

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2008)09-0847-03

sIL-15R α 与脾细胞孵育后对小鼠黑色素瘤细胞生长的免疫调节作用

顾艳宏^{1,2}, 王榕生², 束永前², 徐强^{1*} (1南京大学生命科学院医药生物技术国家重点实验室, 江苏南京 210093
²南京医科大学第一附属医院肿瘤生物治疗中心, 江苏南京 210029)

Immunomodulatory effects of splenic cells added by sIL-15R α on the regulation of melanoma cell growth

GU Yan-hong², WANG Rong-sheng², SHU Yong-qian², XU Qiang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, ² Centre of Tumor Biology Therapy, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **A M:** To study the immunomodulatory effects of splenic cells added by soluble IL-15R α on the regulation of melanoma cell growth. **METHODS:** The splenic cells of mice were prepared for culture for 48 hours by adding or not adding soluble IL-15R α (sIL-15R α). Then the adherent cells and non-adherent cells were separated. FACS was used to detect the expression of CD4, CD8, B220, CD11c and CD11c as mentioned above, the four groups (non-adherent cells of splenic cells, adherent cells of splenic cells, non-adherent cells of splenic cells added by sIL-15R α , adherent cells of splenic cells added by sIL-15R α) were mixed with melanoma cells separately, then injected intraperitoneally into the cells to mice to observe the tumor volume of them. **control group** was only injected intraperitoneally into melanoma cells. **RESULTS:** The melanoma growth rate of mice with adherent cells added by sIL-15R α was significantly less than that of the other groups. FACS showed the molecules of this group were possibly dendritic cells. **CONCLUSION:** sIL-15R α added by splenic cells can make an immunomodulatory effects possibly mainly by the effects of dendritic cells and inhibit the growth of tumor cells.

[Keywords] sIL-15R α ; IL-15; dendritic cell; melanoma

[摘要] **目的:** 研究可溶性 IL-15R α 与脾细胞共同孵育后对

收稿日期: 2008-04-17; 接受日期: 2008-06-20

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2007246)

作者简介: 顾艳宏(1973-), 女, 山东青岛人, 博士生

Tel: 025-83714511-6428 E-mail: kaixinq48@hotmail.com

* Corresponding author E-mail: molpham@163.com

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

小鼠黑色素瘤细胞生长的免疫调节作用。方法: 制备小鼠脾细胞, 分成两组, 一组加入可溶性重组 IL-15R α (sIL-15R α), 另外一组不加, 培养 48 h 后, 分离两组的贴壁细胞和非贴壁细胞, 流式细胞术 (FCM) 分析 CD4、CD8、B220、CD11c、CD11c 的表达; 并把上述 4 组细胞 (即脾细胞非贴壁细胞组, 脾细胞贴壁细胞组, 脾细胞 + sIL-15R α 非贴壁细胞组, 脾细胞 + sIL-15R α 贴壁细胞组) 和黑色素瘤细胞一起分别注射到小鼠腹部皮下, 观察小鼠腹部皮下肿瘤生长抑制情况, 对照组只注射小鼠黑色素瘤细胞。结果: 脾细胞 + sIL-15R α 贴壁细胞组小鼠黑色素瘤的生长速度显著小于其他各组; FCM 分析, 此组细胞主要成分可能为树突状细胞 (DC)。结论: sIL-15R α 与脾细胞共同孵育后, 可能通过 DC 的作用, 对黑色素瘤的生长进行免疫调节, 从而抑制瘤细胞的生长。

[关键词] sIL-15R α ; IL-15; 树突细胞; 黑色素瘤

[中图分类号] R392.11 **[文献标识码]** A

IL-15 属于 IL-2 家族, 它与 IL-2 共用 β 和 γ 受体进行信号传导, 但同时又拥有自己独特的 α 受体, 是与 IL-2 功能有所不同的一种 T 细胞生长因子^[1]。在生理条件下, IL-15 与膜上的 IL-15R α 结合, 但一般认为, 只有在出现 IL-2/15R β 和 γ 时, 才能进行信号传导^[2]。IL-15R α 分布广泛, 在很多组织和细胞都能被检测出来, 例如脑、肠、肝、外周血单核细胞 (PBMC) 等。它在体内以两种形式存在, 一种是膜型, 一种是可溶型, 可通过自分泌、内分泌、旁分泌或近分泌形式作用于靶器官和组织。其中, 可溶型的 IL-15R α (sIL-15R α) 相对分子质量 (M_r) 为 42 000, 在生理条件下, 很低的浓度 (pmol/L) 就能与 IL-15 有很高的亲和力。现在认为, 这种 sIL-15R α 是锚在膜上的 IL-15R α 通过金属蛋白酶水解后脱落的, 它可以阻断 IL-15 与细胞膜表面受体的连接, 抑制 IL-15 的作用。因为 sIL-15R α 对 IL-15 有高亲和力, 有假说认为, sIL-15R α 可能扮演一种类似分子清洗物的作用来去除多余的 IL-15; 当然, 它们之间的这种高亲和力的结合也许还起到其他作用, 目前仍不清楚^[3-4]。本实验中, 我们把 sIL-15R α 与脾脏细胞共同孵育后, 进一步研究其对小鼠黑色素瘤生长的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 6~8周龄的雄性 C57BL/6小鼠, 质量 22~25 g 购自扬州大学实验动物中心。饲养温度为 25℃左右, 光照周期为光照 12 h 黑暗 12 h(12L:12D), 自由采食、饮水。小鼠黑色素瘤细胞 (B16) 为本实验室长期拥有, 培养于 RPMI640 培养液中, 含 100 mL/L 新生小牛血清, 10万 U/L 的青霉素 链霉素 (NVIROGEN)。CD4、CD8、B220、CD11c、CD1a 单克隆抗体 (mAb) 均购自美国 BD 公司。小鼠 IL-15、IL-2、IFN- γ ELISA 试剂盒购自 R&D 公司。可溶性重组 IL-15R α /Fc 嵌合体 (sIL-15R α) 购自 R&D 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脾细胞的制备 拉颈椎处死小鼠, 无菌条件下取出脾脏, 放入盛有 RPMI640 完全培养液的平皿中, 研磨, 过滤, 获得粗制的脾细胞悬液; 4℃ 低速离心 1 000 r/min; 5~10 min 弃上清, 重悬细胞, 加入预冷 Tris-NH₄C 红细胞裂解液 1 mL, 轻轻吹打混匀, 室温静置 1~2 min 溶解红细胞; 加 5 mL RPMI640 完全培养液终止反应, Hank's 液洗 2 次, 最后将沉淀细胞重悬于 2 mL RPMI640 完全培养液中; 细胞计数及测定存活率。

1.2.2 FCM 检测 把上述制备的小鼠脾细胞, 分成两组, 一组加入可溶性重组 IL-15R α (sIL-15R α), 另外一组不加, 培养 48 h 后, 分离两组的贴壁细胞和非贴壁细胞, 用 FCM 分析其组分。即把上述 4 组细胞: 脾细胞非贴壁细胞组 (SC NA), 脾细胞贴壁细胞组 (SC AD), 脾细胞加入 IL-15R α 非贴壁细胞组 (SC+sIL-15R α NA), 脾细胞加入 IL-15R α 贴壁细胞组

(SC+sIL-15R α AD), 分别用 PBS 洗涤 2 次, 将细胞重悬于 PBS 中, 加入抗 CD4-PE、CD8-PE、CD11c-PE、CD1a-B220-PE, 充分混匀, 置 4℃ 黑暗中孵育 30 min; PBS 洗涤 2 次后, 用 FCM 检测。

1.2.3 动物实验 共 60 只小鼠, 分 5 组。第 1 组为对照组, 注射小鼠黑色素瘤细胞, 其余 4 组分别注射上述培养 48 h 后分离的细胞 (即 SC NA、SC AD、SC+sIL-15R α NA、SC+sIL-15R α AD) 和小鼠黑色素瘤细胞的混悬液。具体如下: 用 750 mL/L 乙醇消毒小鼠腹部皮肤, 用注射器吸取上述细胞悬液 0.2 mL (5×10^5), 接种于小鼠腹部皮下。接种 1 周后, 用游标卡尺测量肿瘤结节的最长径 a 和最短径 b 根据公式计算肿瘤体积 (V)^[9], $V = a \times b^2 / 2$, 求其平均值绘制肿瘤生长曲线。并根据不同时间段绘制无瘤小鼠的百分比曲线, 以评价各组小鼠肿瘤生长情况。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS10.0 软件分析数据, 两两比较采用 Student's t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。流式细胞仪采用 CellQuest 软件获取, WinMDI 2 分析。

2 结果

2.1 细胞表型分析 SC NA 与 SC+sIL-15R α NA 组细胞表型分析: CD11c、CD1a 表达阴性, CD4、CD8、B220 表达阳性, 提示其主要成分为 T、B 细胞。SC AD 组与 SC+sIL-15R α AD 组, CD11c、CD1a 表达阳性, CD4、CD8、B220 表达阴性, 提示其主要组分可能为树突状细胞 (图 1)。

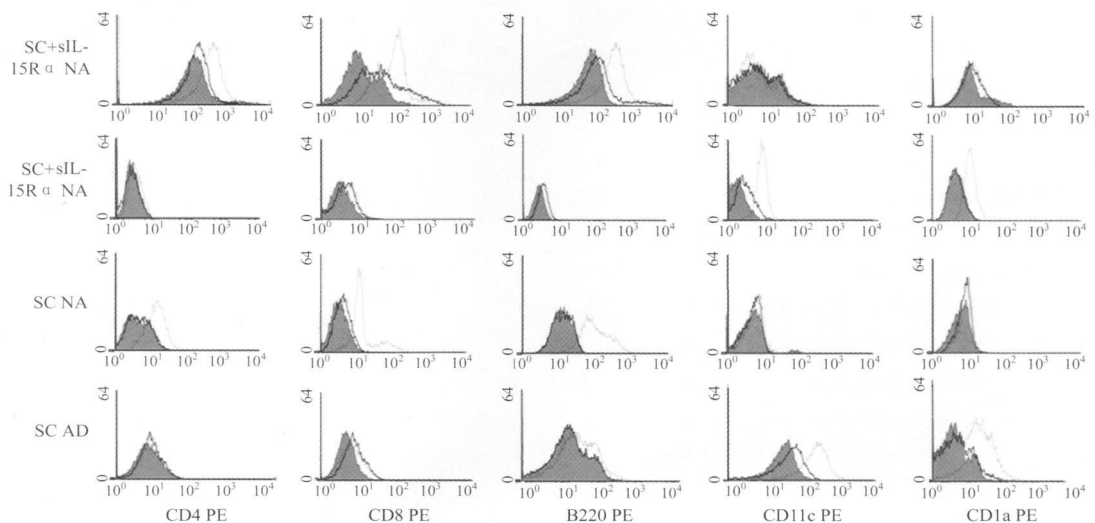


图 1 细胞表面 CD4、CD8、B220、CD11c 和 CD1a 的表达

Fig 1 Expression of CD4、CD8、B220、CD11c and CD1a on the surface of cells

2.2 小鼠黑色素瘤的生长抑制情况 对照组肿瘤生长速度最快, 其次为 SC NA 组和 SC+sIL-15R α NA 组, 再其次为 SC AD 组, SC+sIL-15R α AD 组肿瘤生长速度最慢。SC+sIL-15R α AD 组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 不同时间段无瘤小鼠的百分比 对照组从第 20 天开始

小鼠均出现肿瘤, 无瘤百分比为 0。SC NA (图 3A) 组在第 27 天有 6 只小鼠出现肿瘤, 第 39 天时共有 9 只小鼠出现肿瘤; SC+sIL-15R α NA 组 (图 3B) 在第 20 天 3 只小鼠出现肿瘤, 第 27 天时共有 6 只小鼠出现肿瘤; SC AD 组 (图 3C) 在第 27 天有 3 只小鼠开始出现肿瘤; SC+sIL-15R α AD 组 (图 3D) 直到第 35 天才开始有 3 只小鼠出现肿瘤。各组无瘤小鼠的百

分比情况基本跟肿瘤的生长抑制情况一致。其中 SC+sIL-15R α AD组无瘤小鼠的百分比最高。

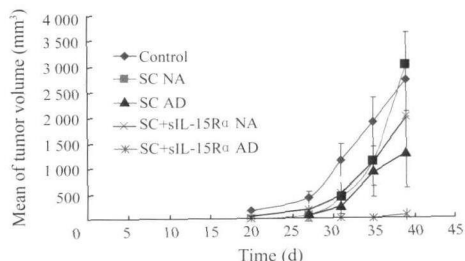


图2 荷瘤小鼠的生长抑制情况

Fig 2 The inhibitory effect of mice bearing melanomas

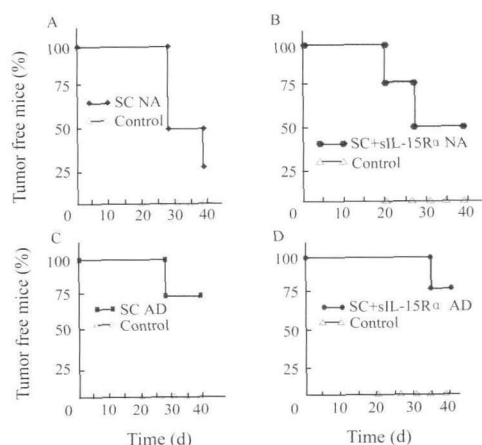


图3 不同时间段无瘤小鼠的百分比(与对照组相比)

Fig 3 The Percentage of tumor free mice in different time interval

3 讨论

IL-15是一个对原发性和过继性免疫都非常重要的多效性细胞因子。IL-15R α 作为IL-15的独特型受体,对IL-15而言是非常重要的。在本实验中使用的sIL-15R α 是与IL-15具有高亲和力的重组IL-15R α /F的嵌合体,其M_r为42 600,与IL-15结合后,能竞争性抑制IL-15与膜上IL-15R α 受体的连接^[6],已经成为研究可溶型IL-15R α 的工具。

实验中显示,当把对IL-15有高亲和性的可溶型的IL-15R α 和脾脏细胞共同培养后与小鼠黑色素瘤细胞一起种植到小鼠皮下,其中SC+sIL-15R α AD组出现肿瘤的时间最晚,肿瘤的生长速度最慢,分析其组分发现,其主要成分可能为DC,同样SC AD组细胞表型与其相同。DC是体内非常重要的一种高度特异性抗原递呈细胞,在免疫系统中起着非常重要的作用。为什么两者的细胞表型相同,但对小鼠黑色素瘤的抑制情况却不同呢?我们考虑主要是sIL-15R α 的作用,在培养48 h后,sIL-15R α 可以与脾细胞中各种细胞分泌的IL-15相结合,从而能竞争性抑

制IL-15与膜上IL-15R α 受体的连接^[6],使得DC膜上的IL-15R α 可能得以保存。当把这种细胞和黑色素瘤细胞一起注射到小鼠体内时,DC细胞表面的IL-15R α 能够递呈IL-15给邻近的细胞,例如NK细胞,CD8⁺细胞,启动它们分泌细胞因子和细胞毒效应,来杀伤肿瘤细胞^[7]。而SC AD组,DC膜上的IL-15R α 被IL-15结合,不能起到递呈作用,所以效果不显著。而在其他两组,sIL-15R α NA和SC NA组,由于缺乏DC的作用,不能启动小鼠体内的免疫监视,导致肿瘤生长速度较快。各组无瘤小鼠的百分比跟上述结果一致,生长速度最快的对照组,无瘤小鼠的百分比最低,生长速度最慢的SC+sIL-15R α AD组,无瘤小鼠的百分比最高。

本实验中我们进一步揭示了可溶型IL-15R α 在IL-15作用机制中的重要性,它与脾细胞共同孵育后,可能通过DC的作用发挥免疫调节作用,从而抑制小鼠黑色素瘤的生长。可溶型的IL-15R α 将来也许能成为一个有前景的药物,特别是对肿瘤的免疫治疗方面,可能起到更重要的作用。

参考文献:

- [1] Comish GH, Sinclair LV, Cantrell DA. Differential regulation of T cell growth by IL-2 and IL-15 [J]. *Blood* 2006; 108(2): 600-608.
- [2] Stoklasek TA, Schilus KS, Lefrancois L. Combined IL-15/IL-15R α immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo [J]. *J Immunol* 2006; 177(9): 6072-6080.
- [3] Giron-Michel J, Guiliani M, Fogli M, et al. Membrane bound and soluble IL-15/IL-15R complexes display differential signaling and functions on human hematopoietic progenitors [J]. *Blood* 2005; 106: 2302-2310.
- [4] Rubinsten MP, Kovar M, Purton JF, et al. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R [J]. *PNAS* 2006; 103: 9166-9171.
- [5] Schiffer B, Gebhard S, Hejmerding CK, et al. Switching off HER-2/neu in a tetracycline controlled mouse tumor model leads to apoptosis and tumor size-dependent remission [J]. *Cancer Res* 2003; 63: 7221-7231.
- [6] Bernard J, Hah C, Mortier E, et al. Identification of an interleukin-15 alpha receptor binding site on human interleukin-15 [J]. *J Biol Chem* 2004; 279(23): 24313-24322.
- [7] Sao N, Patel HJ, Waldmann TA, et al. The IL-15/IL-15R α on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells [J]. *PNAS* 2007; 104: 588-593.