

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.03.007

· 基础研究 ·

IL-27联合IL-15通过磷酸化STATs途径调控NK92细胞的抗肿瘤作用

蒋亚楠¹, 孙雨飞¹, 王坤², 付强^{1,2,3} (1. 滨州医学院 免疫学教研室, 山东 烟台 264003; 2. 滨州医学院 生物制药教研室, 山东 烟台 264003; 3. 山东思乐基医药科技有限公司, 山东 烟台 264003)

[摘要] **目的:** 探讨IL-27联合IL-15对NK92细胞抗肿瘤作用的影响及其分子和信号通路机制。**方法:** 将高表达IL-15的NK92(IL-15-NK92)细胞分别置于不同质量浓度的IL-27(0、10、20、30及60 ng/ml)下培养24 h, ELISA法检测IL-27对IL-15-NK92细胞分泌IL-15的影响, Transwell法检测IL-27对IL-15-NK92细胞迁移作用的影响, CCK-8法检测IL-27对IL-15-NK92细胞增殖能力的影响, 流式细胞术检测IL-15-NK92细胞表面受体NKG2D、NKp30和NKp46的表达水平以及穿孔素和颗粒酶B的分泌水平, LDH法检测IL-15-NK92细胞对多种血液肿瘤和实体瘤细胞的杀伤作用, WB检测STATs通路相关蛋白的表达及其磷酸化水平。**结果:** 30 ng/ml的IL-27可以促进IL-15-NK92细胞IL-15的分泌($P<0.01$)、明显增强其迁移能力($P<0.05$), 但明显抑制其增殖能力($P<0.05$); 并且显著促进IL-15-NK92细胞表面受体NKG2D、NKp30和NKp46的表达(均 $P<0.05$)、明显促进穿孔素分泌($P<0.05$)但不影响颗粒酶B的分泌($P>0.05$)。30 ng/ml的IL-27可显著促进IL-15-NK92细胞对多种血液肿瘤和实体瘤细胞的杀伤能力($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 并且上调STAT1、STAT3、及STAT5蛋白的磷酸化水平(均 $P<0.01$)。**结论:** IL-27可增强IL-15-NK92细胞对实体肿瘤细胞和血液肿瘤细胞的杀伤作用, 该作用与IL-27上调IL-15-NK92细胞中JAK-STAT通路相关蛋白STAT1、STAT3、STAT5磷酸化水平和促进该细胞中多种活化性受体相关。

[关键词] IL-27; IL-15; NK92细胞; 抗肿瘤; JAK-STAT通路

[中图分类号] R7350.51; R392.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)03-0261-08

IL-27 in combination with IL-15 regulates anti-tumor effect of NK92 cells by phosphorylating the STATs pathway

JIANG Yanan¹, SUN Yufei¹, WANG Kun², FU Qiang^{1,2,3} (1. Department of Immunology, Binzhou Medical University, Yantai 264003, Shandong, China; 2. Department of Biological Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, Shandong, China; 3. Shandong Cellogene Pharmaceuticals Co., LTD., Yantai 264003, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of IL-27 in combination with IL-15 on the anti-tumor effects of NK92 cells and the possible molecular and signaling mechanisms. **Methods:** NK92 cells with high IL-15 expression (IL-15-NK92 cells) were cultured in different mass concentrations of IL-27 (0, 10, 20, 30 and 60 ng/ml) for 24 h. The effects of IL-27 on IL-15 secretion, migration and proliferation of IL-15-NK92 cells were detected by ELISA, Transwell and CCK-8 assay, respectively. Flow cytometry was used to detect the expression levels of IL-15-NK92 cell surface receptors NKG2D, NKp30 and NKp46, as well as the secretion levels of perforin and granzyme B. LDH method was used to detect the cytotoxic effect of IL-15-NK92 cells on hematologic tumor cells and solid tumor cells, and WB was used to detect the expressions and phosphorylation level of STATs pathway-related proteins. **Results:** IL-27 at the concentration of 30 ng/ml promoted IL-15-NK92 cells secreting IL-15 ($P<0.01$), significantly enhanced the cell migration ($P<0.05$) but inhibited the proliferation of IL-15-NK92 cells ($P<0.05$). 30 ng/ml IL-27 could significantly promote the expressions of NKG2D, NKp30 and NKp46 on surface of IL-15-NK 92 cells, as well as elevate the secretion of perforin (all $P<0.05$), but didn't affect the secretion of granzyme B ($P>0.05$); moreover, it also significantly enhanced the cytotoxicity of IL-15-NK92 cells against hematologic malignancies and solid tumor cells ($P<0.05$ or $P<0.01$), and up-regulated the phosphorylation levels of STAT1, STAT3 and STAT5 (all $P<0.01$). **Conclusion:** IL-27 can enhance the cytotoxicity of IL-15-NK92 cells against hematologic tumor cells and solid tumor cells, which might be related with its upregulation of phosphorylation level of STAT1, STAT3 and STAT5 in JAK-STAT pathway and multiple activating receptors in IL-15-NK92 cells.

[Key words] IL-27; IL-15; NK92 cell; Anti-tumor; JAK-STAT pathway

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(3): 261-268. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.03.007]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81370730, No.81571512); 山东省自然科学基金重点项目资助(No.ZR2015JL027); 烟台市高端人才引进“双百计划”专项经费资助。Project supported by the National Natural Science Foundation (No.81370730, No.81571512), the Natural Science Foundation of Shandong Province (No.ZR2015JL027), and the Yantai “Double Hundred Plan” for Advanced Talents Introduction in Yantai City

[作者简介] 蒋亚楠(1994-), 女, 硕士生, 主要从事NK细胞免疫的基础研究, E-mail: ynjiaang809@163.com

[通信作者] 付强(FU Qiang, corresponding author), 博士, 教授, 主要从事NK细胞免疫的基础研究, E-mail: qiangfu11@fudan.edu.cn

自然杀伤(natural killer, NK)细胞是一种能够杀伤肿瘤和病毒感染细胞的免疫细胞,在固有免疫和适应性免疫中均发挥重要作用,其不需预先刺激即可溶解肿瘤细胞,并且无主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)限制性,已成为肿瘤免疫治疗的研究热点^[1-3]。NK92细胞是1992年从大颗粒淋巴瘤(large granular lymphocyte, LGL)非霍奇金淋巴瘤患者的外周血淋巴细胞中分离并建立的细胞系,在表面受体与功能特征方面与NK细胞相似,其具有广泛的溶细胞活性及安全性^[4-5]。IL-15是一种多功能细胞因子,不仅能够活化NK细胞,还能促进其分化、成熟和增殖^[6]。IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21和I型干扰素可以独立或协同调节NK细胞的功能,而其他细胞因子,如IL-23和IL-27,可能会增强或抑制NK细胞功能,这取决于其环境^[7-8]。IL-15基因修饰的NKL细胞的杀伤相关分子的表达水平显著上升,对肝癌、白血病、宫颈癌和结肠癌的杀伤水平、抗凋亡水平明显提高^[9]。大多数影响NK细胞功能的细胞因子通过Janus激酶(Janus kinase, JAK)信号转导和转录激活因子(signal transduction and transcriptional activators, STAT)途径传递信号,这是一种从细胞表面向细胞核传递细胞外信号的保守途径^[10]。因此,理解JAK-STAT分子在NK细胞生物学中的作用是至关重要的。

在体内外实验中外源性IL-15都可显著促进NK92细胞的生物学功能,而内源性IL-15对NK92细胞生物学功能的调节作用尚未见报道,IL-27联合IL-15对NK92细胞是否有调节作用、其作用是否与JAK-STAT通路有关也不甚清楚。本实验室通过成功构建的高表达IL-15的NK92(IL-15-NK92)细胞来探讨其生物学功能,以及IL-27对IL-15-NK92细胞生物学功能的调节作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、实验动物及主要试剂

NK92细胞购自美国ATCC公司,人Burkitts淋巴瘤Raji细胞购自中科院保藏细胞库,IL-15-NK92细胞、人慢性粒细胞白血病K562细胞、乳腺癌MCF-7细胞和前列腺癌PC-3细胞均由本实验室保存。L500培养基购自北京达科为生物技术有限公司,胎牛血清购自美国Gibico公司,ELISA试剂盒购自北京达科为生物有限技术,CCK-8试剂盒购自日本同仁化学公司,试剂盒CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测试剂盒购自美国Promega公司,流式抗体NKp30和NKG2D购自美国BD公司,

NKp46抗体购自美国Biolegend公司,穿孔素和颗粒酶B单抗购自美国eBioscience公司,WB所用抗STAT1和STAT3抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,STAT5抗体购自美国SAB公司,P-STAT1、P-STAT3和P-STAT5抗体购自美国Abcam公司。流式细胞仪购自美国Beckman公司。

1.2 细胞培养

K562和Raji细胞培养于含10%胎牛血清及1%青链霉素混合液的RPMI 1640培养液中,PC-3细胞和MCF-7细胞培养于含10%胎牛血清及1%青链霉素混合液的DMEM培养液中,IL-15-NK92细胞培养于含20%胎牛血清及1%青链霉素混合液的L500培养液中,均置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养。

1.3 ELISA法检测IL-27对IL-15-NK92细胞分泌IL-15的影响

IL-15-NK92细胞计数后种板,细胞密度调整为 1×10^6 个/ml,用不同质量浓度的IL-27(0.30及100 ng/ml)刺激IL-15-NK92细胞24 h后收集细胞上清,用ELISA试剂盒检测IL-15的分泌情况,并用酶标仪检测各孔在450 nm处的D值,绘制标准曲线,计算浓度。每次3个复孔,实验重复3次。

1.4 Transwell法检测IL-27对IL-15-NK92细胞迁移能力的影响

收集生长状态良好的IL-15-NK92细胞,用PBS将细胞离心洗涤一遍。将细胞放在不含FBS的L500培养基中饥饿培养24 h后,将细胞离心收集,用L500培养基重悬,将 2×10^5 个细胞加入到Transwell上室中,最终体积为200 μ l体系。Transwell下室中加入500 μ l含有20% FBS的L500培养基,每组3个复孔。24 h后,将Transwell板取出,然后将下室中细胞收集,加入CCK-8试剂,于培养箱中孵育4 h,使用酶标仪检测450 nm处的D值。实验重复3次。

1.5 CCK-8法检测IL-27对IL-15-NK92细胞增殖的影响

收集生长状态良好的IL-15-NK92细胞,细胞密度调整为 1×10^6 个/ml,接种于六孔板中,用不同质量浓度的IL-27(0.30及60 ng/ml)刺激IL-15-NK92细胞24 h后,收集细胞将细胞密度调整为 1×10^5 个/ml,以每孔100 μ l接种于96孔培养板中,每组设3个复孔,置于恒温培养箱中,分别于第0、12、24、36、48和60 h进行测定。每孔加入10 μ l的CCK-8试剂,将培养板放入恒温培养箱中孵育4 h后,使用酶标仪测定各孔在450 nm处的D值。实验重复3次。

1.6 LDH法检测IL-27对IL-15-NK92细胞毒性的影响

以IL-15-NK92细胞为效应细胞,以K562、Raji、

PC-3、MCF-7 细胞为靶细胞。收集对数生长期的靶细胞,调整细胞密度至 1×10^5 个/ml,按 $50 \mu\text{l}$ /孔接种于96孔板,4个复孔;分别加入10、20、30及60 ng/ml的IL-27,培养24 h后将IL-15-NK92细胞加入铺有靶细胞的96孔板中,使效应细胞与靶细胞按照3:1比例混合培养,总体积 $100 \mu\text{l}$ 。将各组的培养体系在 37°C 、5% CO_2 条件下培养4 h,进行LDH法检测。离心取 $50 \mu\text{l}$ 上清加入新的96孔板,每孔加入 $50 \mu\text{l}$ 底物,室温避光孵育30 min,每孔加入 $50 \mu\text{l}$ 终止液,在1 h之内使用酶标仪在490 nm的波长下测定每孔的 D 值。根据试剂盒说明书提供的公式计算每孔肿瘤细胞的杀伤率,公式如下:细胞杀伤率 $=[(\text{实验组 } D \text{ 值}-\text{效应细胞自发释放孔的 } D \text{ 值})-(\text{靶细胞最大释放孔 } D \text{ 值}-\text{靶细胞自发释放孔 } D \text{ 值})]/(\text{靶细胞最大释放孔 } D \text{ 值}-\text{靶细胞自发释放孔 } D \text{ 值})] \times 100\%$ 。实验重复3次。

1.7 流式细胞术检测IL-27对IL-15-NK92细胞中NKG2D、NKp30、NKp46、穿孔素以及颗粒酶B表达的影响

收集IL-27(30 ng/ml)处理24 h之后的IL-15-NK92细胞,用PBS洗涤2次后,采用直接标记法分别用针对NKG2D、NKp30、NKp46、穿孔素和颗粒酶B的单克隆抗体标记细胞,置于 4°C 、避光条件下孵育30 min后,用PBS洗涤2次以除去过量的未结合的抗体,离心后每管加入 $400 \mu\text{l}$ PBS,轻轻摇匀。用流式细胞仪检测并分析结果。实验重复3次。

1.8 WB检测IL-27对IL-15-NK92细胞中STAT通路相关蛋白及其磷酸化水平的影响

收集30 ng/ml的IL-27处理0、10、20、30、60及120 min的IL-15-NK92细胞,提取蛋白后行SDS-PAGE,电泳后将蛋白转移至PVDF膜上,用5%的脱脂奶粉封闭,加兔抗人STAT1、STAT3、STAT5、P-STAT1、P-STAT3、P-STAT5以及 β -actin抗体过夜,加HRP-山羊抗兔二抗孵育,用 β -actin作为内参,用ImageJ软件分析曝光所得数据,计算目的蛋白相对表达量。实验重复3次。

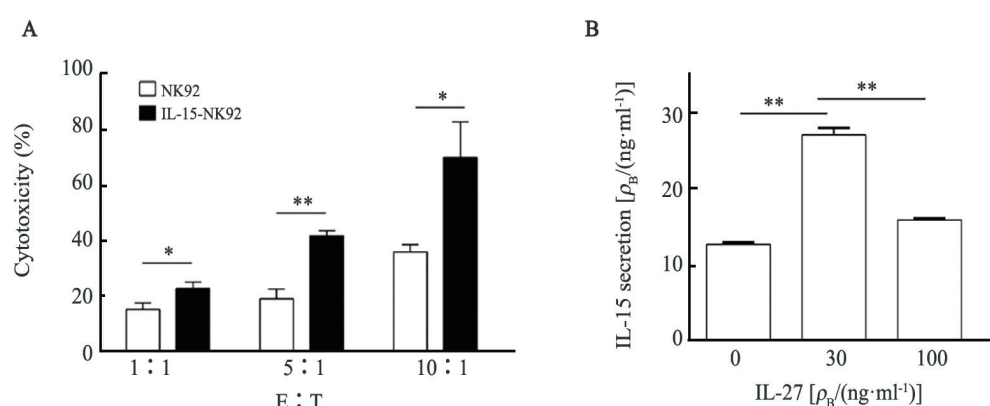
1.9 统计学处理

所有数据均采用SPSS17.0统计软件分析,正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个独立样本之间的比较采用独立样本 t 检验,多个独立样本之间的比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-15-NK92对K562细胞的毒性明显强于NK92细胞

IL-15-NK92细胞以及NK92细胞对K562细胞均具有细胞毒作用,且随着效靶比的增加,IL-15-NK92细胞以及NK92细胞对K562细胞的杀伤作用越强。但是,IL-15-NK92细胞对K562细胞的细胞毒作用比NK92细胞更强($P < 0.05$,图1A)。ELISA检测结果显示,30 ng/ml的IL-27可以促进IL-15-NK92细胞中IL-15的分泌($P < 0.01$,图1B),100 ng/ml的IL-27对IL-15-NK92细胞分泌IL-15的促进作用反而有所减弱($P < 0.01$,图1B)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: The cytotoxicity of IL-15-NK92 cells and NK92 cells against K562 cells;

B: The secretion of IL-15 in IL-15-NK92 cells after the IL-27 treatment

图1 IL-15-NK92细胞分泌IL-15的水平以及对K562细胞的细胞毒性

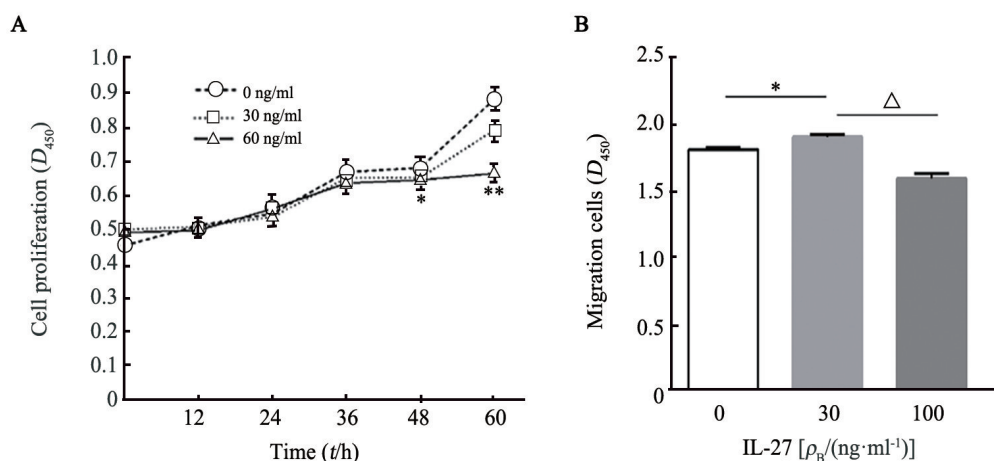
Fig.1 IL-15 secreted by IL-15-NK92 cells and its cytotoxic activity against K562 cells

2.2 IL-27对IL-15-NK92细胞增殖能力和迁移能力的影响

CCK-8增殖实验检测结果显示:IL-15-NK92细胞组、IL-15-NK92细胞+IL-27(30 ng/ml)组及IL-15-NK92

细胞+IL-27(60 ng/ml)组的增殖能力在0、12、24和36 h时无明显的差异($P>0.05$,图2A)。在48和60 h时,IL-15-NK92细胞+IL-27(30 ng/ml)组及IL-15-NK92细胞+IL-27(60 ng/ml)组的 D 值比IL-15-NK92细胞组明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图2A),并且IL-15-NK92细胞+IL-27(60 ng/ml)组的 D 值比IL-15-NK92细胞+IL-27(30 ng/ml)组更低($P<0.05$,图2A)。结果提示,

IL-27对IL-15-NK92细胞的增殖能力有抑制作用。采用Transwell法检测IL-15-NK92细胞的迁移能力,CCK-8检测迁移细胞数量结果显示,IL-15-NK92细胞的IL-27刺激组和对照组相比,在IL-27 30 ng/ml时 D 值升高($P<0.05$),而在100 ng/ml时 D 值反而降低($P<0.05$,图2B)。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 0 ng/ml group; $\Delta P<0.05$ vs 30 ng/ml group

A: IL-27 could inhibit proliferation of IL-15-NK92 cells; B: IL-27 could promote migration of IL-15-NK92 cells

图2 IL-27对IL-15-NK92细胞增殖和迁移能力的影响

Fig.2 Effects of IL-27 on proliferation and migration of IL-15-NK92 cells

2.3 IL-27促进IL-15-NK92细胞表面受体NKG2D、NKp30、NKp46的表达以及穿孔素的分泌

用30 ng/ml的IL-27处理IL-15-NK92细胞,采用流式细胞术方法检测IL-15-NK92细胞表面受体的表达变化,结果显示IL-15-NK92组表面受体NKG2D(图3A)、NKp30(图3B)和NKp46(图3C)的表达量比NK92对照组相表达量明显增加(均 $P<0.05$)。与没有用IL-27预先处理的对照组相比,IL-27能促进IL-15-NK92细胞受体NKG2D、NKp30和NKp46的表达(图3D, $P<0.05$)。同时用流式细胞术检测IL-15-NK92细胞的分泌水平,IL-27能够增强IL-15-NK92细胞分泌穿孔素(图3E和G)的能力($P<0.05$),但不影响对颗粒酶B(图3F和G)的分泌能力。

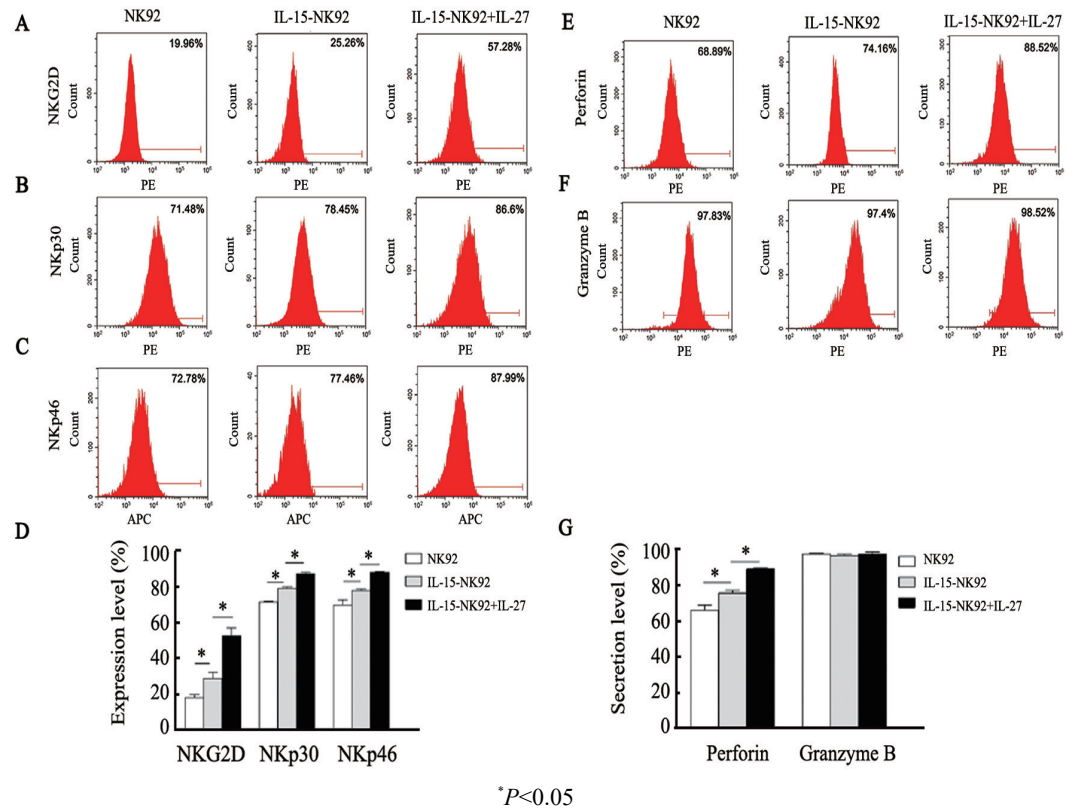
2.4 IL-27促进IL-15-NK92细胞对多种肿瘤细胞的杀伤活性

LDH法检测结果显示,10、20及30 ng/ml质量浓度的IL-27均可促进IL-15-NK92细胞对血液肿瘤细胞K562(图4A)和Raji细胞(图4B)的杀伤能力,且30 ng/ml的IL-27对其细胞毒促进作用最强($P<0.01$)。同样,10、20及30 ng/ml的IL-27均可显著促进IL-15-NK92细胞对实体肿瘤细胞MCF-7(图4C)和PC-3细胞(图4D)的杀伤作

用,且30 ng/ml的IL-27的促进作用最强($P<0.05$)。但当IL-27质量浓度增至60 ng/ml时,其杀伤作用反而有所降低。

2.5 IL-27调控IL-15-NK92细胞中JAK-STAT通路相关蛋白STAT1、STAT3和STAT5的磷酸化水平

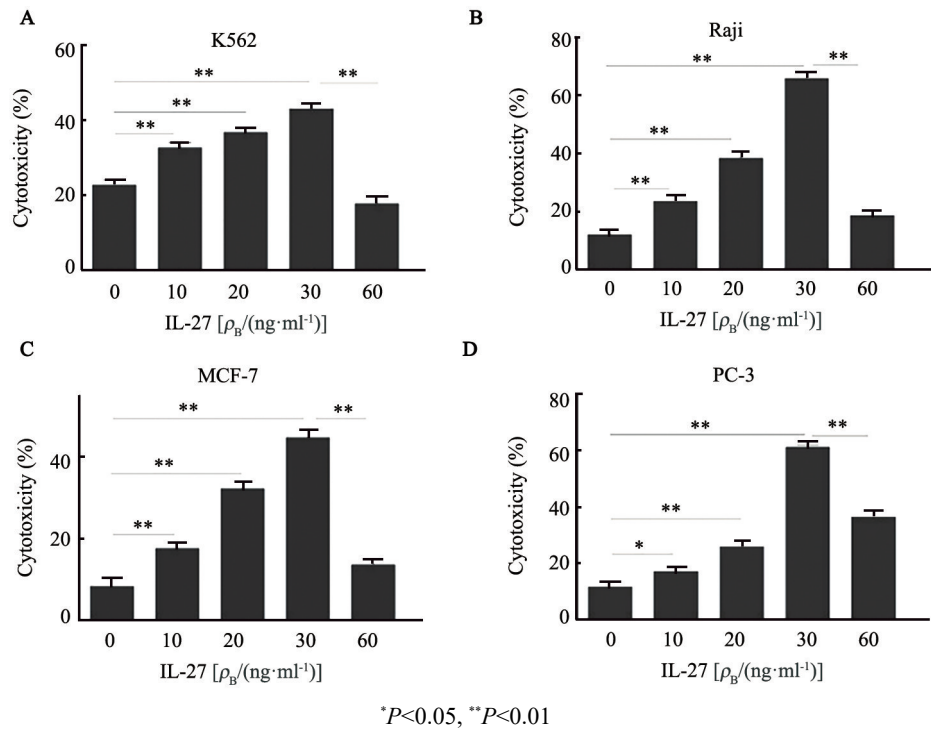
用30 ng/ml的IL-27处理IL-15-NK92细胞,分别在0、10、20、30、60及120 min后用WB检测IL-15-NK92细胞中STAT1、STAT3及STAT5蛋白及其磷酸化水平。结果表明,IL-27在0、10、20、30及60 min刺激后均使STAT1、STAT3及STAT5蛋白的磷酸化水平上调,且在20 min这个时间点STAT1、STAT3及STAT5磷酸化水平最高($P<0.01$,图5A-D)。同时发现IL-15-NK92细胞里的STAT1、STAT3以及STAT5蛋白水平下调($P<0.01$,图5A)。用不同质量浓度的IL-27(0、10、20、30及60 ng/ml)处理IL-15-NK92细胞,20 min后用WB检测IL-15-NK92细胞中STAT1、STAT3及STAT5磷酸化水平,结果发现,STAT1、STAT3和STAT5的磷酸化水平随着IL-27质量浓度的增加而增强($P<0.01$,图5E-H),但当IL-27质量浓度增加到60 ng/ml时,其对应蛋白的磷酸化水平会下降($P<0.01$,图5E-H)。



A-D: IL-15-NK92 cells were co-cultured with IL-27 for 24 h, and then the expression of NKG2D, NKp30 and NKp46 in IL-15-NK92 cells was analyzed by FCM; E-G: The secretion of perforin and granzyme B in IL-15-NK92 cells was analyzed by FCM

图3 IL-27促进IL-15-NK92细胞中NKG2D、NKp30、NKp46以及穿孔素的表达

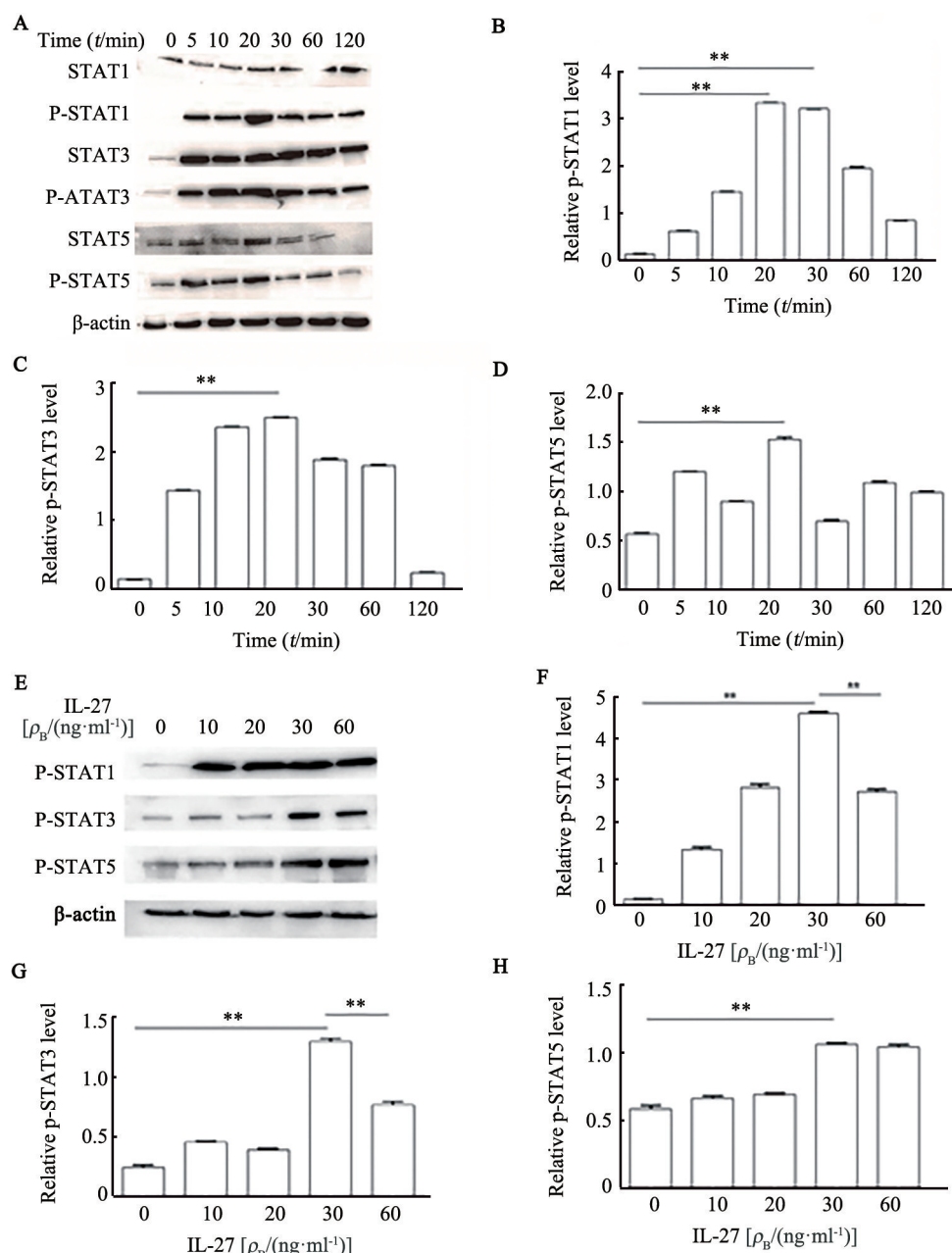
Fig.3 IL-27 promoted the expressions of NKG2D, NKp30, NKp46 and perforin in IL-15-NK92 cells



A: The cytotoxicity of IL-15-NK92 cells against K562 cells after treatment of IL-27; B: The cytotoxicity of IL-15-NK92 cells against Raji cells after treatment of IL-27; C: The cytotoxicity of IL-15-NK92 cells against MCF-7 cells after treatment of IL-27; D: The cytotoxicity of IL-15-NK92 cells against PC-3 cells after treatment of IL-27

图4 IL-27促进IL-15-NK92细胞对多种肿瘤细胞系的杀伤

Fig.4 IL-27 improved the cytotoxicity of IL-15-NK92 cells against multiple tumor cell lines

** $P < 0.01$

A-D: The phosphorylation levels of STAT1, STAT3 and STAT5 in IL-15-NK92 cells after IL-27 treatment time-dependent;

E-H: The phosphorylation levels of STAT1, STAT3 and STAT5 in IL-15-NK92 cells after IL-27 treatment dose-dependent

图5 IL-27调控IL-15-NK92细胞JAK-STAT通路中STAT1、STAT3和STAT 5磷酸化水平

Fig.5 IL-27 regulated STAT1, STAT3 and STAT 5 phosphorylation in JAK-STAT pathway in IL-15-NK92 cells

3 讨论

近年来,随着肿瘤发病率的增高,肿瘤免疫疗法因主张恢复和调动机体本身免疫功能而备受瞩目。NK92细胞几乎不表达所有的杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs),同时表达一系列激活性受体并且含有丰富的穿孔素和颗粒酶,因此NK92细胞有很强的广谱杀伤肿瘤细胞的作用,使其成为临床肿瘤免疫中的重要治疗手段^[11]。NK92细胞是唯一经美国FDA批准

进入临床试验 I / II 期的NK细胞系。

IL-15是NK细胞最有效的激活剂^[7]。研究^[12-14]表明,IL-15需要通过IL-15R α 进行转运,IL-15与可溶性IL-15R α 的结合产生一种称为IL-15超激动剂(IL-15 SA)的复合物,它比单独的IL-15具有更大的生物活性;IL-15SA具有选择性扩增NK细胞和记忆性CD8⁺T淋巴细胞的能力,对肿瘤和病毒具有极大的杀伤力。IL-15 SA通过增加CD69表达和IFN- γ 、穿孔素、颗粒酶B的产生而引起NK细胞活化^[15]。本研究表明,IL-15-NK92细胞对K562细胞的杀伤作用

随着效靶比的增高而增强,且IL-15-NK92细胞的杀伤作用比NK92细胞要强,进一步证明了内源性的IL-15会增强NK92细胞的细胞毒活性。据文献^[16]报道,IL-27是肿瘤免疫治疗的有效佐剂。IL-27可维持并加强IL-15诱导NK细胞杀伤多发性骨髓瘤^[17]。本研究发现,无论是对实体肿瘤细胞还是血液肿瘤细胞,IL-27(30 ng/ml)都可以通过促进IL-15-NK92细胞表面受体NKG2D、NKp30、NKp46的表达以及穿孔素的分泌来增强其对肿瘤细胞的杀伤作用。同时进一步证实IL-15和IL-27协同促进NK92细胞杀伤人Burkitts淋巴瘤Raji细胞、人慢性粒细胞白血病K562细胞、人乳腺癌MCF-7细胞和人前列腺癌PC-3细胞。本实验发现30 mg/ml IL-27可促进IL-15-NK92细胞的迁移,但IL-27抑制IL-15-NK92细胞的增殖。LARONI等^[18]发现,IL-27可使CD56^{bright}和CD56^{dim}NK细胞的IL-10和IFN- γ 表达增加,活性及杀伤能力增强,而增殖能力降低,这与本实验结果相吻合。

IL-27与NK细胞表面的细胞因子特异性受体(IL-27R和gp130)结合形成异二聚体受体,这些受体的信号会激活下游的JAK1/2/TYK2和依赖于该受体的STAT1/3/4家族成员来发挥调节作用^[10,19]。在肿瘤免疫中,IL-27在NK细胞内可通过JAK1-STAT1/3/5通路来促进NK细胞活化,增加IL-10的分泌,提高其生存能力以及抑制其增殖^[18]。研究^[20]发现,IL-27可以通过激活STAT1直接触发NK细胞IFN- γ 的分泌,促进NK细胞的活化。IL-27在小细胞肺癌细胞系上调STAT1/3磷酸化和表面HLA I类抗原、TAP1及TAP2的mRNA的表达,从而有助于NK细胞清除肿瘤细胞^[21]。本研究通过WB实验证实,IL-27同样可增强IL-15-NK92细胞内STAT1、STAT3及STAT5蛋白的磷酸化水平,用不同质量浓度的IL-27刺激IL-15-NK92细胞,STAT1、STAT3和STAT5的磷酸化水平随IL-27质量浓度的增加而增强,但当IL-27增加到60 ng/ml时,其磷酸化水平则转为下降;并且,此质量浓度的IL-27抑制了IL-15-NK92细胞的细胞毒活性。因此,本实验阐明了IL-27通过JAK-STAT信号通路中STAT1、STAT3和STAT5的活化而调控了IL-15-NK92的细胞毒性。

综上所述,IL-27通过促进IL-15-NK92细胞表面受体NKG2D、NKp30和NKp46表达以及穿孔素的分泌来增强IL-15-NK92细胞对实体肿瘤细胞和血液肿瘤细胞的杀伤,该杀伤作用与上调JAK-STAT通路中STAT1、STAT3和STAT5磷酸化水平相关。研究结果为在临床肿瘤免疫治疗中NK92细胞联用IL-27和IL-15提供了实验依据,为进一步优化NK92细胞肿

瘤免疫治疗方案提供了数据支持。

[参 考 文 献]

- [1] WU Y, LI J, JABBARZADEH K P, et al. Natural killer cells as a double-edged sword in cancer immunotherapy: A comprehensive review from cytokine therapy to adoptive cell immunotherapy[J/OL]. *Pharmacol Res*, 2020, 155: 104691[2020-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMID:32070721>. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104691.
- [2] 方芳, 肖卫华, 田志刚. NK细胞肿瘤免疫治疗技术的挑战[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(1): 1-8. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.01.001.
- [3] FRANKS S E, WOLFSON B, HODGE J W. Natural born killers: NK cells in cancer therapy[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(8): 2131[2020-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMCID:PMC7465121>. DOI: 10.3390/cancers12082131.
- [4] KLINGEMANN H, BOISSEL L, TONEGUZZO F. Natural killer cells for immunotherapy - advantages of the NK-92 cell line over blood NK cells[J/OL]. *Front Immunol*, 2016, 7: 91[2020-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMCID:PMC4789404>. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00091.
- [5] TONN T, SCHWABE D, KLINGEMANN H G, et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92 [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(12): 1563-1570. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.06.017.
- [6] VULETIC A, JOVANIC I, JURISIC V, et al. IL-2 And IL-15 Induced NKG2D, CD158a and CD158b expression on T, NKT- like and NK cell lymphocyte subsets from regional lymph nodes of melanoma patients[J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(1): 223-231. DOI: 10.1007/s12253-018-0444-2.
- [7] KONJEVIC G M, VULETIC A M, MIRJACIC M K, et al. The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment [J]. *Cytokine*, 2019, 117(2): 30-40. DOI: 10.1016/j.cyt.2019.02.001.
- [8] ZWIRNER N W, ZIBLAT A. Regulation of NK cell activation and effector functions by the IL-12 family of cytokines: The case of IL-27[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 25[2020-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMCID:PMC5243847>. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00025.
- [9] JIANG W, ZHANG C, TIAN Z, et al. hIL-15-gene modified human natural killer cells (NKL-IL15) exhibit anti-human leukemia functions[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(7): 1279-1288. DOI: 10.1007/s00432-018-2654-0.
- [10] GOTTHARDT D, TRIFINOPOULOS J, SEXL V, et al. JAK/STAT cytokine signaling at the crossroad of NK cell development and maturation[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2590[2020.11.01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMCID:PMC6861185>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02590.
- [11] 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. DOI: 10.1089/15258160152509145.
- [12] STOKLASEK T A, SCHLUNS K S, LEFRANCOIS L. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo[J]. *J Immunol*, 2006, 177(9): 6072-6080. DOI: 10.4049/

- jimmunol.177.9.6072.
- [13] ROMEE R, COOLEY S, BERRIEN-ELLIOTT M M, et al. First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation[J]. *Blood*, 2018, 131(23): 2515-2527. DOI: 10.1182/blood-2017-12-823757.
- [14] MARGOLIN K, MORISHIMA C, VELCHETI V, et al. Phase I trial of ALT-803, a novel recombinant IL15 complex, in patients with advanced solid tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(22): 5552-5561. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0945.
- [15] PULLIAM S R, UZHACHENKO R V, ADUNYAH S E, et al. Common gamma chain cytokines in combinatorial immune strategies against cancer[J]. *Immunol Lett*, 2016, 169(1): 61-72. DOI: 10.1016/j.imlet.2015.11.007.
- [16] ZHU J, LIU J Q, SHI M, et al. IL-27 gene therapy induces depletion of Tregs and enhances the efficacy of cancer immunotherapy[J/OL]. *JCI Insight*, 2018, 3(7): e98745[2020-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928864>. DOI: 10.1172/jci.insight.98745.
- [17] DONDERO A, CASU B, BELLORA F, et al. NK cells and multiple myeloma-associated endothelial cells: molecular interactions and influence of IL-27[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(21): 35088-35102. DOI: 10.18632/oncotarget.17070.
- [18] LARONI A, GANDHI R, BEYNON V, et al. IL-27 imparts immunoregulatory function to human NK cell subsets[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26173[2020-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3198386>. DOI: 10.1371/journal.pone.0026173.
- [19] ZHAO S, LIANG T, ZHANG C, et al. IL-27 Ralpha(+) cells promoted allojection via enhancing STAT1/3/5 phosphorylation [J]. *J Cell Mol Med*, 2020; 24(18): 10756-10767. DOI: 10.1111/jcmm.15700.
- [20] ZIBLAT A, DOMAICA C I, SPALLANZANI R G, et al. IL-27 stimulates human NK-cell effector functions and primes NK cells for IL-18 responsiveness[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(1): 192-202. DOI: 10.1002/eji.201444699.
- [21] CARBOTTI G, NIKPOOR A R, VACCA P, et al. IL-27 mediates HLA class I up-regulation, which can be inhibited by the IL-6 pathway, in HLA-deficient small cell lung cancer cells[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 140[2020-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5637329>. DOI: 10.1186/s13046-017-0608-z.
- [收稿日期] 2020-12-11 [修回日期] 2021-02-25
[本文编辑] 沈志超