

NKG2D 介导 NK 细胞对鼻咽癌细胞杀伤作用的体外研究

梅家转, 郭坤元, 魏红梅, 常红, 宋朝阳

NKG2D Mediated Cytotoxicities of NK Cells Against Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line (CNE2) in Vitro

MEI Jia-zhuan, GUO Kun-yuan, WEI Hong-mei, CHANG Hong, SON G Chao-yang

Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510582, China

Corresponding Author: GUO Kun-yuan, E-mail: gzyuan@pub.Guangzhou.gd.cn

Abstract: Objective To analyze HLA-I class I molecules and the expression of NKG2D ligands in human nasopharyngeal carcinoma cell line (CNE2) and their effects on cytotoxicity of natural killer (NK) cells.

Methods The expression of NKG2D ligands on the surface of CNE2 and K562 cells were analyzed by flow cytometry. The HLA-I class I molecules in CNE2 cells and killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) expressed by NK cells (isolated from 5 healthy persons) were analyzed by PCR-SSP. Cytotoxicities of NK cells against CNE2 and K562 cells were detected by LDH releasing assay at different effect-to-target cell ratios (E:T). In blocking experiments, different anti-NKG2D ligands monoclonal antibodies (mAbs) were added to the target cells at 20:1 E:T ratio. **Results** It was found that MICA, MICB, ULBP2 were expressed by CNE2, ULBP1, ULBP3 were not detectable on CNE2; K562 expressed all the NKG2D ligands. There were mismatches between inhibitory KIRs expressed by NK cells and HLA-I class I molecules expressed by the CNE2 cells. NK cells displayed highly in vitro cytotoxicity against K562 and CNE2 cells with analysis of (29.02 ± 0.45)%, (10.50 ± 2.17)%, (44.43 ± 1.36)%, (27.68 ± 1.47)%; (57.82 ± 1.35)%, (36.99 ± 3.13)%; (71.24 ± 2.36)%, (55.00 ± 2.20)%, respectively at 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 E:T ratios ($P = 0.000$). Blocking experiments confirmed that killing of K562 by NK cells was efficiently inhibited by anti-MICA mAb, anti-MICB mAb, anti-ULBP1 mAb, anti-ULBP2 mAb and anti-ULBP3 mAb. Anti-MICA mAb, anti-ULBP2 mAb could partially inhibit the cytotoxicity of NK cells against CNE2 cells, whereas anti-ULBP1 mAb and anti-ULBP3 mAb could not inhibit the cytotoxicity of NK cells. **Conclusion** Expression of NKG2D ligands is correlated with the cytotoxicity of NK cells. NK-mediated cytolytic activity may be boosted by engineering cells expressing high levels of activating NKG2D ligands.

Key words: Natural killer cell; NKG2D; Killer cell immunoglobulin-like receptor

摘要: 目的 探讨鼻咽癌 CNE2 细胞表面 HLA-I 类分子表型和 NKG2D 配体的表达情况, 进一步了解其对同种异体 NK 细胞杀伤活性的影响。方法 流式细胞仪检测 NKG2D 的配体 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 在 K562、CNE2 细胞的表达情况。PCR-SSP 法分析 CNE2 细胞 HLA-A、B、Cw 分型和 NK 细胞 KIR 分型。LDH 释放法测定 5 例健康者 NK 细胞在不同效靶比时对 K562、CNE2 细胞的杀伤活性, 效靶比 20:1 时观察抗 NKG2D 配体的单抗对 NK 细胞杀伤 K562、CNE2 细胞活性的影响。

结果 CNE2 细胞表达 MICA、MICB、ULBP2, 不表达 ULBP1、ULBP3。K562 细胞表面表达 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3。5 例健康者 NK 细胞抑制性 KIR 与 CNE2 细胞表面的 HLA-I 类分子之间存在错配。效靶比 5:1、10:1、20:1、30:1 时 NK 细胞对 K562、CNE2 细胞的杀伤活性分别为 (29.02 ± 0.45)%, (10.50 ± 2.17)%, (44.43 ± 1.36)%, (27.68 ± 1.47)%; (57.82 ± 1.35)%, (36.99 ± 3.13)%; (71.24 ± 2.36)%, (55.00 ± 2.20)%, 分别在各效靶比时 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性较 CNE2 细胞明显增强 ($P = 0.000$) ; 在效靶比 20:1 时 anti-MICA、anti-MICB、anti-ULBP1、anti-ULBP2、anti-ULBP3 可明显抑制

收稿日期: 2006-05-12; 修回日期: 2006-08-24

作者单位: 510282 广州, 南方医科大学珠江医院血液科

通讯作者: 郭坤元, E-mail: gzyuan@pub.Guangzhou.gd.cn

作者简介: 梅家转(1966-), 男, 在读博士, 副主任医师, 主要从事恶性肿瘤的生物治疗

· 233 ·

NK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性,与阻断前相比有显著性差异 ($P = 0.000$);anti-MICA、anti-MICB、anti-ULBP2 可明显抑制 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性,与阻断前相比有显著性差异 ($P < 0.01$),但 anti-ULBP1、anti-ULBP3 不能阻断 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性。结论 NKG2D 配体影响 NK 细胞对靶细胞的杀伤活性,提高 NKG2D 配体的表达有可能提高 NK 细胞的抗肿瘤活性。

关键词:自然杀伤细胞;NKG2D;杀伤细胞免疫球蛋白样受体

中图分类号:R392.12 文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2007)04-0233-04

0 引言

NK 细胞对靶细胞的杀伤活性与其细胞表面的受体和靶细胞表面的配体密切相关。NK 细胞表面的抑制性杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor, iKIR) 与靶细胞表面特定的 HLA-I 类分子结合可以明显抑制 NK 细胞的活性,靶细胞缺乏 iKIR 特定的配体将激发 NK 细胞对其杀伤活性^[1]。NKG2D 为 NK 细胞的活化性受体,表达于所有的 NK 细胞表面,是介导 NK 细胞识别和溶解肿瘤细胞的主要活化性受体。NKG2D 的配体为 MHC-I 类链相关基因产物 (MICA、MICB) 及 ULBPs (人巨细胞病毒 UL16 蛋白的结合蛋白 ULBP1、ULBP2、ULBP3),NKG2D 的配体在多种肿瘤细胞表达,其在鼻咽癌 CNE2 细胞株 HLA-I 类分子表型和 NKG2D 配体的表达情况,进一步了解其对同种异体 NK 细胞杀伤活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

NK 细胞分离缓冲液 (磷酸盐缓冲液, pH 7.2, 含 0.5% BSA 和 2 mM EDTA) 及 CD56 MicroBeads (Miltenyi Biotec 公司), FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG1 (eBioscience 公司), RPMI1640 (Gibco 公司), 淋巴细胞分离液 (上海试剂二厂), rhIL-2 (上海华新公司), NK 细胞杀伤活性检测试剂盒 (Cytotoxicity Tox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega 公司), KIR PCR-SSP 分型试剂盒 (Dynal 公司), PCR-SSP-A、B、Cw 特异性引物试剂盒 (Biotest 公司), 流式细胞仪 (Coulter 公司), AMO-1 (anti-MICA, IgG1), BMO-1 (anti-MICB, IgG1), M295 (anti-ULBP1, IgG1), M310 (anti-ULBP2, IgG1), M551 (anti-ULBP3, IgG1), 以上单抗由德国 Alexander Steinle 及意大利 Lorenzo Moretta 教授惠赠。

人鼻咽癌细胞株 CNE2 由军事医学科学院李春海教授惠赠^[2],人慢性髓系白血病细胞株 K562 由本室冻存。

1.2 方法

1.2.1 NK 细胞的分离纯化 采用常规密度梯度离心法分离 5 例健康人外周血单个核细胞, PBS 洗涤 2 次, 计数细胞, CD56 MicroBeads 作细胞阳性分选, 获得 CD3⁻ CD56⁺ 细胞, 流式细胞仪检测 CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ 细胞的纯度。

1.2.2 细胞培养 细胞培养基为含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640。培养 NK 细胞时加入 1000 U/ml 的 rhIL-2。

1.2.3 K562、CNE2 细胞表面 NKG2D 主要活化性配体的测定 收集对数期生长的 K562、CNE2 细胞, PBS 洗涤后, 计数细胞, 分管, 按 1 μg/10⁶ 细胞浓度分别加入 AMO-1、BMO-1、M295、M310、M551, 4 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 以 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG1 二抗 4 孵育 30 min, PBS 洗涤, 同型 IgG1 (Pharmingen 公司) 作为阴性对照抗体, 流式细胞仪分析样本中 1 × 10⁴ 个细胞中阳性细胞数, 计算表达率。

1.2.4 CNE2 细胞表面 HLA-A、B、Cw 基因分型 采用 PCR-SSP 法, 按 PCR-SSP-A、B、Cw 特异性引物试剂盒说明操作。

1.2.5 KIR 基因分型 采用 PCR-SSP 法, 按 KIR 基因分型试剂盒说明操作。

1.2.6 NK 细胞杀伤活性测定 采用 4 h LDH 释放测定法, 参照 Cytotoxicity Tox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 说明操作。抗体封闭试验以效靶比 20:1 时 AMO-1、BMO-1、M295、M310、M551 各 1 μg 分别与靶细胞室温孵育 15 min, 然后再加入 NK 细胞测杀伤率。NK 细胞杀伤活性 (%) = (实验组 OD 平均值 - 靶细胞自然释放组 OD 平均值 - 效应细胞自然释放组 OD 平均值) / (靶细胞最大释放组 OD 平均值 - 靶细胞自然释放组 OD 平均值) × 100 %

1.3 统计学处理方法

应用 SPSS10.0 软件进行数据处理, 采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 NK 细胞的纯度

流式细胞仪检测 CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ 细胞的纯度达 90% 以上。

2.2 K562、CNE2 细胞表面 NKG2D 的配体表达

本研究结果显示 CNE2 细胞表面 MICA、MICB、ULBP1 的表达率分别为 $(85.78 \pm 4.95)\%$ 、 $(55.13 \pm 2.21)\%$ 、 $(51.47 \pm 2.43)\%$ ，不表达 ULBP1、ULBP3；K562 细胞表面 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 的表达率分别为 $(57.12 \pm 1.12)\%$ 、 $(46.64 \pm 0.40)\%$ 、 $(43.50 \pm 0.93)\%$ 、 $(65.24 \pm 0.47)\%$ 、 $(53.96 \pm 1.24)\%$ ，见表 1。

表 1 NKG2D 的配体在 K562、CNE2 细胞表面表达的阳性细胞百分数 ($\bar{x} \pm s$, %)

Cell line	n	MICA	MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3
K562	5	57.12 ± 1.12	46.64 ± 0.40	43.50 ± 0.93	65.24 ± 0.47	53.96 ± 1.24
CNE2	5	85.78 ± 4.95	55.13 ± 2.21	0	51.47 ± 2.43	0

2.3 CNE2 细胞表面 HLA-A、B、Cw 基因分型结果

CNE2 细胞表面 HLA-A、B、Cw 表型为 A2,24；B18,35；Cw4,7。

2.4 KIR 基因分型

5 例健康人均表达 KIR2DL1、KIR2DL3、KIR3DL1、KIR3DL2。

2.5 NK 细胞杀伤活性

本研究结果显示 NK 细胞对 K562、CNE2 细胞的杀伤活性在效靶比 5:1 时分别为 $(29.02 \pm 0.45)\%$ 、 $(10.50 \pm 2.17)\%$ ；效靶比 10:1 时分别为 $(44.43 \pm 1.36)\%$ 、 $(27.68 \pm 1.47)\%$ ；效靶比 20:1 时分别为 $(57.82 \pm 1.35)\%$ 、 $(36.99 \pm 3.13)\%$ ；效靶比 30:1 时分别为 $(71.24 \pm 2.36)\%$ 、 $(55.00 \pm 2.20)\%$ ，在各效靶比时 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性较 CNE2 细胞明显增强 ($P = 0.000$)；效靶比 20:1 时 AMO-1、BMO-1、M295、M310、M551 分别对 K562 细胞表面相应位点进行封闭，NK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性分别为 $(46.82 \pm 2.62)\%$ 、 $(49.26 \pm 0.98)\%$ 、 $(50.42 \pm 1.79)\%$ 、 $(50.75 \pm 1.23)\%$ 、 $(51.68 \pm 1.34)\%$ 和阻断前 $(57.82 \pm 1.35)\%$ 相比有显著性差异 ($P < 0.01$)，见图 1；效靶比 20:1 时 AMO-1、BMO-1、M310 分别对 CNE2 细胞表面相应位点进行封闭，NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性分别为 $(27.07 \pm 2.87)\%$ 、 $(29.12 \pm 0.68)\%$ 、 $(27.71 \pm 3.18)\%$ 与阻断前 $(36.99 \pm 3.13)\%$ 相比有显著性差异 ($P < 0.01$)；M295、M551 对 CNE2 细胞表面相应位点进行封闭，NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性分别为 $(36.67 \pm 3.27)\%$ 、 $(36.75 \pm 2.53)\%$ ，与阻断前相比无明显变化 ($P > 0.05$)，见图 2。

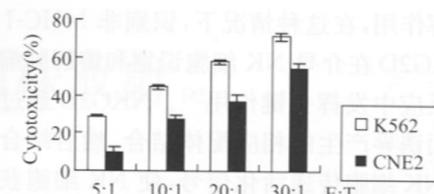


图 1 不同效靶比时 NK 细胞的杀伤活性

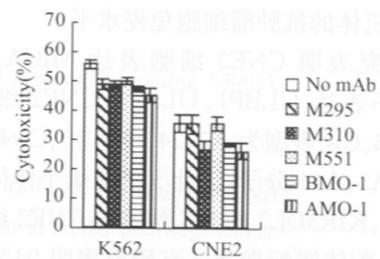


图 2 效靶比 20:1 时不同单抗对 NK 细胞杀伤 K562、CNE2 细胞的阻断作用

3 讨论

NK 细胞是机体内重要的淋巴细胞亚群，在肿瘤免疫中 NK 细胞构成了第一道杀伤防线。NK 细胞表面的抑制性杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (iKIR) 与靶细胞表面特定的 HLA-I 类分子结合可以明显抑制 NK 细胞的活性，靶细胞缺乏 iKIR 特定的配体 (KIR-配体错配) 将激发 NK 细胞对靶细胞的杀伤活性^[1]。不同的 iKIR 分子识别并结合不同的 HLA-I 类分子。KIR2DL1 识别 HLA-Cw2、Cw4、Cw5、Cw6；KIR2DL2/2DL3 识别 HLA-Cw1、Cw3、Cw7、Cw8；KIR3DL1 识别 HLA-B w4；KIR3DL2 识别 HLA-A3、A11；其余的 KIR 配体尚未明确^[3]。KIR2DL1、KIR2DL2/2DL3、KIR3DL1、KIR3DL2 是目前已知的影响 NK 细胞同种异体反应性的主要抑制性受体^[1]。

NKG2D 是 1991 年 Houchins 等在 NK 细胞中发现的，NKG2D 除表达在所有 NK 细胞上外，在绝大多数 T 细胞、CD8⁺ T 细胞上也有表达^[4]。人 NKG2D 的配体分为两大类：第一类包括 MICA、MICB，属于非经典的 HLA-I 类基因，集中表达于胃肠道上皮细胞表面，在大多数上皮性肿瘤细胞如肺癌、乳腺癌、肾癌及卵巢癌、结肠癌肿瘤组织中也有表达。第二类人 NKG2D 配体由 ULBP1、ULBP2、ULBP3 组成，均带有 MHC 样 1、2 结构域，并通过糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定在细胞表面，其表达较广泛，可以表达于多种细胞、组织、肿瘤，是 NKG2D 发挥杀伤活性的主要配体。

研究表明，由于肿瘤细胞的 MHC-I 类分子丢失或变异，使得特异性 MHC 限制性的细胞毒 T 细胞

不能发挥作用,在这种情况下,识别非 MHC-I 类分子的 NKG2D 在介导 NK 细胞识别和溶解肿瘤细胞的免疫反应中发挥关键作用^[5]。NKG2D 通过与靶细胞表面诱导产生的相应配体结合,然后结合转接蛋白向 NK 细胞传递活化信号,使 NK 细胞获得攻击靶细胞的能力,另外还可能为 CD8⁺ T 细胞提供必要的协同刺激信号。在很大程度上 NKG2D 的活化决定了机体的抗肿瘤细胞免疫水平。

本研究表明 CNE2 细胞表达 MICA、MICB、ULBP2,不表达 ULBP1、ULBP3;CNE2 细胞表面 HLA-A、B、Cw 表型为 A2,24、B18,35、Cw4,7,不表达 Bw4、A3、A11 分子,因此 5 例健康个体体内表达 KIR3DL1、KIR3DL2 的 NK 细胞与 CNE2 细胞之间存在 KIR-配体错配现象。有研究表明 94% 个体表达 KIR3DL1、KIR3DL2 为 NK 细胞的框架基因,任意个体的 NK 细胞均表达 KIR3DL2^[6],因此任意个体的 NK 细胞均与 CNE2 细胞之间存在着 KIR-配体错配现象,结合 NKG2D 配体的检测结果表明任意个体的 NK 细胞都存在杀伤 CNE2 细胞的分子基础。本结果显示 NK 细胞对 CNE2 细胞有较高的杀伤活性,anti-MICA、anti-MICB、anti-ULBP2 均可不同程度地抑制 NK 细胞对 CNE2 的杀伤活性,说明 NKG2D 在 NK 细胞杀伤 CNE2 细胞中起主导作用。

K562 细胞不表达 HLA-I 类分子,因此任意个体的 NK 细胞都与之存在 KIR-配体错配现象,本研究结果表明 K562 细胞表达 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3。NK 细胞对 K562 细胞具有较高的杀伤活性,anti-MICA、anti-MICB、anti-ULBP1、anti-ULBP2、anti-ULBP3 均可不同程度地抑制 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性,说明 NK 细胞杀伤 K562 细胞通过 NKG2D 发挥作用。

研究表明^[7-9],肿瘤细胞表面 NKG2D 配体在体

内存在膜型和可溶性两种形式,可溶性 NKG2D 配体与 NKG2D 的结合可诱导 T、NK 细胞表面 NKG2D 的内化和降解,下调 NKG2D 表达,进而严重损害肿瘤抗原特异性 T 细胞效应,同时削弱 NK 细胞的活性,促进肿瘤免疫逃逸。鼻咽癌患者体内是否存在高浓度的可溶性 NKG2D 配体,能否作为患者的临床预后指标,值得我们进行进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Hsu KC, Keever Taylor CA, Wilton A, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes [J]. Blood, 2005, 105(12): 4878-4884.
- [2] 姜润德, 张立新, 岳文, 等. 人鼻咽癌顺铂耐药细胞系 (CNE2/DDP) 的建立及耐药相关基因的筛选 [J]. 癌症, 2003, 22(4): 337-345.
- [3] Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity [J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20(1): 217-251.
- [4] Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect [J]. Blood, 2002, 100(6): 1935-1947.
- [5] Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, et al. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing [J]. Immunity, 2002, 17(1): 19-29.
- [6] Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, et al. Alloreactive natural killer cells in mismatched hematopoietic stem cell transplantation [J]. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2004, 33(3): 216-221.
- [7] Song H, Kim J, Cosman D, et al. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression [J]. Cell Immunol, 2006, 39(1): 22-30.
- [8] Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, et al. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas [J]. J Hepatol, 2005, 43(6): 1013-1020.
- [9] Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, et al. Soluble MICA in malignant diseases [J]. Int J Cancer, 2006, 118(3): 684-687.

[编辑:周永红]