

参考文献

- 1 Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future [J]. *Lancet*, 2011, 377 (9773): 1276 – 1287
- 2 Yaturu S. Diabetes and skeletal health [J]. *J Diabetes*, 2009, 1 (4): 246 – 254
- 3 钟卫权. 不同负荷的游泳运动及雌激素对去卵巢大鼠血清 IL-6、TGF- β 1 水平及生化指标的影响 [J]. *医学研究杂志*, 2008, 37 (12): 86 – 88
- 4 牛银玲, 邵小英. 糖尿病性骨质疏松 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13 (2): 138 – 140
- 5 Shan PF, Wu XP, Zhang H, *et al.* Age-related bone mineral density, osteoporosis rate and risk of vertebral fracture in mainland Chinese women with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Endocrinol Invest*, 2011, 34 (3): 190 – 196
- 6 Fritton JC, Kawashima Y, Mejia W, *et al.* The insulin-like growth factor-1 binding protein acid-labile subunit alters mesenchymal stromal cell fate [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (7): 4709 – 4714
- 7 Merlotti D, Gennari L, Dotta F, *et al.* Mechanisms of impaired bone strength in type 1 and 2 diabetes [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010, 20 (9): 683 – 690

(收稿: 2011-06-18)

(修回: 2011-07-07)

RhIL-21 对 NK-92MI 细胞生物学活性的影响

郑 瑞 陈葆国 颜卫华 李伯利 章卫国 干灵红

摘 要 目的 探讨 rhIL-21 对 NK-92MI 细胞免疫功能的影响。方法 以不同浓度 (25 ~ 100 ng/ml) 的 rhIL-21 培养 NK-92MI 细胞 24 ~ 72 h, 观察 NK-92MI 细胞的增殖。以 50 ng/ml 的 rhIL-21 处理 NK-92MI 不同时间后, FACS 检测 NK-92MI 细胞的凋亡, NK-92MI 细胞表面 NKG2D 受体及胞内颗粒酶-B 蛋白的表达; 细胞杀伤试剂盒检测 NK-92MI 细胞对靶细胞 K-562 的细胞毒效应; RT-PCR 检测 NK-92MI 受体 NKG2D, 效应分子颗粒酶-B、穿孔素及细胞因子 IFN- γ 基因 mRNA 的表达; ELISA 检测其分泌 IFN- γ 的水平。结果 RhIL-21 虽能抑制 NK-92MI 细胞的增殖 ($P < 0.05$), 但不会促进细胞的凋亡 ($P < 0.05$)。RhIL-21 能促进 NK-92MI 细胞穿孔素、IFN- γ 、颗粒酶-B、NKG2D 受体基因及相应蛋白质的表达上调 ($P < 0.05$)。rhIL-21 预处理组 NK-92MI 对 K-562 细胞的细胞毒效应也明显增强 ($P < 0.05$)。结论 RhIL-21 能增强 NK-92MI 细胞的细胞毒效应, IL-21 在肿瘤的免疫治疗中有潜在临床应用价值。

关键词 重组人白细胞介素-21 NK-92MI 细胞 干扰素- γ NKG2D 颗粒酶 穿孔素

Effect of rhIL-21 on NK-92MI Cells. Zheng Rui, Chen Baoguo, Yan Weihua, Li Boli, Zhang Weiguo, Gan Linghong. Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To investigate the effect of rhIL-21 on NK-92MI cells. **Methods** Using in vitro cultural experiments, NK-92MI cells were treated with different concentration of rhIL-21 and then the proliferation were tested at different time. In addition, after NK-92MI cells treated with 50 ng/ml rhIL-21 for 48 h or 72 h, the NK-92MI cell activity, apoptotic cells, the expressions of NKG2D and granzyme-B was measured using FACS assay. The levels of IFN- γ from the supernatants were detected by ELISA. The expressions of NKG2D, perforin, granzyme-B, and IFN- γ mRNA were determined by RT-PCR. **Results** RhIL-21 inhibited NK-92MI cell proliferation. However, rhIL-21 did not affect cell apoptosis. RhIL-21 increased the expressions of the effector molecules granzyme-B and IFN- γ as well as activation receptor NKG2D at the mRNA and protein levels. Furthermore, compared with control, rhIL-21 enhanced the cytotoxicity of NK92-MI cells against K-562 target. **Conclusion** RhIL-21 could enhance the cytotoxicity of NK92-MI cells possibly by up-regulating the expression of activation and effector molecular, suggesting that IL-21 might have therapeutically effect to enhance NK cell-mediated antitumour responses.

Key words Recombination human interleukin 21 (rhIL-21); NK-92MI cells; Interferon- γ (IFN- γ); NKG2D; Granzyme-B; Perforin

IL-21 主要是由活化的 CD4⁺T 细胞和 NKT 细胞分泌, 属于 γ c (共同 γ 链) 细胞因子家族成员之

一^[1-3]。至今有不少关于白介素 (IL)-21 对鼠和人 NK 细胞生物学调节的研究。曾发现 IL-21 和 IL-15 体外共同培养的鼠 NK 细胞, 其增殖受到抑制, IL-21 也并非 NK 细胞早期成熟必须的细胞因子^[4]。IL-21 可以通过增强鼠 NK 细胞杀伤活性对 NKG2D

作者单位: 317000 临海, 浙江省台州医院

通讯作者: 陈葆国, 电子信箱: baoguochen@126.com

配体阳性的肿瘤细胞有抑制作用,但也有研究表明 IL-21 通过下调人 primary NK 和 CD8⁺T 细胞表面 NKG2D/DAP10 的表达,而抑制 primary NK 细胞通过 NKG2D 介导的细胞毒作用^[5,6]。可见 IL-21 对 NK 细胞功能的调节可能因种群差异存在差异。因此本文通过 rhIL-21 对 NK-92MI 细胞生物学活性调节的研究,进一步探讨 IL-21 对 NK 细胞的免疫调节作用。

材料与方法

1. 材料:rhIL-21 及 Human IFN- γ Mini ELISA Development Kit 购自美国 PeproTech 公司,细胞毒活性检测试剂盒 CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 购自美国 Promega 公司,PE 标记鼠 anti-hNKG2D 购自 R&D 公司,TRizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司,Revert Aid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit 购自加拿大 Fermentas(MBI)公司,凋亡检测试剂盒购自联科生物 AnnexinV/PI apoptosis kit,胎牛血清、新生牛血清、马血清、RPMI-1640 及 α -MEM 基础培养基均购自美国 GIBCO 公司。引物由上海基康是生物技术有限公司合成。NK-92MI 细胞(恶性非霍奇金淋巴瘤患者外周血 NK 细胞系 NK-92 经稳定转染 hIL-2 后得到)及 K-562 细胞(人慢性髓系白血病细胞系)均为本室保存。

2. 细胞培养:NK-92MI 细胞培养:在 α -MEM 培养基中加入终浓度为 12.5% 的胎牛血清和 12.5% 的马血清,于 37℃、含 5% CO₂ 和 95% 湿度的孵箱常规培养;K-562 细胞培养:于 RPMI-1640 培养基中加入 10% 的新生牛血清,常规传代培养。

3. 细胞增殖试验:取处于对数生长状态良好的 NK-92 MI 细胞,1200r/min $\times$ 4min,离心。PBS 洗 1 次,1ml α -MEM 完全培养基悬起细胞,计数。调整细胞浓度为 1 $\times$ 10⁵/ml,备用。按 rhIL-21 药物浓度实验分 4 组,分别为 0ng/ml,25ng/ml,50ng/ml 和 100ng/ml 组。配备含 200ng/ml rhIL-21 的 α -MEM 完全培养基 1ml(取 2 μ l 100ng/ μ l 的 rhIL-21 加入到 1ml α -MEM 完全培养基)于 96 孔板实验各孔加入 100 μ l 的 α -MEM 完全培养基,取含 200ng/ml rhIL-21 的 α -MEM 完全培养基加入到第一组各孔,100 微升/孔。轻混匀后分别取 100 微升/孔加入下一个稀释度的各孔依次倍比 2 稀释,3 复孔/稀释度,取 NK92 MI 细胞悬液 100 μ l 加入各相应孔。将 96 孔板置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,分别在 24、48 和 72h 3 个药物培养时间段收集细胞并计数。

4. 细胞毒效应试验:取生长状态良好 NK-92MI 细胞,PBS 洗涤两次后,于 100ml 培养瓶中按 2 $\times$ 10⁵ 个/ml 细胞浓度培养,一组加入终浓度为 50ng/ml rhIL-21,一组未加药物,在 37℃、含 5% CO₂ 的孵箱常规培养 48h。收集预处理后细胞,PBS 洗涤 3 次,把两组细胞浓度调为 4 $\times$ 10⁶ 个/毫升备用。取 U 型底 96 孔板,按 CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒操作步骤,设靶细胞自然释放孔、培养基背景

孔、靶细胞最大释放孔、体积校正孔及效应细胞自然释放孔。取准备好的 NK-92MI 细胞加入 96 孔板,以倍比稀释法设立 6 个效应细胞浓度梯度,体积 50 微升/孔。再取准备好的生长状态良好的靶细胞 K-562(2 $\times$ 10⁵ 个/毫升)50 μ l 加入到相应各孔,使效靶比分别为 20:1、10:1、5:1、2.5:1、1.25:1 共 5 个浓度梯度,每个梯度 4 个复孔。在 37℃、含 5% CO₂ 的孵箱常规培养 4h 后,以每孔 10 μ l 裂解液加入到靶细胞最大释放孔和体积校正孔,再孵育 45min 后,取出 250g $\times$ 4min 离心,收集上清 50 微升/孔,移入另一平底 96 孔板,再加入反应液 50 微升/孔,避光室温孵育 30min,490nm 读取吸光度值。通过检测上清中 LDH 含量计算 NK-92MI 对 K-562 细胞的细胞毒活性。细胞毒效应计算公式:细胞毒(%)=(实验组-效应细胞自发释放-靶细胞自发释放)/(靶细胞最大释放-靶细胞自发释放) $\times$ 100%。

5. 流式细胞术(FACS)检测:以 50ng/ml rhIL-21 预处理 NK-92MI 细胞 48h,同时设 PBS 对照组(即未加药组)。收集细胞用 PBS 洗涤两次,离心后,用 300 μ l PBS 重悬细胞混匀,平分为 3 管,一管加入 anti-IgG-PE/IgG-FITC 同型对照荧光标记抗体,一管加入 anti-Granzyme B-PE 荧光标记抗体,另一管加入 anti-hNKG2D-PE 荧光抗体,室温孵育 30min,PBS 洗涤两次,细胞用 500 μ l PBS 悬起,上机分析。同样方法培养细胞 48h 和 72h,按 AnnexinV/PI apoptosis kit 操作步骤检测 rhIL-21 对 NK-92MI 细胞凋亡影响。

6. RT-PCR 检测目的基因的表达:分时收集 50ng/ml 预处理 0、6、12 和 24h 的 NK-92MI 细胞,PBS 洗涤 2 两次,细胞计数板计数,每次取同等量细胞,用 TRizol 试剂盒抽取细胞总 mRNA。反转录反应取 2 μ l mRNA,总体系为 20 μ l,合成 cDNA。PCR 反应体系为 25 μ l:2.5 μ l 10 $\times$ Buffer,1.5 μ l 25mmol/L MgCl₂,0.5 μ l dNTP,0.5 μ l cDNA,各 0.5 μ l 上下游引物,0.5 μ l Taq DNA 聚合酶,18.5 μ l 去离子水。反应条件:94℃ 10min;94℃ 1min,56℃ 45s,72℃ 45s 共 38 个循环;72℃ min;4℃ Hold。取 4 μ l PCR 产物用 1.3% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果用 Quantity one 软件进行灰度分析,对目的基因进行半定量。各引物如表 1。

表 1 各 PCR 引物序列及扩增片段长度

引物	序列 (5'~3')	扩增片段长度 (bp)
IFN- γ Forward	GGCTGTTACTGCCAGGACCCAT	339
IFN- γ Reverse	TGCTTTGCGTTGGACATTCAAGT	
Perforin Forward	TCAGCCTGGGTAAACTCGC	511
Perforin Reverse	TGCCAAGGAGGTCATCGTC	
Granzyme B Forward	GCCGACCCAGCAGTTTAT	274
Granzyme B Reverse	TTCGCACTTTCGATCTTCC	
β -actin Forward	GGCGACGAGGCCCCAGA	463
β -actin Reverse	CGATTTCCCGCTCGGC	
NKG2D Forward	CTGGGAGATGAGTGAATTCATA	416
NKG2D Reverse	GACTTCACCAGTTTAAGTAAATC	

7. ELISA 检测 IFN- γ 的分泌: 试验于 96 孔板中进行, 检测 50ng/ml rhIL-21 药物在不同时间对 NK-92MI 细胞分泌 IFN- γ 的影响。体积为 200 微升/孔, 每个时间梯度 (12h, 24h 和 48h) 3 个复孔, 同时设培养基 (含 12.5% 胎牛血清和 12.5% 马血清的 α -MEM) 和常规 NK-92MI 细胞培养对照组, 于 37℃、含 5% CO₂ 的孵箱培养。按 Human IFN- γ Mini ELISA Development Kit 实验步骤进行, 检测 490nm 吸光度值。

8. 统计学方法: 所有数据均采用 SPSS 13.0 统计软件分析, 计量资料描述用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计分析前各组数据均进行方差齐性检验, 多组间数据比较采用 One-way ANOVA 方差分析, 组间两两比较采用 LSD 统计方法, 两组间比较采用两组间独立样本 *t* 检验 (细胞杀伤实验采用配对资料 *t* 检验), $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

结 果

1. rhIL-21 对 NK-92MI 细胞增殖的影响: 实验数据显示, 随培养时间的延长实验组及对照组细胞均有不同程度的增殖 (One-way ANOVA 方差分析, 结果显示各组 P 均 < 0.05)。同时观察到随培养时间的延长各组之间细胞的增殖并不同步, 实验组较对照组细胞生长缓慢, 特别是在培养 72h 之后, 差异更为显著 ($P = 0.000$), 可见 rhIL-21 抑制了 NK-92MI 细胞的正常增殖, 但并未看到呈药物浓度梯度依赖性抑制, 统计学显示各实验组之间差别无统计学意义 ($P < 0.05$)。结果如表 2 所示。

表 2 不同浓度 rhIL-21 对 NK-92MI 增殖的影响

组别	不同时期 NK-92MI 细胞数量 ($\times 10^4$ /ml)		
	24h	48h	72h
0ng/ml ($n = 3$)	5.83 $\pm$ 0.28	8.39 $\pm$ 0.40	11.84 $\pm$ 0.69
25ng/ml ($n = 3$)	5.94 $\pm$ 0.60	7.84 $\pm$ 0.58	8.24 $\pm$ 0.80
50ng/ml ($n = 3$)	5.61 $\pm$ 0.38	7.42 $\pm$ 0.44	7.49 $\pm$ 0.38
100ng/ml ($n = 3$)	5.63 $\pm$ 0.23	6.88 $\pm$ 0.44	7.25 $\pm$ 0.14
<i>P</i>	0.704	0.051	0.000

2. rhIL-21 对 NK-92MI 细胞凋亡的影响: 鉴于结果 1 所示, 不同剂量 rhIL-21 对 NK-92MI 细胞的增殖有不同程度的抑制, 我们选择既能发挥药效又不至于过度抑制细胞生长的剂量 (50ng/ml) 进行后续试验研究。在 50ng/ml rhIL-21 培养 NK-92MI 48h 和 72h 后, Annexin V 和 PI 染色显示, 实验组和对照组细胞凋亡率的差别无统计学意义 (48h, $P = 0.947$; 72h, $P = 0.325$), 且不随培养时间的延长而增加, 即 50ng/ml rhIL-21 并未增加 NK-92MI 细胞的凋亡。结果如表 3 所示。

表 3 rhIL-21 对 NK-92MI 凋亡的影响 (%)

组别	Annexin V ⁺ /PI ⁺		
	0h	48h	72h
实验组 ($n = 3$)	1.39 $\pm$ 0.51	2.11 $\pm$ 1.21	2.74 $\pm$ 0.61
对照组 ($n = 3$)	-	2.18 $\pm$ 1.35	2.04 $\pm$ 0.90
<i>P</i>		0.947	0.325

3. rhIL-21 对 NK-92MI 细胞细胞毒效应的影响: 以 50ng/ml 浓度的 rhIL-21 预处理 NK-92MI 48h 后, 观察 NK-92MI 细胞毒效应的改变。结果显示在效靶比为 5:1、2.5:1、1.25:1 时, 50ng/ml 能增强 NK-92MI 细胞的细胞毒活性 ($P < 0.05$)。结果如图 1 所示。

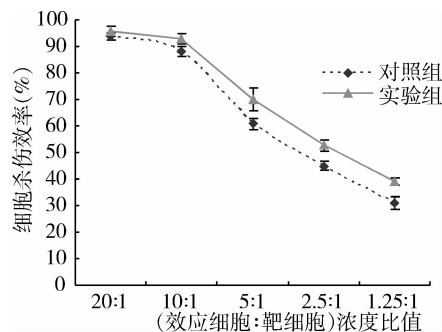


图 1 rhIL-21 对 NK-92MI 细胞毒效应的影响

4. rhIL-21 对 NK-92MI 细胞相关基因表达的影响: RT-PCR 结果显示, 50ng/ml rhIL-21 能够促进 NK 细胞细胞毒效应相关基因如颗粒酶-B (274bp)、穿孔素 (511bp)、IFN- γ (339bp) 以及 NK 细胞表面活化型受体 NKG2D 基因 (416bp) mRNA 的表达, 且均呈时间依赖性表达增强 ($P < 0.05$), 见图 2, 用 Quantity one 软件分析目的基因与 β -actin 的灰度比值见表 4。

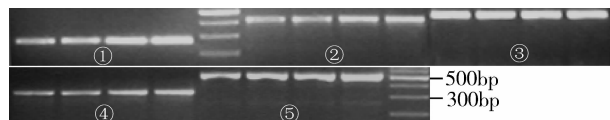


图 2 RT-PCR 鉴定 NK-92MI 细胞活化相关基因表达

①~⑤分别为颗粒酶-B、NKG2D、 β -actin、IFN- γ 及穿孔素基因 mRNA 在 NK-92MI 细胞中的表达, 由左至右 4 个泳道分别代表 rhIL-21 培养 0、6、12 和 24h 4 个时间段

5. rhIL-21 对 NK-92MI 细胞表面 NKG2D 受体及胞质颗粒酶-B 蛋白的调节: 50ng/ml rhIL-21 处理 NK-92MI 细胞 48h 后, 细胞表面 NKG2D 受体的平均荧光强度及胞质颗粒酶-B 蛋白的表达均明显增强 (NKG2D, $P = 0.00$; 颗粒酶-B, $P = 0.00$), 如图 3 及表 5 所示。

表 4 不同时间目的基因的表达量变化

组别	时间				P
	0h	6h	12h	24h	
IFN- γ (n=3)	0.20 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.03	0.52 $\pm$ 0.08	0.000
穿孔素 (n=3)	0.34 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.05	0.68 $\pm$ 0.15	0.92 $\pm$ 0.10	0.000
颗粒酶-B (n=3)	0.30 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.09	0.74 $\pm$ 0.11	0.92 $\pm$ 0.09	0.000
NKG2D (n=3)	0.23 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.06	0.59 $\pm$ 0.03	0.000

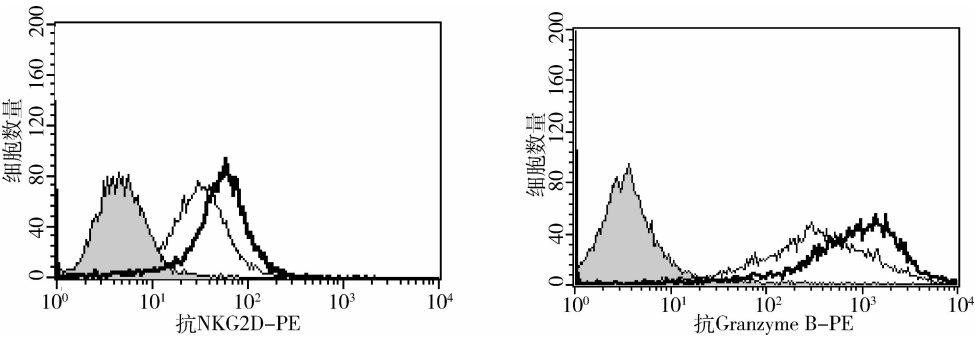


图 3 流式细胞术检测 NK-92MI 细胞表面 NKG2D 受体及胞内颗粒酶-B 的表达

横坐标为荧光强度,纵坐标为细胞数量;“阴影”代表同型对照;“细线”代表 rhIL-21 处理前;“粗线”代表 rhIL-21 培养 48h 后

表 5 NKG2D 及颗粒酶-B 蛋白平均荧光强度的变化

组别	NKG2D 平均荧光强度		颗粒酶-B 平均荧光强度	
	0h	48h	0h	48h
实验组 (n=3)	33.39 $\pm$ 2.13	58.03 $\pm$ 2.46	715.15 $\pm$ 11.97	1075.66 $\pm$ 82.63
对照组 (n=3)	-	31.95 $\pm$ 2.02	-	726.14 $\pm$ 14.88
P		0.000		0.002

6. rhIL-21 对 NK-92MI 细胞 IFN- γ 分泌的影响:根据 ELISA 标准曲线公式 ($y = 755.81x^2 - 721.46x + 139.66, r^2 = 0.9551$) 计算相应吸光度值对应的 IFN- γ 浓度。随培养时间的延长,两组细胞分泌 IFN- γ 水平均有升高(实验组 $P = 0.000$,对照组 $P = 0.000$)。但与对照组比较,50ng/ml rhIL-21 药物处理组细胞分泌 IFN- γ 的能力在 24h 和 48h 时,均明显高于对照组(24h $P = 0.020$,48h $P = 0.002$);而在 12h 时两组相比,分泌 IFN- γ 水平无显著性差异($P = 0.173$),如图 4 所示。

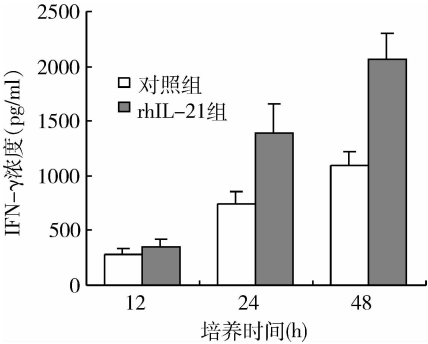


图 4 50ng/ml rhIL-21 对 IFN- γ 分泌的影响

讨 论

自 Parrish - Novak 等^[1]报道 IL-21 对 NK 细胞的研究以来,有较多关于 IL-21 对人及鼠 NK 细胞增殖、免疫调节及抗肿瘤效应等各方面的研究。针对 IL-21 对 NK 细胞增殖的研究,有报道表明 IL-21 能抑制 IL-15 或 IL-2 活化的鼠 NK 细胞的增殖,并能促使 NK 细胞通过经典的凋亡途径发生凋亡^[4,7]。虽然种属不同,但与本研究 rhIL-21 能不同程度抑制 NK-92MI 细胞增殖的结果相近。然而这种生长抑制不是 NK-92MI 细胞凋亡率增加的结果,本研究并未发现 rhIL-21 培养组和对照组在 NK-92MI 生长 48h 后,Annexin V⁺/PI⁺ 双阳性细胞百分率的差异。这同 Skak 等^[8]报道的,IL-21 能促进人外周血纯化的 NK 细胞的存活率结果相吻合,或者至少证明了 IL-21 不会促进人 NK 细胞的凋亡。

作为具有天然抗肿瘤活性的 NK 细胞,其细胞毒效应可受多种细胞因子的调节。研究 IL-21 对 NK 细胞细胞毒效应的影响,是 IL-21 对 NK 细胞各种免疫调节的综合体现。本研究结果表明 50ng/ml 浓度的 rhIL-21 均能显著增强 NK-92MI 细胞对靶细

胞 K-562 的细胞毒效应,这与 Skak 等^[8]的研究结果一致,尽管也有其他研究结果与此不同,但多数研究支持 IL-21 能增强 NK 细胞细胞毒效应的结论^[5-8]。传统理论认为 NK 细胞的活化是细胞表面活化型受体和抑制型受体综合作用的结果,因此本实验分别从基因和蛋白质水平上检测了 rhIL-21 对 NK-92MI 细胞表面主要活化型受体 NKG2D 的调节。结果表明,50ng/ml 的 rhIL-21 能逐渐增强 NKG2D 基因 mRNA 的表达,并能显著增强培养 48h 后 NK-92MI 细胞表面 NKG2D 受体的平均荧光强度。Skak 等^[8]报道 IL-21 能增强外周血单个核细胞中 NK 细胞表面细胞毒效应受体 Nkp46、活化型受体 NKG2D 及抑制型受体 CD94 和 NKG2A 不同程度的表达上调,而最终表现为细胞毒活性的增强。而 Burgess 等^[6]曾报道 IL-21 通过下调纯化人 primary NK 细胞表面 NKG2D/DAP10 的表达,而抑制 primary NK 细胞通过 NKG2D 和其配体介导的细胞毒活性。这种结果的差异是否由不同细胞系造成?有待于体内实验或更多实验进一步验证。

RT-PCR 结果显示 IFN- γ 、穿孔素及颗粒酶的表达随 rhIL-21 培养时间的延长而逐渐增强,且 IFN- γ 的分泌及颗粒酶蛋白表达水平也明显增强。这进一步验证了 NK-92MI 被 rhIL-21 活化后细胞毒效应的增强机制。IFN- γ 是在细胞免疫中发挥关键调节作用的细胞因子,显然 rhIL-21 促进 NK-92MI 细胞分泌的 IFN- γ ,进一步增强了细胞免疫能力。这有利于在肿瘤免疫中机体抗肿瘤免疫的能力,但也可能导致机体过度免疫而产生自身免疫性疾病。当然机体的免疫平衡的维持靠复杂的细胞因子网络的调节。曾有研究表明高浓度的 IFN- γ 能下调人 NK 细胞活化型受体 NKG2D 基因及蛋白水平的表达,IL-21 可以通过对转录因子 Eomesodermin 的抑制而下调 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 能力。

通过本实验的研究,进一步认识了 IL-21 对人 NK 细胞免疫调节作用,然而对单纯的体外实验和细胞系研究并不能模拟人体复杂的微环境,实验结果不能完全揭示疾病状态下 IL-21 对 NK 细胞的调节。因此通过对自身免疫性疾病或肿瘤患者机体免疫状态的检测、细胞因子的分析及精细的体内实验的研究,观察 IL-21 在相关疾病中所扮演的角色,将对全面认识 IL-21 生物学活性非常重要。

参考文献

- 1 Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, *et al.* Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function [J]. *Nature*, 2000, 408 (6808) : 57-63
- 2 Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, *et al.* IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production [J]. *J Immunol*, 2007, 178 (5) : 2827-2834
- 3 Habib T, Senadheera S, Weinberg K, *et al.* The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3 [J]. *Biochemistry*, 2002, 41 (27) : 8725-8731
- 4 Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, *et al.* IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation; a mediator of the transition from innate to adaptive immunity [J]. *Immunity*, 2002, 16 (4) : 559-569
- 5 Takaki R, Hayakawa Y, Nelson A, *et al.* IL-21 enhances tumor rejection through a NKG2D-dependent mechanism [J]. *J Immunol*, 2005, 175 (4) : 2167-2173
- 6 Burgess SJ, Marusina A I, Pathmanathan I, *et al.* IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8⁺T cells [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (3) : 1490-1497
- 7 Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, *et al.* IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells [J]. *J Immunol*, 2004, 172 (4) : 2048-2058
- 8 Skak K, Frederiksen KS, Lundsgaard D. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression [J]. *Immunology*, 2008, 123 (4) : 575-583

(收稿:2011-05-20)

(修回:2011-07-07)

(上接第 74 页)

- 5 Farrugia AN, Atkins GJ, To LB, *et al.* Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (17) : 5438-5445
- 6 Nicola Giuliani, Simona Colla, Francesca Morandi, *et al.* Lack of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) expression and functional production by human multiple myeloma cells [J]. *Haematologica*, 2005, 90 (2) : 275-278
- 7 Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, *et al.* Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (20) : 11581-11586

- 8 D. L. Lacey, E. Timms, H. L. Tan, *et al.* Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation [J]. *Cell*, 1998 (93) : 165-176
- 9 Chesneau V, Becherer JD, Zheng Y, *et al.* Catalytic properties of ADAM19 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (25) : 22331-22340
- 10 Atsuhiko Hikita, Ikuo Yana, Hidetoshi Wakeyama, *et al.* Negative Regulation of Osteoclastogenesis by Ectodomain Shedding of Receptor Activator of NF- κ B Ligand [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 (48) : 36846-36855

(收稿:2011-07-05)

(修回:2010-07-15)