参考文献

1. Schmidt — Wolf I G , L ef t ero va P , Me ht a BA , et al . Pheno t ypic cha ract erizatio n a nd i dentificatio n of eff ecto r cell s i nvol ved i n t u mo r cell reco gnitio n of cyto ki ne — i nduced killer cell s[J] . Exp He matol ,1993 ,21 (13) :1 673 — 1 679
2. Ma ki G. Ex vivo p ur gi ng of st e m cell a uto graf t s u si ng cyto to xic cell s[J] . J He mato t her St e m Cell Re s ,2001 ,10 (4) : 545 — 551
3. Li nn YC , L a u L C , Hui KM . Generatio n of cyto ki ne — i nduced killer cell s f ro m leukae mic sa mples wit h i n vit ro cyto to xicit y a gai n st a utolo go u s a nd allo geneic leu kae mic bla st s [J]. Br J
4. 杨永红. 细胞因子诱导的杀伤细胞的研[J]活 性 观 察]. 生 物 医学工程学杂志 ,2001 ,18 (1) : 94 — 96
6. 于津浦 ,任秀宝 ,张澎 ,等. 恶必天安门体瘤患者自体 CI K 细胞 的体外大量扩增与生物学指标检测 [J] . 中国肿瘤生物治疗杂志 ,2001 ,8 (3) :215 — 216
7. 张乐萍 ,陆爱东 ,童春容 ,等. 细胞因子诱导的杀伤细胞/ 白细胞介素 2 治疗儿童急性淋巴细胞白血病微小残留病疗效观察 [J] . 实用儿科临床杂志 ,2003 ,18 (3) :185 — 186
8. Ri dolfi L , Ridolfi R , Ricco bo n A ,et al . Adj uva nt i mmuno t herap y wit h t umo r i nfilt rati ng l ymp hocyt e s and i nt erleu ki n — 2 i n p a tient s wit h re sect ed stage Ⅲ a nd Ⅳ melano ma [J] . J Immuno t h er ,2003 ,26 (2) :156 — 162
9. 陈复兴 ,刘军权 ,张南征 ,等. 自体细胞因子诱导的杀伤细胞过继性免疫 治 疗。恶 性 肿 瘤 的 临 床 观 察 [J] . 癌 症 ,2002 ,21 (7) :797 — 801

NK 细胞与乳腺癌生物治疗

张香梅,张文清,刘　杰,高春晖,贾岩峰,于　洋,谷晓伟
保定市第三医院/肿瘤医院 乳腺科,保定,071000

乳腺癌是目前女性最为常见恶性肿瘤,在我国其发病率逐年升高。寻找有效的治疗方法,意义深远。对乳腺癌的治疗也已经进入以手术为主,结合化疗、放疗、内分泌治疗及生物治疗的综合治疗时期。现有的治疗措施的应用、疗效的提高,都基于疾病的规范性诊治。乳腺癌的正确诊断和治疗,直接关系患者的生存时间和生活质量。在对于肿瘤的治疗,传统方法中,放、化疗除杀灭肿瘤细胞外,对正常细胞也有损伤。生物治疗能够更为特异性的杀灭肿瘤细胞而不伤及正常组织。并可通过激活自身免疫系统产生免疫记忆来预防肿瘤复发和转移。因此生物治疗是继手术、化疗、放疗、内分泌治疗之后,乳腺恶性肿瘤的另一重要治疗手段。

在肿瘤生物治疗中,应用免疫活性细胞进行治疗,成为当前的研究热点。[1]自然杀伤细胞 (natural killer cells,NK) 是人体免疫系统的第一道防线,是先天性免疫系统的重要组成部分,是机体抗御感染和防止细胞恶性转化的重要免疫调节细胞。目前 NK 细胞的临床治疗主要通过利用细胞因子体内扩增、激活 NK 细胞和体外产生 LAK、CIK 细胞杀伤自体肿瘤细胞,但并未取得实质性进展。随着自然杀伤细胞抑制性受体(KIR) 及其他 NK 细胞受体(NKR) 的发现,对 NK 细胞受体在识别和裂解肿瘤细胞的重要作用的不断了解,为肿瘤的免疫治疗提供了新的治疗策略。以下就 NK 细胞的生物学特性及其在乳腺癌生物治疗上的研究应用作以综述。

NK 细胞属于淋巴细胞,但却与与 T、B 淋巴细胞不同,NK 细胞无需肿瘤特异性抗原识别便可以直接杀伤肿瘤细胞,是肿瘤免疫治疗的重要效应细胞[2]。人类 NK 细胞约占全血淋巴细胞的 10 % ～15 % 。目前研究认为 NK 细胞特异性表达 CD56,而缺乏 T 细胞抗原 CD3。NK 细胞具有以下功能:(1) 对病毒感染细胞、白血病细胞及其他肿瘤细胞产生 IFN— γ, TNF— α, GM— CSF) ;(3) 通过细胞膜 Fc 片段受体,与抗体 Fc 段结合,从而介导抗体依赖的细胞毒 ADCC 作用[3]。

1. NK 细胞生物学特性

NK 细胞起源于骨髓 CD＋34 造血祖细胞 HPC ,并需要骨髓微环境发育成熟。NK 细胞的发育分为两个阶段:首先,在— 15、flt— 3 配基(FL) I 和 c— kit 配基(KL)等早期造血生长因子作用下,CD ＋34 IL — 2/ IL— 15Rβ+CD —(IL— 15Rβ) 的 NK 前体细胞;然后在 IL— 15 刺激下继续分化 56NK 细胞[4]。

早期研究证实主要组织相容性抗原 I 类分子(MHC— I) 抑制 NK 细胞杀伤自体正常细胞从而避免自身免疫。NK 细胞可以选择性杀伤缺失 MHC— I 类分子的自体细胞即"迷失自我" 假说[5]。与 T、B 淋巴细胞不同,NK 细胞无编码抗原识别受体基因的重组,主要借助一系列独特的细胞表面受体识别 MHC— Ⅰ 类或Ⅰ类样分子,从而活化或抑制 NK 细胞执行相应的生物学功能[6]。

NK 细胞受体主要分为以下几类:(1)自然杀伤细胞抑制性受体 (killer cell inhibitory receptor,KIR) KIR 基因位于染色体 19q13. 4,分为抑制性和活化性两组受体,每一组均有其特定的细胞外结构域,且与特定的配体结合。由于其跨膜区、细胞内或细胞质结构域的差异,与不同的 MHC — Ⅰ类亚型配体结合,因而分别介导抑制性或活化性应答反应。KIR 按结构分为两个和三个(KIR2D 和 KIR3D) 免疫球蛋白样胞外区,特异性识别 MHC— Ⅰ类分子。根据胞质区结构域的不同分为活化性受体和抑制性受体,前者均有免疫受体酪氨酸活化基序 (ITAM) ,均有免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM) 。[7](2)C 型凝集素(C— type lectin) 抑制性受体基因定位于染色体 12p12. 13,相当于小鼠 Ly49

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

（基因定位于第6号染色体）。CD94是由单一的非多态型的基因编码产生，缺少胞质区，通过二硫键与NKG2A/B、C或E形成异二聚体。NKG2分子的胞外区和胞质区决定了受体的功能，是活化性受体，具有含ITAM的短胞质区[8]。(3)非MHC－Ⅰ类分子特异性活化的受体。在对MHC－Ⅰ类分子缺乏或阴性的靶细胞的杀伤中尚存在一些活化性受体起着重要作用，包括自然杀伤细胞毒受体（NCR）和NKG2D受体。NCR是免疫球蛋白样活化性受体，包括NKP46，NKP44，NKP30，它们在分子结构上没有同源性[9]。NKP46编码基因位于人类第19号染色体，在静息及激活的NK细胞上均有表达，可对多种靶细胞发生细胞毒作用，包括自身、同种异体和异种来源的肿瘤转化细胞[10]。

2. NK细胞临床应用进展

2.1 体内扩增、激活NK细胞

目前NK细胞的免疫治疗主要是利用细胞因子体内扩增、激活NK细胞和体外产生LAK、CIK细胞杀伤自体肿瘤细胞。从早期的大剂量IL－2治疗的严重毒副作用到随后的长期小剂量联合间断中剂量IL－2治疗证实在HIV感染及恶性肿瘤患者中可以较好耐受。但这种治疗方法只是增强骨髓祖细胞向NK细胞分化及依赖IL－2延迟NK细胞的凋亡，而并非外周血成熟NK细胞的增生[11,12]。因此联合应用IL－2和其他细胞因子（如IL－12，IL－15，KL，FL）可能达到更好的体内和体外扩增NK细胞的效果[13,14]。但是由自体肿瘤细胞上表达的MHC－Ⅰ类分子所介导的抑制性信号仍然是成功治疗的最大限制。

2.2 体内阻滞抑制性受体

在自体和HLA相合的干细胞移植中，白血病细胞表达MHC－Ⅰ类分子与NK细胞的抑制性受体结合从而抑制NK细胞对自体白血病细胞的杀伤。Koh等[15]最近利用急性白血病小鼠模型证实在体内阻滞NK细胞抑制性受体的可行性。给B6鼠接种C1498（H2d）鼠的白血病细胞，利用5E6F（ab'）2抗Ly49C和Ⅰ抗体治疗可以避免B6鼠死于白血病，治疗中未发现明显的毒副反应及对造血的破坏。选择性应用NK细胞抑制性受体阻滞剂可以增强免疫系统对病毒感染的免疫反应。

2.3 调节活化性受体及配体

正如早期研究证实NK细胞的功能依赖于相应的抑制性和活化性受体介导的抑制性和活化性信号的平衡。除了可以阻滞抑制性受体，是否可以利用细胞因子来诱导或上调NK细胞表面的活化性受体的表达以打破这种平衡。IL－2可以诱导在静止NK细胞表面缺乏的自然细胞毒受体NKp44。初步的研究发现NCR的表达密度可能是恒定的，并不受IL－12，IL－15，IL－12，IL－18影响[11]。目前尚未发现影响NKG2D表达水平的细胞因子报道。但活化后的NK细胞表现出的明显强于未活化的NK细胞的肿瘤靶细胞杀活性的事实，预示着调控NK细胞表面受体的表达及肿瘤细胞相应配体的表达必将为临床治疗提供新的策略。

2.4 同种异体反应性NK细胞与造血干细胞移植（HSCT）

早在2002年Karre就已经对NK细胞在促进造血干细胞植入、降低移植物抗宿主病（GVHD）发生以及增强移植物抗白血病（GVL）效应等方面的作用进行了详细的评述[16]。

NK细胞的异源反应性不会攻击除淋巴造血细胞以外的组织细胞，这使得移植前的异源反应性NK细胞输注用作受者预处理是安全的。Ruggeri等[17]发现将杂交小鼠H2d/b的同种异体反应性4×106 NK细胞，输注给非致死量照射的H－2b/b小鼠，可以使H2d/b小鼠的骨髓细胞顺利植入。而未输注杂交H2d/b鼠的同种异体反应性NK细胞的H－2b/b鼠排斥H2d/b鼠骨髓细胞不能植入。这个试验证实异体反应性NK细胞在GVH中的作用可以起到足够的免疫抑制帮助植入而无GVHD发生。因此可以使半相合非清髓移植无需使用严重的免疫抑制的预处理而成功植入。

2.5 抗CD抗体活化NK细胞

NK细胞除接受KAR和KIR的配体信号使之处于活化或非活化状态外，尚可接受其他活化信号的作用，其中CD分子就是一组可以挖掘的分子，以寻求活化整体NK细胞或清除部分单核细胞后对抗癌、抗病毒或抗自身免疫状态的作用[18]。

2.6 同种异体NK细胞系的治疗意义

目前在NK抗肿瘤研究中已经建立了人NK－92，NKL，YT，NK3.3等NK细胞系，NK－92是唯一进入临床研究的细胞系。研究发现NK－92几乎完全缺乏KIRs表达，却保留有穿孔素和颗粒酶B介导的细胞毒作用。在体外对多种恶性疾病和异种移植的SCID小鼠中发挥重要的抗肿瘤活性[19]。国内的很多学者致力于从NK细胞肿瘤中筛选细胞株，在体外培养条件下进行某些细胞因子（SCF，IL－15，IL－12，IL－18，IL－21等）的基因转染，形成新型治疗方案，对相关疾病的生物治疗有重要意义。

结语

乳腺癌的发展提示机体自身的抗肿瘤免疫已不足以阻止肿瘤的生长，机体发生恶性肿瘤时，自身的防御机能减弱或受到抑制。必须探索各种免疫学原理和技术治疗乳腺癌，提高临床疗效。乳腺癌的免疫治疗作为新的有效治疗手段，必将随着研究的深入而起到越来越多的重视。NK细胞无需肿瘤特异性抗原识别便可以直接杀伤肿瘤细胞，是肿瘤免疫治疗的重要效应细胞，有望成为新一代肿瘤过继细胞免疫治疗的主力军。但因相关研究主要限于实验室，临床试验的主要在血液系统恶性肿瘤的治疗上开展，有关乳腺癌的治疗研究很少。因此，扩大NK细胞的临床应用范围，尤其是针对实体瘤的治疗，以获取更多的临床资料，将是NK细胞今后的主要发展方向。目前有关NK细胞的受体及信号传导等生物学特性的研究已获得重大突破，通过活化KAR或抑制KIR在理论上均可增强NK细胞的杀伤活性。由KIR独特性不相容引发的NK细胞的异源反应活性有利

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

于异基因造血干细胞植人，预防 GVHD 发生以及清除受者体内残存白血病细胞(GVL 效应) 。临床移植前选择 KIR 独特性不相容供者，利用异源反应性 NK 细胞预处理，研发用于临床治疗的 NK 细胞抑制性受体阻滞剂，针对 KAR 增强 NK 细胞的杀伤活性,将会在 NK 细胞的生物治疗方面提供新的思路,必将为乳腺癌生物治疗带来新的希望。

参考文献

1. J ano t C , S to ltz J F , A vena rd G, e t a l. P rep a ra t io n o f va r ice lla h e rp e s zo ste r imm uno g lo bu lin. T ran sfu sio n, 1981, 21: 732 734.
2. Farag S S, VanDeusen J B, Fehniger T A, et al. Biology and clinical im— pact of human natural killer cells[J]. Int J Hematol, 2003, 78(1): 7— 17.
3. Chiorean E G, Miller J S. The biology of natural killer cells and im— plications for therapy of human disease [J]. J Hematother Stem Cell Res, 2001, 10(4): 451— 463.
4. Colucci F, Caligiuri M A, Di Santo J P. What does it take to make a natural killer? [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(5): 413— 425.
5. Ljunggren H G, Karre K. In search of the "missing self":MHC— molecules and NK cell recognition[J]. Immunol Today, 1990, 11 (7):237— 244.
6. Farag S S, Fehniger T A, Ruggeri L, et al. Natural killer cell recep— tors: new biology and insights into the graft— versus— leukemia effect[J]. Blood, 2002, 100(6): 1935— 1947.
7. Ma ki G. Ex vivo p ur gi ng of st e m cell a uto graf t s u si ng cyto to xic cells[J]. J He mato t her St e m Cell Re s ,2001 ,10 (4) : 545 — 551
8. Held W, Coudert J D, Zimmer J. The NK cell receptor repertoire: [J]. Curr Opin Immu2003, 15(2): 233— 237.
9. Zingoni A, Palmieri G, Morrone S, et al. CD — 69 triggered ERKacti2va— tion and functions are negatively regulated by CD94 / NKG2 — Ain— hibitory receptor[J]. Eur J Immunol, 2000, 30 (2): 644— 651.
10. Vankayalapati R, Wizel B, Weis S E, et al. The NKp46 receptor con— tributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium[J]. J Immunol, 2002, 168 (7): 3451— 3457.
11. Shi M, Zhang B, Tang Z R, et al. Autologous cytokine— induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10 (8):
1146— 1151.
12. Miller J S, Soignier Y, Panoskaltsis— Mortari A, et al. Successful adop— tive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer[J]. Blood, 2005, 105(8): 3051— 3057.
13. Borg C, Terme M, Taieb J, et al. Novel mode of action of c— kit tyro— sine kinasinhibitors leading to NK cell— dependent antitumor effects[J]. J Clin Invest,2004,114(3): 379— 388.
14 Mazzolini G, Prieto J, Melero I. Gene therapy of cancer with inter— leukin— 12[J]. Curr Gene Ther, 2005, 5(6): 573— 581.
15. Koh C Y, Blazar B R, George T, et al. Augmentation of antitumor ef— fects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo[J]. Blood, 2001, 97(10): 3132— 3137.
16. Karre K. Immunology. A perfect mismatch[J]. Science, 2002, 295(5562): 2029— 2031.
17. Ruggri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants[J]. Science, 2002, 295(5562): 2097— 2100.
18. Jole G, Turner J, Alexander L R. Anti— CD40 antibody induces an2ti — tumor and antimetastatic effects: the role of NK cells[J]. J Immunol,2001, 166(1): 89— 94.
19. Tonn T, Becker S, Esser R, et al. Cellular immunotherapy of malig— nancies using the clonal natural killer cell line NK— 92[J] . J Hema— tother Stem Cell Res, 2001, 10(4): 535— 544.

低频率超声对 MCF—7/ADM 肿瘤细胞的生物学效应

张战民[1],张凤春[2]

1. 南昌大学第一附属医院肿瘤科,南昌,330006

2. 上海交通大学附属仁济医院肿瘤科,上海 200127

【摘要】目的 观察低频率超声空化效应对人乳腺癌细胞株 MCF—7/ADM 的生物学效应,并对相关机制进行探讨。**方法** 以非细胞毒剂量的低频率超声(40.00kHz±10%,0.5W±20%W/cm2)照射联合 ADM 处理 MCF—7/S、MCF—7/ADM 细胞,采用 MTT 法研究低频率超声对细胞存活率的影响。用流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞内阿霉素的浓度。**结果** 单独应用 ADM 对 MCF—7 细胞的抑制率为 66.47%,低频超声处理后,ADM 对 MCF—7 细胞的抑制率为 67.25%与单用 ADM 组无统计学差异($P > 0.05$)。单独应用 ADM 对 MCF — 7/ADM 细胞的抑制率为 21.65%,低频超声处理后,ADM 对 MCF—7/ADM 细胞的抑制率为 43.13%($P < 0.05$)。单独应用 ADM,MCF—7 细胞的凋亡率分别为 33.99%, MCF—7/ADM 细胞的凋亡率分别为 4.4%,低频超声与 ADM 合用后, MCF—7/ADM 凋亡率分别为 13.70%。超声处理后,耐药细胞内 ADM 浓度显著增加,峰值明显右移,但尚不能达到敏感细胞的水平。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net