

# B<sub>16</sub>黑色素瘤 NK 免疫耐受变异群 在体外的产生及其意义\*

唐西明\*\* 董 郡

(中山医科大学病理学教研室, 广州, 510089)

**提 要** 研究 B<sub>16</sub>黑色素瘤细胞在自然杀伤(NK)细胞环境中获得 NK 耐受力的现象,并建立了暂时耐受 NK 的 B<sub>16</sub>亚群。将小鼠分别用 Poly I:C 和 anti-asialo GM<sub>1</sub> 处理以活化和灭活 NK 细胞,制备其脾淋巴细胞悬液。当 B<sub>16</sub>细胞反复多次与高 NK 活性的脾淋巴细胞共同孵育后,能在体内或体外抵抗 NK 细胞的杀伤。这说明经受 NK 攻击后的肿瘤细胞能从 NK 的攻击中获取对 NK 的耐受力,这一现象也许是肿瘤在机体内得以生存、发展并浸润转移的重要因素之一。

**关键词** 天然杀伤细胞; B<sub>16</sub>黑色素瘤; 免疫耐受; 组织培养

**中图分类号** R739.5; 73-3; 730.21

近年已十分明确,突变后的肿瘤细胞的生存、生长、浸润及转移与宿主内自然杀伤(NK)细胞活性低下密切相关<sup>[1]</sup>。可以推测,瘤细胞对 NK 细胞的敏感性也同样影响着肿瘤的生长与发展。因而肿瘤细胞的 NK 耐受现象已受到关注。不同的肿瘤、同一肿瘤内不同的细胞克隆之间,对 NK 的敏感性差异很大<sup>[2,3]</sup>,许多因子能影响肿瘤对 NK 的敏感性<sup>[4,5]</sup>。作者认为,肿瘤 NK 耐受性可以在其发展中不断形成,而肿瘤生长环境中 NK 活性大小是肿瘤产生 NK 耐受性的重要因素之一。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动 物

C57BL/6J 小鼠 60 只,雌性,体重 12~15g,4~8 周龄,中国医学科学院动物所提供。

### 1.2 肿 瘤

B<sub>16</sub>黑色素瘤细胞,中国医学科学院药物所提供,在 C57BL/6J 小鼠体内传代。

### 1.3 培养液

RPMI1640 (Gibco),另加 20% 小牛血清,青霉素、链霉素各 100μ/ml,2 × 10<sup>-2</sup> mmol/L HEPES。

### 1.4 脾淋巴细胞制备

按 Shu 的方法<sup>[6]</sup>稍加改良。小鼠颈椎脱臼致死,75% 酒精浸泡 5min,取脾用 10ml 氯化铵钾缓冲液将脾细胞冲洗出,经过滤、离心、HBSS 洗 2 次,玻璃粘附法去单核细胞、收集备用,台盼蓝染色拒染率不小于 95%。

### 1.5 B<sub>16</sub>细胞 NK 耐受亚群的制备

将 B<sub>16</sub>细胞反复与不同活性的 NK 细胞共同孵育而产生。步骤如下:取 15 只小鼠中 3 只,分别于处死前 1、3 和 1d 注射 Poly I:C (NK 激活剂,广州光华制药厂)、anti-asialo GM<sub>1</sub> (NK 灭活剂,日本和光)和生理盐水(对照)。小鼠处死后按前述方法分别制备脾淋巴细胞悬液,将细胞悬液加于贴壁生长良好的 B16 细胞(与淋巴细胞比约为 1:100)上,4h 后倾去淋巴细胞和上清液,用 HBSS 洗 3 次,换新鲜培养液继续培养至次日,待瘤细胞恢复

\* 国家教委基金资助课题

\*\* 第一作者,35岁,男,讲师

良好后重复上述处理,每日1次,连续5d,所得细胞分别命名为 B<sub>16</sub>-Pi、B<sub>16</sub>-Gi 和 B<sub>16</sub>-Si,未经上述处理者为 B<sub>16</sub>-0。

### 1.6 体外细胞毒试验

采用 16h<sup>125</sup>I-UdR 同位素释放分析

$$^{125}\text{I 释放率} = \frac{\text{实验组 cpm} - \text{自发释放 cpm}}{\text{总释放 cpm} - \text{自发释放 cpm}} \times 100\%$$

### 1.7 体内4h 肺滞留率

将上述同位素标记的 B<sub>16</sub>各亚群细胞注入 C57BL/6J 小鼠尾静脉内,4h 后取肺于 FT613放免仪上测定同位素滞留率,以检测 B<sub>16</sub>各亚群细胞在体内对 NK 细胞的敏感性。

### 1.8 统计学方法

采用单因素多个实验组与一个对照组均数间的两两比较(Dunnett *t* 检验)<sup>[8]</sup>。

法<sup>[7]</sup>。方法大致如下:将待测细胞在体外用<sup>125</sup>I-UdR 标记,与 C57BL/6J 小鼠脾淋巴细胞混合培养 16h,收集上清液及淋巴细胞于 FT613放免仪上测定<sup>125</sup>I 释放率。另设5孔为自发释放孔。

## 2 结 果

### 2.1 Poly I:C 和 anti-asialoGM<sub>1</sub>对小鼠脾 NK 活性的影响

本文采用 16h<sup>125</sup>I 同位素释放分析法检测了经 Poly I:C、anti-asialo GM<sub>1</sub>和生理盐水处理后的小鼠脾 NK 细胞活性。以<sup>125</sup>I-UdR 标记的 B<sub>16</sub>细胞为靶细胞,各组小鼠 NK 活性如表1。

表1 Poly I:C 和 anti-asialo GM<sub>1</sub> 小鼠脾 NK 活性

处 理	<i>n</i>	16h <sup>125</sup> I-B <sub>16</sub> 细胞同位素释放率( $\bar{x}$ )	<i>q'</i> *
1. 生理盐水对照	5	11.07	
2. Poly I:C	5	19.56	3.02
3. anti-asialo GM <sub>1</sub>	5	4.47	2.99

\* Dunnett *t* 检验,  $P < 0.01$

### 2.2 与不同 NK 活性的淋巴细胞共同孵育后的 B<sub>16</sub>亚群细胞体外对 NK 的敏感性

B<sub>16</sub>细胞在体外与不同活性的 NK 细胞反复共同孵育后,对 NK 的敏感性明显不同,体外细胞毒试验结果(表2)显示,B<sub>16</sub>-Pi 的 NK 耐受性较 B<sub>16</sub>-0者增加;B<sub>16</sub>-Si 的 NK 耐受性轻度增加;B<sub>16</sub>-Gi 的 NK 耐受性未增加。而且这种获得性的 NK 耐受性的差别是暂时的,体外传代过程中会逐渐丧失,至第10代时各组与对照组 B<sub>16</sub>-0之间已无明显差别,说明肿瘤这种获得性 NK 耐受性在无 NK 细胞环境中不能长期保持。

### 2.3 与不同 NK 活性脾淋巴细胞共同孵育后的 B<sub>16</sub>细胞对体内 NK 的敏感性

在体内,NK 细胞较其它免疫细胞作用迅速。因而肿瘤细胞4h 肺滞留率反映了体内 NK 活性或肿瘤对 NK 的敏感性。实验结果表明(表3)B<sub>16</sub>-Pi 较对照组 B<sub>16</sub>-0在肺内滞留率高,在体内能抵抗 NK 攻击,说明其获得了耐受 NK 的能力。B<sub>16</sub>-Gi 则不能耐受 NK。因此可以认为肿瘤细胞经受 NK 攻击后能耐受 NK,增强在 NK 环境中的生存能力。

表2 B<sub>16</sub>亚群细胞体外 NK 敏感性

B <sub>16</sub> 亚群	n	16h <sup>125</sup> I 同位素释放率( $\bar{x} \pm s$ )%	
		第2代	第10代
B <sub>16</sub> -Pi	5	8.03 ± 1.28 *	17.23 ± 2.62
B <sub>16</sub> -Gi	5	13.32 ± 2.06	17.92 ± 2.03
B <sub>16</sub> -Si	5	10.54 ± 1.39 * *	16.98 ± 2.84
B <sub>16</sub> -0	5	13.65 ± 1.89	17.42 ± 1.99

\*  $q' = 3.52, P < 0.01$ ; \* \*  $q' = 2.91, 0.01 < P < 0.05$ , 其余各组  $P > 0.05$ . Dunnett *t* 检验, 各实验组与对照组 B<sub>16</sub>-0 比较

表3 B<sub>16</sub>亚群细胞体内 NK 敏感性

B <sub>16</sub> 亚群	n	4 h <sup>125</sup> I 同位素滞留率( $\bar{x} \pm s$ )%	q'	P
B <sub>16</sub> -Pi	10	32.64 ± 5.42	3.22	<0.01
B <sub>16</sub> -Gi	10	14.42 ± 2.80	1.97	>0.05
B <sub>16</sub> -Si	10	20.37 ± 3.51	2.71	<0.05
B <sub>16</sub> -0	10	13.62 ± 2.32		

Dunnett *t* 检验, 各实验组与对照组 B<sub>16</sub>-0 比较

### 3 讨 论

越来越多的迹象表明肿瘤在宿主内的生物学行为是不断变化的。随着肿瘤在体内的生长和发展,其生物学行为不断恶化,生长速度加快、浸润转移能力增强,这往往是恶性肿瘤病人在中晚期迅速恶化的原因之一。肿瘤生物学行为的恶化,一方面是机体重要器官功能包括免疫功能衰竭的结果,另一方面是肿瘤自身发生了重要变化,如免疫耐受力的增强。

从事实验肿瘤的人们曾注意到,转移灶肿瘤的移植块较原发灶容易接种成功;体内生长的肿瘤较体外培养的瘤细胞容易接种成功。这说明能逃避机体免疫生存下来的肿瘤细胞具有较强的生命力。作者进一步推测这种肿瘤逃避免疫的能力实际上主要是(或一定程度上是),肿瘤获得的NK耐受力,而这种获得性NK耐受力是肿瘤细胞在经受NK

细胞攻击后产生的一种适应性变化。实验结果证实了这一推测。

实验结果显示:B<sub>16</sub>细胞在体外遭受NK细胞反复攻击后,对NK的敏感性降低(即NK耐受性增强)。而且增加的NK耐受力的强度与其遭受NK攻击的NK活性有关。这种NK耐受力的获得很可能会影响肿瘤生物学行为。NK细胞的攻击使大部分敏感的肿瘤细胞死亡,然而少数残存的肿瘤细胞由于产生了NK耐受性,从而能逃避NK的杀伤,进而生物学行为更加恶化。

Yogeeswaran 等<sup>9</sup>早已注意到肿瘤细胞与脾淋巴细胞接触后产生NK耐受性的现象,但对机理解释未能统一认识。有人认为是IFN-r的作用,Gronberg等<sup>14</sup>指出IFN-r能降低靶细胞对大颗粒淋巴细胞胞浆颗粒溶解毒性的敏感性。但Saxena等<sup>15</sup>从ConA刺激的大鼠脾细胞上清液中分离出的一种诱导Yac 1细胞能抵抗NK的因子并不具备IFN-r的免疫学和理化特性。他们发现用该因子

处理 Yac-1 细胞后能使细胞表达 MHC-I 抗原增多,从而认为肿瘤细胞 NK 耐受性的改变与其表达 MHC-I 抗原有关。但这一观点并未得到广泛支持。本文对 NK 耐受性的机制未作进一步探讨,肿瘤获得 NK 耐受性与其经受 NK 的直接攻击有关,而这并非是简单的克隆选择的结果,因为这一获得的 NK 耐受力并不能在体外长期保持。

肿瘤在 NK 细胞环境中获得 NK 耐受的现象在解释肿瘤生物学行为恶化方面具有很大意义。NK 细胞是肿瘤的重要免疫细胞,肿瘤逃避 NK 的攻击是其生存的重要前提。肿瘤细胞从 NK 的杀伤过程中获得 NK 耐受力是其生长适应能力增强的表现。这一能力直接导致肿瘤在机体内因逃避 NK 的免疫而加速其生长、浸润和转移过程。

#### 参 考 文 献

- 1 Gorelik E, Wilttrout RH, Okumura K, et al. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int J Cancer*, 1982, 30:107
- 2 Kimber I, Moore M, Roberts K. Variance in resistance to natural and antibody-dependent cellular cytotoxicity and to complement-mediated lysis among K562 lines. *Int J Cancer*, 1983, 32: 219
- 3 唐西明,董 郡. 人类自然杀伤细胞对靶细胞的选择性杀伤的研究. *中华病理学杂志*, 1990, 19,(2):144
- 4 Gronberg A, Ferm MT, Janet NG, et al. IFN-gamma treatment of K562 cells inhibits natural killer cells triggering and decreases the susceptibility to lysis by cytoplasmic granular lymphocytes. *J Immunol*, 1988, 140(12):4397
- 5 Sexena RK, Spleen cell derived factor imparts resistance to NK cell mediated lysis in a mouse lymphoma cell line. *Immunol Lett*, 1987, 15(2): 105
- 6 Shu S, Zhou T, Rosenberg SA. In vitro sensitization and expansion with viable tumor cells and interleukin 2 in the generation of splenic therapeutic effector cells. *J Immunol*, 1986, 136(10): 3891
- 7 石 卫,吴易元,张友会. 天然杀伤(NK)细胞活性测定—<sup>125</sup>I UdR 及 <sup>51</sup>Cr 释放试验的比较. *中国免疫学杂志*, 1986, 2(1):14
- 8 郭祖超. 单因素多个实验组与一个对照组均数间的两两比较. *医用数理统计方法*. 第3版. 北京:人民卫生出版社,1988. 266~268
- 9 Yogeewaran G, Gronberg A, Hansson M, et al. Correlation of glycosphingolipids and sialic acid in Yac-1 lymphoma variants with their sensitivity to natural kill-cell-mediated lysis. *Int J Cancer*, 1981, 28:517

(1992-09-01收稿 1993-07-20修回)

# A NEW NK-TOLERANT VARIANT SUBSET OF B<sub>16</sub> MELANOMA CELLS PRODUCED IN VITRO AND ITS SIGNIFICANCE

Tang Ximing      Dong Jun

(Department of Pathology Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

A phenomenon of B<sub>16</sub> melanoma cells acquiring NK-tolerance in surrounding of NK cells was investigated, and in the same time, a new NK-tolerant B16 subset produced. For activating and inactivating NK cells, the mice were injected with Poly I:C and anti-asialo GM1 separately. The splenic lymphocyte suspensions of the pretreated mice having different NK activity were yielded and cocultured respectively with subconfluent B16 cells for four hours. After the same treatment of five times (1 time/day), the B<sub>16</sub> subsets have different NK-tolerance. The subset which was attacked by high active NK cells can resist NK cytotoxicity. The results revealed that the tumor cells can acquire NK-tolerance during the attacking by NK cells, and this phenomenon perhaps is one of important factors involving survival, development, infiltration and metastasis of malignant cells in host.

**Key words**      killer cells natural; B<sub>16</sub> melanoma; immune tolerance; tissue culture

## · 题 录 ·

- 黄 迪      Epstein-Barr 病毒特异性 DNA 酶抗体水平检测在鼻咽癌早期发现中的提示性    中华肿瘤杂志, 1993,15(4):289
- 蔡海英      人食管癌裸鼠移植瘤株的建立及其应用的研究    中华肿瘤杂志,1993,15(4):248
- 关永源      Cyclopiiazomin acid 增加 SHR 和 WKY 血管平滑肌细胞 Ca<sup>2+</sup> 依赖性外向    中国药理学通报, 1993,9(4):257~260
- 伍杰雄,等      三七总皂甙对 Sprague-Dawley 种系大鼠脑血管阻力的影响    中药药理与临床,1993,9(4):21
- 伍杰雄,等      滋肾宁神丸对小鼠行为的影响    中草药,1993,24(7):36
- 伍杰雄,等      三七总皂甙对大鼠颈内动脉、肠系膜前动脉血流动力学的作用比较    中国药理学通报 1993,9(3):198
- 陈炳生      IgE、IRMA 在过敏性疾病中的应用    放射免疫学杂志,1993,6(2):79~80
- 余步云      风湿热现状    中华内科杂志,1991,33(1):1~2