

低剂量辐射激活 NK 杀伤活性在过继免疫治疗中的研究进展

潘晓松 施宇佳 姚怡敏 徐红 刘芬菊

(苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院 苏州 215123)

摘要 NK 细胞是机体杀伤肿瘤的重要免疫细胞,低剂量辐射(LDR)可以增强 NK 细胞的增殖能力及生物活性,其机制可能与 LDR 后内源性谷胱甘肽的诱导作用、增强 P38MAPK 信号传导途径有关。NK 细胞特别是 A-NK 细胞是过继性细胞免疫治疗良好的细胞来源,具有很好的治疗恶性肿瘤应用前景。

关键词 NK 细胞,低剂量辐射,过继性细胞免疫治疗

中图分类号 R392.12, Q691.5, R730.51

自然杀伤细胞(Natural killer cells)通常称为 NK 细胞,具有多种免疫学功能,是先天性免疫系统的重要组成部分,也是淋巴细胞中的一个特殊亚组,作为机体抗感染和防止细胞恶性转化的重要免疫细胞,在免疫调节和适应性反应建立的过程中起着关键作用。自然杀伤细胞作为细胞免疫中的非特异性成分,是早期抗肿瘤免疫机制中起重要作用的效应细胞,处于机体抗肿瘤的第一道防线,不依赖抗体或补体,不需预先激活即可直接杀伤肿瘤细胞,其杀伤作用无肿瘤特异性和 MHC 限制性。人类 NK 细胞是许多正常组织中常驻的淋巴细胞群体,在某些实体组织(包括肝、脾、肺及各种实体瘤等)中数量较多,而且这些细胞表达活化标志(CD69、CD25、HLA-DR)及各种粘附分子的水平明显高于外周血淋巴细胞,当予以生物反应调节剂全身或局部治疗时,在病毒感染期间,实体组织中 NK 细胞明显增多,有利于监视体内微环境并干涉肿瘤的发展^[1]。人类 NK 细胞呈 CD56、CD16 阳性,CD3、CD4、CD19 阴性,少部分 NK 细胞为 CD8 阳性。然而小鼠 NK 细胞为 NK1.1 阳性和 AMGM1 阳性,CD3、CD4、CD8 为阴性。资料表明,NK 细胞通过穿孔素及 Fas 配基活化后可产生 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-1 等细胞因子,而这些细胞因子的免疫调节作用是在 NK 细胞抗癌反应中实现的^[2]。本工作对利用 NK 细胞体外扩增回输技术,实现过继免疫治疗肿瘤的现状及其在临床中的应用进行回顾。

1 低剂量辐射(LDR)增强 NK 细胞活性

人类环境中长久以来就存在电离辐射。与人类

同在的低剂量辐射,所谓低剂量辐射是指剂量率 0.05 mGy/min 以内的各种照射,就累积剂量而言,低剂量是指人体遭受 200 mGy 以内的低 LET 辐射或 50 mGy 以内的高 LET 辐射。低剂量辐射可以刺激细胞提高在分子水平上的修复功能、提高淋巴反应性、促进抗体形成以及增强细胞抗肿瘤效应,机体受到低剂量辐射的最终结果是机体免疫功能增强。NK 细胞在体外的大量、迅速扩增是进行过继免疫研究或临床应用的重要基础,但是外周血中 NK 细胞相对数量较少,且为一异质性细胞群体,即使高度纯化的多克隆 NK 细胞仍无法满足 NK 细胞研究中的某些特殊要求。低剂量辐射可以引起多种正常体细胞的增殖,免疫增强效应早在 20 世纪 70 年代就有报道,它表现在淋巴细胞及其亚群分裂、增殖加快以及抗体水平形成加快、NK 细胞活性和抗体依赖性细胞活性(ADCC)增强、细胞因子分泌增强等,并且低剂量照射全血可增加淋巴细胞 ³H-TdR 的掺入^[3,4]。文献[5]报道,LDR 的 NK 细胞其增殖能力及生物活性都得到了增强。很多实验已经验证 LDR 可以诱导体外培养的体细胞出现免疫增强效应^[6,7]。

文献[5]采用 X 射线全身照射 Wistar 大鼠,分为 50 mGy、100 mGy、500 mGy 三个剂量组,通过流式细胞术观察低剂量照射后大鼠外周血 NK 细胞活性。发现,低剂量照射 24 h 后 NK 细胞活性上升,其中 100 mGy 照射组 24 h 后 NK 细胞活性明显升高,和对照组比较有显著性差异($p < 0.01$),但随着照射时间的延长,NK 活性逐渐下降(见表 1),但 500 mGy 组照射后 NK 活性降低。同时应用免疫

国家大学生创新项目(SG315750)、国家自然科学基金(30870585)资助

第一作者:潘晓松,女,1985年4月出生,2009年6月将硕士毕业,现为苏州大学放射医学与公共卫生学院在读硕士,研究方向为分子放射生物学

通讯联系人:刘芬菊

收稿日期:初稿 2008-11-24,修回 2009-02-09

组化方法,测定照射后细胞因子 IL-2、TNF- α 的含量,发现低剂量照射 100 mGy 组 24 h 后 IL-2、TNF- α 的含量较其它组明显提高^[5]。该实验结果提

示了低剂量电离辐射预照射,诱导了大鼠的适应性反应和兴奋性效应,具有增强机体的免疫功能效果。

Table 1 The effect of LDR on activity of NK cell

Dose / mGy	Activity of NK cell after LDR ($\bar{x} \pm s$, %)				
	1d	5 d	10 d	16 d	21 d
0	27.5 $\pm$ 4.0	18.6 $\pm$ 6.3	14.5 $\pm$ 5.3	12.2 $\pm$ 1.2	10.2 $\pm$ 2.3
50	26.3 $\pm$ 2.3	20.2 $\pm$ 3.1	18.5 $\pm$ 3.5	13.5 $\pm$ 4.3 ⁽¹⁾	11.2 $\pm$ 3.2
100	34.1 $\pm$ 2.3 ⁽²⁾	30.2 $\pm$ 3.6 ⁽²⁾	22.3 $\pm$ 2.3 ⁽¹⁾	15.2 $\pm$ 3.6 ⁽¹⁾	10.2 $\pm$ 2.3
500	23.4 $\pm$ 2.3	20.4 $\pm$ 1.3	15.3 $\pm$ 2.6	10.2 $\pm$ 5.3 ⁽²⁾	9.5 $\pm$ 2.6

$n=8$, ⁽¹⁾ Compared with 1d, $p<0.01$; ⁽²⁾ Compared with the control group, $p<0.05$

文献[6]报道用 25 mGy、75 mGy、200 mGy、500 mGy 体外照射小鼠脾脏 NK 细胞,并选择 4 h、24 h、48 h、72 h 共四个时间点:用流式细胞仪检测 LDR 后 NK 细胞增殖情况,结果发现,NK 细胞在 500 mGy 以下照射均表现为增殖状态,但在 75 mGy 受照射后的 24 h 最敏感,表现为增殖指数最高;采用 K562 细胞(人红白血病细胞株)为靶细胞,用 ³H-TdR 掺入法检测体外 LDR 后 NK 细胞的杀伤活性,结果显示 25 mGy、75 mGy、200 mGy、500 mGy 体外照射剂量组的 NK 细胞杀伤活性均在照射后 24 h 出现最高值。其中,75 mGy 组 24 hNK 细胞的杀伤活性最大。同样,有研究人员应用 75 mGy 体外照射 NK 细胞,并选择照射后 4 h、24 h、48 h、72h 共 4 个时间点,以肝癌 SMMC-7721 细胞为靶细胞,应用流式细胞仪检测体外 LDR 后 NK 细胞的增殖指数,用 ³H-TdR 掺入法检测体外 LDR 后 NK 细胞的杀伤活性。结果显示体外 LDR 可以增加 NK 细胞的增殖指数和杀伤活性,时间上以照射后 24 h 最为明显^[7]。较多实验研究结果显示,给予 NK 细胞剂量为 75~100 mGy 的 LDR,在照后 24 h 左右 NK 细胞杀伤活性最大,这为临床过继免疫治疗提供了实验依据。

目前低剂量辐射能使 NK 细胞增殖和提高 NK 细胞杀伤活性的相关机制尚待进一步研究。Kojima 等^[8]给予小鼠全身 γ 射线 0.5 Gy 照射,发现脾细胞谷胱甘肽水平在照后 2~6 h 显著升高,4 h 时出现高峰,照后 12 h 下降到照射前的水平。将从正常小鼠获得的还原型谷胱甘肽(GSH)添加到全身低剂量照射后的小鼠脾细胞,发现 GSH 可增加脾细胞的总谷胱甘肽含量和 NK 细胞活性。而其他的 GSH 的合成前体,如半胱氨酸, N-乙酰半胱氨酸和氧化谷胱甘肽,也增加了 NK 细胞的活性。但增强作用完全被抑制 GSH 前体合成的抑制剂丁硫氨酸亚砷胺

封锁,可见低剂量辐照后活细胞中内源性谷胱甘肽的立即诱导作用是 NK 细胞出现活性增强的原因之一。杨丽云等^[6]发现体内体外对 NK 细胞照射都会增强其增殖和杀伤活性,应用 P38MAPK 的抑制剂和激动剂进行抑制和激活 P38MAPK 信号通路的同时再给予 LDR,结果显示抑制 P38MAPK 后 LDR 后 NK 细胞的增殖和杀伤活性上升程度有所下降,与对照组比较差异显著($p<0.05$),反之亦然,这表明体外 LDR 是通过 P38MAPK 这条信号通路引起 NK 细胞增殖和活性的变化的^[6]。

2 LDR 提高过继免疫抗肿瘤疗效

肿瘤的生物免疫治疗被认为是继手术、放疗、化疗之后,对肿瘤具有确切效果的又一治疗方法。而过继性细胞免疫治疗是指通过传输体外培养扩增的免疫效应细胞,达到放大机体抗肿瘤免疫目的的肿瘤治疗方法。它作为目前生物免疫治疗中比较成熟的技术,是恶性肿瘤生物治疗的支柱性技术,包括两个过程:(1)效应细胞的体外选择扩增;(2)将效应细胞回输给肿瘤病人。其优点是抗癌谱广,几乎对所有肿瘤均能起到一定的治疗作用,同时可减轻放疗的不良反应。

Rosenberg 等^[9]发现人的外周血淋巴细胞加上 IL-2 后可产生一种淋巴样细胞,它能溶解新鲜的、非培养的但对 NK 细胞有抵抗的人瘤细胞,却不能溶解正常细胞,此种细胞被称为淋巴因子激活的杀伤细胞(Lymphokine-activated killer, LAK)。LAK 具有粘附于塑料材质器皿表面的特性,故又称之为粘附性 NK 细胞(Adherent Natural killer cell, A-NK 细胞)。并且首次证明荷瘤小鼠回输 LAK 细胞能延长小鼠存活期。从此以 LAK、TIL 细胞为代表的肿瘤生物治疗在临床上得到广泛应用,并取得了一定的疗效^[9]。临床资料表明,淋巴因子激活的杀伤细

胞 (LAK) 和肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 在治疗肿瘤过程中疗效欠佳, 且细胞在体外大量扩增困难, 故限制了临床的应用。而 NK 细胞是一类无需预先致敏, 无 MHC 限制性, 能直接杀伤靶细胞的特殊的淋巴细胞群体, 它具有的许多特点优于其它过继免疫治疗的效应细胞, 体外实验中它不仅具有极高的增殖和杀伤 K562、Daudi 等肿瘤细胞的能力, 还能浸润到肿瘤细胞囊球内部杀伤其中的瘤细胞。体内实验中 A-NK 是血液和组织中非常有效的免疫监视细胞, 能进入实体组织并破坏其中的瘤细胞, 减少转移瘤数目, 甚至引起部分转移瘤的消退, 延长荷瘤动物的生存期^[10]。A-NK 细胞和 IL-2 (IL-2 能刺激 NK 细胞增殖) 过继转输几乎能完全抑制在裸鼠体内建立的人头颈部鳞状细胞癌模型肿瘤的生长; 对胃癌肝转移模型能明显减少肝内转移瘤数目并延长小鼠生存期。对结肠癌肺转移大鼠模型转输同基因 A-NK 细胞, 发现 A-NK 细胞能识别并特异性浸润肺转移灶, 并具有时间和剂量依赖性, 用聚乙二醇修饰 IL-2 可使 A-NK 细胞对肿瘤的浸润性增强^[11]。赵东陆等^[12]运用 IL-2 联合 IL-12 激活 A-NK 细胞, 将 A-NK 细胞转输至肝癌 HepG-2 细胞株裸鼠皮下移植瘤模型体内, 发现移植瘤生长速度缓慢, 体积明显小于对照组, 而且荷瘤鼠生存期显著延长。文献^[13]用 NK 细胞过继免疫治疗小鼠转移瘤的实验研究证实, NK 细胞能聚集并浸润到肺及肝脏的转移性肿瘤病灶周围及肿瘤组织内部, 起到杀伤肿瘤的作用。Igarashi 等^[14]的研究表明, 使用不相容的杀伤免疫球蛋白样受体 (KIRS) 同种异体 NK 细胞的免疫疗法, 与使用自体 NK 细胞方法相比, 可能有更优越的抗实体肿瘤效果。Ruggeri 等^[15]的实验已在 NOD/SCID 小鼠身上证明: 将 NK 细胞输注到 NOD/SCID 小鼠体内, 在产生抗白血病效应的同时, 却不会产生移植物宿主效应 (GVHD)。可见, 过继性 NK 细胞免疫疗法的抗肿瘤效果是有目共睹的。而且 NK 细胞输注的过继性细胞免疫疗法的抗癌谱较广, 截至目前已报道了包括黑色素瘤、黑色

素瘤肺转移、胃癌、直肠癌、肺癌、结肠癌肝转移、结肠癌肺转移、肾癌肺转移、肺腺癌等不同病种, 使用 NK 细胞输注的过继性细胞免疫疗法后得到缓解。但是联合大剂量 IL-2 输注的不良反应较大, 例如液体滞留, 体重增加, 此外多数病人还有发热寒颤、全身不适。而 NK 细胞输注的不良反应却不大, 仅部分病人有短暂发热效应^[9]。而低剂量辐射能够增殖 NK 细胞、A-NK 细胞并提高其杀伤活性, 这使得 NK 细胞的体外大量扩增成为可能, 为 NK 细胞用于过继性细胞免疫治疗提供了良好的细胞来源。

应用低剂量辐射 (LDR) 以及 IL-2 共同刺激 NK 细胞增殖回输治疗肿瘤, 目前临床治疗报道比较少。文献^[7]以重组人 IL-2 (rhIL-2) 为诱导因子在体外进行 NK 细胞的扩增培养, 并给予其 75 mGy 体外 LDR, 然后把 NK 细胞输入到 SMMC-7721 肝癌大鼠, 与未处理 NK 细胞输入组比较, 发现 LDR 后的 NK 细胞输入可以明显延长大鼠生存时间, 降低肿瘤体积和外周血中 AFP 浓度 ($p<0.05$)。实验表明 LDR 可以促进 NK 细胞在体外的增殖并且使其活性增强, 体外增殖后的 NK 细胞输入大鼠体内后对肿瘤有抑制和杀伤作用, 并使荷瘤大鼠生存期延长^[7]。杨丽云等^[6]把 LDR 后的 NK 细胞输入到 K562 荷瘤小鼠体内, 观察 NK 细胞对 K562 成瘤的抑制作用和对已经成瘤的小鼠肿瘤的生长的抑制作用 (见表 2), 发现 LDR 后 NK 细胞输入可以抑制 K562 细胞 (CD13⁺) 成瘤, 表现在肿瘤形成缓慢 (肝脾 CD13⁺ 细胞、S 期细胞, 外周血异常细胞百分率下降), 与未经过 LDR 的 NK 细胞输入组差异具有统计学意义 ($p<0.05$); 还对已经成瘤的小鼠的肿瘤有抑制作用, 比未经过 LDR 的 NK 细胞效果明显, 表现在肿瘤体积减小、重量降低以及生存时间延长和生存率明显上升 ($p<0.05$) 等方面^[6]。这表明 LDR 后的 A-NK 细胞作为过继性细胞免疫治疗优质细胞来源, 发挥了较强的抗肿瘤作用。

Table 2 Inhibition of adoptive LDR-NK cell immunotherapy on tumor growth

Groups	Tumor volume (cm ³ , n=8)	Tumor weight (g, n=8)	Survival time (d, n=12)	Survival rate (% , n=12)
Control group	4.12±1.21	3.01±0.09	29.5±8.4	12.56±1.45
NK cell+IL-2 group	1.54±0.29 ⁽¹⁾	1.25±0.03 ⁽¹⁾	60.2±10.5 ⁽¹⁾	72.64±10.39 ⁽¹⁾
LDR-NK cell+IL-2 group	0.98±0.09 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.58±0.01 ⁽¹⁾⁽²⁾	81.5±14.8 ⁽¹⁾⁽²⁾	92.82±11.71 ⁽¹⁾⁽²⁾
IL-2 group	3.47±0.98	2.47±0.04	41.8±9.6	39.61±3.37 ⁽¹⁾

Compared with the control group, ⁽¹⁾ $p<0.05$; Compared with NK cell+IL-2 group, ⁽²⁾ $p<0.05$

3 展望

低剂量辐射联合特殊细胞因子(例如 IL-2)预先处理能够使 NK 细胞体外扩增,其杀伤活性增强,补充 NK 细胞,不仅避免大剂量细胞因子带来的不良反应,而且它不依赖宿主免疫能力,抗癌谱广,还可以与化疗或放疗合用,减轻放化疗的不良反应,是一种比较好的过继性细胞免疫疗法,具有广阔的临床抗肿瘤应用前景!其研究可能出现以下几种趋势:(1)低剂量辐射对 NK 细胞过继免疫治疗激活作用机制的研究。(2)寻找照射剂量与 NK 细胞过继免疫治疗的疗效之间的量效关系。(3)加强 NK 细胞过继免疫治疗的病种特异性研究。

参考文献

- Cooper M A, Fehninger T A, Turner S C, *et al.* Blood, 2001, **97**(10): 3146-3151
- Farag T A, Fehninger L, Ruggeri A, *et al.* Blood, 2002, **100**(6): 1935-1947
- HU B, WU L, HAN W. Cartcinogenesis, 2006, **27**(2): 245-251
- WANG H P, LONG X H, SUN Z Z, *et al.* Int J Radiat Biol, 2006, **82**(3): 181-190
- 封丽, 邓太平. 中国辐射卫生, 2007, **16**(3): 26-28
FENG Li, DENG Daping. Chin J Radiol Health, 2007, **16**(3): 26-28
- 杨丽云, 林美雄. 放射免疫学杂志, 2006, **19**(6): 529-534
YANG Liyun, LIN Meixiong. Journal of Radioimmunology, 2006, **19**(6): 529-534
- 王宝胜, 张道广, 张铭琰. 中国老年学杂志, 2006, **12**(26): 1679-80
WANG Baosheng, ZHANG Daoguang, ZHANG Minglian. Chinese J Gerontol, 2006, **12**(26): 1679-80
- Kojima S, Ishida H, Takahashi M, *et al.* 2002, **157**(3): 275-80
- Rosenberg S A, Lotze M T, Muul L M, *et al.* N Engl J Med, 1985, **313**(23): 1485-92
- GU S, Furukawa H, Yamashita A, *et al.* Cancer Immunol Immunother, 2000, **48**(12): 703-713
- 杨虹. 国外医学免疫学分册, 2002, **25**(4): 184-6
YANG Hong. Foreign Medical Sciences: Immunology, 2002, **25**(4): 184-6
- 赵东陆, 王志华, 张春艳. 世界华人消化杂志, 2004, **8**(12): 1959-1961
ZHAO Donglu, WANG Zhihua, ZHANG Chunyan. World Chinese Journal of Digestology. 2004, **8**(12): 1959-1961
- YANG Q, Hokland M E, Bryant J L, *et al.* Int J Cancer, 2003, **105**(4): 512-519
- Igarashi T, Wynberg J, Srinivasan R, *et al.* Blood, 2004, **104**(1): 170-177
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, *et al.* Science, 2002, **295**(5562): 2097-2100

Progress of research on activation function of NK cell exposed to low dose radiation in adoptive cellular immunotherapy

PAN Xiaosong SHI Yujia YAO Yimin XU Hong LIU Fenju

(School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT Natural killer cells is an important immunological factor in killing malignant cells. Low dose radiation can enhance proliferation and biological activity of NK cell. The involvement of P38MAPK signal pathway and endogenous glutathione induced by LDR may be the probable mechanism. Natural killer cell, especially adherent natural killer cell, is the preferential choice for adoptive cellular immunotherapy, which has a remarkable foreground in malignancy therapy.

KEYWORDS Natural killer cell, Low dose radiation (LDR), Adoptive cellular immunotherapy (ACI)

CLC R392.12, Q691.5, R730.51