

[文章编号] 1007-385X(2003)01-0021-04

## 人 SCF 基因转染 NK 细胞系的生物学特性研究

张 建<sup>1,2,3</sup>, 张建华<sup>2</sup>, 许晓群<sup>2</sup>, 冯进波<sup>2</sup>, 孙 沛<sup>1,2</sup>, 田志刚<sup>1,2</sup>(1. 中国科技大学免疫学研究所, 合肥 230027; 2. 山东省医科院基础所, 济南 250062; 3. 山东大学医学院, 济南 250012)

[摘要] 目的: 研究人 SCF 基因转染 NK 细胞系的生物学特性。方法: 利用 LipofectAMINE 将 SCF 真核表达载体 pcDNA3-hSCF 转染 NK-92 细胞系, RT-PCR 鉴定表达 SCF 的细胞克隆并以 SCF 依赖细胞株 TF-1 测活, MTT 法检测增殖和杀伤活性。流式细胞术检测细胞表面分子 CD3, CD16 和 CD56。结果: 建立表达 hSCF 基因的 NK-92-hSCF 细胞株, 在 IL-15 培养条件下, 其增殖能力显著高于 NK-92, 并且低剂量的 IL-15 可以维持其较高的杀伤活性流式细胞术检测细胞表面分子 CD3、CD16 和 CD56。结论: 可以通过 SCF 基因修饰 NK-92, 改变其生物学特性, 提高其增殖能力, 使 NK 细胞系有更实用的应用价值。

[关键词] 造血干细胞因子; 转染; NK 细胞系; 生物学特性

[中图分类号] R392.12 [文献标识码] A

## The Characterization of NK-92 Cell Line Transfected with Human Stem Cell Factor Gene

ZHANG Jian<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Jian-hua<sup>2</sup>, XU Xiao-qun<sup>2</sup>, FENG Jin-bo<sup>2</sup>, SUN Rui<sup>1,2</sup>, TIAN Zhi-gang<sup>1,2</sup>(1. Institute of Immunology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, 2. The Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science Jinan 250062; 3. Shandong University Medical School, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To study the characterization of NK cell line transfected with hSCF gene. **Methods:** pcDNA3-hSCF was transfected into NK-92 cell line with LipofectAMINE, RT-PCR was used to identify NK-92-hSCF cell which express hSCF and the activity was assayed by TF-1 cell line. CD3, CD16 and CD56 molecules were tested by FACS. **Results:** We established NK-92-hSCF cell line which express hSCF steadily, and its proliferation increased compared with parental cell line when incubated with rhIL-15 or rhIL-2. **Conclusion:** The characterization of NK-92 could be changed by transfecting with hSCF gene, and its proliferation was improved, The gene transfection of NK-92 cell made it suitable for clinical applications.

[Key words] stem cell factor; transfection; NK cell line; characterization

\* 目前世界上已建立的 NK 细胞株主要有 6 种<sup>[1]</sup>, 其中对 NK-92 细胞的研究较为广泛。鉴于 NK-92 细胞的表型及功能十分相似于新鲜 NK 细胞, 被学者用作 NK 细胞研究的主要材料来源。又由于 NK-92 细胞具备强于新鲜 NK 细胞的杀伤效力, 易于大规模质控培养, 已被美国 FDA 批准进入抗癌临床试验 II 期<sup>[2]</sup>。为了进一步探索造血干细胞因子(SCF)与 NK 细胞功能之间的关系以及 SCF 基因修饰 NK-92 细胞用于提高 NK-92 细胞抗癌效率的可行性, 我们将 SCF 基因转染入 NK-92 细胞并系统观察其增殖、杀伤、表型等生物学特性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料来源

pcDNA3, T-vector 载体, 购自上海生工生物工程公司; NK-92, K562 细胞购于 ATCC, 本室储存; TF-1 细胞, 为本室长期保存; LipofectAMINE<sup>TM</sup>, 为 GIBCO 产

[基金项目] 国家高技术研究发展专项经费资助  
(编号 2002AA216151)

[作者简介] 张 建(1965-), 女, 山东牟平人, 副研究员, 硕士, 主要从事分子免疫学研究。

[通讯作者] 田志刚

品;rhIL-15 本室基因工程产品,纯度 >95%,比活为  $1 \times 10^6$  U/mg; rhIL-2 为长春基因药物制品有限公司产品,比活为  $1 \times 10^6$  U/mg; rhSCF, rhIL-3 为 Sandos 产品; CD56, CD16, CD3 单克隆抗体为 Pharmigen 产品; 引物设计如下: P1 5' GGA TCC ATT ATG CAA CAG GGG GTA AC, P2 5' GGT ACC TGC CTT TCC TTA TGA AG, 由上海生工生物工程公司合成; 逆转录酶及内切酶均购自 GIBCO 公司; G418 为 GIBCO 产品; MTT 为 Sigma 产品;  $\alpha$ -MEM 和 RPIM-1640 为 GIBCO 产品; 马血清为 Hyclone 产品。

### 1.2 hSCF 真核表达载体的构建及其在 NK-92 细胞中的表达

提取胎肝总 mRNA, 以 P1 和 P2 为引物进行 RT-PCR 获得 hSCF cDNA 并与 T-vector 连接、转化 DH5 $\alpha$  受体菌, PCR 及酶切筛选阳性克隆后进行 DNA 序列测定。T-vector-hSCF 以 EcoRV 和 Kpn I 酶切, 回收、纯化 hSCF 片段并插入 EcoR V 和 Kpn I 酶切的 pcDNA3 载体, 转化 DH5 $\alpha$  后通过 PCR 和酶切鉴定出数个克隆, 分别将这些阳性克隆转染到 CHO 细胞, 48 h 后收集细胞, RT-PCR 方法鉴定 hSCF 基因的表达。然后, 将该 pcDNA3-hSCF 重组载体以 LipofectAMINE<sup>TM</sup> 转染 NK-92 细胞, G418 筛选 (200  $\mu$ g/ml ~ 1,000  $\mu$ g/ml), 每周增加一个浓度梯度, 当对照组细胞基本死亡时, 以含 200  $\mu$ g/ml G418 的培养基继续培养转染细胞, 并 RT-PCR 鉴定 SCF mRNA 的转录水平; 然后有限稀释法克隆细胞, 上清以 TF-1 细胞测活, 将有活性的细胞克隆进行扩增、冻存。

### 1.3 NK 细胞的增殖实验

MTT 法测定 rhIL-2 和 rhIL-15 对 NK 细胞的增殖作用。将 NK-92 和 NK-92-hSCF 分别调成  $1 \times 10^5$ /ml, 于 96 孔板中加 100  $\mu$ l, 以不同浓度的 rhIL-15 或 rhIL-2 于 37 $^{\circ}$ C 培养 3 d, 加入 MTT 后继续培养 4 h, 离心, 去除 100  $\mu$ l 上清, 并加入 100  $\mu$ l 10% SDS, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。测定 570 nm 的 OD 值。细胞计数法观察 NK 细胞增殖的时效关系, 于 24 孔板中加入  $10^4$  cells/ml 和 100 U/ml 的 rhIL-2 或 rhIL-15, 每天计数 1 次, 每两天半量换液, 连续培养 7 d。

### 1.4 NK 细胞杀伤活性的测定

以 MTT 法测定 NK 细胞的杀伤活性。分别以 NK-92 和 NK-92-hSCF 为效应细胞, K562 为靶细胞, 效: 靶比为 10:1, 5:1, 2.5:1, 1.25:1, 0.625:1, 加入 96 孔板中, 每个效靶比设 4 个复孔, 每孔总体积为 200  $\mu$ l, 并设完全培养基做调零孔。37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养过夜, 加入 MTT 后继续培养 4 h。以下步骤同 1.3, 以下列公式计算 NK 细胞杀伤活性:

杀伤活性(%) =

$$\left[ 1 - \frac{(\text{效应细胞} + \text{靶细胞 OD 值}) - \text{效应细胞 OD 值}}{\text{靶细胞 OD 值}} \right] \times 100\%$$

### 1.5 细胞表型的测定

流式细胞仪检测 NK 细胞表面分子。收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 0.5% BSA 封闭 30 min, PBS 洗涤 2 次, 然后加入 CD56-PE 和 CD16-FITC 单抗, 冰浴 30 min。收集细胞, 用 1% ~ 4% 的甲醛溶液固定, FACS 分析。

### 1.6 hSCF 活性测定

以目前国际通用的 SCF 依赖细胞株 TF-1 测定 SCF 活性。取 rhSCF 为标准品, 用 1640 培养液稀释至 128 U/ml 为起始浓度。将 96 孔细胞培养板每孔加入 100  $\mu$ l 1640 培养液, 分别取 rhSCF 标准品和样本各 100  $\mu$ l 于 96 空板中倍比稀释, 共设 8 个稀释度, 每个稀释度 3 个复孔, 并设单纯 1640 液为阴性对照。取 TF-1 细胞离心后弃上清, 生理盐水洗涤 4 次, 用 1640 培养液调至  $1 \times 10^5$ /ml, 分别加入 100  $\mu$ l/孔。37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 ~ 72 h, 待阴性对照孔细胞全部死亡时, 每孔加入 MTT, 继续培养 4 h, 之后步骤同 (1.3)。采用概率单位法计算各样本的生物反应率, 最终计算出样本 SCF 的生物效价 (U/ml)。

## 2 结果

### 2.1 表达 hSCF 细胞株 NK-92-hSCF 的建立

利用 LipofectAMINE<sup>TM</sup> 将 pcDNA3-hSCF 转染 NK-92 细胞, 24 h 后加入 G418 进行筛选。当对照组 NK-92 细胞基本死亡时, 将转染细胞进行有限稀释克隆化细胞, 同时以 RT-PCR 进行 SCF 转录水平的检测和用 TF-1 细胞测定上清活性, 共筛选出 11 个分泌 hSCF 的阳性细胞克隆, 扩增后冻存。

图 1 RT-PCR 筛选 SCF 基因转染 NK 细胞的阳性克隆  
Fig. 1 RT-PCR analysis of NK cell clone which transfected with hSCF gene

1: DNA marker; 2: NK-92-hSCF; 3: NK-92

## 2.2 IL-15 和 IL-2 对 NK-92-hSCF 的增殖作用

在 IL-2 培养条件下, NK-92-hSCF 比 NK-92 的增殖效应有所提高,而在 IL-15 培养条件下 NK-92-hSCF 比 NK-92 的增殖效应更强(图 2)。图 3 表示在 IL-15 或 IL-2 培养条件下, NK-92-hSCF 和 NK-92 的增长趋势,其中 NK-92-hSCF 的增殖能力显著高于 NK-92 细胞。

## 2.3 IL-15 和 IL-2 对 NK-92-hSCF 杀伤活性的影响

在 IL-2 或 IL-15(100 U/ml)的培养条件下, NK-92-hSCF 比 NK-92 对 K562 的杀伤活性没有显著性差异,但两者的杀伤活性保持在较高的水平(图 4)。

## 图 4 NK-92 和 NK-92-hSCF 对 K562 的杀伤活性

Fig.4 Cytotoxicity of NK-92 and NK-92-hSCF against K562 cell

A: IL-2; B: IL-15

## 图 2 NK-92 和 NK-92-hSCF 在 IL-2 或 IL-15 培养下的增殖效应

Fig.2 Proliferation of NK-92 and NK-92-hSCF incubated with IL-2 or IL-15

A: IL-2; B: IL-15

## 2.4 细胞表型

流式细胞仪检测显示, hSCF 基因转染 NK-92 后, 其细胞膜表面表达的 CD56 分子与未转染的 NK-92 相比, 其强度有显著增强, 而 CD16 分子仍为阴性(图 5)。

## 3 讨论

NK 细胞是独特的淋巴细胞, 不需致敏就可以杀伤靶细胞。80 年代以来, 有些细胞因子(如 IL-2)被用来激活 NK 细胞用于过继免疫治疗。但是, NK 细胞的分化发育和杀伤活性受到非常复杂的细胞因子及受体系统的严格调控<sup>[3]</sup>, IL-2, IL-15, SCF 等细胞因子对其生物学特征均有重要的调节作用, 其中 SCF 是骨髓基质细胞产生的一种能刺激多种细胞生长发育的多功能细胞因子, 其受体 c-Kit 在 CD34<sup>+</sup>造血干细胞和 CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK 细胞上都有表达, 可以协同 IL-2 提高 NK 细胞的增殖及 IFN- $\gamma$  的表达<sup>[4]</sup>, 并且 SCF 可以协同 IL-15 促进脐血 CD34<sup>+</sup>造血干细胞向 NK 细胞分化发育<sup>[5]</sup>, 这些研究结果都表明 SCF 在 NK 细胞的分化发育过程中起着重要作用, 尤其是维持并促进 NK 细胞的增殖

## 图 3 NK-92 和 NK-92-hSCF 在 100 U/ml IL-2 或 100 U/ml IL-15 培养下的增殖动力学

Fig.3 Proliferation of NK-92 and NK-92-hSCF incubated with IL-2(100 U/ml) or IL-15(100 U/ml)

有重要意义。NK-92 是 1992 年从淋巴瘤病人中获得的 NK 细胞系,具有高效、广谱抗肿瘤作用。由于 NK-92 细胞的细胞毒活性依赖于 IL-2,在临床应用时必须滴注 IL-2 以维持 NK-92 的细胞毒活性,而 IL-2 的毒副作用使 NK-92 的临床应用受到一定的限制。为此, Tam 等<sup>[6]</sup>人将 IL-2 基因转染到 NK-92 中,建立了自身分泌 IL-2 而不依赖外源性 IL-2 的 NK-92M1 和 NK-92C1,其增殖能力和对 K562 的杀伤活性与未转染的 NK-92 相似。这些资料提示 NK-92 细胞可以通过基因转染技术导入细胞因子基因并改变其特性使之有更实用的应用价值,迄今为止尚未见除 IL-2 之外的其它细胞因子基因修饰 NK-92 细胞的报道。随着细胞因子与 NK 细胞关系的研究进展,推测会有更多的目的基因可能被转染入 NK 细胞,本研究是这种尝试的开始。

图 5 hSCF 基因对 NK-92 细胞表面 CD56 和 CD16 分子表达的影响

Fig. 5 Effect of hSCF gene on the expression of CD56 and CD16 molecules of NK-92 cell line

由于 NK-92 的表型为 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>,被认为是一种不成熟的 NK 细胞。在我们的实验中发现,SCF 蛋白可以促进 NK-92 对 IL-2/IL-15 的增殖反应性。为此,我们将 hSCF 真核表达载体 pcDNA3-hSCF 转入 NK-92 细胞,建立表达 hSCF 的 NK 细胞系 NK-92-hSCF,进一步探索 SCF 与 NK 细胞生物学功能之间的关系以及 SCF 基因修饰 NK-92 细胞用于提高 NK-92 抗癌效率的可行性。结果表明,我们所获得的分泌 hSCF 的 NK-92-hSCF 细胞株,虽然其表达 hSCF 的量较低(这可能是由于 NK-92 细胞本身所表达的 c-kit 受体与 hSCF 结合而降低了培养基中 hSCF 的量),但在 IL-15 或 IL-2 培养时,NK-92-hSCF 的增殖能力均强于 NK-92,而且 IL-15 培养时 NK-92-hSCF 的增殖能力最强;同时细胞表型测

定结果表明,NK-92-hSCF 和 NK-92 均为 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>,其 CD56 分子的表达强度显著提高。以上结果说明,转染 hSCF 基因后 NK-92 细胞其增殖特性发生了变化,具备更强的增殖特性,这也从另一个角度提示,SCF 与 c-kit 的相互作用是 NK 细胞分化发育重要的信号<sup>[7]</sup>,内源性 SCF 与外源性 SCF 都可以协同 IL-15 和 IL-2 促进 NK 细胞的增殖和杀伤活性。

本研究一方面进一步验证了在 NK 细胞分化发育过程中 SCF 协同 IL-15 的重要作用,另一方面,在临床应用 NK-92 细胞过继免疫治疗肿瘤时,可以应用 IL-15 或 IL-2 在体外培养 NK-92-hSCF,在短时间内达到临床治疗剂量,并可以以低剂量的 IL-15 维持 NK-92-hSCF 的高杀伤活性,而避免了 IL-2 的毒副作用,为临床提供一种更有效的免疫效应细胞。NK-92-hSCF 杀伤因子的变化及体内抗肿瘤作用正在研究中。

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Drexler HG, Matsuo Y. Malignant hematopoietic cell line *in vitro* models for the study of natural killer cell leukemia-lymphoma[ J ]. *Leukemia*, 2000, 14: 777-782.
- [ 2 ] Tonn T, Becker S, Esser R, *et al.* Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92[ J ]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10(4): 535-544.
- [ 3 ] Shibuya A, Nagayoshi K, Nakamura K, *et al.* Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells[ J ]. *Blood*, 1995, 85: 3538-3546
- [ 4 ] Fehniger TA, Carson WE, Morzek E, *et al.* Stem cell factor enhances interleukin-2-mediated expansion of murine natural killer cells *in vivo*[ J ]. *Blood*, 1997, 90(9): 3647-3653
- [ 5 ] Cavazzana CM, Haccin BS, Saint BG, *et al.* Role of interleukin-2 (IL-2), IL-7, and IL-15 in natural killer cell differentiation from cord blood hematopoietic progenitor cells and from gamma c transduced severe combined immunodeficiency X1 bone marrow cells [ J ]. *Blood*, 1996, 88(10): 3901-3909.
- [ 6 ] Tam YK, Maki G, Miyagawa B, *et al.* Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy[ J ]. *Human Gene Therapy*, 1999, 10: 1359-1373.
- [ 7 ] Colucci F, Di Santo JP. The receptor tyrosine kinase c-kit provides a critical signal for survival, expansion, and maturation of mouse natural killer cells[ J ]. *Blood*, 2000, 95(3): 984-991

[ 收稿日期 ] 2002 - 08 - 27

[ 修回日期 ] 2002 - 10 - 30