论著

文章编号:1000-5404(2006)16-1652-04

$Prostein_{31-39}$特异的、HLA-A*2.1限制性NKT细胞表型及功能初步研究

王惠明,王沂芹,阮志华,徐文岳,邹丽云,赵婷婷,吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 诱导培养前列腺癌相关抗原Prostein特异性NKT细胞,并对其表型及功能作初步研究鉴定。**方法** 以$Prostein_{31-39}$肽、IL-2、IL-12反复刺激培养HLA-A2.1$^+$健康志愿者外周血单个核细胞(PBMCs),对得到的细胞系进行细胞毒功能试验,并以多色流式细胞检测技术进行表型分析。**结果** $Prostein_{31-39}$肽、IL-2、IL-12可以诱导PBMCs产生肽特异性CD3$^+$/CD56$^+$NKT细胞,具有较强的肽特异性细胞毒活性及NK样细胞毒活性。**结论** $Prostein_{31-39}$肽、IL-2及IL-12可以协同诱导培养肽特异性NKT细胞,这为研究抗原特异性NKT细胞在前列腺癌免疫治疗中的作用奠定了基础。

关键词:前列腺癌;NKT细胞;IL-12;Prostein

中图法分类号:R392-33;R392.12;R737.25 **文献标识码**:A

Generation and characterization of HLA-A*2.1 restricted and $Prostein_{31-39}$ specific NKT cell lines

WANG Hui-ming, WANG Yi-qin, RUAN Zhi-hua, XU Wen-yue, ZOU Li-yun, ZHAO Ting-ting, WU Yu-zhang (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To generate and characterize the Prostein-specific NKT cell lines. **Methods** $Prostein_{31-39}$ peptide, IL-2 and IL-12 were used to stimulate peripheral blood mononuclear cells of healthy male donors. ^{51}Cr release assay and flow cytometric analysis were applied to study the cytotoxicity and phenotypic properties of the induced cell lines. **Results** The *ex vivo* expanded cell lines contained some peptide specific CD3$^+$/CD56$^+$ natural killer T cells, and possessed enhanced cytotoxicity function against $Prostein_{31-39}$ bearing target cells and also NK-sensitive K562 cells. **Conclusion** IL-12 is essential for the generation of $Prostein_{31-39}$ specific NKT cell lines, paving the way to further explore the possibility of using prostein specific NKT cells to overcome the immune evasion of prostate cancer cells.

Key words: prostate cancer; NKT cells; IL-12; Prostein

细胞免疫应答是机体消除肿瘤或抵御感染的重要机制,其中细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxicity T lymphocytes, CTLs)在肿瘤特异性免疫应答中处于核心的地位[1,2]。但肿瘤细胞在免疫选择压力下,发展出了多种逃避CTLs杀伤的机制,例如,前列腺癌细胞通过下调表达肿瘤抗原分子或MHC-Ⅰ类分子,逃避CTLs通过TCR的特异性识别及杀伤[3]。而作为天然免疫系统重要成分的NK细胞,其识别杀伤靶细胞不依赖于MHC-Ⅰ类分子/抗原肽复合物[4]。因此,如果能协同发挥CTLs及NK细胞的作用,理论上可有效提高肿瘤免疫治疗效果。目前相继报道,在小鼠及人体内均存在一类独特的NKT细胞,兼具CTLs及NK的表型和功能特点。与经典NKT细胞不同,这一类NKT细胞在TCR使用上无偏嗜性而具多样性,其识别结合对象亦非CD1d呈递的糖脂类抗原[5]。由于这一类CD1d非限制性NKT细胞能以MHC依赖的或MHC非依赖的方式识别杀伤靶细胞,在细胞毒效应功能上较常规CTLs及NK细胞具有一定的优越性,有利于打破肿瘤免疫耐受。

Prostein是近期新发现的一个前列腺癌相关抗原,它特异地表达于前列腺组织(正常或癌变组织),在其他组织(包括胸腺)或其他肿瘤组织中均未见表达[6]。因此Prostein是一个理想的前列腺癌免疫防治的靶抗原。$Prostein_{31-39}$(CLAAGITYV)已被鉴定为HLA-*A2.1限制性表位[7]。我们以$Prostein_{31-39}$肽、IL-2及IL-12诱导HLA-A2.1$^+$健康志愿者PBMCs,建立Pros-

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2001CB510001)和国家自然科学基金资助项目(30400215)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2001CB510001) and the National Natural Science Foundation of China (30400215)

作者简介:王惠明(1972-),男,湖北省仙桃市人,博士研究生,讲师,主要从事细胞免疫耐受维持及逆转方面的研究。电话:(023)66556991,E-mail: hm_wang72@163.com

通讯作者:吴玉章,电话:(023)68752386

收稿日期:2005-09-30;修回日期:2006-01-10

$tein_{31-39}$特异性 T 细胞系，利用五聚体检测技术证实了 $Prostein_{31-39}$特异性 NKT 细胞的存在，并对其表型及功能进行了初步研究。

1　材料与方法

1.1　细胞株培养

抗原加工缺陷型 T2 细胞、抗 HLA-＊A2.1 单抗杂交瘤细胞 BB7.2、人红白血病细胞 K562 和人 B 淋巴细胞白血病细胞 Raji 细胞株由本室培养保存。LNcap 前列腺癌细胞株由吴刚博士提供。BB7.2 细胞用含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养基培养，K562 细胞用 100 ml/L 胎牛血清的 IMDM 培养基培养，T2 细胞、Raji 细胞、LNcap 细胞用含 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养。实验用细胞均处于对数生长期。

1.2　HLA-A＊0201/$Prostein_{31-39}$ pentamer（五聚体）

MHC 五聚体是由一段螺旋结构将 5 个肽-MHC 复合物连结起来的聚合物，可用来检测或分离肽特异性的 T 细胞。本研究所用 PE 标记的 HLA-A＊0201/$Prostein_{31-39}$ Pentamer 由英国 Proimmune 公司合成。$Prostein_{31-39}$九肽由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3　全血法检测外周血有核细胞 HLA-＊A2.1 表达

取男性健康献血员外周血 100 μl，加入 BB7.2 细胞培养上清 100 μl，室温孵育 20 min，PBS 洗涤后加入 FITC 标记羊抗鼠 IgG（武汉博士德生物工程公司）100 μl，37 ℃孵育 10 min 后，加入红细胞裂解液再孵育 10 min，PBS 洗涤、1% 多聚甲醛固定后上流式细胞仪检测。

1.4　制备人外周血单个核细胞

入选 HLA-＊A2.1 阳性男性健康献血员，无肿瘤及免疫功能紊乱相关疾病史。其外周血用生理盐水作等倍稀释后，按稀释全血∶人淋巴细胞分离液＝1∶1 体积数将稀释全血铺加于离心管中人淋巴细胞分离液液面上，1 800 r/min 离心 15 min 后，小心吸取分离液与血浆之间液层，生理盐水洗涤 2 次，1 500 r/min 离心 10 min，沉淀细胞用 RPMI 1640 液悬浮计数，取一定量细胞现用，其余细胞冻存备用。

1.5　$Prostein_{31-39}$特异性 CTLs 诱导培养

参照 Wajchman 等[8]方法并略加改动：新鲜分离 PBMCs 用含 10% 胎牛血清（Hyclone）的 RPMI1640 培养液悬浮，部分细胞以 30 Gy γ 射线照射作为 APCs 使用。按每孔 5×10^6 个 PBMCs、5×10^5 APCs 加入 24 孔培养板中，并添加 2 mmol/L L-谷氨酰胺（Sigma）、50 μmol/L 2-巯基乙醇（Sigma）、50～100 U rIL-2（美国 Peprotech 公司）、500 μmol/L TCEP（美国 PIERCE 公司，用于增强抗原肽的免疫原性）及 10 μg $Prostein_{31-39}$九肽，加或不加 10 ng/ml rIL-12（美国 Peprotech 公司），每孔终体积数为 1 ml。细胞置 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。每 3 天半量更换含上述相同浓度 rIL-2、rIL-12 的培养基，每 7～8 d 予 5×10^5/孔经 30 Gy γ 射线照射过的自体 PBMCs 及 10 μg/ml $Prostein_{31-39}$肽、500 μmol/L TCEP 重复刺激。观察细胞生长状态，待孔内死亡细胞及细胞残体超过 60% 时用细胞分离液以密度梯度离心法去除。

1.6　^{51}Cr 释放试验

T2 细胞、K562 细胞、Raji 细胞、LNcap 细胞为靶细胞，以 100 μCi$Na_2[^{51}CrO_4]$（中国同位素公司）标记 1 ml 细胞数为 5×10^6个的靶细胞，37 ℃孵育 90 min，再以 RPMI1640 液洗细胞 3 次，细胞计数后按每孔 1×10^4 个种植于 96 孔 U 底微孔板。为获得 $Prostein_{31-39}$肽负载的 T2 细胞，标记的 T2 细胞与 5 μg 肽在 100 μl 体积、37 ℃条件下冲击 1 h。按不同效靶比（E∶T）值每孔加入相应数量的效应细胞，并使终体积数为 200 μl，天然释放孔不添加效应细胞，最大释放孔加入 100 μl 2% Triton X-100，每孔设复孔数为 3。培养板置 5% CO_2、37 ℃条件下孵育 4 h。离心后吸取每孔上清，用 FT-603 型 γ 闪烁计数仪测定每份上清的 cpm 值。特异性溶细胞活性由特异性释放百分数表示，按下述公式计算：

$$\text{特异性释放}=\frac{\text{实验孔 cpm}-\text{自然释放对照孔 cpm}}{\text{最大释放对照孔 cpm}-\text{自然释放对照孔 cpm}}\times100\%$$

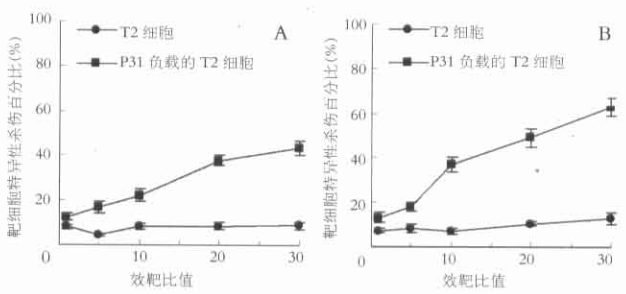
1.7　多色流式细胞检测

采用 FITC、PE 或 PE-Cy5 标记的小鼠抗人单克隆抗体直接染色法。CD3-FITC（IgG1）、CD56-PE（IgG-2b）购于美国 Exalpha 公司，CD8-FITC（IgG-2a）购于美国 Ancell 公司，CD56-PE-Cy5（IgG1）购于美国 BD 公司。2×10^5个细胞用配对抗体或 HLA-A＊0201/$Prostein_{31-39}$ Pentamer-PE 在冰中染色 30 min，以匹配的小鼠 IgG 同型抗体作为对照。细胞用含 1% BSA 的 PBS 洗涤并悬浮后，上 FACScalibur 流式细胞仪（Becton Dickinson）检测，数据用 CellQuest 专用分析软件分析。

2　结果

2.1　诱导培养的 CTLs 细胞系肽特异性杀伤活性分析

为了解诱导培养 CTLs 细胞系肽特异的靶细胞杀伤活性，在仅含 IL-2 及 IL-2 与 IL-12 同时存在条件下，以 $Prostein_{31-39}$刺激 PBMCs 四轮后，所得到的培养细胞作为效应细胞，检测其细胞毒效应的特异性。在 E∶T ＝ 30∶1 时，两种不同的培养条件所获得 CTLs 对负载 $Prostein_{31-39}$的靶细胞表现出了不同程度的特异性杀伤活性。同时加入 IL-2 及 IL-12 两种细胞因子的培养细胞系杀伤活性（62.9%）要明显高于单用 IL-2 一种细胞因子的培养细胞系（43.6%）。两种培养细胞在各种 E∶T 下对 T2 细胞均无明显杀伤活性（图 1）。这提示所建立的细胞系含有 $Prostein_{31-39}$特异的 CTL，IL-12 能增强 CTLs 细胞系的肽特异性杀伤活性。

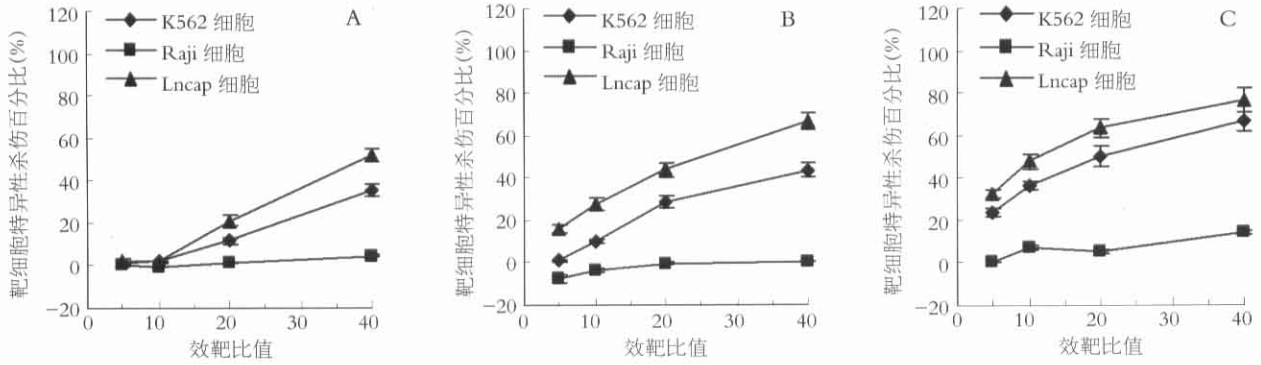


A：$Prostein_{31-39}$ + IL-2 诱导的 CTLs 细胞系；B：$Prostein_{31-39}$ + IL-2 + IL-12 诱导的 CTLs 细胞系

图 1　不同条件诱导培养的细胞系对肽负载 T2 细胞的杀伤活性

2.2 诱导培养的 CTLs 细胞对 LNcap 细胞系、K562 细胞系及 Raji 细胞系的杀伤活性分析

LNcap 细胞是表达 Prostein 抗原的 HLA-A＊0201$^+$前列腺癌细胞株，K562 细胞为 NK 细胞敏感的细胞株，Raji 细胞为 LAK 细胞敏感的细胞株。以这 3 种细胞为靶细胞的^{51}Cr 释放试验结果显示，新鲜分离的 PBMCs 在 E∶T = 40∶1 时对 LNcap 细胞及 K562 细胞均有一定程度的杀伤活性，分别为 52.21% 和 35.38%，但对 Raji 细胞几乎无杀伤活性（图 2A）；单用细胞因子 IL-2 所建立的细胞系对 LNcap 细胞及 K562 细胞特异性杀伤活性增加到 66.5% 和 43.4%，对 Raji 细胞杀伤活性影响不大（图 2B）；添加 IL-12 所得到的细胞对 LNcap 细胞及 K562 细胞杀伤活性增强到 75.9% 和 66.2%，但对 Raji 细胞仍无明显的杀伤活性（图 2C）。这些结果说明建立的 CTLs 细胞系能特异性杀伤提呈内源性抗原肽 Prostein$_{31\text{-}39}$的前列腺癌细胞，而且添加 IL-12 能使建立的细胞系增强其非特异性的 NK 样细胞毒活性。

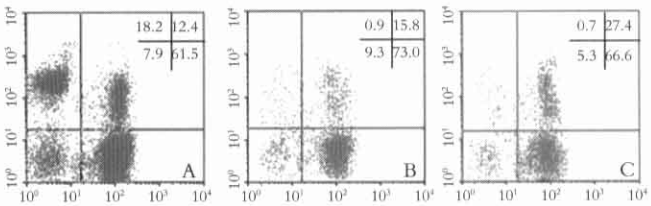


A：新鲜分离 PBMCs；B：Prostein31-39 + IL-2 诱导的 CTLs 细胞系；C：Prostein31-39 + IL-2 + IL-12 诱导的 CTLs 细胞系

图 2 不同效应细胞对 K562、Raji、Lncap 细胞的杀伤活性

2.3 培养细胞系表型分析

为了解不同培养细胞表型特点，我们进行了细胞的 CD3/CD56 二色流式细胞学检测。新鲜分离 PBMCs 中含有不同比例的 T 细胞（CD3$^+$/CD56$^-$）、NK 细胞（CD3$^-$/CD56$^+$）及 NKT（CD3$^+$/CD56$^+$）细胞（图 3A）；以肽及 IL-2 刺激培养四周后，NK 细胞含量明显减少，CD3$^+$/CD56$^-$细胞数明显增多，CD3$^+$/CD56$^+$细胞含量有一定程度增加（图 3B）；而在含 IL-12 的培养体系内，CD3$^+$/CD56$^+$细胞含量有较大增加（图 3C）。这说明添加细胞因子 IL-12，导致培养的 CTLs 细胞系中 NKT 细胞数量大量增加。

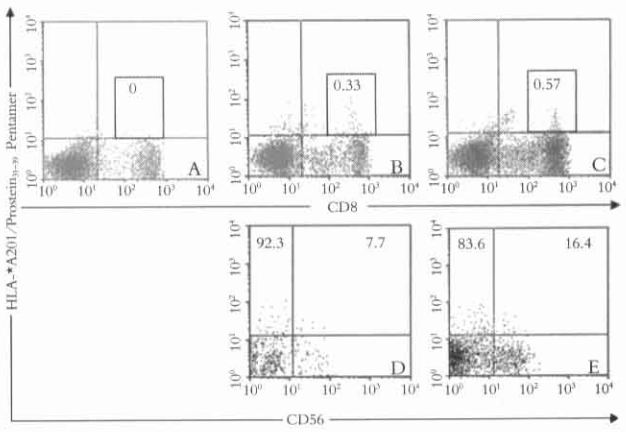


A：新鲜分离 PBMCs；B：Prostein31-39 + IL-2 诱导的 CTLs 细胞系；C：Prostein31-39 + IL-2 + IL-12 诱导的 CTLs 细胞系

图 3 不同细胞群体 CD3、CD56 染色分析

2.4 Prostein$_{31\text{-}39}$特异性细胞频率分布

采用 CD8/pentamer/CD56 三色流色检测分析不同细胞群体中 Prostein$_{31\text{-}39}$特异性细胞频率分布。在 PBMCs 中检测不到 CD8$^+$/pentamer$^+$细胞（图 4A）；在仅以 IL-2 诱导培养的细胞系中，CD8$^+$/pentamer$^+$细胞比例可达 0.33%（图 4B），其中含 7.7% CD8$^+$/pentamer$^+$/CD56$^+$细胞，亦即 Prostein$_{31\text{-}39}$特异性 NKT 细胞（图 4D）；IL-12 能使培养体系中 Prostein$_{31\text{-}39}$特异性 T 细胞及 NKT 细胞含量明显上升，分别达到 0.57% 及 16.4%（图 4C、E）。这一结果提示，IL-12 有助于 Prostein$_{31\text{-}39}$特异性 NKT 细胞的扩增。



A：新鲜分离 PBMCs；B：Prostein31-39 + IL-2 诱导的 CTLs 细胞系；C：Prostein31-39 + IL-2 + IL-12 诱导的 CTLs 细胞系；D：B 中 CD8$^+$淋巴细胞；E：C 中 CD8$^+$淋巴细胞

图 4 不同细胞群体 Prostein31-39 特异性 NKT 细胞频率分布

3 讨论

前列腺癌是男性泌尿生殖系最常见的肿瘤，近年来，随着我国人口老龄化和饮食结构的改变，前列腺癌发病率在逐年上升。由于前列腺癌复发转移快，除手术和放疗之外的免疫生物学治疗方式逐渐引起人们重视。迄今为止已有多个前列腺癌相关抗原得到鉴定，其中，Prostein 因其高特异地表达于男性前列腺正常或恶变组织[6]，使得它成为一种十分理想的可用于前列腺癌免疫治疗的靶抗原。本实验也证实，Prostein 抗原肽在体外诱导的 CTLs 对前列腺癌细胞具有一定的杀

伤效应。

细胞免疫应答是机体肿瘤免疫的主要方面，特异性 CTLs 应答被认为是肿瘤免疫应答的中心环节，但肿瘤细胞往往通过抑制抗原呈递细胞活化、抗原流失及 HLA-I 类分子弱表达等机制逃逸 CTLs 的识别杀伤。NK 细胞发挥免疫监视作用则不需预致敏，亦不需 HLA-I 类分子参与抗原呈递。因此采取同时转输 CTL 及 NK 细胞的过继免疫治疗方式，可得到较理想的抗瘤效果[9]，提示协同发挥天然免疫及适应性免疫系统的作用，可能打破肿瘤的免疫耐受。

特异性免疫系统的某些 T 细胞表面也表达 NK 细胞的标志，如 CD16、CD56、NKR 等，$CD3^+CD56^+$ NKT 细胞主要由 $CD8^+$ 细胞及少量 $CD4^-CD8^-$ 细胞组成。$CD3^+CD56^+$ 细胞不同于常规 CD1d 限制性 NKT 细胞，它们以 CD1d 非依赖性识别抗原肽，其 TCR 使用具有偏向性。肿瘤抗原 HER-2/neu、GP100 及 MUC1 特异性 $CD3^+CD56^+$ NKT 细胞，HPV E6 抗原特异性 $CD3^+CD56^+$ NKT 细胞已相继被发现[8,10-12]。它们能以 HLA-I 类分子限制性及非限制性的双重方式杀伤肿瘤细胞，即同时具有常规 CTL 及 NK 细胞的活性特点。实验证实这一类细胞具有很强的抗肿瘤活性。我们通过五聚体检测技术，也发现抗原肽 $Prostein_{31-39}$ 诱导的 CTLs 细胞系中有一部分细胞表达 CD56 分子，直接证实了 $Prostein_{31-39}$特异性 NKT 细胞的存在，为利用抗原特异性 NKT 细胞进行前列腺癌的免疫治疗提供了依据。

IL-12 是一种重要的 Th1 型免疫应答调节因子，对天然免疫系统也有很强的调节作用。它还能有效诱导 NKT 细胞。研究表明，抗 CD3 抗体、IL-2 及 IL-12 协同作用，可以选择性的扩增人 PBLs 中的 $CD3^+CD56^+$ NKT 细胞，而且 IL-12 对于 $CD56^+$ 细胞的扩增十分关键[13]。以特定的抗原肽 MUC1、IL-2 及 IL-12 诱导的 MUC1 特异性的细胞系中，$CD3^+CD56^+$ 细胞含量明显高于只用抗原肽及 IL-2 诱导的 MUC1 特异性的细胞系，IL-12 能促进 MUC1 特异的 $CD3^+CD56^-$ 细胞获得 CD56 分子，而成为 $CD3^+CD56^+$ 表型[8]。在本实验中我们也发现，加入 IL-12 的 $Prostein_{31-39}$ 特异性细胞系中，$CD3^+CD56^+$ 细胞含量明显高于未加 IL-12 的细胞系，并伴有对 K562 细胞和 LNcap 细胞的细胞毒活性水平增强。进一步行五聚体检测显示，IL-12 能促进细胞体系中 $CD56^+$ 肽特异性细胞明显扩增。其机制可能在于一方面 IL-12 促进一部分肽特异性 $CD3^+CD56^+$ 转化为 $CD3^+CD56^+$ 细胞，另一方面促进肽特异性 $CD3^+CD56^+$ 细胞的增殖[8]。

前列腺癌细胞能逃逸常规特异性 CTLs 的攻击，这限制了以激发特异性细胞免疫应答为目的免疫治疗效果，我们尝试将特异性细胞免疫及非特异性细胞免疫结合起来克服前列腺癌细胞的免疫耐受。本实验结果证实抗原肽、IL-2 及 IL-12 协同作用可在体外诱导 PBMCs 中的特异性 NKT 细胞，同时发挥 CTLs 及 NK 细胞的细胞毒效应，这为我们进一步研究利用抗原特异性 NKT 细胞免疫治疗前列腺癌奠定了基础。

参考文献：

[1] DUDLEY M E, WUNDERLICH J R, ROBBINS P F, *et al*. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes[J]. Science, 2002, 298(5594): 850-854.

[2] YEE C, THOMPSON J A, BYRD D, *et al*. Adoptive T cell therapy using antigen-specific $CD8^+$ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: *in vivo* persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(25): 16168-16173.

[3] BLADES R A, KEATING P J, MCWILLIAM L J, *et al*. Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implications for immunotherapy [J]. Urology, 1995, 46(5): 681-687.

[4] WHITESIDE T L, HERBERMAN R B. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer[J]. Curr Opin Immunol, 1995, 7(5): 704-710.

[5] BERZINS S P, SMYTH M J, GODFREY D I. Working with NKT cells——pitfalls and practicalities[J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17(4): 448-454.

[6] KALOS M, ASKAA J, HYLANDER B L, *et al*. Prostein expression is highly restricted to normal and malignant prostate tissues[J]. Prostate, 2004, 60(3): 246-256.

[7] FRIEDMAN R S, SPIES A G, KALOS M. Identification of naturally processed CD8 T cell epitopes from prostein, a prostate tissue-specific vaccine candidate[J]. Eur J Immunol, 2004, 34(4): 1091-1101.

[8] WAJCHMAN H J, PIERCE C W, VARMA V A, *et al*. *Ex vivo* expansion of $CD8^+CD56^+$ and $CD8^+CD56^-$ natural killer T cells specific for MUC1 mucin[J]. Cancer Res, 2004, 64(3): 1171-1180.

[9] CHATTOPADHYAY U. Tumour immunotherapy: developments and strategies[J]. Immunol Today, 1999, 20(11): 480-482.

[10] BAXEVANIS C N, GRITZAPIS A D, TSITSILONIS O E, *et al*. HER-2/neu-derived peptide epitopes are also recognized by cytotoxic $CD3^+$ $CD56^+$ (natural killer T) lymphocytes[J]. Int J Cancer, 2002, 98(6): 864-872.

[11] SAETERDAL I, THOR-STRATEN P, MYKLEBUST J H, *et al*. Generation and characterization of gp100 peptide-specific NK-T cell clones[J]. Int J Cancer, 1998, 75(5): 794-803.

[12] SANTIN A D, HERMONAT P L, RAVAGGI A, *et al*. Expression of CD56 by human papillomavirus E7-specific $CD8^+$ cytotoxic T lymphocytes correlates with increased intracellular perforin expression and enhanced cytotoxicity against HLA-A2-matched cervical tumor cells [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(3 Suppl): 804s-810s.

[13] SATOH M, SEKI S, HASHIMOTO W, *et al*. Cytotoxic gammadelta or alphabeta T cells with a natural killer cell marker, CD56, induced from human peripheral blood lymphocytes by a combination of IL-12 and IL-2[J]. J Immunol, 1996, 157(9): 3886-3892.

（编辑　龙　亮）