

• 论 著 •

## 自然杀伤 T 淋巴细胞对黑色素瘤细胞的免疫调节及杀伤功能实验研究

黄建敏<sup>1</sup>, 师煜博<sup>2△</sup>, 陈忠华<sup>3</sup>

(1. 广西医科大学第一附属医院检验科, 广西南宁 530021; 2. 广西医科大学第一附属医院呼吸疾病研究所, 广西南宁 530021; 3. 华中科技大学同济医学院同济医院器官移植研究所, 湖北武汉 430030)

**摘要:**目的 探讨自然杀伤 T 淋巴细胞(NKT 细胞)在细胞免疫调节及杀伤功能中的作用。方法 建立混合淋巴细胞培养(MLC)体系, B16F10-luc-G5 细胞作为靶细胞, 以总淋巴细胞为效应细胞。(1)调节效应实验以 NKT 细胞或 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 淋巴细胞为调节细胞, 分为 3 组: NKT 组、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 组、靶细胞空白对照组; 另设有 1640 空白对照组(RPMI1640 溶液)。(2)杀伤效应实验以 NKT 或自然杀伤(NK)细胞为效应细胞, 分为 3 组: NKT 组、NK 组、靶细胞空白对照组。混合培养 24、48、72 h 后, 通过活体成像系统检测该培养系统的靶细胞生物发光, 以监测 NKT 细胞的调节及杀伤效应。**结果** (1)调节效应实验: NKT 组及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 组测定光子数分别与两空白对照组比较, 以及 NKT 组内培养 24 h 与 72 h 时测得光子数比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。(2)杀伤效应实验: NKT 组及 NK 组与靶细胞空白对照组所测光子数比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 且培养 24、72 h 时 NKT 组与 NK 组光子数比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** NKT 细胞具有抑制总淋巴细胞对靶细胞的杀伤效应, 且抑制效应具有时间性, 其调节作用较 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 淋巴细胞强。NKT 细胞具有对靶细胞的杀伤效应, 但较 NK 细胞弱。

**关键词:**自然杀伤 T 淋巴细胞; 自然杀伤细胞; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 淋巴细胞; B16F10-luc-G5 细胞; 活体成像系统  
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.014 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2016)05-0613-03

## Study on the immunoregulatory and lethal effects of natural killer T cells on melanoma cells in vitro

Huang Jianmin<sup>1</sup>, Shi Yubo<sup>2△</sup>, Chen Zhonghua<sup>3</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Institute of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Institute of Organ Transplantation, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

**Abstract: Objective** To explore the immunoregulatory and lethal effects of natural killer T lymphocytes(NKTs) in vitro. **Methods** The mixed lymphocyte cultured(MLC) system was established, in which the B16F10-luc-G5 cells were set as target cells, the total lymphocyte cells were set as effector cells. (1) In the experiment on immunoregulatory effects, NKT lymphocytes or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes were set as regulating cells, there was three groups, including the NKT group, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T group and pure target cell control group. Otherwise, the 1640 blank control group was set by only adding RPMI1640 solution. (2) In the experiment on antitumor effects, the NKT or natural killer(NK) lymphocytes were set as killer cells, there was three groups, including the NKT group, NK group and pure target cell control group. Mixed culturing 24, 48 and 72 hours, the bioluminescence of target cells in MCL system was detected by using the in vivo imaging system. **Results** (1) In the experiment on immunoregulatory effects, there were statistically significant differences in measured average photon numbers between NKT group, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T group and the two control groups( $P < 0.05$ ). The statistically significant differences were also found in the NKT group between 24 hours and 72 hours ( $P < 0.05$ ). (2) In the experiment on antitumor effects, there were statistically significant differences in measured average photon numbers, when the NKT group and NK group were compared to the pure target cell control group( $P < 0.05$ ). After culturing 24 and 72 hours, statistically significant differences were found between NKT group and NK group( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The NKT cells could inhibit the lethal effects of lymphocyte cells on target cells, and the inhibitory effects are changed by the length of culturing. Compared with the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes, NKT lymphocytes have stronger regulatory effects. Additionally, the NKT cells have lethal effects on target cells, which might be weaker than that of NK cells.

**Key words:** natural killer T cells; natural killer cells; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes; B16F10-luc-G5 cells; in vivo imaging system

人体体内有少许 T 淋巴细胞表面能表达自然杀伤细胞(NK 细胞)特有的标志, 这部分细胞称为自然杀伤 T 淋巴细胞(NKT 细胞)。NKT 细胞参与体内免疫调节、维持免疫稳定、防止器官移植排斥, 在抗肿瘤免疫中发挥着重要作用。可以通过分析 NKT 细胞是否具有调节总淋巴细胞的杀伤效应, 研究 T 淋巴细胞在肿瘤免疫中的作用。本实验主要应用活体成像系统(IVIS), 在混合淋巴细胞培养(MLC)中分析带荧光素标

记的 B16F10-luc-G5 黑色素肿瘤细胞, 通过平均光子数的变化验证 NKT 细胞是否具有抑制总淋巴细胞对靶细胞的杀伤效应, 以及是否具备与 NK 细胞相似的杀伤靶细胞的作用。现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及细胞系** 小鼠黑色素瘤细胞株 B16F10-luc-G5 购自美国 Xenogen 公司; 雄性健康封闭群 BALB/c 小鼠购

自华中科技大学同济医学院器官移植研究所动物中心。

**1.2 方法** 冻存肿瘤细胞快速融化,加入含 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 生长培养基中,获取 BALB/c 小鼠淋巴细胞后,与淋巴细胞分离液混合,分离并分选 NKT 细胞、NK 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞。以总淋巴细胞为效应细胞, B16F10-luc-G5 肿瘤细胞为靶细胞,效应细胞与靶细胞的比例为效靶比,建立 MLC 并进行分组。NKT 组:效靶比为 20:1,每孔加总淋巴细胞 5×10<sup>4</sup> 个、靶细胞 2.5×10<sup>3</sup> 个;CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 组:效靶比为 10:1,每孔加总淋巴细胞 2.5×10<sup>4</sup> 个、靶细胞 2.5×10<sup>3</sup> 个;靶细胞空白对照组:每孔加靶细胞 2.5×10<sup>3</sup> 个;每组均 3 个复孔;1640 空白对照组:仅为 RPMI1640 溶液。MLC 建立后继续培养,分别于 24、48、72 h 检测生物发光,加入细胞孔中显像。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理与统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组内比较使用单因素方差分析,组间比较采用 *q* 检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 NKT 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞的分离与鉴定** 利用流式细胞仪分离 Balb/c 小鼠脾细胞获得 NKT 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞,经流式细胞仪检测其纯度分别为 94.6%、93.3%。见图 1~4(见《国际检验医学杂志》网站首页

“论文附件”)。

**2.2 NKT 细胞的调节效应** NKT 组及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 组分别与两空白对照组测定光子数比较,以及 NKT 组内 24 h 与 72 h 时测得光子数比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。通过 IVIS 法绘制 MLC 系统中靶细胞(B16F10-luc-G5 细胞)生长状态图,见图 5(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。表明混合培养 24、48、72 h 时,NKT 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞均抑制总淋巴细胞的杀伤功能。

**2.3 NKT 细胞的杀伤效应** NKT 组各检测时间点光子数均低于 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 组和靶细胞空白对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05);而各时间点 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 组光子数与靶细胞空白对照组比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 2。以 IVIS 结果绘制靶细胞生长状态图,见图 6(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**2.4 NKT 与 NK 细胞直接杀伤靶细胞的效能比较** NKT 组和 NK 组各检测时间点光子数与靶细胞空白对照组比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05);且 NKT 组与 NK 组 24 及 72 h 时光子数比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 3。以 IVIS 结果绘制靶细胞生长状态图,见图 7(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**表 1 不同时间点调节效应实验 MLC 中靶细胞光子数比较**[ $\bar{x} \pm s$ , photon/(cm<sup>2</sup>·ser·s)]

组别	24 h	48 h	72 h
NKT 组	(38.600 0±1.003 2)×10 <sup>4</sup> * #	(45.300 0±1.278 7)×10 <sup>4</sup> * #	(62.200 0±1.020 4)×10 <sup>4</sup> * #△
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T 组	(41.600 0±0.703 2)×10 <sup>4</sup> * #	(40.600 0±1.190 2)×10 <sup>4</sup> * #	(64.800 0±1.832 2)×10 <sup>4</sup> * #
1640 空白对照组	(8.550 0±0.542 6)×10 <sup>4</sup>	(5.070 0±0.475 7)×10 <sup>4</sup>	(9.330 0±0.951 3)×10 <sup>4</sup>
靶细胞空白对照组	(42.200 0±0.342 1)×10 <sup>4</sup>	(47.300 0±0.469 5)×10 <sup>4</sup>	(83.700 0±0.603 9)×10 <sup>4</sup>

\*: *P*<0.05,与 1640 空白对照组比较;#: *P*<0.05,与靶细胞空白对照组比较;△: *P*<0.05,与同组 24 h 时测得的光子数比较。

**表 2 不同时间点杀伤效应实验 MLC 中靶细胞光子数比较**[ $\bar{x} \pm s$ , photon/(cm<sup>2</sup>·ser·s)]

组别	24 h	48 h	72 h
NKT 组	(2.060 0±2.020 8)×10 <sup>5</sup>	(2.530 0±0.751 2)×10 <sup>5</sup>	(4.220 0±1.613 4)×10 <sup>5</sup>
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T 组	(4.220 0±0.672 7)×10 <sup>5</sup> *	(4.690 0±0.430 6)×10 <sup>5</sup> *	(8.360 0±0.377 8)×10 <sup>5</sup> *
靶细胞空白对照组	(4.220 0±0.342 1)×10 <sup>5</sup> *	(4.730 0±0.469 5)×10 <sup>5</sup> *	(8.370 0±0.603 9)×10 <sup>5</sup> *

\*: *P*<0.05,与 NKT 组比较。

**表 3 不同时间点直接杀伤靶细胞效应实验 MLC 靶细胞光子数比较**[ $\bar{x} \pm s$ , photon/(cm<sup>2</sup>·ser·s)]

组别	24 h	48 h	72 h
NKT 组	(2.060 0±2.020 8)×10 <sup>5</sup> * #	(2.530 0±0.751 2)×10 <sup>5</sup> *	(4.220 0±1.613 4)×10 <sup>5</sup> * #
NK 组	(4.720 0±1.398 0)×10 <sup>4</sup> *	(5.520 0±1.571 0)×10 <sup>4</sup> *	(1.190 0±0.217 5)×10 <sup>5</sup> *
靶细胞空白对照组	(4.220 0±0.342 1)×10 <sup>5</sup>	(4.730 0±0.469 5)×10 <sup>5</sup>	(8.370 0±0.603 9)×10 <sup>5</sup>

\*: *P*<0.05,与靶细胞空白对照组比较;#: *P*<0.05,与 NK 组比较。

**3 讨 论**

NKT 参与体内免疫调节、维持免疫稳定并防止器官移植排斥,在抗肿瘤免疫中发挥重要作用。本实验的目的在于研究 NKT 细胞能否调节总淋巴细胞的杀伤效应,通过比较 NKT 细胞与经典的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 调节细胞的体外调节功能,以及 NKT 细胞与 NK 细胞对肿瘤细胞的直接杀伤效应,分析 NKT 细胞的功能。

体外研究表明,在抗原刺激下,NKT 细胞可被 CD1d 提呈的糖脂类抗原激活,α-半乳糖神经鞘胺醇(α-GalCer)为 NKT 细胞的一种高效、特异的刺激抗原。NKT 细胞可迅速分泌大

量具有免疫调节作用的细胞因子,类似于辅助性 T 淋巴细胞 2 (Th2)型分泌白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-13(IL-13)、干扰素-γ(IFN-γ)等,从而影响免疫反应类型,实现对免疫应答和自身免疫的调节。Kawano 等<sup>[1]</sup>从人外周血中分离 Vα24 NKT 细胞,经 α-GalCer 活化,与恶性黑色素瘤细胞株 HMV-1、胰腺癌细胞株 PANC-1 等多种人类肿瘤细胞系进行作用,结果发现 Vα14<sup>+</sup> NKT 细胞具体外杀伤肿瘤细胞的效应,活化的 Vα24 NKT 细胞对多数肿瘤细胞均有明显的杀伤作用。在未预先致敏的情况下,白细胞介素-12(IL-12)与 α-GalCer 共同活化的 NKT 细胞对多种肿瘤细胞系和自

体肿瘤组织均具有明显的细胞毒活性。由 IL-12 治疗诱导出的 NK1.1<sup>+</sup>V142J $\alpha$ 281<sup>+</sup>NKT 细胞可以介导肿瘤排斥, 过往输注经 IL-12 活化的 V $\alpha$ 14 NKT 细胞可有效阻止小鼠 B16 黑色素瘤肝脏转移灶的形成<sup>[2]</sup>。研究证明, NKT 细胞被  $\alpha$ -GalCer 激活后分泌的 IFN- $\gamma$  在肿瘤排斥反应中起着关键作用<sup>[3]</sup>。V $\alpha$ 24<sup>+</sup>NKT 细胞的细胞毒性是通过穿孔素介导的, 并且 T 淋巴细胞受体(TCR)V $\alpha$ 24、CD1d 和  $\alpha$ 2 脑苷脂也起一定作用<sup>[4]</sup>。NKT 细胞并不直接杀伤肿瘤细胞, 而是通过 IFN- $\gamma$  介导下游效应细胞, 如 NK 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的积聚并提高其对肿瘤的敏感性而发挥抗肿瘤效应<sup>[5]</sup>。 $\alpha$ -GalCer 和 IL-12 激活的 NKT 细胞可增强 NK 和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的抗肿瘤活性, 也可促进抗原呈递细胞(APC)活化与上调 CD40L 表达, 从而进一步促进 IL-12 的产生, 使肿瘤免疫得到加强<sup>[6]</sup>。 $\alpha$ -GalCer 可抑制许多肿瘤的肝转移, 且为激活的 NKT 细胞的肿瘤杀伤效应。NKT 细胞既可通过识别靶细胞上的 CD1d-ligand 复合物直接介导抗肿瘤反应<sup>[6]</sup>, 亦可通过分泌白细胞介素-2(IL-2)和 IFN  $\gamma$  激活 NK 细胞, 间接介导抗肿瘤反应<sup>[7]</sup>。

本文实验结果证明, NKT 在体外进行混合培养时, 可发挥对 B16F10-luc-G5 细胞的杀伤效应, 该杀伤效应应具有时间性, 随着时间的延长达到更大的靶细胞杀伤作用。通过与 NK 细胞的平行比较发现, NKT 与其有相似的抗肿瘤功能。NK 细胞是细胞复杂的免疫调节网络中的重要组分, 而 NKT 细胞是免疫细胞中一个具特定标志的 T 淋巴细胞亚群, 不同于 NK 细胞, 两者均有抗肿瘤细胞效应。虽然 NKT 细胞在抗肿瘤能力上弱于 NK 细胞, 两者在机体内的功能和作用机制是否与体外实验相似, 还需进一步研究。

另外, NKT 细胞可下调机体的免疫监视能力, 导致肿瘤的发生。Moodycliffe 等<sup>[8]</sup>发现, 从紫外线照射的小鼠分离得到的 NKT 细胞, 作为抑制性 T 淋巴细胞在调节紫外线诱发的皮肤癌细胞生长中具有重要作用, 可抑制体内获得性免疫的产生。紫外线辐射的致癌作用及引起的免疫抑制是通过 NKT 细胞来实现的<sup>[8]</sup>。本次实验结果显示, 在 MLC 系统中, NKT 可以抑制总淋巴细胞对 B16F10-luc-G5 细胞的杀伤效应, 在培养 24~48 h 内可达到一定的抑制效应, 但培养时间超过 48 h 后, 该抑制效应明显减弱, 通过与经典的调节 T 细胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞)进行平行比较, NKT 亦具有相似的抑制总淋巴细胞杀伤效应的作用。本次实验可初步显示 NKT 具有双向效应, 既具备抗癌作用又有免疫抑制作用。因此, 笔者认为需要对 NKT 进行更深入的研究, 特别是其释放的细胞因子的浓度及相关蛋白质组的变化, 以期将针对 NKT 细胞的相关检测

数据应用于临床医学检验实验室, 以利于临床疾病的有效诊治。

综上所述, NKT 细胞在肿瘤免疫调节及肿瘤杀伤中起一定作用, 国外临床上已有针对 NKT 进行的肿瘤免疫靶向治疗, 已达到良好的效果, 说明 NKT 细胞在抑制某些肿瘤的发生、发展机制中起着重要作用。

参考文献

- [1] Kawano T, Nakayama T, Kamada N, et al. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha 24 NKT cells[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(20):5102-5105.
- [2] Schmiege J, Yang G, Franck RW, et al. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide[J]. *J Exp Med*, 2003, 198(11):1631-1641.
- [3] Gehrman U, Hiltbrunner S, Näslund TI, et al. Potentiating anti-tumor immunity with  $\alpha$ GC-loaded exosomes[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(10):e26261.
- [4] Nakamura T, Yamazaki D, Yamauchi J, et al. The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves  $\alpha$ -galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration[J]. *J Control Release*, 2013, 171(2):216-224.
- [5] Smyth MJ, Crowe NY, Pellicci DG, et al. Sequential production of interferongamma by NK1.1(+)T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosyl ceramide[J]. *Blood*, 2002, 99(4):1259-1266.
- [6] Fujii S, Shimizu K, Smith C, et al. Activation of natural killer T cells by  $\alpha$ Galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a co-administered protein[J]. *J Exp Med*, 2003, 198(2):267-279.
- [7] Fujii S, Shimizu K, Okamoto Y, et al. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic[J]. *Front Immunol*, 2013, 4(4):409.
- [8] Moodycliffe AM, Nghiem D, Clydesdale G, et al. Immune suppression and skin cancer development: regulation by NKT cells[J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(6):521-525.

(收稿日期:2015-12-26)



(上接第 612 页)

血者状态, 通过严格的筛查、检测, 为临床患者提供安全、有效的血液。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 卫医政发[2012]1号附件 血站技术操作规程:2012版[Z]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2012.
- [2] 丛玉隆. 淘汰血红蛋白血液硫酸铜比重试验及沙利目测法的原因及替代试验(上)[J]. *中级医刊*, 1993, 28(7):50-52.
- [3] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3版. 南京:东南大学出版社, 2006:136-140.
- [4] 熊立凡, 李树仁. 临床检验基础[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2003:12-85.
- [5] Roback JD, Grossman BJ, Harris T, et al. Technical manual[M]. 17th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks,

2011:965.

- [6] Tondon R, Verma A, Pandey P, et al. Quality evaluation of four hemoglobin screening methods in a blood donor setting along with their comparative cost analysis in an Indian scenario[J]. *Asian J Transfus Sci*, 2009, 3(2):66-69.
- [7] 许文荣, 王建中. 临床血液学与检验[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2007:208-210.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB18469-2012 全血及成分血质量要求[S]. 北京:中国标准出版社, 2012.
- [9] 李宁. 无偿献血者血常规检测必要性的探讨[J]. *中国输血杂志*, 2014, 27(1):38-40.

(收稿日期:2015-09-21)