

消化系统疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002030

食管鳞癌细胞对自然杀伤细胞的生物学效应的影响

秦 梅¹, 高凤霞¹, 韩 飞², 戴天阳², 任德莲¹, 吴 剑²
(西南医科大学 1. 免疫学教研室; 2. 附属医院普胸外科, 泸州 646000)

【摘要】目的:研究食管鳞癌原代细胞对自然杀伤细胞表型及功能的调控。**方法:**收集新鲜食管鳞癌组织, 采用改良组织块结合酶消化法在体外培养原代食管鳞癌细胞, 通过裸鼠皮下成瘤模型及免疫组织化学技术鉴定食管鳞癌细胞; 收集正常人外周血单个核细胞, 磁珠法负性分离 NK 细胞; 将原代食管鳞癌细胞培养上清与 NK 细胞共培养 (根据共培养条件分组为 NC-NK, ESCC1-NK, ESCC2-NK), 使用流式细胞术检测 NK 细胞表面及胞内分子的表达; 通过裸鼠皮下成瘤及肺转移模型研究原代食管鳞癌细胞对 NK 细胞肿瘤杀伤作用的影响。**结果:**与 NC-NK 组比较, ESCC1-NK 组、ESCC2-NK 组活化型受体 NKG2D (56.84 ± 1.28 , 41.89 ± 2.17 , 29.40 ± 1.32) ($P=0.008$, $P=0.001$), NKP30 (45.79 ± 1.90 , 19.54 ± 1.27 , 26.59 ± 1.47) ($P=0.001$, $P=0.003$) 及 CD16 (84.82 ± 1.38 , 55.95 ± 2.29 , 36.07 ± 1.97) ($P=0.001$, $P=0.000$) 表达降低; NK 细胞胞内效应分子颗粒酶 B (94.87 ± 1.04 , 80.52 ± 0.99 , 78.67 ± 2.73) ($P=0.013$, $P=0.008$) 及增殖相关抗原 Ki67 (70.15 ± 2.35 , 52.31 ± 1.74 , 50.02 ± 2.68) ($P=0.017$, $P=0.011$) 表达下降; 活化型受体 NKP44、NKP46、CD226, 穿孔素及抑制型受体 NKG2A、CD158b 的表达差异无统计学意义。动物实验显示: 皮下瘤体体积 ESCC1-NK 组和 NC-NK 组间有差异 ($F=54.689$, $P=0.000$); ESCC1-NK 处理组肺转移灶数 (41.00 ± 3.11) 多于 NC-NK 处理组 (25.25 ± 2.32) ($t=4.068$, $P=0.007$)。**结论:**原代食管鳞癌细胞可能通过抑制 NK 细胞活化及增殖、下调 NK 细胞杀伤效应分子的表达来抑制 NK 细胞肿瘤杀伤效应, 从而逃逸机体免疫监视。

【关键词】食管鳞癌; 自然杀伤细胞; 原代细胞; 免疫抑制

【中图分类号】R392.12

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-09-08

Effect of esophageal squamous cell carcinoma cells on the biological activity of natural killer cells

Qin Mei¹, Gao Fengxia¹, Han Fei², Dai Tianyang², Ren Delian¹, Wu Jian²

(1. Teaching and Research Section of Immunology; 2. General Thoracic Surgery Affiliated Hospital, Southwest Medical University)

【Abstract】Objective: To study the regulation and control of the phenotype and function of natural killer (NK) cells by the primary cells of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods:** Fresh ESCC tissue was collected, from which primary ESCC cells were cultured in vitro by the modified tissue block enzymolytic method, and identified using a subcutaneous tumor-formation model in nude mice and the immunohistochemical technique. Human peripheral blood mononuclear cells were collected from healthy subjects, from which the NK cells were isolated by negative-selection magnetic beads, and co-cultured with the supernatant of the primary ESCC cells obtained above. The cultured cells were divided into groups of NC-NK, ESCC1-NK, and ESCC2-NK according to their respective culture conditions. Flow cytometry was used to determine the molecular expression both on the surface of and within the NK cells. The subcutaneous tumor-formation model and lung metastasis model were used to study the effect of primary ESCC cells on the killing effect of NK cells in nude mice. **Results:** Compared with the NC-NK group, the ESCC1-NK group and the ESCC2-NK group had significantly reduced expression of the activated receptors NKG2D (56.84 ± 1.28 vs. 41.89 ± 2.17 and 29.40 ± 1.32 ; $P=0.008$ and 0.001 , respectively), NKP30 (45.79 ± 1.90 vs. 19.54 ± 1.27 and 26.59 ± 1.47 ; $P=0.001$ and 0.003 , respectively), and CD16 (84.82 ± 1.38 vs. 55.95 ± 2.29 and 36.07 ± 1.97 ; $P=0.001$ and 0.000 , respectively) as well as significantly reduced expression of the effector molecule granzyme B (94.87 ± 1.04 vs. 80.52 ± 0.99 and 78.67 ± 2.73 ; $P=0.013$ and 0.008 , respectively) and the proliferation-associated antigen Ki67 (70.15 ± 2.35 vs. 52.31 ± 1.74 and 50.02 ± 2.68 ; $P=0.017$ and 0.011 , respectively) in NK cells. There were no significant differences between the three groups

作者介绍: 秦 梅, Email: 752851925@qq.com,

研究方向: 肿瘤免疫。

通信作者: 吴 剑, Email: glandowen1011@sina.com。

基金项目: 四川省卫计委资助项目 (编号: 17033); 泸州市市-校联合资助项目 (编号: 090300020840)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190321.1612.010.html>
(2019-03-22)

in the expression of the activated receptors NKP46, CD226, and NKP44 as well as perforin and the inhibitory receptors NKG2A and CD158b. Animal experiments showed that there was a significant difference between the ESCC1-NK group and the NC-NK group in the volume of subcutaneous tumors ($F=54.689, P=0.000$) with a significantly greater number of lung metastases observed in the ESCC1-NK group (41.00 ± 3.11 vs. $25.25 \pm 2.32, t=4.068, P=0.007$). **Conclusion:** Primary ESCC cells may suppress the tumor-killing effect of NK cells by inhibiting the activation and proliferation of NK cells and down-regulating the expression of the effector molecules in NK cells, thereby escaping the immune surveillance in the body.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma; natural killer cell; primary cell; immunosuppression

食管癌是消化道常见恶性肿瘤,其发病率及死亡率分别在我国排名第3位和第4位^[1-2]。越来越多的研究表明,肿瘤的发生发展和临床转归受到肿瘤微环境中各种细胞相互调控的影响,其中抗肿瘤的免疫细胞受到抑制性调控与肿瘤的进展及病人的临床预后不良密切相关。自然杀伤(natural killer, NK)细胞作为固有免疫系统中肿瘤杀伤能力最强的细胞^[3],可通过其表面受体直接识别恶变细胞并表达颗粒酶、穿孔素和 IFN- γ 等效应分子诱导癌细胞凋亡。然而,有学者在肺癌^[4]、肝癌^[5]等实体瘤中发现, NK 细胞的功能受到抑制进而介导了肿瘤的免疫逃逸。本实验室前期研究发现,食管鳞癌组织中的 NK 细胞含量明显高于癌旁组织,但免疫杀伤能力减弱^[6]。故本实验进一步就新建立的食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)原代细胞与 NK 细胞共培养来探讨食管癌细胞对 NK 细胞表型及功能的调控,为阐明食管癌免疫抑制性微环境的形成机制提供新实验证据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

4 例新鲜食管癌标本取自 2017 年 10 至 12 月西南医科大学附属医院胸外科行食管癌手术切除的患者。术前均行胃镜活检确诊为食管鳞癌,既往均未进行任何治疗,且无慢性感染及其他免疫系统疾病。NK 细胞取自健康志愿者。本研究中收集的所有标本均取得患者的知情同意并经过医院伦理学委员会的审查和批准。

1.2 材料

人外周血淋巴细胞(PBMC)分离液、0.25%胰蛋白酶(TBD 公司);鼠抗人角蛋白多克隆抗体(Abcam 公司);RPMI1640 (Gibco 公司);青霉素和链霉素(华北制药公司);DMSO(Sigma 公司);Human NK Cell Enrichment Set-DM 试剂盒、抗 CD3-FITC、CD56-APC、NKG2D- PERCP-CY5.5、NKG2A-PERCP、NKP30-PE、NKP44-PE、CD158b-PE、CD226-PE、CD16-PE-CY7、穿孔素-PERCP-CY5.5、颗粒酶-PE、Ki67-PE-CY7 荧

光抗体、细胞固定/细胞破膜溶液试剂盒(BD 公司)、Hanks 液(Solarbio 公司);胎牛血清(FBS)、IV 型胶原酶(1 mg/mL)、透明质酸酶(1 mg/mL)、DNA 酶(0.25 mg/mL)(invitrogen 公司);SPF 级 5~6 周龄雄性裸鼠(重庆腾鑫比尔实验动物有限公司)。

1.3 食管癌组织的原代培养方法

取材手术台切除食管癌组织后,置于含 5%碘伏原液的无菌容器中,尽快送到细胞培养室。超净工作台中取出食管癌组织,放入无菌容器中, PBS 溶液,浸泡 15 min,然后用眼科小剪刀剪去组织中坏死部分。更换 PBS 溶液,用滴管吹打洗涤,反复 3~5 次,直至组织块发白、无血渍,将其剪碎至 1~2 mm³,加 PBS 溶液,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清后加入 5 mL 酶工作液(含 IV 型胶原酶、透明质酸酶、DNA 酶的 Hanks 液),混匀,将离心管置于 37 °C 恒温水浴锅中,5 min 振荡 1 次。当管内液体变浑浊,食管组织块已分散,且失去块状形态,一经摇动即成细胞团或单个细胞可认为消化充分,然后静置 3~5 min 沉淀组织块,取上清,加入等量 FBS 终止消化,混匀后离心,弃上清。向离心沉淀中加入 2 mL 含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基重悬细胞,移入 6 孔板中,置 37 °C、饱和湿度 5%CO₂ 培养箱中培养。

1.4 细胞的传代、冻存与复苏

取对数生长期细胞,用 PBS 液漂洗后,0.25%胰酶消化细胞,倒置显微镜下观察,当细胞质回缩、细胞间隙增大后,加含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基终止消化,收集细胞,1 200 r/min 离心 6 min,用培养液重悬细胞,按照 1:2 比例进行传代,于 37 °C、5%CO₂ 条件下培养,收集培养上清存于 -80 °C。同时冻存适量细胞,冻存液为含 8%二甲基亚砜的全血清,液氮罐中永久保存。复苏时将冷冻管从液氮中取出,37 °C 水浴,使细胞在 1 min 内融化,1 200 r/min 离心 6 min,用培养液重悬细胞并培养。

1.5 裸鼠荷瘤实验

取 5~6 周龄的裸鼠 2 只,将 1×10^6 个食管癌细胞(ESCC1、ESCC2)接种于裸鼠腋下。4 周后,颈椎脱臼法处死小鼠,剥离瘤组织,用 10%甲醛固定,进行 HE 染色,分析组织特征。免疫组织化学染色检测鳞癌标志物 P63。

1.6 分选 NK 细胞

Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,使用 0.5 mL $1 \times$ BD IMagTM 缓冲液重悬细胞后,按照分选说明书

加入生物素,室温避光孵育 15 min,充分混匀;1 200 r/min 离心 7 min 洗去多余的生物素后加入等量磁粒,室温避光孵育 30 min;把标记细胞转移到无菌 EP 管中,放到分离磁珠上 7 min,吸取上清液至一个新的无菌管,重复 3 次后,得到纯化的 NK 细胞。

1.7 肿瘤细胞上清液与 NK 细胞共培养

取培养 48 h 的食管癌原代细胞上清 1 mL,加入 1 μ L 的重组人白细胞介素-2(100 U/mL),与 1×10^6 个 NK 细胞共培养,根据共培养条件分为 RPMI1640 培养基刺激 NK 组(NC-NK)、ESCC1 上清液刺激 NK 组(ESCC1-NK)与 ESCC2 上清液刺激 NK 组(ESCC2-NK)(注:3 组所用 NK 细胞来源于同一个体),48 h 后收集细胞进行流式检测表面及胞内分子的表达,重复 3 次(注:3 次实验所用 NK 细胞来源于不同个体)。并观察共培养后 NC-NK、ESCC1-NK 细胞对裸鼠人食管癌原代细胞皮下移植瘤及肺转移肿瘤的影响。

1.8 流式细胞术检测 NK 细胞表面受体及胞内分子的表达

收集共培养后的 NK 细胞,用 PBS 洗涤后,将每组细胞分为 3 管,调节终体积至 100 μ L,第 1 管加入适量 CD3、CD56 及 NK 表面分子的荧光标记抗体,室温避光孵育 20 min,PBS 溶液洗涤,上机检测。第 2、3 管加入适量 CD3、CD56 荧光抗体标记 NK 细胞,室温避光孵育 20 min 后,PBS 溶液洗涤后,加入 250 μ L 细胞固定/及破膜溶液,4 $^{\circ}$ C 打孔 20 min,第 2、3 管分别加入适量穿孔素及颗粒酶、Ki67 荧光抗体室温避光孵育 20 min,PBS 溶液洗涤,上机检测。

1.9 NK 细胞对皮下移植瘤及肺转移肿瘤的杀伤能力

取 5~6 周龄的裸鼠 20 只,平均分为 2 组,每组 10 只,即皮下成瘤组和肺转移组。再将皮下成瘤组和肺转移组平均分为 2 个小组,每组 5 只:RPMI1640 培养基刺激-NK 组(NC-NK 组)、ESCC1 上清液刺激-NK 组(ESCC1-NK 组)。皮下成瘤组将 1×10^6 个 ESCC1 细胞接种于裸鼠腋下、肺转移组将等量 ESCC1 细胞经尾静脉注入裸鼠体内。分别于 5、10、15 d 后搜集共培养后的 NC-NK、ESCC1-NK 细胞,PBS 洗涤后,用 200 μ L 生理盐水悬浮后经尾静脉注入对应分组裸鼠体内,每日记录皮下移植瘤瘤体大小及裸鼠生长状况,4 周后,颈椎脱臼法处死 2 组小鼠。皮下成瘤组小鼠剥离瘤组织,按公式 $V = a \times b^2 / 2$ 计算肿瘤相对体积(a 为肿瘤最长径, b 为垂直于长径的最大横径)。肺转移组剥离小鼠完整的肺组织,观察肺转移情况,甲醛固定后进行石蜡包埋切片,并进行 HE 染色。肺转移灶的大小分级:Ⅰ级,直径小于 0.50 mm;Ⅱ级,直径 0.50~1.00 mm;Ⅲ级,直径 1.00~2.00 mm;Ⅳ级,直径大于 2.00 mm。总转移数=Ⅰ级(结节数) $\times$ 1+Ⅱ级 $\times$ 2+Ⅲ级 $\times$ 3+Ⅳ级 $\times$ 4^[7]。

1.10 统计学方法

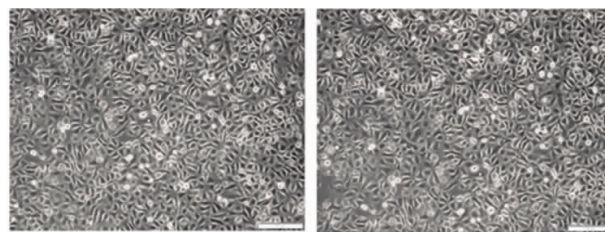
采用 Graphpad prism7.0 及 SPSS 17.0 处理数据,多组资料比较采用方差分析,如差异有统计学意义,进一步将实验组与对照组比较(Dunnett's t 检验);多时间点观测资料行两因素重复测量方差分析,若差异有统计学意义,进一步比较

各时间点差异(成组 t 检验)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

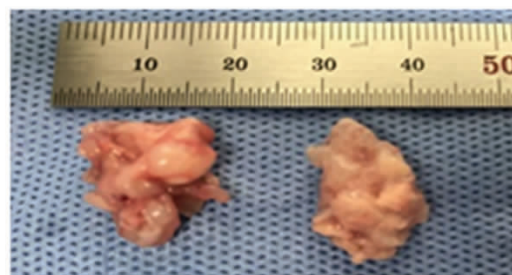
2 结果

2.1 食管鳞癌原代细胞的培养与鉴定

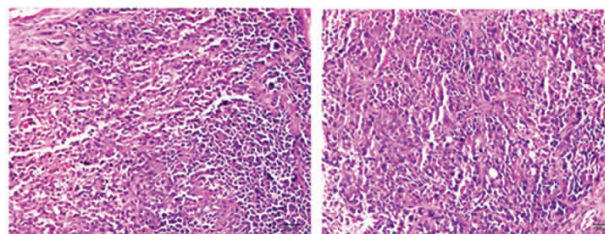
采用改良组织块结合酶消化法培养食管鳞癌原代细胞,传代成功后,镜下可见两株细胞呈多角形,体积较大,胞浆丰富,胞核圆或卵圆形,大小不等,核仁明显(图 1A)。将上述细胞注入裸鼠腋下,4 周后处死小鼠,解剖瘤体,肿瘤最长径为 1.60~2.00 cm。说明 2 株细胞具有致瘤性特征(图 1B)。取瘤体进行 HE 染色及免疫组织化学染色进一步确定肿瘤细胞特征。HE 染色可见异种移植肿瘤细胞体积较大,形态多样,胞核大小及染色深浅不一,具有明显的异型性(图 1C)。免疫组化染色鳞癌标志 P63 表达强阳性,胞浆呈棕黄色颗粒,进一步确定细胞为上皮源性(图 1D)。



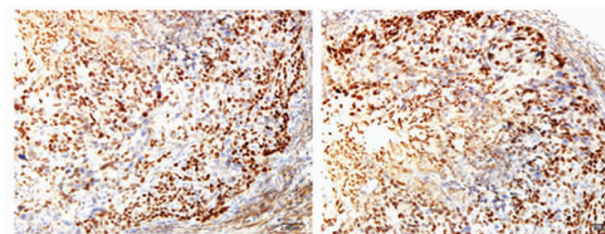
A. 食管鳞癌原代细胞 ESCC1(左)、ESCC2(右)(10 $\times$)



B. ESCC1、ESCC2 皮下瘤体形态



C. ESCC1、ESCC2 皮下瘤体切片 HE 染色(20 $\times$)



D. 免疫组化测 ESCC1、ESCC2 瘤体 P63 表达(20 $\times$)

图 1 食管鳞癌原代细胞的分离及鉴定

2.2 NK 细胞表面受体的表达

NK 细胞的负性分选结果显示, NK 细胞纯度 >90%, T 细胞 <1% (图 2), 可用于后续实验。将食管鳞癌原代细胞培养上清与 NK 共培养, 与 NC-NK 比较, ESCC1-NK、ESCC2-NK 表面活化型受体 NKG2D ($56.84 \pm 1.28, 41.89 \pm 2.17, 29.40 \pm 1.32$) ($P=0.008, P=0.001$)、NKP30 ($45.79 \pm 1.90, 19.54 \pm 1.27, 26.59 \pm 1.47$) ($P=0.001, P=0.003$)、CD16 ($84.82 \pm 1.38, 55.95 \pm 2.29, 36.07 \pm 1.97$) ($P=0.001, P=0.020$) 的表达降低, 其余活化型受体 NKP44 ($1.76 \pm 0.27, 2.63 \pm 0.29, 1.94 \pm 0.35$) ($P=0.209, P=0.894$)、NKP46 ($46.34 \pm 1.67, 45.95 \pm 1.38, 48.61 \pm 1.57$) ($P=0.982, P=0.594$) 及 CD226 ($92.15 \pm 2.08, 90.19 \pm 3.96, 89.10 \pm 1.18$) ($P=0.766, P=0.560$) 抑制型受体 NKG2A ($34.86 \pm 0.92, 34.69 \pm 2.63, 36.31 \pm 1.25$) ($P=0.992, P=0.619$)、CD158b ($40.28 \pm 1.89, 38.61 \pm 1.89, 40.30 \pm 1.06$) ($P=0.787, P=0.999$) 表达差异无统计学意义 (表 1、图 3、图 4)。结果显示与食管鳞癌细胞上清共培养后 NK 细胞活化能力减弱。

2.3 NK 细胞胞内效应分子的表达

NK 细胞与肿瘤细胞上清共培养后, 与 NC-NK 组比较, ESCC1、2-NK 组效应分子颗粒酶 B ($94.87 \pm 1.04, 80.52 \pm 0.99$,

78.67 ± 2.73) ($P=0.013, P=0.008$) 的表达降低, 穿孔素 ($89.91 \pm 1.52, 90.06 \pm 2.38, 88.54 \pm 2.21$) ($P=0.973, P=0.220$) 的差异无统计学意义; NK 细胞 Ki67 增殖指数下降 ($70.15 \pm 2.35, 52.31 \pm 1.74, 50.02 \pm 2.68$) ($P=0.017, P=0.011$) (表 1、图 5)。结果表明共培养后 NK 细胞杀伤效应分子表达减少, 增殖能力受到抑制。

2.4 NK 细胞对皮下移植瘤及肺转移肿瘤的杀伤能力

上述结果显示体外共培养后的 NK 细胞生物学活性受到抑制, 进一步分析共培养后的 NK 细胞对裸鼠皮下移植瘤及肺转移肿瘤的杀伤能力 (以 ESCC1 为例)。裸鼠腋下注射 ESCC1 细胞后, 于第 5 天可见最长径约为 0.50 cm 的瘤体, 经尾静脉注入共培养的 NK 细胞。结果显示 ESCC1-NK 组和 NC-NK 组组间有差异 ($F=54.689, P=0.000$), 不同时间的测量结果 ($F=410.270, P=0.000$) 及不同组在不同时间上的变化趋势差异有统计学意义 ($F=13.160, P=0.000$)。同一时间点的组间两两比较结果显示 ESCC1-NK 组瘤体平均体积大于 NC-NK 组 (图 6A、B), 第 15 ($F=15.200, P=0.018$)、20 ($F=31.440, P=0.005$)、25 ($F=13.410, P=0.022$) 及 28 天 ($F=919.790, P=0.000$) 2 组差异均有统计学意义。裸鼠肺组织进行 HE 染色结果显示, 肺部的转移灶细胞排列紧密, 核大深染, 呈不规则样;

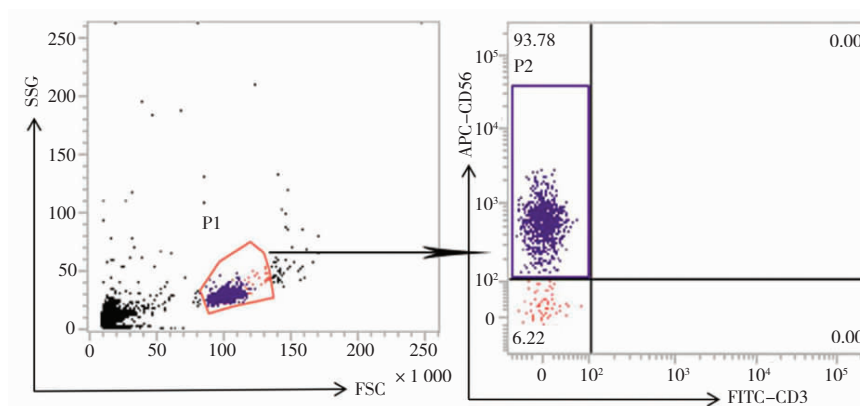


图 2 流式细胞术检测 NK 细胞的分选纯度

表 1 NC-NK、ESCC1-NK 和 ESCC2-NK 组活化性、抑制性及效应分子表达情况结果比较 ($n=3$)

名称	组别 ($n=3$)			F 值	P 值	两两比较 P 值
	NC-NK	ESCC4-NK	ESCC8-NK			
NKG2D	56.84 ± 1.28	41.89 ± 2.17	29.40 ± 1.32	56.950	0.001	^a $P=0.008$, ^b $P=0.001$
NKP30	45.79 ± 1.90	19.54 ± 1.27	26.59 ± 1.47	51.530	0.001	^a $P=0.001$, ^b $P=0.003$
CD16	84.82 ± 1.38	55.95 ± 2.29	36.07 ± 1.97	123.700	0.000	^a $P=0.001$, ^b $P=0.000$
NKP44	1.76 ± 0.27	2.63 ± 0.29	1.94 ± 0.35	2.020	0.247	—
NKP46	46.34 ± 1.67	45.95 ± 1.38	48.61 ± 1.57	0.690	0.553	—
CD226	92.15 ± 2.08	90.19 ± 3.96	89.10 ± 1.18	0.500	0.639	—
NKG2A	34.86 ± 0.92	34.69 ± 2.63	36.31 ± 1.25	0.590	0.596	—
CD158b	40.28 ± 1.89	38.61 ± 1.89	40.30 ± 1.06	0.240	0.796	—
颗粒酶 B	94.87 ± 1.04	80.52 ± 0.99	78.67 ± 2.73	19.160	0.009	^a $P=0.013$, ^b $P=0.008$
穿孔素	89.91 ± 1.52	90.06 ± 2.38	88.54 ± 2.21	2.580	0.191	—
Ki67	70.15 ± 2.35	52.31 ± 1.74	50.02 ± 2.68	16.400	0.012	^a $P=0.017$, ^b $P=0.011$

注: a, ESCC1-NK vs. NC-NK; b, ESCC2-NK vs. NC-NK

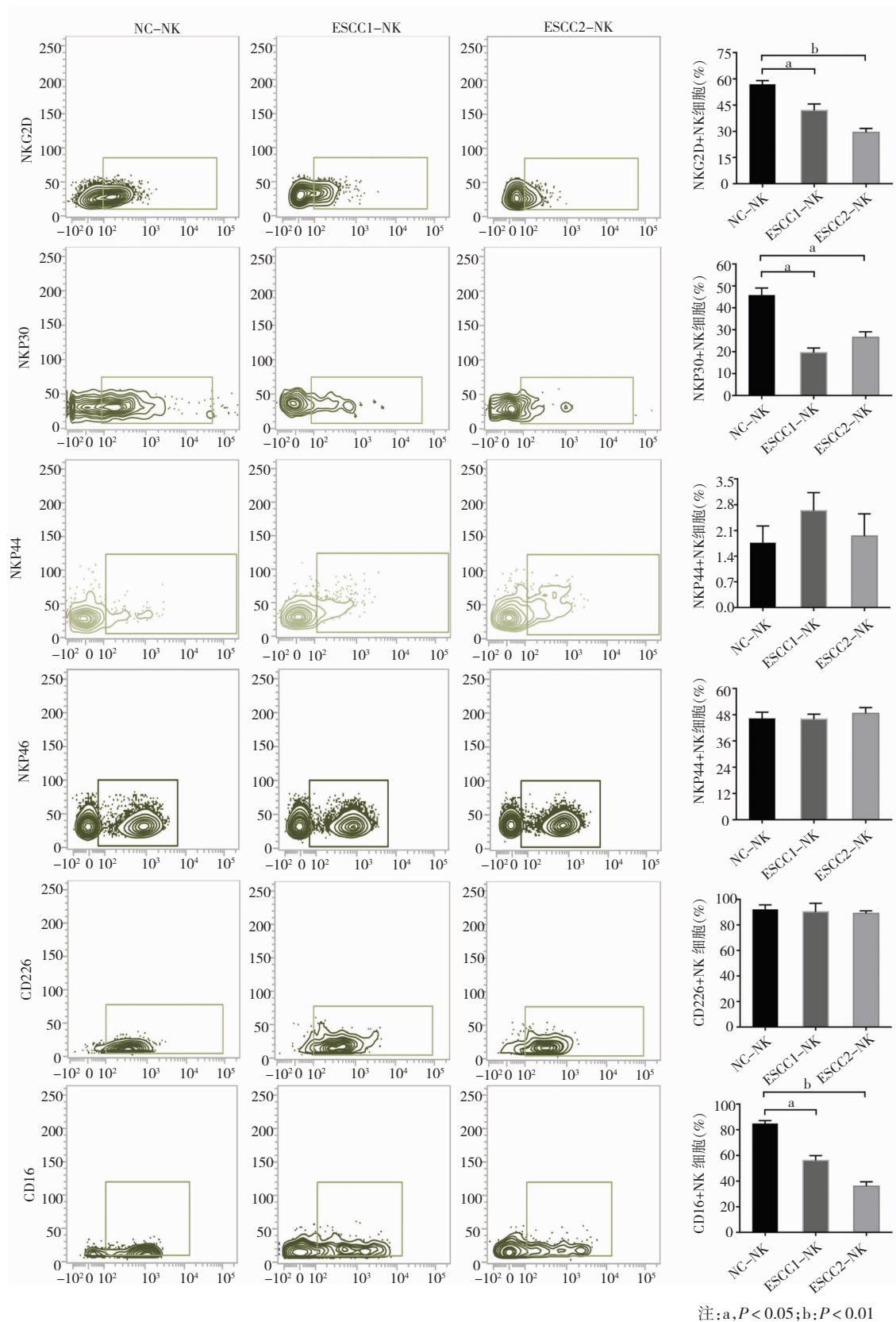


图3 流式细胞术检测 NK 细胞表面活化受体 NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、CD226、CD16 的表达

ESCC1-NK 组裸鼠肺部的肿瘤结节数 (41.00 ± 3.11) 明显多于 NC-NK 组裸鼠肺部的肿瘤结节数 (25.25 ± 2.32), ($t=4.068$, $P=0.007$) (图 6C)。动物实验提示与肿瘤细胞上清液共培养的

NK 细胞杀伤活性弱于正常培养的 NK 细胞的杀伤活性,提示肿瘤原代细胞可能表达某些介质以抑制 NK 细胞的杀伤能力。

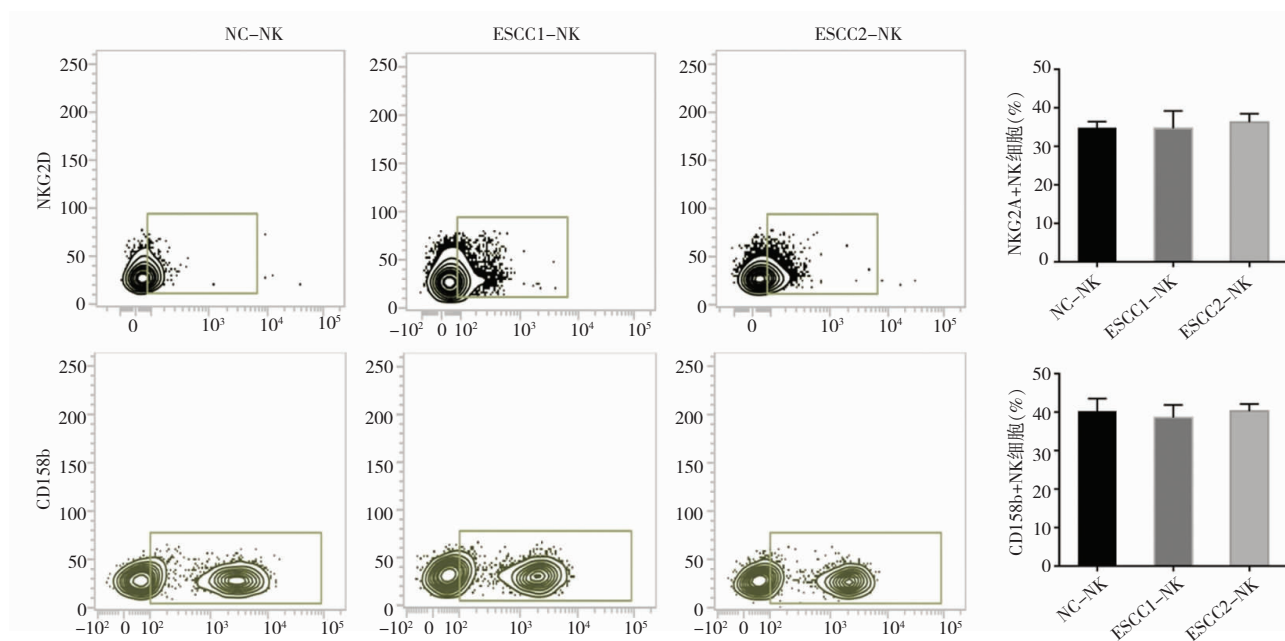


图 4 流式细胞术检测 NK 细胞表面抑制性受体 NKG2A、CD158b 的表达

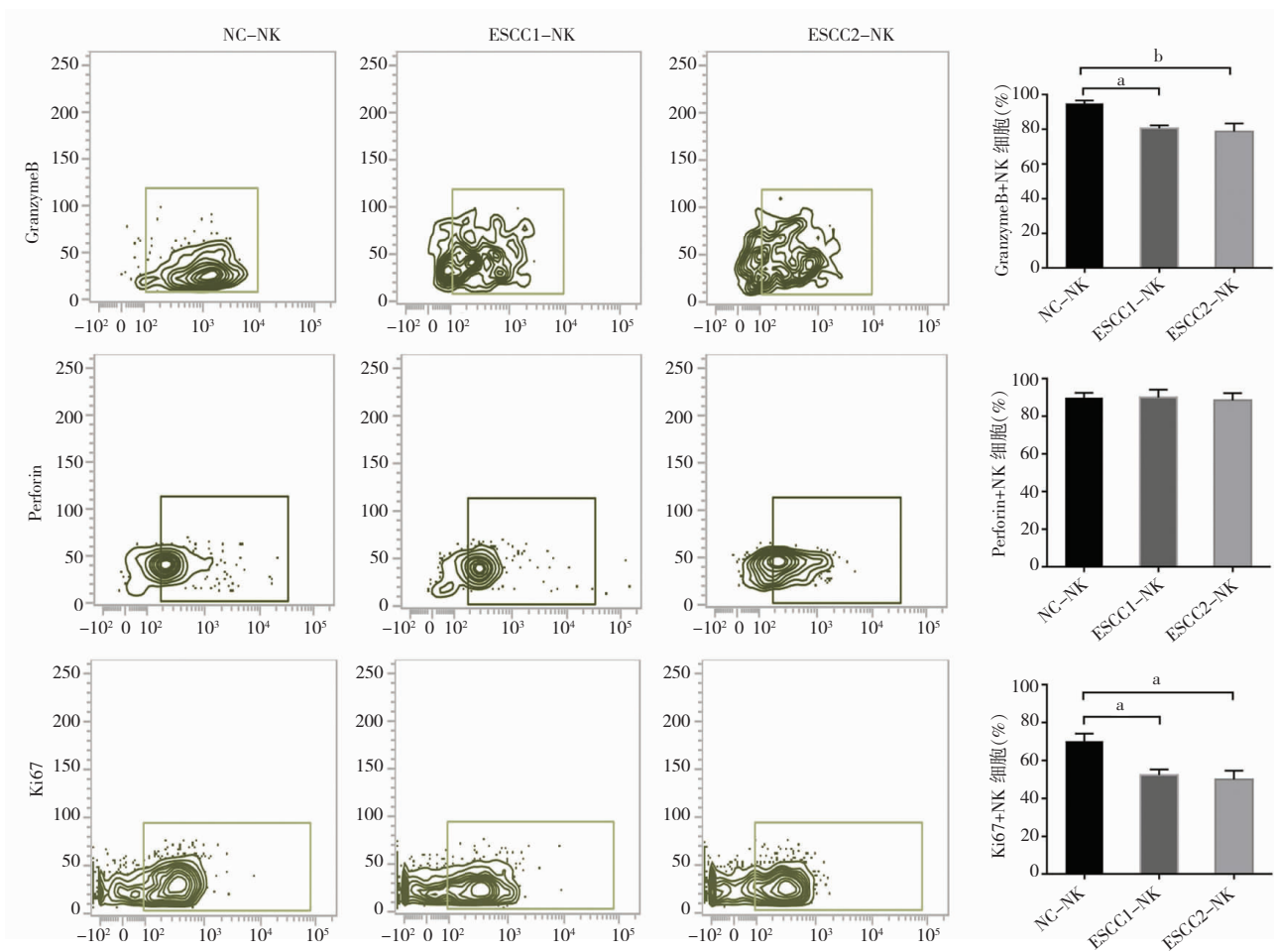
注: a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$

图 5 流式细胞术检测 NK 细胞胞内效应分子 GranzymeB、Perforin、Ki67 的表达

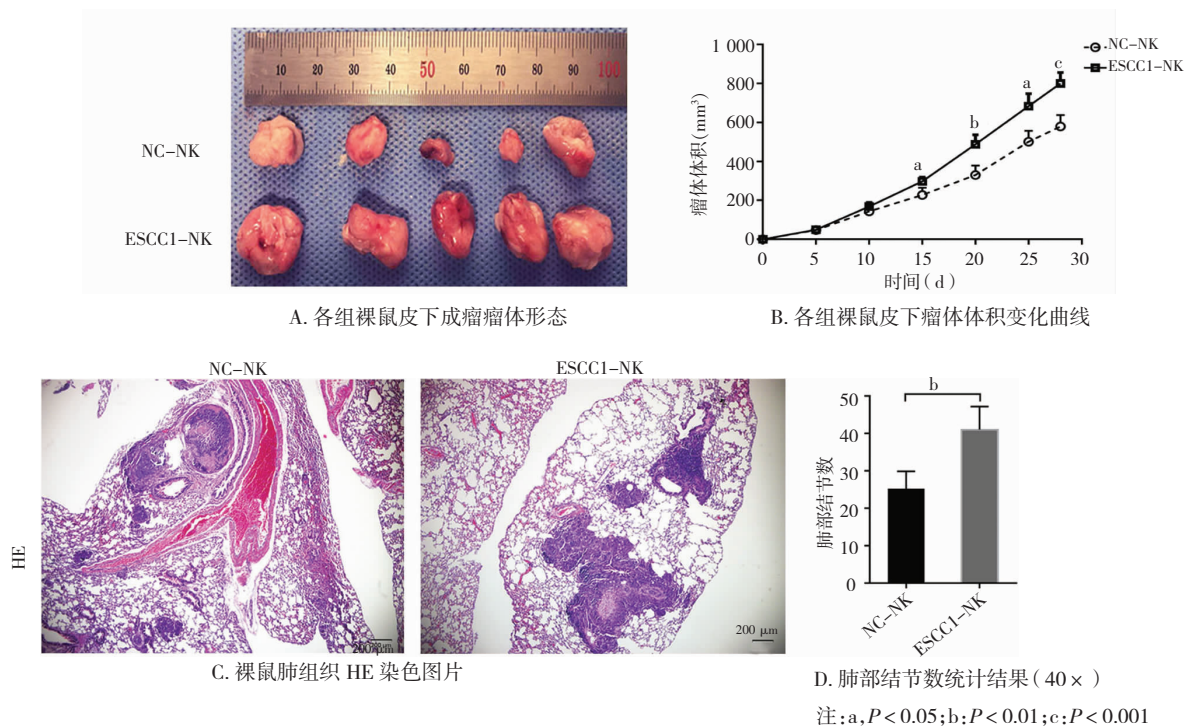


图 6 NK 细胞对皮下移植瘤及肺转移肿瘤的杀伤能力

3 讨论

NK 细胞是机体抑制肿瘤生长的重要免疫监视细胞^[8],与 T 细胞需要抗原致敏且受到 MHC 分子的限制不同,NK 细胞可直接识别并杀伤癌细胞,是机体抵抗肿瘤的第一道防线^[9]。目前研究表明 NK 细胞对转移性或血液性肿瘤表现出快速且有效的免疫,然而,许多人类癌症^[10-11]疾病和动物模型^[12]中都发现存在 NK 细胞功能失调的现象。且目前针对 NK 细胞在食管鳞癌微环境中功能异常的研究尚少。因此,针对 NK 细胞在食管鳞癌微环境中研究,了解其在食管鳞癌中受到的免疫调控显得尤为重要。由于在体内研究肿瘤细胞形成的微环境难度比较大,有报道指出,将 T 细胞与乳腺癌原代肿瘤细胞培养上清共培养后,可以诱导类似肿瘤微环境对 T 细胞的免疫抑制效应^[13]。故本研究进一步将食管癌原代细胞培养上清和 NK 细胞共培养,拟探究食管癌细胞对 NK 细胞表型及功能的调控。结果发现,原代食管鳞癌细胞可能通过抑制 NK 细胞活化及增殖、减少 NK 细胞杀伤效应分子的表达来降低 NK 细胞杀伤能力,从而逃逸机体免疫监视。

原代细胞与传统细胞株相比,更能反映当前个体的肿瘤细胞的特质。但其在分离提取过程中,易受霉菌、细菌、纤维细胞污染,所以制备较为困难。

本研究采用改良后食管鳞癌原代培养技术,成功分离得到 ESCC1 和 ESCC2,将这 2 株细胞培养上清与 NK 细胞共培养来探讨其对 NK 细胞活性及功能的影响。NK 细胞的活化状态受到其表面活化性受体和抑制性受体的平衡调控^[14]。研究报道,NK 细胞表面受体的改变参与了许多疾病的发生发展,例如 MDS 患者外周血表面活化性受体 NKG2D 低于对照组,随着病程的进展,活化性受体表达逐渐下降^[15];对大量急性髓系白血病患者 NK 细胞进行分析发现,患者 NK 细胞表面关键的活化分子 NKP30 均表达不足^[16]。本实验食管鳞癌原代细胞培养上清与 NK 共培养后,与 NC-NK 相比,ESCC1-NK、ESCC2-NK 表面活化型受体 NKG2D、NKP30、CD16 的表达明显降低,其余活化型受体 NKP46、CD226、NKP44 的表达及抑制型受体 CD158b、NKG2A 表达差异无统计学意义。上述结果表明 NK 细胞活化能力受损。

NK 细胞通过其表面的受体识别靶细胞后,释放细胞毒性颗粒是 NK 细胞行使杀伤功能的主要途径^[17-18]。NK 细胞在食管癌细胞上清共培养后,其发挥抗肿瘤功能的效应蛋白颗粒酶 B 的表达减少,从而直接影响了肿瘤细胞的杀伤。与文献报道^[19]胃癌颗粒酶 B 表达明显低于癌旁组织相一致。细胞核相关抗原 Ki-67 是经典的细胞增殖相关分子标志物^[20]。本实验 NK 细胞与 ESCC1、ESCC2 上清液共培养后,Ki-67 明显降低。提示食管癌细胞抑制 NK

细胞的杀伤及增殖能力。

动物实验观察与肿瘤细胞上清液共培养后 NK 细胞对皮下移植瘤及肺转移肿瘤的杀伤能力,结果显示 ESCC1-NK 组皮下瘤体体积大于 NC-NK 组;ESCC1-NK 组裸鼠肺部的肿瘤结节数高于 NC-NK 组裸鼠肺部的肿瘤结节数。提示共培养后的 NK 细胞杀伤活性弱于正常的 NK 细胞的杀伤活性,进一步说明肿瘤原代细胞可能通过某种途径抑制 NK 细胞的杀伤能力。例如肿瘤细胞分泌免疫抑制细胞因子 TGF- $\beta^{[21]}$ 、影响 NK 细胞活化相关配体^[22]和受体^[23]的修饰和表达,干扰 NK 细胞的正常功能,从而避免免疫监视等。

总体而言,本次实验显示食管癌原代细胞对 NK 细胞活化、效应分子的表达、细胞增殖均具有较强的抑制作用,促使 NK 细胞对肿瘤的免疫杀伤效应减弱。进一步明确了 NK 细胞在食管癌中的表达调控及其临床意义,为阐明食管癌免疫抑制性微环境的形成机制提供新的实验证据。然而,肿瘤细胞与 NK 细胞的相互作用是个极其复杂的动态过程,涉及多个信号途径,如 TGF- β 、PI3K/AKT 等。食管癌细胞通过何种途径影响 NK 细胞生物学活性还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, et al. Functions of natural killer cells [J]. Nature Immunology, 2008, 9(5): 503-510.
- [4] Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma [J]. Cancer Res, 2011, 71(16): 5412-5422.
- [5] Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, et al. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the Nkp30 receptor [J]. Hepatology, 2009, 50(3): 799-807.
- [6] 王超. 食管鳞癌微环境对 NK 细胞表型及功能的影响 [D]. 泸州: 西南医科大学, 2018.
- [7] 王迪凡, 徐立辉. 用高转移人骨肉瘤亚群 OS-732 建立裸鼠骨肉瘤肺转移模型 [J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(15): 1466-1470.
- [8] Langers I, Renoux V M, Thiry M, et al. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis [J]. Biologics: Targets & Therapy, 2012, 6: 73-82.
- [9] Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma [J]. International Immunology, 2001, 13(4): 459-463.
- [10] Jewett A, Tseng HC. Tumor induced inactivation of natural killer cell cytotoxic function; implication in growth, expansion and differentiation of cancer stem cells [J]. Journal of Cancer, 2011, 2: 443-457.
- [11] Mamessier E, Sylvain A, Thibault ML, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2011, 121(9): 3609-3622.
- [12] Gill S, Vasey AE, De Souza A, et al. Rapid development of exhaustion and downregulation of co-siderin limits the anti-tumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells [J]. Blood, 2012, 119(24): 5758-5768.
- [13] Zhao E, Maj T, Kryczek I, et al. Cancer mediates effector T cell dysfunction by targeting microRNAs and EZH2 via glycolysis restriction [J]. Nature Immunology, 2016, 17(1): 95-103.
- [14] Moretta L, Bottino C, Pende D, et al. Human natural killer cells: their origin, receptors and function [J]. European Journal of Immunology, 2002, 32(5): 1205-1211.
- [15] Carlsten M, Baumann B, Simonsson M, et al. Reduced DNAM-1 expression on bone marrow NK cells associated with impaired killing of CD34⁺ blasts in myelodysplastic syndrome [J]. Leukemia, 2010, 24(9): 1607-1616.
- [16] Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, et al. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia; evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCR^{low} phenotype induction [J]. Blood, 2007, 109(1): 323-330.
- [17] Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis [J]. Nature Reviews Immunology, 2006, 6(12): 940-952.
- [18] Metkar S, Wang B, Aguilar-Santelises M, et al. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation [J]. Immunity, 2002, 16(3): 417-428.
- [19] Zhou Y, Shi D. Effect of GrB-positive expression in benign and malignant gastric epithelial tissue on local immune response [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2002, 82(14): 966-969.
- [20] Inwald E, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry [J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2013, 139(2): 539-552.
- [21] Castriconi R, Dondero A, Bellora F, et al. Neuroblastoma-derived TGF- β 1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells [J]. The Journal of Immunology, 2013, 190(10): 5321-5328.
- [22] Nanbakhsh A, Pochon C, Mallavialle A, et al. c-Myc regulates expression of NKG2D ligands ULBP1/2/3 in AML and modulates their susceptibility to NK-mediated lysis [J]. Blood, 2014, 123(23): 3585-3595.
- [23] Benson DM, Bakan CE, Mishra A, et al. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel, monoclonal anti-PD-1 antibody [J]. Blood, 2010, 116(13): 2286-2294.

(责任编辑: 唐秋姗)