统计学意义 ( $F=8.416$  和  $9.191, P=0.018$  和  $0.015$ ) (见图 3C)。

### 2.4 肿瘤患者 NK 细胞扩增效果

从 2 例霍奇金淋巴瘤患者的外周血中分离 PBMCs, 然后使用细胞因子预处理的方法进行 NK 细胞的扩增培养, 14 d 后取样分析 NK 细胞的得率。流式细胞仪分析结果显示 (见图 4), 2 例肿瘤患者 PBMCs 均能成功扩增 NK 细胞 ( $CD3^+CD56^+$ ), 其阳性率分别为  $62.63\%$  和  $50.24\%$ , 而其他细胞 (T 细胞和 NKT 细胞) 的比例较低。

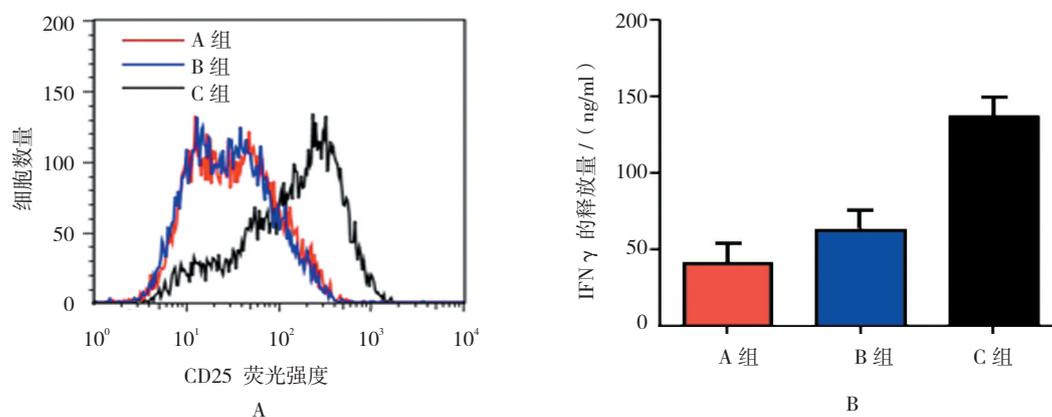


图 2 3 种培养方式下 CD25 的表达及 NK 细胞释放  $IFN\ \gamma$  的比较

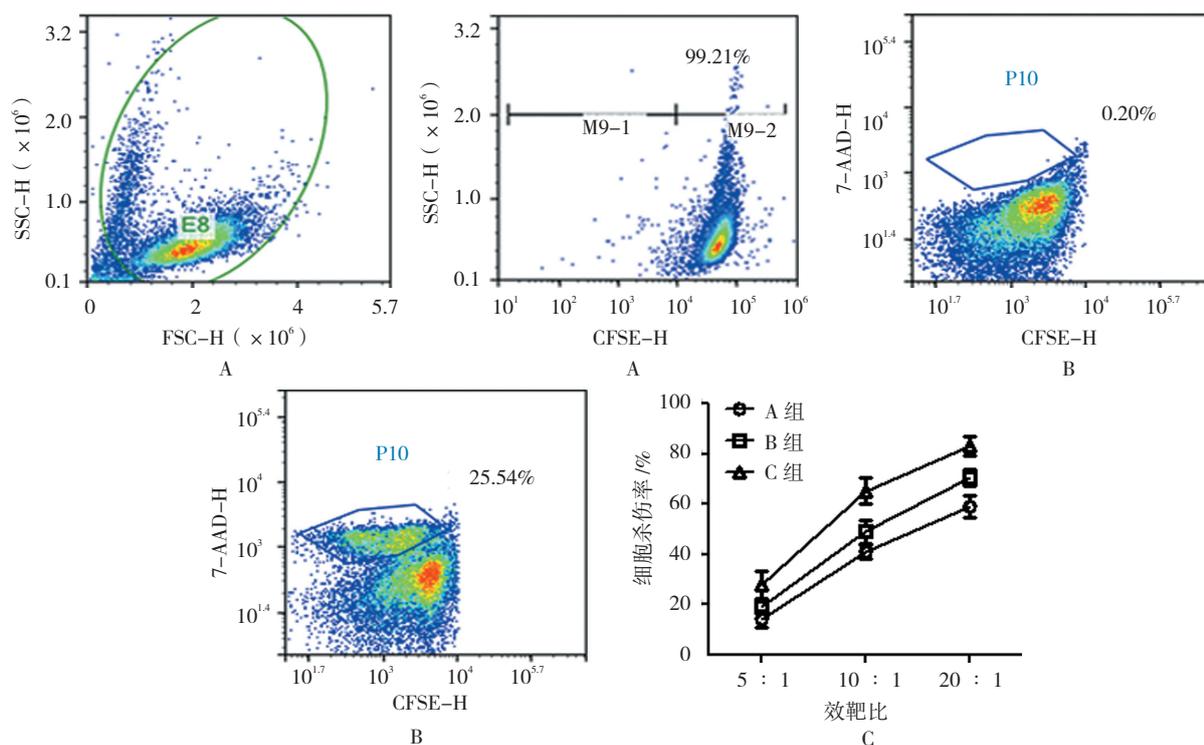


图 3 3 种培养方式下 NK 细胞杀伤活性的比较

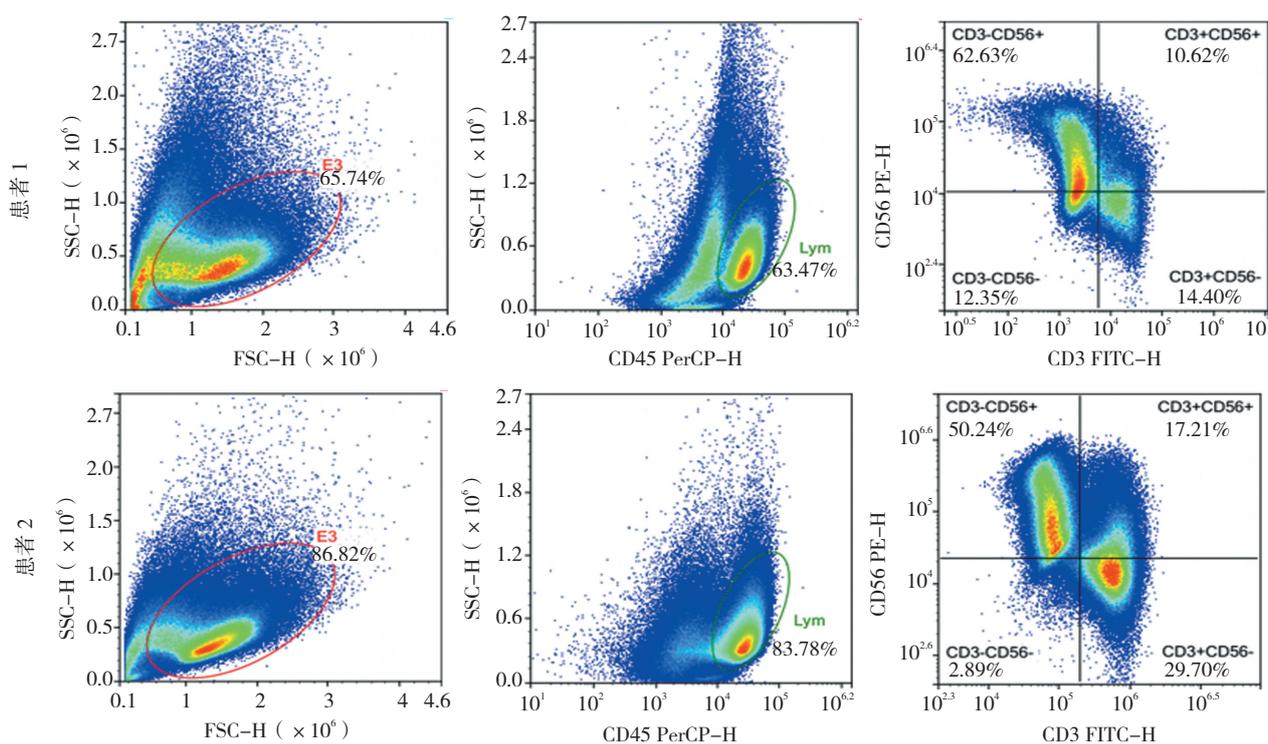


图 4 肿瘤患者 NK 细胞的扩增效果

### 3 讨论

IL-12、IL-15、IL-18 等细胞因子对 NK 细胞的功能具有重要的作用。在 NK 细胞培养过程中添加不同种类的细胞因子, 从而发展出多种培养方法<sup>[11]</sup>。不同的细胞因子组合和剂量等略有不同, 而添加方式通常为持续添加。在体外扩增过程中持续添加细胞因子不但增加了培养成本, 而且由于 IL-12 细胞因子会造成严重的不良反应, 因此要限制 IL-12 在 NK 细胞培养过程中的使用量以及残余量。有研究发现<sup>[12-13]</sup>, IL-12、IL-15 和 IL-18 可能是通过促进 IFN- $\gamma$  mRNA 的合成以及蛋白质的表达参与 NK 细胞早期的免疫应答, 并不涉及 NK 细胞的生长及活性维持。本研究探索了使用细胞因子预处理的培养方法, 先使用 IL-12、IL-15 和 IL-18 3 种因子刺激 16 h, 然后使用只添加 IL-2 的培养基进行培养。结果显示 IL-12、IL-15 和 IL-18 预处理的培养方法能很好地扩增 NK 细胞, 细胞扩增倍数和 NK 细胞比例与传统的持续添加细胞因子的培养方式相当。NK 细胞的生长依赖于 IL-2 信号通路, 而 IL-2 的复合体形式决定了信号通路的敏感性, 以及细胞因子刺激 NK 细胞活性的能力<sup>[14]</sup>。本研究发现, IL-12、IL-15 和 IL-18 预处理能上调细胞表面 CD25 (IL-2R $\alpha$ ) 的表达, 从而 NK 细胞表面可

形成 IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$  复合体, 大大提高 NK 对于细胞因子刺激的敏感性, 降低了细胞因子的使用量。值得注意的是, 预处理的培养方式获得的 NK 细胞的活性 (IFN $\gamma$  的释放量和体外杀伤 K562 肿瘤细胞的能力) 显著提高。此外, IL-12+IL-15+IL-18 预处理的培养方法还能够有效扩增肿瘤患者自身的 NK 细胞。因此, 相对于传统培养方式下扩增的 NK 细胞, 使用 IL-12、IL-15 和 IL-18 预处理的培养方式得到的 NK 细胞在临床上具有更大的优势。

#### 参考文献:

- [1] CHILDS R W, CARLSTEN M. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(7): 487-498.
- [2] WALDMANN T A, DUBOIS S, TAGAYA Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy[J]. *Immunity*, 2001, 14(2): 105-110.
- [3] YIN T, WANG G, HE S, et al. Human cancer cells with stem cell-like phenotype exhibit enhanced sensitivity to the cytotoxicity of IL-2 and IL-15 activated natural killer cells[J]. *Cell Immunol*, 2016, 1(300): 41-45.
- [4] LAUWERYS B R, GAROT N, RENAULD J C, et al. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18[J]. *J Immunol*, 2000, 165(4): 1847-1853.

- [5] BEHZADI P, BEHZADI E, RANJBAR R. IL-12 Family cytokines: general characteristics, pathogenic microorganisms, receptors, and signalling pathways[J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2016, 63(1): 1-25.
- [6] TRINCHIERI G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(2): 133-146.
- [7] MIRJACIC M K, BABOVIC N, DZODIC R, et al. Favorable in vitro effects of combined IL-12 and IL-18 treatment on NK cell cytotoxicity and CD25 receptor expression in metastatic melanoma patients[J]. *J Transl Med*, 2015, 13(120): 1-14.
- [8] ROMEE R, LEONG J W, FEHNIGER T A. Utilizing cytokines to function-enable human NK cells for the immunotherapy of cancer. *Scientifica (Cairo)*[J]. 2014, 2014(1): 1-18.
- [9] 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.
- [10] LEONG J W, CHASE J M, ROMEE R, et al. Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014, 20(4): 463-473.
- [11] CHILDS R W, BERG M. Bringing natural killer cells to the clinic: ex vivo manipulation[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2013, 2013(1): 234-246.
- [12] STRENGELL M, MATIKAINEN S, SIREN J, et al. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells[J]. *J Immunol*, 2003, 170(11): 5464-5469.
- [13] ROBERTI M P, ROCCA Y S, AMAT M, et al. IL-2 - or IL-15-activated NK cells enhance cetuximab-mediated activity against triple-negative breast cancer in xenografts and in breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 136(3): 659-671.
- [14] LIAO W, LIN J X, LEONARD W J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy[J]. *Immunity*, 2013, 38(1): 13-25.

(张蕾 编辑)