DOI:10.19789/j.1004-9398.2017.02.011

NK 细胞对 A549 细胞的 β-catenin 信号通路影响*

李登瑞[1] 郭素敏[1] 李 辉[1] 侯宏伟[1] 李晓霞[1] 刘欣燕[1] 杜杰杰[2] 宋利超[2] 尹江凡[2] 高 莉[2] 杨永辉[1]**

(1. 河北省胸科医院,河北省肺癌防治中心,河北 石家庄 050041; 2. 河北师范大学生命科学学院,河北 石家庄 050024)

摘 要

目的: 研究 NK 细胞对肺腺癌细胞系 A549 的杀伤作用. 方法: 无菌采集健康人外周血,培养 NK 细胞,对 A549 细胞进行杀伤活性的实验,检测 NK 对 A549 的杀伤活性,同时用 Western blot 检测 A549 细胞中 β-catenin 的表达. 结果: NK 对 A549 的杀伤率为 82.64%,β-catenin 的条带变浅,蛋白表达量逐渐降低. 结论: NK 对 A549 具有杀伤力,同时能够阻断 A549 细胞中的 Wnt/β-catenin 信号通路,可成为免疫治疗肺癌的一种新方法.

关键词: 自然杀伤细胞, 人肺癌细胞 A549, Wnt/β-catenin 信号通路.
中图分类号: Q279

近年来,随着全球范围内科学技术的高速发展,环境污染逐步加剧,肺癌的发生率也逐步提高. 肺癌,又被称为支气管肺癌,是全世界范围内的常见的恶性肿瘤. 近年来统计结果显示,肺癌发病率及死亡率居癌症之最[1],而其治疗效果却相对较差. 肺癌包括小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),其中,非小细胞肺癌的发病率约占总肺癌发病率的 80% ~ 90%. 现在,单纯的依靠放化疗治疗已经不能很好地战胜肿瘤,随着科学技术和医疗技术的发展,免疫治疗在治疗肿瘤方面逐步引起人们的关注[2-6]. 本实验主要探讨自然杀伤细胞(NK 细胞)在治疗肺癌方面的可能性.

1 材料与方法

1.1 材 料

人类非小细胞肺癌 A549 细胞由中国科学院上海细胞库提供; NK 细胞为本实验室培养; NKGM 培养基为美国 Gibco 公司产品; 胎牛血清为美国 Hyclone 公司产品; 淋巴细胞分离液为天津灏洋生物制品科技责任有限公司产品; IL-12、IL-15 为美国 Peprotech 公司产品; 抗人 CD3 单抗为武汉生物制品研究所产品; SDS 蛋白裂解液及 BCA 蛋白定量试剂盒均为碧云天公司产品; β-catenin 多克隆抗体为 Abcam 公司产品; β-actin 多克隆抗体为晶美公司产品.

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中,使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 A549 细胞,每天使用倒置显微镜观察细胞生长情况,换液,细胞长满培养瓶后进行 1/2 传代培养.

1.2.2 PBMC 细胞的分离

无菌、静脉采集健康志愿者外周血,用肝素抗凝,向 50 mL 离心管中加入 15 mL Ficoll-Paque PLUS 单核细胞分离液,再贴着管壁缓慢加入 30 mL 肝素抗凝外周血,避免破坏 Ficoll 分离液的水相,在室温、3 500 rpm 条件下离心 15 min. 将上层血浆小心吸出至另一个 50 mL 离心管中,56 ℃灭活 25 min,待用. 将淡黄色的单核细胞层吸出至 15 mL 离心管中,用无菌 PBS 洗涤 3 次,弃上清,沉淀即为外周血单核细胞. 获得 PBMC 细胞,以无血清的 PRMI-1640 培养基悬浮沉淀细胞,调整细胞浓度到 5×10^6/mL,细胞移入 6 孔板中,3 mL/孔,置于 37 ℃,贴壁细胞用作培养细胞,未贴壁细胞用作培养 NK 细胞.

1.2.3 NK 细胞的培养

用 90 mL NKGM 培养基重悬单核细胞,加入已

收稿日期: 2016-09-01
* 2013 年河北省省级重大医学研究课题(ZD2013063); 2012 年国家自然科学基金(31101638); 2013 年河北省省级重大医学研究课题(ZD2013060); 2014 年省级科技计划项目(14277789D).
**通讯作者

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

灭活的自体血清 10 mL 和 5 万单位重组人 IL-2 和 IL-15，混匀后注射入小培养袋中，置于 37 ℃孵箱静置培养. 第 3 天，补充入 50 mL NKGM 培养液和 2.5 万单位重组人 IL-2 和 IL-15，混匀后继续培养. 第 4 天，把小培养袋中的培养液平均分配到两个大培养袋中继续培养，每 3 ~ 4 天向每个大培养袋中补充 100 mL NKGM 培养液和 15 万单位重组人 IL-2. 总共培养约 14 d，全部实验操作在 GMP 实验室进行，按照试剂盒说明书进行一系列的质量检测，包括淋巴细胞分类，潜在的细菌、真菌污染，细胞培养液的内毒素水平.

1.2.4　NK 对 A549 细胞杀伤活性

将 A549 细胞悬液置于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中进行培养，收集对数生长期 A549 细胞，调整细胞数为 2.0×10^6 mL^{-1}，加入 51Cr 3.7 MBq，37 ℃ 孵育 1.5 h，中间每隔 15 min 晃动 1 次. 标记完毕后洗涤 3 次，调整靶细胞数至 1.0×10^5 mL^{-1}，加入 96 孔 U 型板，100 μL/孔. 收集 NK 细胞，按照不同的效靶比分组: NK 组、NK + A549(50∶1) 组、A549 组加入含有预先标记 A5492 细胞的 96 孔 U 型板中，37 ℃ 孵育 4 h，380 rpm 离心 5 min，收集上清液每孔 100 μL，用计数仪测定 CPM 值 并计算杀伤活性.

按以下公式计算:

$$\text{杀伤率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{实验孔 } A \text{ 值} - \text{效应细胞对照孔 } A \text{ 值}}{\text{靶细胞对照孔 } A \text{ 值}}\right) \times 100\%$$

1.2.5　NK、A549 共培养

取培养 3 d 后的 NK 细胞，调整细胞浓度为 5×10^6/mL，按 50∶1 的比例接种到 A549 细胞培养板，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中共同培养 24 h.

1.2.6　Western blot 法检测 β-catenin 的表达

SDS 裂解液裂解 1.2.5 中共培养的细胞，提取细胞总蛋白，测蛋白浓度，分装蛋白，-20 ℃保存，计算上样量. 取 60 μg 蛋白上样，电泳，转膜，封闭 2 h，加入一抗，4 ℃过夜，洗膜，加入二抗，37 ℃孵育 1 h，洗膜，加化学发光液，进行显影.

2　结果

2.1　倒置显微镜观察

2.1.1　A549 细胞的形态观察

倒置显微镜观察，可见 A549 细胞聚集生长，细胞呈不规则状态生长. 见图 1.

2.1.2　NK 细胞的形态观察

培养过程中，在细胞因子的刺激作用下，细胞个头小，亮且圆，分布均匀，一段时间后，可见部分细胞明显分化扩增为 NK 细胞，形成细胞团，培养第 6 天倒置显微镜观察可见细胞增值明显，呈集落状分布. 培养第 14 天，可见细胞呈圆球状，细胞核大且圆. 见图 2.

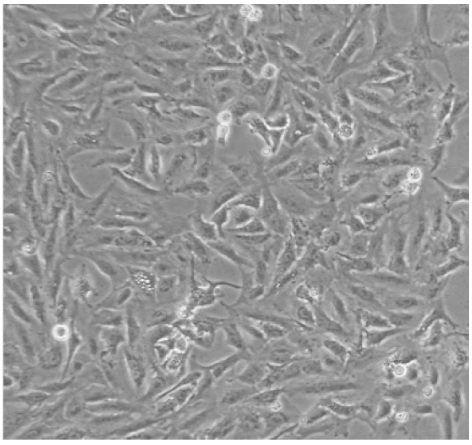


图 1　倒置显微镜观察 A549 细胞形态(400 ×)

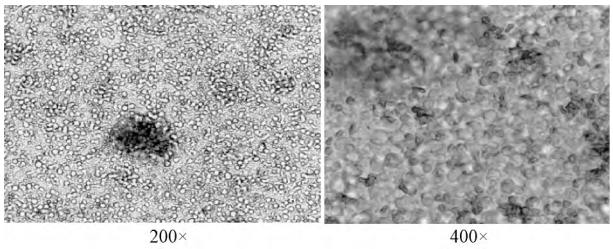


图 2　倒置显微镜观察 NK 细胞形态

2.2　NK 对 A549 细胞杀伤活性的比较

由结果可知，NK 对 A549 细胞具有杀伤作用，杀伤率为(82.640 ± 2.538) %. 见表 1.

表 1　NK 对 A549 细胞杀伤活性

分组	OD 值($\bar{x} \pm s, n = 6$)	杀伤率/%
NK	2.147 ± 0.030	82.640 ± 2.538
NK + A549	2.468 ± 0.083	
A549	2.489 ± 0.029	

2.3　Western blot 法检测 β-catenin 的表达

NK 与 A549 共培养 24 h，Western blot 法检测 A549 细胞中 β-catenin 表达含量，结果发现，与 β-actin 相比，β-catenin 条带变浅，说明 A549 细胞中 β-catenin 的表达逐渐减少，说明 NK 能够下调 Wnt 信号通路中 β-catenin 从而促进肺癌细胞的凋亡. 见图 3.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

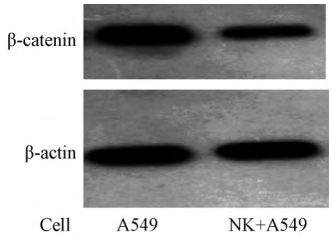


图 3 Western blot 法检测 β-catenin 的表达

3 讨 论

近年来,随着全国范围内 $PM_{2.5}$ 的加剧,肺癌的发生率也逐步提高,所以,肺癌的治疗成为现阶段的重要任务. 常规方法治疗肺癌已经不能满足现状,免疫治疗成为现阶段研究的主要方向.

NK 细胞是先天免疫中一类重要的细胞,通过细胞毒作用和分泌细胞因子参与机体抗感染和抗肿瘤免疫[7-9]. 因其作用不需初次免疫活化,因而在过继免疫治疗上有其独特的应用前景. 由于不能获得数量大、纯度高的人 NK 细胞,使 NK 细胞在免疫治疗中的应用受到了限制. 采用体外扩增的方法获得足够数量和较高纯度的人 NK 细胞,是近年来研究 NK 细胞功能特别是探讨过继免疫治疗的一个重要基础平台. 尤其是对手术后或者放、化疗后患者效果显著,能消除残留的转移病灶,防止癌细胞的扩散,提高机体自身的免疫力[10].

Wnt(wingless-type MMTV integration site family members)信号通路是一条能够调控细胞增殖、分化的信号通路,涉及个体发育、细胞增殖、分化、凋亡和坏死等多个方面,β-catenin 是 Wnt 信号通路的核心蛋白成分[11-12]. 在 Vaughan 等人[6] 建立的小鼠模型实验中,激活的 Wnt 信号增加了肿瘤的概率,大量研究表明,Wnt/β-catenin 信号通路在乳腺癌,大肠癌,非小细胞肺癌等肿瘤中均异常表达. Wnt 信号通路的活性与 β-catenin 有关,在肺癌的发生与发展中,Wnt/β-catenin 信号通路途径中 Wnt 蛋白(Wnt-1、Wnt-2)表达上调,Wnt 对抗物 WIF-1、DKK 转录终止[13-15]. ,进一步研究表明 β-catenin 在包括肺癌在内的多种实体瘤细胞中高表达[16-17].

本实验通过 Ficoll 密度梯度离心法分离健康志愿者 PBMC,加入不同的细胞因子体外诱导 NK 细胞,再与肺腺癌细胞 A549 联合培养后测细胞凋亡率和细胞内 β-catenin 的表达情况,在测 NK 细胞杀伤率的实验中发现 NK 能够杀伤肺腺癌 A549 细胞,杀伤率为(82.64 ± 2.538)%. 而在 Western 测 A549 细胞内 β-catenin 蛋白反应细胞凋亡时,结果得出与 β-actin 相比,β-catenin 条带变浅,说明 A549 细胞中 β-catenin 的表达逐渐减少,得出结论,NK 能够下调 Wnt 信号通路从而促进肺癌细胞的凋亡,得出更好的、更有效的治疗肺癌的免疫疗法,进一步扩大了肺癌患者免疫治疗的理论依据.

参 考 文 献

[1] She J, Yang P, Hong Q, et al. Lung cancer in China: challenges and interventions [J]. Chest, 2013, 143(4): 1117 - 1126.

[2] Nagaraj S, Ziske C, Schmidt-Wolf I G. Human cytokineinduced killer cells have enhanced in vitro cytolytic activity via non-viral in terleukin-2 gene transfer [J]. Genet Vaccines Ther, 2004, 2(1): 12.

[3] Schmidt-Wolf I G, Lefterova P, Mehta B A, et al. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells [J]. Experimental hematology, 1993, 21 (13): 1673 - 1679.

[4] Sconocchia G, Eppenberger S, Spagnoli G C, et al. NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer [J]. Oncoimmunology, 2014, 3(8): e952197.

[5] Garcia Campelo M R, Alonso C G, Aparicio G G, et al. Stem cell and lung cancer development: blaming the Wnt, Hh and Noth signalling pathway [J]. Clin Transl Oncol, 2011, 13(2): 77 - 83.

[6] Vaughan A E, Halbert C L, Wootton S K, et al. Lung cancer in mice induced by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is not maintained by rare cancer stem cells, but tumorigenicity does correlate with Wnt pathway activation [J]. Mol Cancer Res, 2012, 10: 86 - 95.

[7] Mehta B A, Wolf S. Two pathways of exocytosis of cytoplasmic granulecotents and target cell killing by cytokine induced CD3 CD56 killercells [J]. Blood, 1995, 86(9): 3493 - 3499.

[8] Chuang S S. In situ hybridisation for Epstein-Barr virus as a differential diagnostic tool for T-and natural killer/T-cell

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

lymphomas in non-immunocompromised patients [J]. Pathology, 2014, 46(7): 581-591.
[9] Schmidt-Wolf, Finke S, Huhn D, et al. Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma [J]. Br J Cancer, 1999, 81(6): 1009-1016.
[10] Poli M, Sève P, Merrot O, et al. Diagnosis of a multicentric extranodal nasal-type natural killer T-cell lymphoma made with an anterior chamber tap [J]. Retin Cases Brief Rep, 2012, 6(1): 46-9.
[11] Han M E, Lee Y S, Baek S Y, et al. Hedgehog signaling regulates the survival of gastric cancer cells by regulating the expression of Bcl-2 [J]. Int J Mol Sci, 2009, l0(7): 3033-3043.
[12] June C H. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic [J]. Journal of Clinical Investigation, 2007, 117: 1466-1476.
[13] Olioso P, Giancola R, Riti M D, et al. Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: a pilot clinical trial [J]. Hematological Oncology, 2009, 27(3): 130-139.
[14] Schmidt-Wolf I G, Negrin R S, Kiem H P, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity [J]. J Exp Med, 1991, 174(1): 139-149.
[15] Fiala M. Curcumin and omega-3 fatty acids enhance NK cell-induced apoptosis of pancreatic cancer cells but curcumin inhibits interferon-γ production: benefits of omega-3 with curcumin against cancer [J]. Molecules, 2015, 20(2): 3020-3026.
[16] Schmidt-Wolf I G, Lefterova P, Mehta B A, et al. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells [J]. Exp Hematol, 1993, 21(13): 1673-1679.
[17] Rooney M, Shukla S, Wu C, et al. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity [J]. Cell, 2015, 160(1-2): 48-61.

Effect of Wnt/β-catenin Signaling Pathway of NK Cell on Lung Cancer Cell A549

Li Dengrui[1]　Guo Sumin[1]　Li Hui[1]　Hou Hongwei[1]　Li Xiaoxia[1]　Liu Xinyan[1]　Du Jiejie[2]　Song Lichao[2]
Yin Jiangfan[2]　Gao Li[2]　Yang Yonghui[1]

(1. The Center of Lung Cancer Prevention, Hebei Province Chest Hospital, Shijiazhuang Hebei　050041;
2. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang Hebei　050024)

Abstract

Objective: Killing effect of NK cells of lung cancer A549. Methods: Aseptically collected from healthy human peripheral blood, cultured NK cell, the experiment about killing activity on A549 cell was done, the cytotoxicity of NK aganist A549 was detected, while using Western-biot to measure expression of β-catenin. Results: The cytotoxicity of NK on A549 was 82.64%, the bands of β-catenin became shallow, so the protein expression decreased gradually. Conclusion: NK is lethal to A549 and can block the Wnt/β-catenin signaling pathway in A549 cells, so it could become a new method for the treatment of lung cancer.

Key words: NK cells, lung cancer cell A549, Wnt/β-catenin signaling pathway.

作者简介　**李登瑞**(1955-),**男,山东冠城人,主任医师,教授,主要从事肿瘤和结核病的生物治疗研究**。E-mail: lidengrui55@sohu.com.
杨永辉(1972-),**男,河北藁城人,主任医师,教授,从事病理学诊断及细胞免疫治疗方面研究**。E-mail: yonghuiyang@vip.163.com.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net