

## 自然杀伤细胞抑制肝癌肺转移

申九妹, 熊共鹏, 郑启忠, 张宏斌, 洪再发

### ■背景资料

多种肿瘤患者抗肿瘤免疫力低下是肿瘤发生、发展和转移的主要因素, 包括肝癌。肝脏肿瘤微环境中自然杀伤(natural killer, NK)细胞的免疫功能受到抑制。目前, 已有多项研究表明NK细胞能抑制肿瘤生长。因此, 激活NK细胞并使其发挥免疫功能是治疗肝癌的一种有效方法。然而, 在NK细胞抑制肝细胞癌转移的研究尚少。

申九妹, 郑启忠, 厦门市中医院病理科 福建省厦门市 361009

熊共鹏, 张宏斌, 洪再发, 厦门市中医院肝病中心肝外科 福建省厦门市 361009

申九妹, 住院医师, 主要从事肿瘤病理学方向的研究。

基金项目: 福建省科技计划项目青年创新基金资助项目, No. 2016D23; 福建中医药大学校级课题资助项目, No. XB2015039。

作者贡献分布: 申九妹与洪再发对此文所作贡献均等; 此课题由申九妹、熊共鹏及洪再发设计; 研究所用试剂与材料由洪再发提供; 研究过程由张宏斌操作完成; 数据分析由郑启忠完成; 本论文写作由申九妹与洪再发完成。

通讯作者: 洪再发, 主治医师, 361009, 福建省厦门市湖里区仙岳路1739号, 厦门市中医院肝病中心肝外科。  
654147187@qq.com  
电话: 0592-5579713

收稿日期: 2017-06-05  
修回日期: 2017-06-17  
接受日期: 2017-07-05  
在线出版日期: 2017-08-08

### Natural killer cells inhibit pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma

Jiu-Mei Shen, Gong-Peng Xiong, Qi-Zhong Zheng, Hong-Bin Zhang, Zai-Fa Hong

Jiu-Mei Shen, Qi-Zhong Zheng, Department of Pathology, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiamen 361009, Fujian Province, China

Gong-Peng Xiong, Hong-Bin Zhang, Zai-Fa Hong, Department of Hepatobiliary Surgery, Liver Disease Center, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiamen 361009, Fujian Province, China

Supported by: Fujian Province Science and Technology Program for Youth Innovation Fund, No. 2016D23; Fujian University of Traditional Chinese Medicine Tube Fund, No. XB2015039.

Correspondence to: Zai-Fa Hong, Attending Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Liver Disease Center, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, 1739 Xianyue Road, Xiamen 361009, Fujian Province, China. 654147187@qq.com

Received: 2017-06-05

Revised: 2017-06-17

Accepted: 2017-07-05

Published online: 2017-08-08

### Abstract

#### AIM

To investigate the inhibitory role of natural killer (NK) cells in liver cancer metastasis.

#### METHODS

NK cells were isolated from human peripheral blood mononuclear cells, cultivated and identified. *In vitro*, NK cells were used to suppress liver cancer cell proliferation, migration and metastasis. *In vivo*, the homing of NK cells in the liver of nude mice was detected. A nude mouse orthotopic liver transplantation model was used to assess the role of NK cells in inhibiting the growth and metastasis of liver cancer *in vivo*. The expression of NKG2D, NKB1, perforin and granular enzyme was detected to assess the stimulatory effect of interleukin (IL)-2 on NK cell immune function.

#### RESULTS

*In vitro*, NK cells inhibited the proliferation, migration and invasion of liver cancer cells. *In vivo*, NK cells could survive in the liver of nude mice for a long time. NK cells significantly inhibit the pulmonary metastasis of liver cancer in nude mice. However, the liver tumor growth was not

### ■同行评议者

任宁, 博士, 主任医师, 复旦大学附属中山医院外科

inhibited by NK cells. IL-2 can strengthen the suppressor function of NK cells in tumors.

## CONCLUSION

The immunological function of NK cells can be strengthened by IL-2 to inhibit liver cancer metastasis.

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Natural killer cells; Invasion; Hepatocellular carcinoma; Pulmonary metastasis; Interleukin-2

Shen JM, Xiong GP, Zheng QZ, Zhang HB, Hong ZF. Natural killer cells inhibit pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2017; 25(22): 2028-2038 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i22/2028.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v25.i22.2028>

## 摘要

### 目的

研究自然杀伤(natural killer, NK)细胞对肝癌的抑制作用, 为临床应用提供实验依据。

### 方法

从人外周血分离培养及鉴定NK细胞。在体外, 研究NK细胞抑制肝癌细胞的增殖、迁徙、转移。在体内, 检测NK细胞在裸鼠肝脏存活情况。利用人肝癌组织裸鼠肝脏原位移植模型来评估NK细胞在体内对肝癌生长、转移的抑制功能。通过检测NK细胞活化受体、NK1、穿孔素和颗粒酶的表达情况来评估白介素(interleukin, IL)-2对NK细胞免疫功能的刺激作用。

### 结果

采用密度梯度法可以获取大量的外周血单个核细胞, 且能够从中分离到高活力的NK细胞。NK细胞经IL-2激活后活力增高, 成簇悬浮繁殖、扩增、生长。在体外, NK细胞可抑制肝癌细胞的增殖、迁徙和侵袭。在体内, NK细胞在裸鼠肝脏可长期存活; NK细胞可明显抑制裸鼠肝癌肺转移。然而, NK细胞对肝脏肿瘤生长抑制不明显。IL-2可诱导NK细胞免疫相关分子的表达并提高其肿瘤抑制功能。

### 结论

NK细胞的免疫学功能可被IL-2活化从而抑制肝癌的转移。

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 自然杀伤细胞; 侵袭; 肝细胞肝癌; 肺转移; 白介素-2

**核心提要:** 本研究发现自然杀伤(natural killer, NK)细胞在体外对MHCC97-H细胞的增殖、迁徙和侵袭有明显的抑制作用。NK细胞在裸鼠肝脏可长期存活并能在体内抑制肝细胞癌肺转移。数据表明, 白介素-2通过诱导免疫相关分子的表达而增强NK细胞介导的抑制肿瘤转移的功能。

申九妹, 熊共鹏, 郑启忠, 张宏斌, 洪再发. 自然杀伤细胞抑制肝癌肺转移. *世界华人消化杂志* 2017; 25(22): 2028-2038 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i22/2028.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v25.i22.2028>

## 0 引言

肝癌是世界范围内尤其是在东南亚最常见的人类癌症之一<sup>[1]</sup>。尽管外科技术和医疗一直在进展, 肝癌患者5年生存率仍然很低, 每年约600000患者死亡<sup>[2]</sup>。肝癌早期缺乏典型症状, 晚期症状包括衰弱、体质量减轻、厌食、腹胀、恶心、呕吐、发热和腹泻。目前, 有许多方法有助于肝癌的诊断, 包括血液甲胎蛋白、彩色多普勒超声、X射线、计算机断层扫描和磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)<sup>[3,4]</sup>。然而, 转移是肝癌预后不良的主要原因之一, 并是当前治疗肝癌经常面对的困难。多种肿瘤患者抗肿瘤免疫力低下是肿瘤发生、发展和转移的主要因素, 包括肝癌<sup>[5-7]</sup>。自然杀伤(natural killer, NK)细胞在抑制肿瘤发生方面发挥着重要的作用<sup>[5]</sup>。既往研究<sup>[5,8]</sup>表明NK细胞可抑制肿瘤生长, 白介素(interleukin, IL)-2是NK细胞增殖和活化重要的细胞因子。因此, NK细胞可作为抑制肝癌转移的一种有效的治疗方法。然而, NK细胞抑制肝癌肺转移的作用及机制尚不明确。在本研究中, 我们评估NK细胞经IL-2活化后在体外和体内是否可抑制肝细胞癌的转移。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 细胞: 高肺转移特性人肝癌细胞株MHCC97-H, 复旦大学附属中山医院, 上海肝癌研究所赠送。动物: 裸鼠由厦门大学动物中心提供, 并在SPF环境饲养。试剂和药品: 人类NK细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany); RPMI 1640培

## ■ 研究前沿

关于NK细胞抗肿瘤转移和侵袭的潜在机制还不清楚。有研究表明NK细胞能够清除循环中的微转移细胞和攻击器官内的转移细胞。因此, 关于进一步提高NK细胞的抗肿瘤作用方法得到相当的关注。研究显示, NK细胞抗肿瘤活性可能与调节自身信号转导通路或基因表达相关。然而, 我们需要更进一步的研究来明确NK细胞抑制肝癌肺转移的机制。

## ■ 相关报道

目前, 已有多项研究表明NK细胞能抑制肿瘤生长. Maat等表明, NK细胞参与预防葡萄膜黑色素瘤的转移过程. Barkholt等报道, NK细胞联合IL-2可以安全地用于肝癌患者的治疗.

培养基(HyClone; GE Healthcare Life Sciences, Logan, Utah, United States); 胎牛血清(Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, United States); 重组人IL-2(PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ, United States); PE-鼠抗人CD56(clone B159; BD Biosciences, San Diego, CA, United States); APC-鼠抗人CD3(clone UCHT1; BD Pharmingen, San Diego, CA, United States); FITC-抗人NK细胞活化受体(NK activating receptor, NKG2D)(clone 1D11; eBioscience, Inc., San Diego, CA, United States); FITC-抗人NKB1(clone DX9; BD Pharmingen); FITC-穿孔素试剂盒[含FITC-鼠抗人穿孔素(clone  $\delta$ G9)和FITC-鼠免疫球蛋白G2b $\kappa$ (clone 27-35); BD Pharmingen]; FITC-鼠抗人颗粒酶(clone GB11; BD Pharmingen); 抗体亚型对照: PE-鼠IgG1 $\kappa$ (clone MOPC-21), APC-鼠IgG1 $\kappa$ (clone MOPC-21), FITC-鼠IgG1 $\kappa$ (clone MOPC-21)和PerCP-CyTM5.5鼠IgG1 $\kappa$ (clone MOPC-21)(所有都是BD Pharmingen); 5溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland); PerCP-CyTM5.5-鼠抗-BrdU(clone 3D4; BD Pharmingen); Transwell小室(Invasion和Migration)(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, United States); 羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate-succinimidyl ester, CFDA-SE)、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(EnoGene Biotech, Co., Ltd., 南京, 中国); IX73-U荧光显微镜(Olympus Corporation, 东京, 日本).

## 1.2 方法

1.2.1 细胞的分离和培养: 本实验涉及人体的实验均遵守《赫尔斯基宣言》伦理准则且接受厦门中医院伦理委员会的监督和管理. 健康志愿者血液采用梯度离心法来分离外周血单个核细胞. 根据NK细胞分离试剂盒说明分离NK细胞. 然后用含10%胎牛血清、2 pg/mL浓度IL-2的RPMI 1640培养基中培养和活化<sup>[9]</sup>. MHCC97-H在含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养.

1.2.2 NK细胞表面受体及效应分子的检测: 根据实验要求收集相应的NK细胞并与相应的抗体孵育后上流式细胞仪来检测NK细胞表面受体CD56、CD3、NKG2D、NKG2D、NKB1及活化NK细胞的效应分子穿孔素和颗粒酶. 根

据抗体的要求配予相应的对照亚型. 所有抗体的稀释浓度均为1:100.

1.2.3 增殖试验: NK细胞用IL-2(2 pg/mL)在37 °C刺激48 h, 然后与MHCC97-H细胞共培养. 培养的细胞为 $2 \times 10^6$ 细胞/板(MHCC97-H细胞浓度为 $1 \times 10^6$ 细胞/毫升), 使用RPMI 1640培养基中含有10%胎牛血清. 共培养时间为48 h, 收集MHCC97-H细胞. 按照相应说明采用BrdU进行活细胞染色、固定及与抗BrdU抗体孵育, 上流式细胞仪进行检测.

1.2.4 细胞划痕实验: NK细胞对MHCC97-H迁移能力的影响采用细胞划痕实验来评价. MHCC97-H细胞在6孔板( $10^6$ 细胞/孔)用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基进行培养, 待细胞铺满底层的80%时去除培养基用无菌吸管尖端直线划痕. 随后在含有IL-2(2 pg/mL)的0.2%胎牛血清的培养基中与NK细胞( $10^6$ 细胞/孔)共孵育72 h. 对照组未添加NK细胞. 光学显微镜下观察MHCC97-H迁移情况.

1.2.5 Transwell细胞迁移及细胞侵袭实验: NK细胞对MHCC97-H迁移能力和侵袭能力的影响采用Transwell小室(Migration)和Transwell小室(Invasion)来评价. 在NK组, 200  $\mu$ L 0.2%小牛血清培养基, 含 $5 \times 10^4$  MHCC97-H细胞和 $5 \times 10^4$ 已经活化的NK细胞, 加入到Transwell小室的上室. 600  $\mu$ L 10%FBS的培养基中加入下室. 在对照组中, 用培养基代替NK细胞. 在培养箱孵育48 h. 用棉签去除停留在上室的非侵入细胞. 侵袭到下室的细胞用结晶紫染色. 用显微镜计数( $\times 200$ 倍)沿纵向或横向轴不重叠的5个视野的细胞总数, 取平均值.

1.2.6 NK细胞在裸鼠肝脏生存的检测: 所有涉及动物的实验均在厦门大学动物中心进行并获得厦门大学动物保护和利用委员会的批准.  $2 \times 10^6$  NK细胞首先用CFDA-SE染色并通过门静脉注射到裸鼠肝脏体内. 2 wk后取裸鼠肝脏并制作冰冻切片、固定、DAPI染色, 荧光显微镜下观察NK细胞在肝脏的分布及存活情况.

1.2.7 裸鼠肝脏肿瘤生长及转移的检测: 4周龄Balb/c裸鼠后腿皮下注射移植 $2 \times 10^6$  MHCC97-H细胞建立皮下瘤模型. 14 d后取下皮下瘤并切割成1 mm<sup>3</sup>大小的肿瘤组织块, 并接种于裸鼠的肝脏左叶, 建立裸鼠肝脏肝癌细胞原位移植瘤模型. 随后在关闭腹腔前, 实验组门静脉注射经活化的 $2 \times 10^6$  NK细胞. 对照

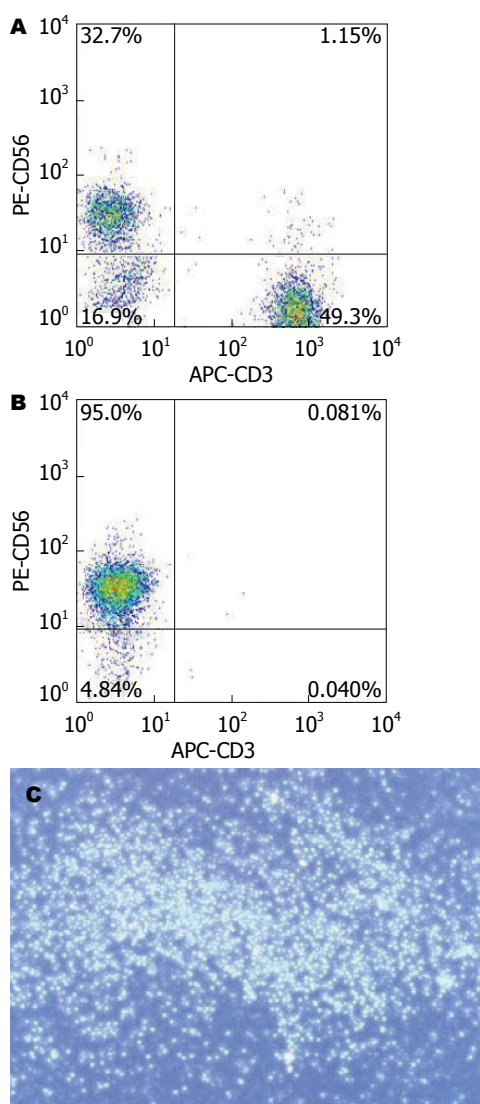


图1 NK细胞的分离和培养. A:  $CD56^+ CD3^-$ 标记的单个核细胞为NK细胞. NK细胞占外周血单个核细胞10%–30%. 个别样本的NK细胞比例>30%; B: 经过分离的NK细胞的纯度>95%; C: NK细胞在培养基里呈悬浮成簇生长( $\times 100$ ). NK: 自然杀伤细胞.

组采用生理盐水代替NK细胞. 两组均在裸鼠肝脏人肝癌组织原位移植瘤模型建立后的第5天和第30天在裸鼠腹腔注射IL-2(1 pg/mg体重). 根据MHCC97-H细胞特性, 在原位移植后8 wk裸鼠均能出现肺转移. 通过MRI检测肝脏肿瘤, 根据MRI数据估算肿瘤体积. 监测肿瘤的生长并在手术后第56天对裸鼠实行安乐死. 取出肝、肺等组织称质量, 取材, 制作石蜡切片(5  $\mu$ m), HE染色, 显微镜下观察计数肿瘤细胞. 根据Yang等<sup>[10]</sup>所描述的方法肺转移结节分为4级. I级:  $\leq 20$ 个癌细胞/癌结节; II级: 20-50个癌细胞/癌结节; III级: 50-100个癌细胞/癌结节; IV级:  $>100$ 个癌细胞/癌结节.

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件处理, 定量资料采用mean $\pm$ SD表示, 2组计量资料比较采用 $t$ 检验, 2组或者多组计数资料比较采用秩和检验. 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 NK细胞的分离和纯度** 文献[5]表明, 外周血NK细胞表达高水平的CD56而不表达CD3. 因此, 从外周血单个核细胞分离得到的 $CD56^+ CD3^-$ 细胞认为是NK细胞. 实验结果提示外周血NK细胞占单个核细胞的比例为10%–30%(图1A), 且经分离后的NK细胞纯度>95%(图1B). 分离得到的NK细胞具有高度活性, 在培养基中以悬浮群集方式生长繁殖(图1C).

**2.2 体外NK细胞抑制MHCC97 H增殖、迁移和侵袭的作用** 为研究NK细胞在体外对肝癌细胞增殖的抑制作用, 我们比较MHCC97-H在有无NK细胞存在的生长情况. MHCC97-H经BrdU染色后上流式细胞仪检测细胞个数. 数据显示, NK细胞/MHCC97-H在合适的比例情况下NK细胞可抑制MHCC97-H细胞增殖. 当NK/MHCC97 H $>0.25/1$ , NK细胞就可以抑制MHCC97-H细胞增殖. 当NK/MHCC97 H达到4/1, NK细胞抑制作用达到高峰(图2A, B). 细胞划痕实验数据表明MHCC97-H在NK细胞存在的情况其移动能力明显下降(图2C). 同样, Transwell实验数据表明在NK细胞存在的情况下MHCC97-H的迁移和侵袭能力明显下降(图2D-F).

**2.3 体内NK细胞对MHCC97 H的抑制作用** 体内细胞存活实验表明, 经CFDA-SE染色的NK细胞定居并存活于裸鼠的肝脏组织(图3A). 为研究NK细胞在体内功能, 采用NK细胞干预人肝癌组织裸鼠肝脏原位移植模型. 实验结果显示NK细胞组和对照组裸鼠均存活6 wk以上. 两组裸鼠的食欲和活性均无显著差异. 裸鼠肝癌大小和质量无明显差异(数据未显示); 由于肺转移病灶太小无法采用MRI检测到(图3B, C). 实验组的肺转移灶大小及数量均显著低于对照组(图3D, E).

**2.4 IL-2对NK细胞的刺激作用** 既往研究<sup>[11]</sup>表明, IL-2为NK细胞生长、增殖和活化所必需. 在本研究中, 比较NK细胞在有无IL-2存在的情况下培养48 h<sup>[8]</sup>. 我们检测NKG2D、KIR3DL1(即NKB1, NK细胞的抑制性受体)、穿孔素和颗粒酶(NK细胞内的功能性分子)的

## ■ 创新点

(1)用裸鼠肝脏人肝癌组织原位移植裸鼠肺转移模型来研究肝癌的侵袭及转移, 这样更符合临床, 既往研究少, 有一定创新; (2)在完成裸鼠肝脏人肝癌组织原位移植后通过门静脉输注NK细胞, 与既往研究采用尾静脉输注外源细胞比较, 前者NK细胞能更直接在肝脏发挥生物学功能. 既往未见类似的报道; (3)既往关于NK细胞与肝癌的研究, 大都集中于相关性及NK细胞抑制肝癌生长等方面, 关于NK细胞抑制肝癌侵袭转移的研究尚少见, 具有一定的创新性.

## 应用要点

我们可通过评估肝癌中NK细胞的浸润情况作为预测肝癌的预后; 通过IL-2激活NK细胞, 使其发挥免疫功能是治疗肝癌的一种有效方法.

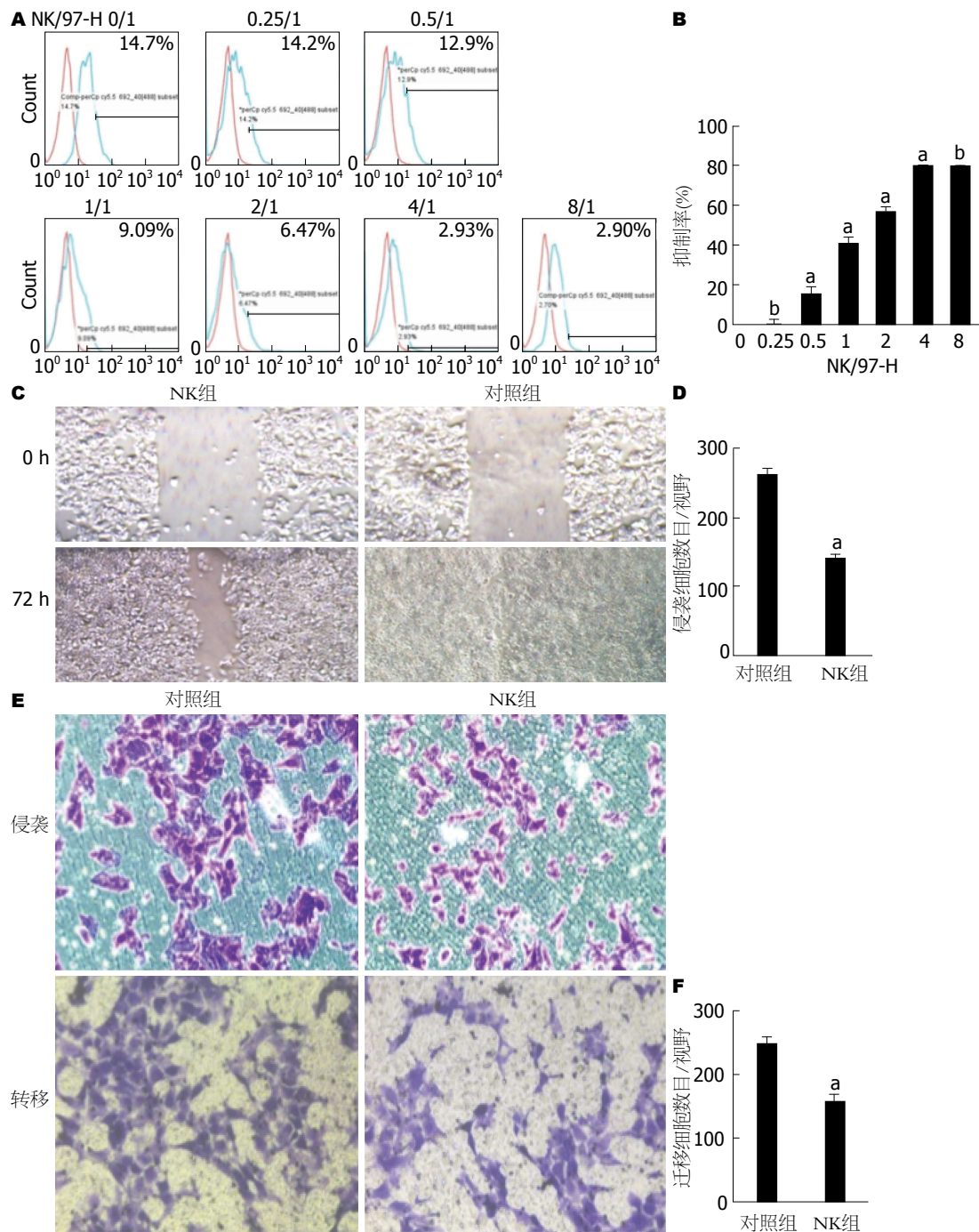
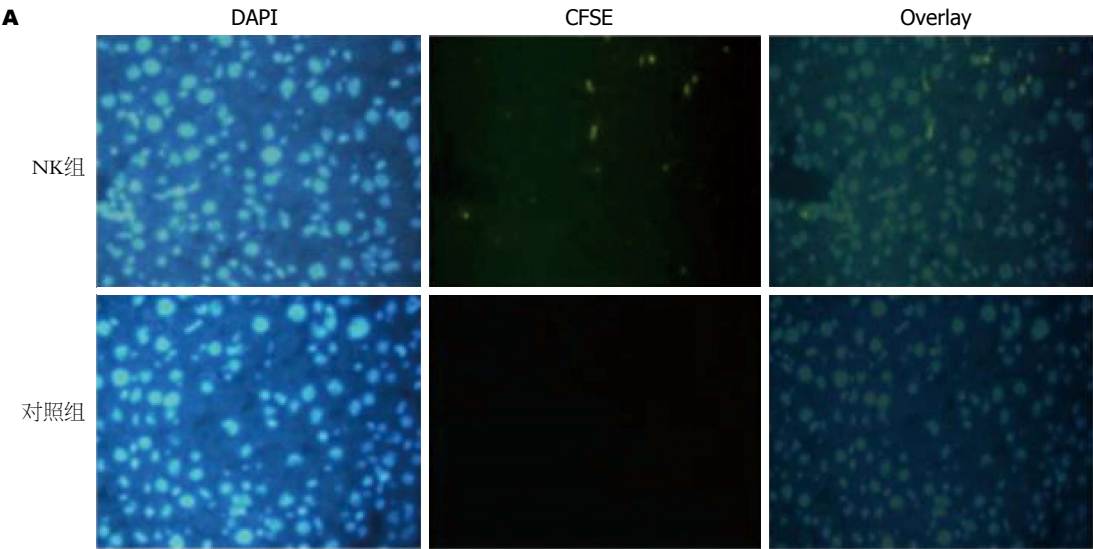


图 2 体外NK细胞抑制MHCC97-H增殖、迁移和侵袭作用的评估. A: MHCC97-H与不同的比率NK细胞共培养后用BrdU染色. 增殖的MHCC97-H与BrdU抗体孵育后上流式细胞仪进行检测. BrdU阳性细胞被确定为增殖细胞; B: NK细胞对MHCC97-H的抑制率, 计算公式 = [(对照组繁殖细胞比率-实验组繁殖细胞比率)/对照组繁殖细胞比率] × 100%; C: NK细胞组和对照组MHCC97-H细胞向无细胞区域迁移的情况(× 100); D: NK细胞组和对照组MHCC97-H侵袭细胞数; E: 组织化学显示NK细胞组和对照组侵袭和迁移MHCC97-H 细胞数(结晶紫染色 × 200); F: NK细胞组和对照组MHCC97-H 迁移细胞数. 资料采用mean ± SD表示( $n = 3$ ). <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组. NK: 自然杀伤细胞.

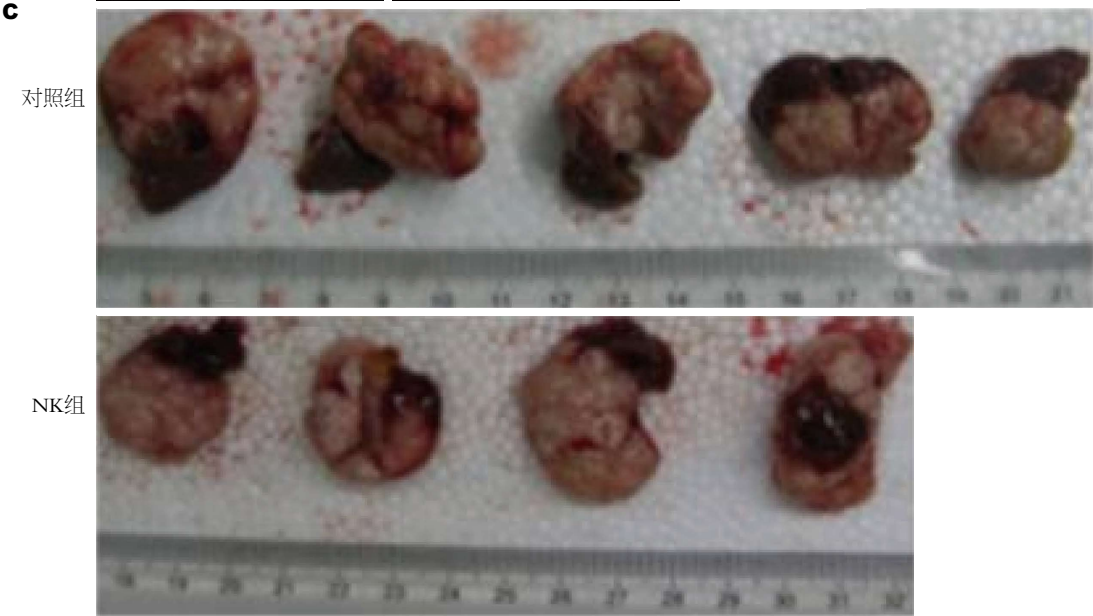
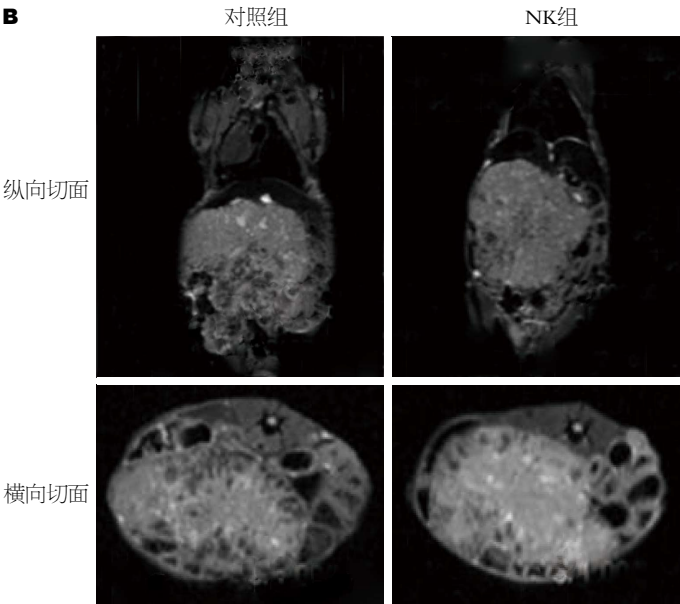
表达情况. 实验数据表明, NK细胞表达中等量NKG2D、穿孔素和颗粒酶且NKG2D、穿孔素和颗粒酶表达在经IL-2刺激后显著升高. NK细胞低表达KIR3DL1, 且KIR3DL1表达在经IL-2刺激后轻度升高(图4).

## 3 讨论

NK细胞是先天免疫系统的重要成员之一. NK细胞对肿瘤的浸润情况可作为预测肝癌的预后<sup>[12]</sup>. 研究<sup>[13]</sup>表明, 肝脏肿瘤微环境中NK细胞的免疫学功能受到抑制. 因此, 激活NK细



**同行评价**  
本文研究了NK细胞对肝细胞癌增殖、转移的影响, 从体外和动物模型两方面验证了NK细胞在肝癌发展过程中可能发挥的抗肿瘤作用。立题依据充分, 研究方法可行, 实验内容详实, 论文书写流畅, 层次分明。



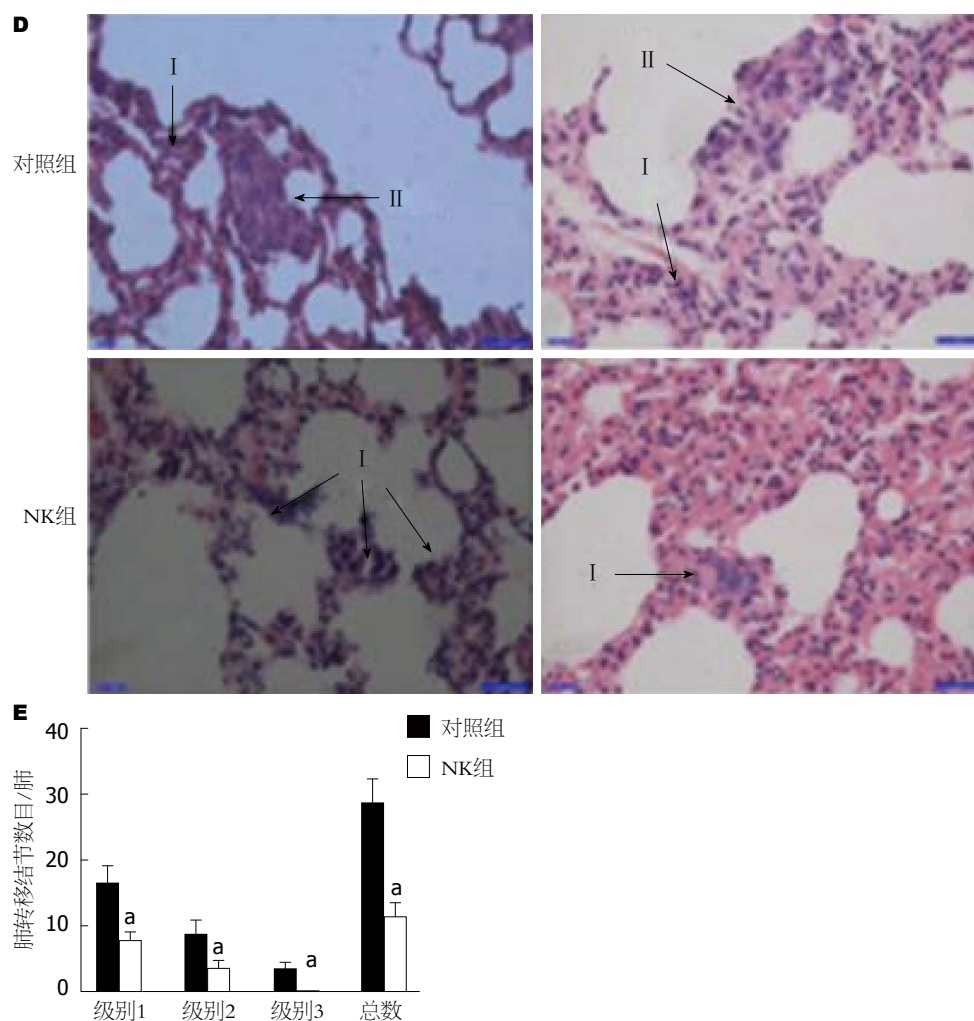


图 3 体内NK细胞抑制MHCC97-H增殖、转移作用的评估. A: 肝脏冰冻切片DAPI染色后荧光显微镜下用绿色(DAPI)和红色激发光(CFSE)激发后观察, Overlay是两者的重叠.  $\times 200$ 型; B: 第8周核磁共振检测裸鼠肝脏肿瘤大小; C: NK细胞组和对照组肿瘤体积大小; D: HE染色光学显微镜下裸鼠肺转移病灶( $\times 200$ ); E: NK细胞组和对照组裸鼠肺转移的数目及大小分级. 资料采用mean  $\pm$  SD表示( $n = 5$ ). <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组. NK: 自然杀伤细胞.

胞并使其发挥免疫功能是治疗肝癌的一种有效方法.

在本研究中, 我们对NK细胞的抗肿瘤活性进行了评估. 目前, 学者把外周血CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>的单个核细胞定义为NK细胞. 本研究发现, 外周血NK细胞占外周血单个核细胞总数的10%-30%. 经分离得到NK细胞纯度达到95%. 在IL-2存在的情况下, NK细胞增殖快速并保留良好的细胞活力. NK细胞能在裸鼠肝脏定居并长期生存. 这一发现与前人的研究<sup>[8,10]</sup>结果相一致. 肝癌患者NK细胞功能障碍与多个因素相关<sup>[14,15]</sup>, 其中包括肿瘤微环境免疫, 各种免疫细胞因子表达的失衡<sup>[16,17]</sup>. 比如: IL-2对于肿瘤微环境中NK细胞的活化有重要作用<sup>[18]</sup>. 如前所述, IL-2是NK细胞生长、活化、增殖所必需. 此外, 受抑制后的NK细胞经IL-2刺激后可重新

恢复其免疫杀伤功能<sup>[19]</sup>. 这些细胞因子影响NK细胞的免疫功能.

目前, 已有多项研究表明NK细胞能抑制肿瘤生长. Maat等<sup>[20]</sup>表明, NK细胞参与预防葡萄膜黑色素瘤的转移过程. 然而, 在NK细胞抑制肝细胞癌转移的研究尚少. Barkholt等<sup>[8]</sup>报道, NK细胞联合IL-2可以安全地用于肝癌患者的治疗. 我们的研究数据表明, 在体外IL-2可激活NK细胞, 抑制MHCC97-H细胞增殖、迁移和侵袭. 此外, 在体内实验数据表明, NK细胞抑制肝细胞癌肺转移. 然而, 实验组和对照组肝脏肿瘤大小差异不显著. 这也许跟动物模型后期肝脏表达大量的肿瘤坏死因子和裸鼠营养不良等有关.

NK细胞抑制肿瘤转移和侵袭的潜在机制尚不明确. 如前所述, NK细胞分泌的细胞因子

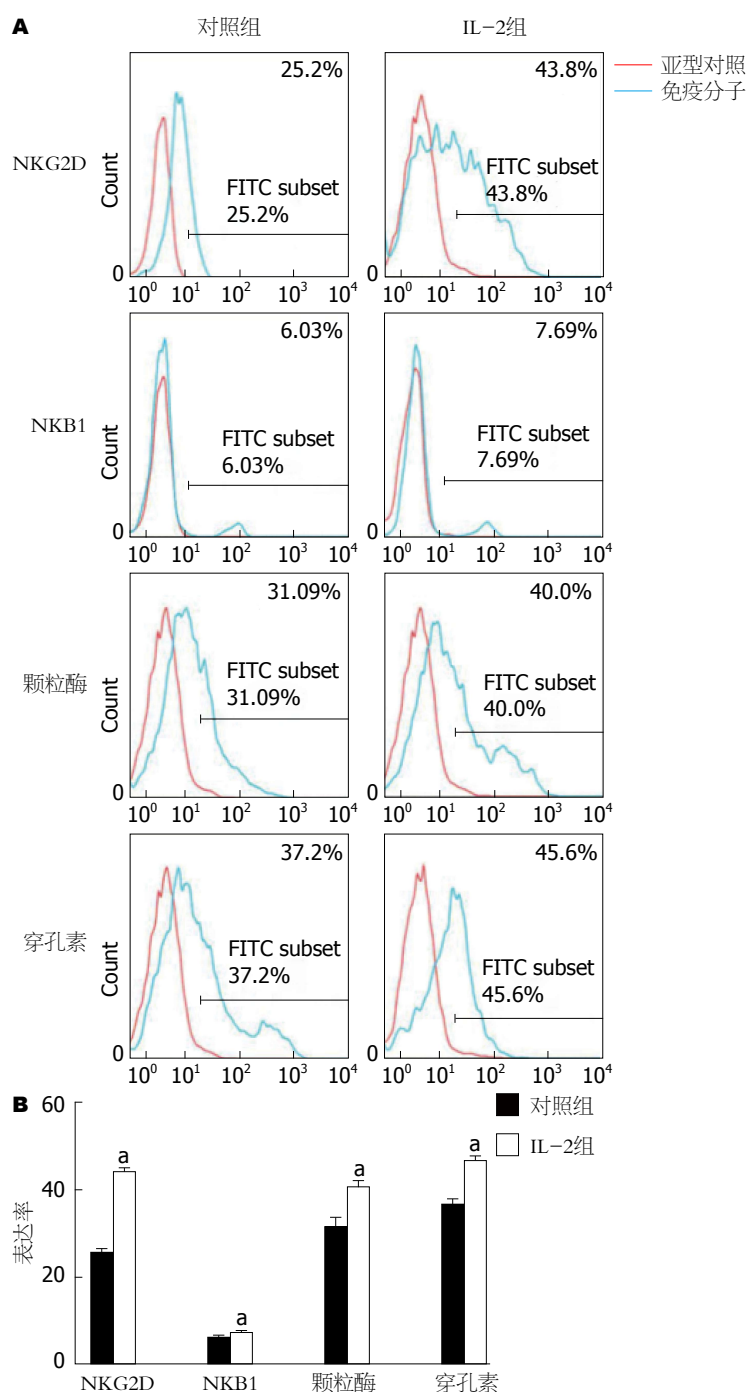


图 4 IL-2对NK细胞的激活作用. A: NK细胞在有IL-2(IL-2组, 2 pg/mL)和无IL-2(对照组)条件下培养, NK细胞表面免疫分子表达采用流式细胞仪检测; B: IL-2组和对照组NK细胞表面免疫分子的表达情况. 资料采用mean  $\pm$  SD表示( $n = 6$ ). \* $P < 0.05$  vs 对照组. IL-2: 白介素-2; NK: 自然杀伤细胞.

在激活抗肿瘤免疫中发挥重要的作用. 例如, 干扰素- $\gamma$ 主要来自NK, 他在IL-2抗肿瘤的过程中扮演重要角色<sup>[21]</sup>. 此外, NK细胞介导的抗肿瘤反应也可能是通过与肿瘤细胞或其他免疫细胞的直接接触. NK细胞与肿瘤细胞之间的接触可能通过细胞表面分子的相互作用促使肿瘤细胞发生免疫编辑促使肿瘤细胞更易于被识别与杀伤<sup>[22,23]</sup>. 既往研究<sup>[24,25]</sup>表明, NK细胞受体

和其相应的配体在肝脏疾病发生发展中发挥重要的作用. NKG2D是一种重要的NK细胞表面激活受体. NKG2D的表达, 与肝癌预后直接相关<sup>[26]</sup>. UL16结合蛋白是一种NKG2D配体并且在肿瘤细胞表面表达. UL16结合蛋白表达缺失已被确定为肝癌复发的独立因素<sup>[27]</sup>. NK细胞的细胞毒作用是通过NKG2D与肿瘤细胞的主要组织相容性复合体(major histocompatibility

complex, MHC) I 类相关链的A/B的相互作用<sup>[28]</sup>. 在本研究中, NK细胞经IL-2刺激后其NKG2D表达显著增加. NK细胞抑制性受体NKB1表达轻度增加. 而作为NK细胞活化的主要标记物颗粒酶、穿孔素表达显著增加. 总体而言, NK细胞经活化后对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭有抑制作用. 杀伤细胞免疫球蛋白受体(killer cell Ig-like receptor, KIR)是与肝癌发生相关的NK细胞受体. 通过识别与结合特定的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) I 类抗原, KIR参与调节NK细胞的活化. 因此, 肿瘤细胞表达的HLA类型可以调节NK细胞的抗肿瘤功能<sup>[29]</sup>. NKB1(KIR3DL1)是KIR家族的成员. NKB1与靶细胞特定的HLA-B抗原相互作用后抑制NK细胞介导的细胞毒作用. NKB1可能作为一个负面信号, 抑制NK细胞的活化. 因此, MHC I 类抗原和KIR的相互作用可调节NK免疫功能<sup>[30]</sup>.

关于NK细胞抗肿瘤迁移和侵袭的潜在机制还不清楚. 有研究表明NK细胞能够清除循环中的微转移细胞和攻击器官内的转移细胞. 因此, 关于进一步提高NK细胞的抗肿瘤作用方法得到相当的关注. 关于NK细胞发育过程中细胞通路和基因表达的功能既往已经有所研究. Notch信号通路的活化使得NK细胞分泌抑制性细胞因子, 从而使得NK细胞反应低下、受体表达下降、功能不良<sup>[31]</sup>. 此外, 已确定microRNA-30c-1通过调节管家基因转录因子homeobox-1的表达来增强NK细胞杀伤肝癌细胞的功能<sup>[32]</sup>. 这些研究表明, NK细胞抗肿瘤活性可能与调节自身信号转导通路或基因表达相关.

总之, 本研究发现NK细胞在体外对MHCC97-H细胞的增殖、迁移和侵袭有明显的抑制作用. NK细胞在裸鼠肝脏可长期存活并能在体内抑制肝细胞癌肺转移. 研究数据表明, IL-2通过诱导免疫相关分子的表达而增强NK细胞介导的抑制肿瘤转移的功能. 然而, 需要更进一步的研究来确定使NK细胞抑制肝癌肺转移的机制.

#### 4 参考文献

- 1 But DY, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1652-1656 [PMID: 18350595 DOI: 10.3748/wjg.14.1652]

- 2 Hao K, Luk JM, Lee NP, Mao M, Zhang C, Ferguson MD, Lamb J, Dai H, Ng IO, Sham PC, Poon RT. Predicting prognosis in hepatocellular carcinoma after curative surgery with common clinicopathologic parameters. *BMC Cancer* 2009; 9: 389 [PMID: 19886989 DOI: 10.1186/1471-2407-9-389]
- 3 Sangiovanni A, Colombo M. Treatment of hepatocellular carcinoma: beyond international guidelines. *Liver Int* 2016; 36 Suppl 1: 124-129 [PMID: 26725909 DOI: 10.1111/liv.13028]
- 4 Invernizzi F, Viganò M, Grossi G, Lampertico P. The prognosis and management of inactive HBV carriers. *Liver Int* 2016; 36 Suppl 1: 100-104 [PMID: 26725905 DOI: 10.1111/liv.13006]
- 5 Seki S, Nakashima H, Nakashima M, Kinoshita M. Antitumor immunity produced by the liver Kupffer cells, NK cells, NKT cells, and CD8 CD122 T cells. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 868345 [PMID: 22190974 DOI: 10.1155/2011/868345]
- 6 Geissler M, Mohr L, Blum HE. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: 1464-1466 [PMID: 11753738 DOI: 10.1055/s-2001-19215]
- 7 Gersuk GM, Westermark B, Mohabeer AJ, Challita PM, Pattamakom S, Pattengale PK. Inhibition of human natural killer cell activity by platelet-derived growth factor (PDGF). III. Membrane binding studies and differential biological effect of recombinant PDGF isoforms. *Scand J Immunol* 1991; 33: 521-532 [PMID: 1851574 DOI: 10.1111/j.1365-3083.1991.tb02522.x]
- 8 Barkholt L, Alici E, Conrad R, Sutlu T, Gilljam M, Stellan B, Christensson B, Guven H, Björkström NK, Söderdahl G, Cederlund K, Kimby E, Aschan J, Ringdén O, Ljunggren HG, Diller MS. Safety analysis of ex vivo-expanded NK and NK-like T cells administered to cancer patients: a phase I clinical study. *Immunotherapy* 2009; 1: 753-764 [PMID: 20636021 DOI: 10.2217/imt.09.47]
- 9 Doskali M, Tanaka Y, Ohira M, Ishiyama K, Tashiro H, Chayama K, Ohdan H. Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3-CD56+ and CD3+CD56+ cells for inducing antihepatocellular carcinoma and antihepatitis C virus activity. *J Immunother* 2011; 34: 129-138 [PMID: 21304407 DOI: 10.1097/CJI.0b013e3182048c4e]
- 10 Yang X, Liang L, Zhang XF, Jia HL, Qin Y, Zhu XC, Gao XM, Qiao P, Zheng Y, Sheng YY, Wei JW, Zhou HJ, Ren N, Ye QH, Dong QZ, Qin LX. MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway. *Hepatology* 2013; 58: 158-170 [PMID: 23389848 DOI: 10.1002/hep.26305]
- 11 Ciaglia E, Pisanti S, Picardi P, Laezza C, Sosa S, Tubaro A, Vitale M, Gazzero P, Malfitano AM, Bifulco M. N6-isopentenyladenosine affects cytotoxic activity and cytokines production by IL-2 activated NK cells and exerts topical anti-inflammatory activity in mice. *Pharmacol Res* 2014; 89: 1-10 [PMID: 25063359 DOI: 10.1016/j.phrs.2014.07.003]
- 12 Zhu LY, Zhou J, Liu YZ, Pan WD. Prognostic significance of natural killer cell infiltration

- in hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng* 2009; 28: 1198-1202 [PMID: 19895742 DOI: 10.5732/cjc.009.10284]
- 13 Matsuoka S, Maeda N, Izumiya C, Yamashita C, Nishimori Y, Fukaya T. Expression of inhibitory-motif killer immunoglobulin-like receptor, KIR2DL1, is increased in natural killer cells from women with pelvic endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2005; 53: 249-254 [PMID: 15833103 DOI: 10.1111/j.1600-0897.2005.00271.x]
  - 14 Li T, Yang Y, Hua X, Wang G, Liu W, Jia C, Tai Y, Zhang Q, Chen G. Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO. *Cancer Lett* 2012; 318: 154-161 [PMID: 22182446 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.020]
  - 15 Ju Y, Hou N, Meng J, Wang X, Zhang X, Zhao D, Liu Y, Zhu F, Zhang L, Sun W, Liang X, Gao L, Ma C. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2010; 52: 322-329 [PMID: 20133006 DOI: 10.1016/j.jhep.2009.12.005]
  - 16 Ohira M, Nishida S, Tryphonopoulos P, Tekin A, Selvaggi G, Moon J, Levi D, Ricordi C, Ishiyama K, Tanaka Y, Ohdan H, Tzakis AG. Clinical-scale isolation of interleukin-2-stimulated liver natural killer cells for treatment of liver transplantation with hepatocellular carcinoma. *Cell Transplant* 2012; 21: 1397-1406 [PMID: 22469170 DOI: 10.3727/096368911X627589]
  - 17 Tsunematsu H, Tatsumi T, Kohga K, Yamamoto M, Aketa H, Miyagi T, Hosui A, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 2012; 130: 356-364 [PMID: 21351090 DOI: 10.1002/ijc.26003]
  - 18 Mikuriya Y, Tashiro H, Kuroda S, Nambu J, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, Ohdan H. Fatty liver creates a pro-metastatic micro-environment for hepatocellular carcinoma through activation of hepatic stellate cells. *Int J Cancer* 2015; 136: E3-E13 [PMID: 25053237 DOI: 10.1002/ijc.29096]
  - 19 Faridi RM, Das V, Tripathi G, Talwar S, Parveen F, Agrawal S. Influence of activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors on predisposition to recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2009; 24: 1758-1764 [PMID: 19279038 DOI: 10.1093/humrep/dep047]
  - 20 Maat W, van der Slik AR, Verhoeven DH, Alizadeh BZ, Ly LV, Verduijn W, Luyten GP, Mulder A, van Hall T, Koning F, Jager MJ, van Bergen J. Evidence for natural killer cell-mediated protection from metastasis formation in uveal melanoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 2888-2895 [PMID: 19234348 DOI: 10.1167/iovs.08-2733]
  - 21 Uemura A, Takehara T, Miyagi T, Suzuki T, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Natural killer cell is a major producer of interferon gamma that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59: 453-463 [PMID: 19756594 DOI: 10.1007/s00262-009-0764-x]
  - 22 Wu Y, Kuang DM, Pan WD, Wan YL, Lao XM, Wang D, Li XF, Zheng L. Monocyte/macrophage-elicited natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma is mediated by CD48/2B4 interactions. *Hepatology* 2013; 57: 1107-1116 [PMID: 23225218 DOI: 10.1002/hep.26192]
  - 23 Yoon JC, Lim JB, Park JH, Lee JM. Cell-to-cell contact with hepatitis C virus-infected cells reduces functional capacity of natural killer cells. *J Virol* 2011; 85: 12557-12569 [PMID: 21937646 DOI: 10.1128/JVI.00838-11]
  - 24 Yamagiwa S, Kamimura H, Ichida T. Natural killer cell receptors and their ligands in liver diseases. *Med Mol Morphol* 2009; 42: 1-8 [PMID: 19294486 DOI: 10.1007/s00795-008-0434-7]
  - 25 Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, Gamrekelashvili J, Zhao F, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* 2009; 50: 799-807 [PMID: 19551844 DOI: 10.1002/hep.23054]
  - 26 Konjević G, Mirjacić Martinović K, Vuletić A, Jović V, Jurišić V, Babović N, Spuzić I. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24: 1-11 [PMID: 17295095 DOI: 10.1007/s10585-006-9043-9]
  - 27 Kamimura H, Yamagiwa S, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Ohkoshi S, Inoue M, Wakai T, Shirai Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. *J Hepatol* 2012; 56: 381-388 [PMID: 21756848 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.06.017]
  - 28 Morisaki T, Onishi H, Koya N, Kiyota A, Tanaka H, Umebayashi M, Ogino T, Nagamatsu I, Katano M. Combinatorial cytotoxicity of gemcitabine and cytokine-activated killer cells in hepatocellular carcinoma via the NKG2D-MICA/B system. *Anticancer Res* 2011; 31: 2505-2510 [PMID: 21873167]
  - 29 Pan N, Jiang W, Sun H, Miao F, Qiu J, Jin H, Xu J, Shi Q, Xie W, Zhang J. KIR and HLA loci are associated with hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis B virus infection: a case-control study. *PLoS One* 2011; 6: e25682 [PMID: 21998681 DOI: 10.1371/journal.pone.0025682]
  - 30 Townsley E, O'Connor G, Cosgrove C, Woda M, Co M, Thomas SJ, Kalayanarooj S, Yoon IK, Nisalak A, Srikiatkachorn A, Green S, Stephens HA, Gostick E, Price DA, Carrington M, Alter G, McVicar DW, Rothman AL, Mathew A. Interaction of a dengue virus NS1-derived peptide with the inhibitory receptor KIR3DL1 on natural killer cells. *Clin Exp Immunol* 2016; 183: 419-430 [PMID: 26439909 DOI: 10.1111/cei.12722]
  - 31 Bachanova V, McCullar V, Lenvik T, Wangen R, Peterson KA, Ankarlo DE, Panoskaltsis-Mortari A, Wagner JE, Miller JS. Activated notch supports development of cytokine producing NK cells which are hyporesponsive and fail to acquire NK cell effector functions. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15: 183-194 [PMID: 19167678]

- DOI: 10.1016/j.bbmt.2008.11.031]  
32 Gong J, Liu R, Zhuang R, Zhang Y, Fang L, Xu Z, Jin L, Wang T, Song C, Yang K, Wei Y, Yang A, Jin B, Chen L. miR-30c-1\* promotes natural killer

cell cytotoxicity against human hepatoma cells by targeting the transcription factor HMBOX1. *Cancer Sci* 2012; 103: 645-652 [PMID: 22320217 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02207.x]

编辑: 马亚娟 电编: 李瑞芳



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 © 2017 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》修回稿须知

**本刊讯** 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与《世界华人消化杂志》的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

#### 1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部.

#### 2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者复核要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期发回的, 作重新投稿处理.

#### 3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》等国外相关文摘与检索系统收录.



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

