自然杀伤细胞毒性测定

NK Cell Cytotoxicity Assay

冯瑾*

医学院免疫所，清华大学，北京

*通讯作者邮箱: fengj17@mails.tsinghua.edu.cn

引用格式: 冯瑾. (2019). 自然杀伤细胞毒性测定. *Bio-101* e1010333. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010333.

How to cite: Feng. J. (2019). NK Cell Cytotoxicity Assay. *Bio-101* e1010333. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010333. (in Chinese)

摘要: NK 细胞的主要功能是杀伤功能，但因许多因素而改变，如基因敲除、基因突变、激活剂、抑制剂等，均有可能影响 NK 细胞的功能，为了研究这些因素对 NK 细胞杀伤功能的影响，我们采用抗体标记 NK 的 IFN- γ 和 CD107a 的方法间接检测 NK 细胞的杀伤活性。本实验方法提前给小鼠腹腔注射 polyI:C 激活 NK 细胞，然后收集小鼠脾脏细胞与靶细胞 (RMAS、YAC-1 细胞) 共孵育，并设立阴性对照和阳性对照 (PMA + Inomycin)，激活的 NK 细胞会发挥杀伤活性，上调 IFN- γ 的表达、增加颗粒酶的分泌。NK 细胞的 IFN- γ 和其颗粒分泌能力的强弱可以间接反映出 NK 细胞杀伤功能的强弱。

关键词: NK 细胞，细胞毒性，杀伤活性

研究背景: 机体内常有一些受刺激或感染而产生的异常细胞，如肿瘤细胞、受感染的细胞。而固有免疫和适应性免疫能先后识别并清除这些异常细胞。其中 NK 细胞在固有免疫中发挥重要的作用。NK 细胞可以迅速识别并杀伤非己或异常的细胞，其杀伤机制主要分为直接和间接的方式。直接杀伤包括 Fas/FasL 途径和 TRAIL/DR5 途径，而间接的杀伤方式包括分泌 IFN- γ 和颗粒酶、穿孔素等。NK 细胞不同于 T、B 细胞，不表达 TCR、BCR，但其胞质内富含嗜天青颗粒，激活后颗粒明显增多，这些颗粒与其杀伤活性有关，所以 NK 细胞的 IFN- γ 和其颗粒分泌能力的强弱可以间接反映出 NK 细胞杀伤功能的强弱。

由于 IFN- γ 在胞内内质网合成、高尔基体加工后向外分泌，这将影响 IFN- γ 胞内染色检测的准确性，所以在共孵育 1 小时后需加入 Brefeldin A 和 Monensin 封闭高尔基

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

体。孵育一段时间后，进行染色，即可流式检测。NK 细胞中的细胞毒性颗粒主要存在于分泌性溶酶体，而 **CD107a** 又称溶酶体相关膜蛋白-1，是存在于溶酶体膜上的一种蛋白，当分泌性溶酶体分泌的过程中，溶酶体与细胞膜结合，**CD107a** 随溶酶体膜与细胞膜结合而表达在细胞膜上，所以 **CD107a** 的表达程度与细胞脱颗粒程度正相关。

相比于其他测细胞毒活性的方法，**51Cr** 释放实验虽然之前很长一段时期内是检测细胞毒活性的黄金标准，但 **51Cr** 具有半衰期短、放射性等缺点，而 **LDH** 释放法具有敏感性低的缺点。而本实验具有安全、便捷、特异等特点，便于研究各基因、蛋白等对 NK 细胞细胞毒性的影响，发掘其中的机制。

材料与试剂

1. 镊子
2. 剪刀
3. 24 孔板 (Costar)
4. 60 mm x 15 mm 平皿 (Corning, catalog number: 430166)
5. 15 毫升离心管 (BD Falcon, catalog number: 352096)
6. 100 目滤网
7. 注射器活塞
8. 血球计数板
9. 小鼠
10. 胎牛血清
11. **CD107** 抗体 (eBioscience, catalog number: 50-1071, clone eBio1D4B, 1:100)
12. **IFN γ** 抗体 (eBioscience, catalog number: 50-1071, clone XMG1.2, 1:200)
13. Poly I:C (InvivoGen, catalog number: 31852-29-6)
14. PMA (Sigma-Aldrich, catalog number: P1585)
15. Inomycin (Sigma-Aldrich, catalog number: 407951)
16. 红细胞裂解液 (eBioscience, catalog number: 00-4333-57)
17. Brefeldin A Solution (1,000x) (eBioscience, catalog number: 00-4506-51)
18. Monensin Solution (1,000x) (eBioscience, catalog number: 00-4505-51)
19. PBS
20. PFA

21. 1640 培养基 (WISENT, catalog number: 350-006-CL)
22. 皂素 (Saponin, Sigma-Aldrich, catalog number: 47036)
23. 洗液 (见溶液配方)
24. 细胞穿膜固定液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 二氧化碳培养箱
2. 多色流式细胞仪
3. 超净工作台
4. 离心机

实验步骤

1. 每只小鼠腹腔注射 200 μ l 1 μ g/ μ l 的 polyI:C。
2. 18 小时后, 处死小鼠, 在超净台取小鼠脾脏, 放于含 100 目筛网和 3 ml PBS 的 60 mm x 15 mm 平皿中用注射器活塞研磨, 研磨至无明显组织块后收集细胞于 15 ml 离心管。
3. 400 x g 离心 5 min。
4. 弃上清, 加 1 ml 1x 红细胞裂解液, 混匀, 冰上裂解 5 min。
5. 裂解完成后可见液体红色变淡, 加 5 ml PBS 终止反应, 400 x g 离心 5 min。
6. 弃上清, 1 ml PBS 重悬细胞, 100 目滤网过滤并收集于 1.5 ml EP 管中。
7. 取 20 μ l 细胞液到新的 1.5 ml EP 管并加入 180 μ l PBS, 混匀, 用血球计数板计数。
8. 调细胞浓度至 $2 \times 10^6/250 \mu$ l ($8 \times 10^6/\text{ml}$), 24 孔板, 每孔加入 250 μ l 细胞混悬液。
9. 收集提前培养好的 RMA-S 和 YAC-1 细胞, 计数。
10. 调细胞浓度至 $2 \times 10^6/250 \mu$ l ($8 \times 10^6/\text{ml}$), 每孔加入 250 μ l 细胞混悬液至相应的孔中 (共 500 μ l)。
11. 同时每孔加入 0.5 μ l CD107 抗体。
12. 设置空白对照孔 (+ 10% FBS 1640), 和阳性对照孔 (每孔加 50 μ l P + I 混合

- 液)。
13. 共孵育 1 个小时后, 加入 Golgi block (每孔 0.5 μ l) (Brefeldin A Solution (1,000x), Monensin Solution (1,000x))。
14. 培养箱中培养 4 小时。
15. 收集培养的细胞, PBS 洗一次, 加入 100 μ l (含 2% FBS 的 PBS) 预先配好的流式抗体混合物对细胞表面分子进行染色。
16. 4 °C 孵育 1 小时, 中间混匀一次。
17. 加 PBS, 400 x g 离心 5 分钟, 洗两次。
18. 弃上清, 每管加入 100 μ l 固定穿膜液, 混匀, 4 °C 孵育 1 小时, 中间混匀一次。
19. 每管加入 500 μ l 洗液, 混匀, 1,700 x g 离心 5 分钟, 洗两次。
20. 弃上清, 每管加入 100 μ l IFN γ 抗体 (洗液稀释), 4 °C 孵育过夜。
21. 加洗液, 混匀, 1,700 x g 离心 5 分钟, 洗两次。
22. 每管加入 400 μ l PBS, 混匀, 按照图 1 所示的画门策略, 流式上机检测。

结果与分析

NK 细胞与 RMA84 或者 YAC-1 肿瘤细胞共同培养后, 可以检测到 NK 细胞产生了 IFN γ 和 CD107a, NK 细胞的 IFN- γ 和 CD107a 的水平反映了检测的 NK 细胞的杀伤活性 (图 2)。

图 1. 流式检测画门策略

图 2. 流式检测 NK 细胞胞内 IFN γ 和 CD107a 的水平

溶液配方

1. 洗液

PBS

0.1%皂素

2% FBS

2. 细胞穿膜固定液 (1 L)

4 g PFA

0.1g 皂素

致谢

董忠军实验室的工作得到清华大学免疫所的支持。本文实验方案改编自本实验室发表的文章 (Chen 等, 2016)。

参考文献

- Chen, S., Yang, M., Du, J., Li, D., Li, Z., Cai, C., Ma, Y., Zhang, L., Tian, Z. and Dong, Z. (2016). [The self-specific activation receptor SLAM family is critical for NK cell education.](#) *Immunity* 45(2): 292-304.