

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2006 )05-0349 -04

## 低表达 MICA/MICB 导致 NK 细胞对人鼻咽癌多药耐药细胞( CNE2/DDP ) 杀伤活性下降

梅家转,周 健,郭坤元,魏红梅( 南方医科大学 珠江医院血液科,广州 510282 )

[ 摘 要 ] **目的:** 探讨 HLA I 类分子及 MHC I 类链相关分子( MICA/MICB )在人鼻咽癌细胞株 CNE2 及多药耐药细胞株 CNE2/DDP 的表达及其对 NK 细胞杀伤活性的影响。**方法:** 流式细胞仪检测 CNE2 和 CNE2/DDP 细胞表面 HLA I 类分子和 MICA/MICB 的表达情况;LDH 释放法测定 3 例健康者的 NK 细胞在不同效靶比时对 CNE2、CNE2/DDP 细胞的杀伤活性;效靶比 10:1 时,用抗 HLA I 类分子单抗( W6/32 )和抗 MICA/MICB 单抗( BAMO-1 )分别封闭 HLA I 类分子和 MICA/MICB,观察 NK 细胞杀伤 CNE2、CNE2/DDP 细胞活性的变化。**结果:** CNE2/DDP 细胞表面 HLA I 类分子和 MICA/MICB 的表达均较 CNE2 细胞明显减少(  $P < 0.01$  )。NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞的杀伤活性在效靶比 5:1 时分别是(  $9.37 \pm 2.14$  )%、(  $4.37 \pm 0.63$  )%;效靶比 10:1 时分别是(  $27.14 \pm 1.82$  )%、(  $15.79 \pm 2.87$  )%;效靶比 20:1 时分别是(  $36.40 \pm 4.28$  )%、(  $26.20 \pm 4.18$  )%;效靶比 30:1 时分别是(  $54.67 \pm 2.80$  )%、(  $40.29 \pm 2.73$  )%。各效靶比时 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞的杀伤活性与 HLA I 类分子和 MICA/MICB 相关,NK 细胞对 CNE2/DDP 细胞的杀伤活性明显低于 CNE2 细胞(  $P < 0.01$  )。效靶比 10:1 时,W6/32 明显增强 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞的杀伤活性(  $P < 0.01$  ),BAMO-1 明显抑制 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞的杀伤活性(  $P < 0.01$  )。**结论:** HLA I 类分子和 MICA/MICB 在 CNE2、CNE2/DDP 的表达差异影响着 NK 细胞的杀伤活性,MICA/MICB 在多药耐药肿瘤细胞的低表达导致耐药肿瘤细胞对 NK 细胞杀伤敏感性下降。

[ 关键词 ] 鼻咽癌细胞;多药耐药细胞株;自然杀伤细胞;MHC I 类链相关分子 A/B;HLA I 类分子

[ 中图分类号 ] R739.62 [ 文献标识码 ] A

## Low expression of MHC class I-related chain A and B reduces NK cell-mediated lysis in nasopharyngeal carcinoma drug-resistant cell line CNE2/DDP

MEI Jia-zhuan, ZHOU Jian, GUO Kun-yuan, WEI Hong-mei ( Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510582, China )

[ Abstract ] **Objective:** To analyze the expression of HLA class I molecules and MHC class I related chain A and B ( MICA/MICB ) in human nasopharyngeal carcinoma cell line ( CNE2 ) and multi-drug resistant nasopharyngeal carcinoma cell line ( CNE2/DDP ), and to assess their influence on NK cell-mediated lysis. **Methods:** Expression of HLA class I molecules and MICA/MICB on the surface of CNE2 and CNE2/DDP cell lines was analyzed by flow cytometry. Cytotoxicity of NK cells ( isolated from 3 healthy persons ) against CNE2 and CNE2/DDP cells were detected by LDH releasing assay at different effect-to-target cell ratios ( E:T ). In blocking experiments, anti-MHC class I monoclonal antibody ( mAb ) ( W6/32, a pan anti-HLA class I antibody ) and anti-MHC class I chain related molecules mAb ( BAMO-1, specifically against MICA and MICB ) were added to the target cells at a E:T ratio of 10:1. **Results:** It was found that the expression of HLA class I molecules and MICA/MICB on CNE2 was higher than that on CNE2/DDP(  $P < 0.01$  ). Cytotoxicity of NK cells against CNE2 and CNE2/DDP cells was (  $9.37 \pm 2.14$  )% , (  $4.37 \pm 0.63$  )% at E:T ratio of 5:1, (  $27.14 \pm 1.82$  )% , (  $15.79 \pm 2.87$  )% at E:T ratio of 10:1, (  $36.40 \pm 4.28$  )% , (  $26.20 \pm 4.18$  )% at E:T ratio of 20:1, and (  $54.67 \pm 2.80$  )% , (  $40.29 \pm 2.73$  )% at E:T ratio of 30:1, respectively. NK cells displayed higher cytotoxicity against parental CNE2 cells than multi-drug resistant CNE2/DDP cells(  $P < 0.01$  ). Expression of HLA class I molecules and MICA/MICB on CNE2, CNE2/DDP cells was correlated with NK cell-mediated lysis. Blocking experiments confirmed that the killing of CNE2, CNE2/DDP cells was efficiently inhibited by BAMO-1, whereas efficiently increased by W6/32.

[ 作者简介 ] 梅家转( 1966- ),男,河南郑州市人,副主任医师,主要从事肿瘤生物治疗的研究

[ 通讯作者 ] 郭坤元, E-mail: gzuyan@pub. guangzhou. gd. cn

**Conclusion:** Low expression of MICA/MICB in multi-drug resistant tumor cell lines leads to reduction of their susceptibility to NK lysis.

**[ Key words ]** nasopharyngeal carcinoma; multi-drug resistant cell line; natural killer cells; major histocompatibility complex class I chain related molecules A/B ( MICA/MICB ); HLA class I molecule

[ Chin J Cancer Biother, 2006, 13( 5 ): 349 -352 ]

耐药肿瘤细胞的存在是恶性肿瘤治疗失败的主要原因,其主要涉及 3 个方面<sup>[1-2]</sup>: (1) 细胞膜 P-糖蛋白的过度表达及多药耐药相关蛋白和肺耐药相关蛋白的异常表达。(2) 酶系统的异常。(3) 抗凋亡基因 *bcl-2* 的高表达导致细胞凋亡的抑制。肿瘤耐药是多种机制共同作用的结果,不同的逆转剂或逆转方式只特异性针对某种或某几种机制的多药耐药,故限制了其在临床的应用。异基因骨髓移植中供者的同种反应性 NK 细胞介导的抗白血病效应可以防止白血病复发<sup>[3-5]</sup>。体外实验证实 NK 细胞能抑制慢性粒细胞白血病患者白血病 CD34<sup>+</sup> 细胞形成粒细胞巨噬细胞集落形成单位<sup>[6]</sup>,表明 NK 细胞对耐药的白血病细胞和白血病克隆形成细胞具有杀伤效应。NK 细胞对靶细胞的杀伤与其细胞表面的活化性受体和配体密切相关,靶细胞表面的 HLA I 类分子及 MHC I 类链相关基因产物 (MICA/MICB) 是影响 NK 细胞杀伤活性的主要分子<sup>[7]</sup>。本研究拟通过体外杀伤实验探讨 NK 细胞对人鼻咽癌亲本细胞株 CNE2 及其多药耐药细胞株 CNE2/DDP 的杀伤活性是否有差异,通过流式细胞仪技术探讨 HLA I 类分子及 MICA/MICB 在 CNE2、CNE2/DDP 细胞的表达是否有差异,并了解 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞的杀伤活性是否与 HLA I 类分子及 MICA/MICB 在 CNE2、CNE2/DDP 细胞的表达相关,为探讨耐药肿瘤细胞逃避免疫攻击的机制提供新的资料。

## 1 材料与方法

### 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 mmol/L EDTA, Miltenyi Biotec 公司), CD56 MicroBeads( Miltenyi Biotec 公司), 抗 MICA/MICB 单抗( BAMO-1, IgG1 )由德国 Alexander Steinle 教授惠赠,鼠抗人 HLA I 类分子单抗( W6/32, IgG2a )、FITC 标记的鼠抗人 HLA I 类分子单抗和 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG1( eBioscience 公司), RPMI 1640 ( 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( Promega 公司)。流式细胞仪( Coulter 公司)。人鼻咽癌亲本细胞株 CNE2 及其多药耐药细胞株 CNE2/DDP 购于军事医

学科学院李春海教授<sup>[8]</sup>, CNE2/DDP 细胞对 DDP 的耐药指数为 27.9, 对氟尿嘧啶及长春新碱的耐药指数分别为 227.9 和 55.5。

### 1.2 NK 细胞分离纯化

采用常规密度梯度离心法分离 3 例健康人外周血单个核细胞, PBS 洗涤 2 次, 计数细胞, CD56 MicroBeads 作 MACS 细胞阳性分选, 获得 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞, 流式细胞仪检测 CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞的纯度。

### 1.3 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 RPMI 1640。培养 NK 细胞时加入 1 000 U/ml 的 rhIL-2。

### 1.4 CNE2、CNE2/DDP 细胞表面人 HLA I 类分子和 MICA/MICB 的测定

收集对数期生长的 CNE2、CNE2/DDP 细胞, PBS 洗涤 2 次, 计数细胞, 分管。检测 HLA I 类分子时, 按每  $1 \times 10^6$  个细胞加入 1 μg W6/32, 4 °C 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 用流式细胞仪分析样本中  $1 \times 10^4$  个细胞中 HLA I 类分子阳性细胞数, 计算荧光标记阳性细胞的百分率。采用间接标记法检测 MICA/MICB 的表达, 加入 BAMO-1 一抗, 4 °C 作用 30 min, PBS 洗涤后再加 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG1 二抗, 4 °C 孵育 30 min, PBS 洗涤后上机分析。同型 IgG1( Pharmingen 公司) 作为阴性对照抗体。为减少误差, 重复实验 3 次。

### 1.5 NK 细胞杀伤活性测定

采用 4 h LDH 释放测定法, 参照 NK 细胞杀伤活性试剂盒说明书操作。抗体封闭实验采用效靶比 10:1 时, 用 10 μg/ml W6/32、BAMO-1 分别与靶细胞室温孵育 15 min, 封闭 MHC I 类分子及 MICA/MICB。然后再加入 NK 细胞测杀伤率。NK 细胞杀伤活性(%) = (实验组 D 值 - 靶细胞自然释放组 D 值 - 效应细胞自然释放组 D 值) / (靶细胞最大释放组 D 值 - 靶细胞自然释放组 D 值) × 100%

### 1.6 统计学处理

应用 SPSS10.0 软件进行数据处理, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用独立样本 *t* 检验。HLA I 类分子、MICA/MICB 分子的表达与 NK 细胞对靶细胞杀伤活性的相关性分析采用双变量相关分析 spearman 法。

## 2 结果

### 2.1 NK 细胞的纯度

流式细胞仪检测 3 例健康人外周血单个核细胞经 CD56 Micro Beads 阳性分选后 CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞的纯度为( 91.23 ± 0.85 )%。

### 2.2 CNE2、CNE2/DDP 细胞表面 HLA I 类分子和 MICA/MICB 的表达情况

CNE2、CNE2/DDP 细胞表面 HLA I 类分子的表达率分别为( 99.77 ± 0.12 )%、( 22.40 ± 2.61 )%，两者相比有非常显著性差异(  $P < 0.01$  )；MICA/MICB 的表达率分别为( 88.67 ± 2.81 )%、( 57.63 ± 1.33 )%，两者相比有非常显著性差异(  $P < 0.01$  )。

### 2.3 NK 细胞杀伤活性

LDH 法测定 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞的杀伤活性,在效靶比 5:1 时分别为( 9.37 ± 2.14 )%、( 4.37 ± 0.63 )%；效靶比 10:1 时分别为( 27.14 ± 1.82 )%、( 15.79 ± 2.87 )%；效靶比 20:1 时分别为( 36.40 ± 4.28 )%、( 26.20 ± 4.18 )%；效靶比 30:1 时分别为( 54.67 ± 2.80 )%、( 40.29 ± 2.73 )%。在各效靶比时 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性较 CNE2/DDP 细胞明显增强(  $P < 0.01$  ) (图 1)。效靶比 10:1 时 BAMO-1 封闭 MICA/MICB 后, NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞的杀伤活性分别为( 9.33 ± 0.89 )%、( 8.88 ± 0.47 )%，均较阻断前非常明显降低(  $P < 0.01$  ),阻断后 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞的杀伤活性无明显差异(  $P > 0.05$  )；W6/32 封闭 HLA I 类分子后, NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞杀伤活性为( 38.60 ± 1.08 )%、( 23.32 ± 2.01 )%，均较阻断前明显增强(  $P < 0.05$  ),封闭后 NK 细胞对 CNE2 细胞杀伤活性仍较 CNE2/DDP 细胞明显增强(  $P < 0.01$  ) (图 2)。

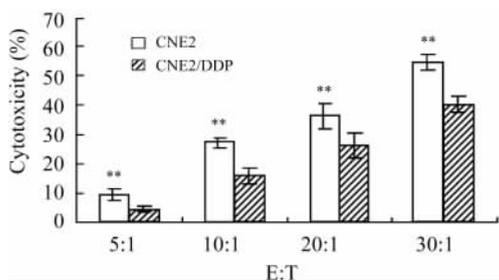


图 1 不同效靶比时 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 的杀伤活性

Fig. 1 Cytotoxicity of NK cell against CNE2 and CNE2/DDP cells at different E:T ratios

\*\*  $P < 0.01$  vs CNE2/DDP (  $n = 3$  )

### 2.4 HLA I 类分子、MICA/MICB 表达率与 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞杀伤活性的相关性分析

双变量相关分析结果表明,不同效靶比时 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞的杀伤活性与 HLA I 类分子、MICA/MICB 的表达均非常显著相关(  $P < 0.01$  )。

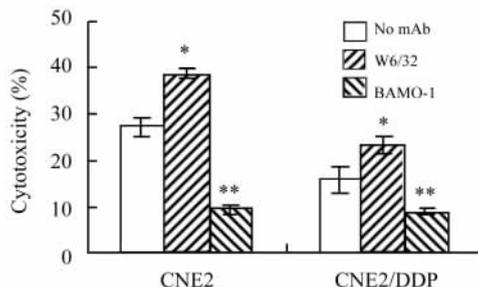


图 2 效靶比 10:1 时不同单抗对 NK 细胞杀伤 CNE2、CNE2/DDP 细胞的阻断作用

Fig. 2 Blocking experiments with different mAbs on CNE2 and CNE2/DDP cells at an E:T ratio of 10:1

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs No mAb

## 3 讨论

NK 细胞对靶细胞的杀伤活性受其表面的抑制性受体和活化性受体调节, 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,靶细胞表面缺乏 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<sup>[9]</sup>。肿瘤细胞常因 HLA I 类分子的改变或丢失导致 iKIR 无法向 NK 细胞传递抑制性信号,从而激活 NK 细胞而杀伤肿瘤细胞<sup>[10]</sup>。

NKG2D 是介导 NK 细胞杀伤活性的主要活化性受体,除表达在所有 NK 细胞上外,在绝大多数  $\gamma\delta$  T 细胞、CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta$  T 细胞上也有表达<sup>[11-12]</sup>。靶细胞表面的 MICA/MICB 分子是 NKG2D 的主要活化性配体,属于非经典的 HLA I 类基因产物<sup>[13]</sup>,编码基因位于第 6 号染色体短臂 HLA I 类区域, MICA/MICB 分子结构中包括 3 个膜外功能域(  $\alpha 1-3$  ), 1 个跨膜区和 1 个胞质内区,整个  $\alpha 1-3$  功能域氨基酸顺序排列同经典的 HLA I 链有 18% ~ 30% 的同源性。不同于经典 HLA I 类分子, MICA/MICB 分子结构内不含  $\beta 2$  微球蛋白,集中表达在胃肠道上皮细胞中,但在大多数上皮性肿瘤组织中如肺癌、乳腺癌、肾癌及卵巢癌、结肠癌等也有表达<sup>[14]</sup>。MICA/MICB 与受体 NKG2D 结合后可以激活 NK 细胞对表达 MICA/MICB 分子的肿瘤细胞的杀伤<sup>[15]</sup>。研究表明,肿瘤细胞的 MHC I 类分子丢失或变

异,使特异性 MHC 限制的细胞毒 T 细胞不能发挥作用,此时,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<sup>[12]</sup>。NKG2D 通过与靶细胞表面相应的配体结合,然后通过结合转接蛋白 DAP-10 传递活化信号,激活 NK 细胞获得攻击靶细胞的能力,另外还可能为 CD8<sup>+</sup>T 细胞提供必要的协同刺激信号<sup>[16]</sup>。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。

耐药肿瘤细胞表面 HLA I 类分子表达增高,导致对 NK 细胞的杀伤活性减弱<sup>[17]</sup>。本研究表明耐药肿瘤细胞表面 HLA I 类分子的表达减低,与 Sedlak 等<sup>[18]</sup>研究结果相同。NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞的杀伤活性与细胞表面的 HLA I 类分子的表达率相关,抗 HLA I 类分子单抗对 CNE2、CNE2/DDP 细胞表面 HLA I 类分子进行封闭可明显增强 NK 细胞的杀伤活性,说明 HLA I 类分子影响 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞杀伤活性。本研究对 MICA/MICB 的表达情况进行了检测,结果显示 CNE2 细胞表面 MICA/MICB 的表达较 CNE2/DDP 细胞明显增强,杀伤实验显示 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性较 CNE2/DDP 细胞增强,相关分析亦表明不同效靶比时 NK 细胞的杀伤活性与 MICA/MICB 的表达率均相关,抗 MICA/MICB 单抗可不同程度地抑制 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 的杀伤活性,说明 MICA/MICB 是影响 NK 细胞对 CNE2、CNE2/DDP 细胞杀伤差异的重要分子。

耐药肿瘤细胞 MHC I 类分子低表达,使得特异性 MHC 限制的细胞毒 T 细胞不能发挥作用,同时耐药肿瘤细胞表面 MICA/MICB 的低表达导致 NK 细胞对其杀伤活性下降。本研究为阐明耐药肿瘤细胞逃避免疫攻击的机制提供了新的资料,将有助于进一步研究提高免疫效应细胞杀伤多药耐药肿瘤细胞的方法。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Perez-Tomas R. Multidrug resistance: Retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment [ J ]. *Curr Med Chem*, 2006, 13( 16 ): 1859-1876.

[ 2 ] 狄岩, 张明, 姜达. 肿瘤化疗多药耐药性的分子机制及其干预 [ J ]. *临床荟萃*, 2005, 20( 8 ): 476-478.

[ 3 ] 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.

[ 4 ] Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, *et al*. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors [ J ]. *Blood*, 2003, 102( 3 ): 814-819.

[ 5 ] Igarashi T, Wynberg J, Srinivasan R, *et al*. Enhanced cytotoxicity

of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand and incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells [ J ]. *Blood*, 2004, 104( 1 ): 170-177.

- [ 6 ] Sconocchia G, Lau M, Provenzano M, *et al*. The antileukemia effect of HLA-matched NK and NK-T cells in chronic myelogenous leukemia involves NKG2D target-cell interactions [ J ]. *Blood*, 2005, 106( 10 ): 3666-3672.
- [ 7 ] Coudert JD, Held W. The role of the NKG2D receptor for tumor immunity [ J ]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16( 5 ): 333-343.
- [ 8 ] 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.
- [ 9 ] Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity [ J ]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20( 1 ): 217-251.
- [ 10 ] Carbone E, Neri P, Mesuraca M, *et al*. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells [ J ]. *Blood*, 2005, 105( 1 ): 251-258.
- [ 11 ] Houchins JP, Yabe T, McSherry C, *et al*. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells [ J ]. *J Exp Med*, 1991, 173( 4 ): 1017-1020.
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] 马凌娣, 蒋纪恺. 自然杀伤细胞受体家族 NKG2D 研究进展 [ J ]. *国外医学: 生理、病理科学与临床分册*, 2003, 23( 4 ): 425-427.
- [ 14 ] Groh V, Rhinehart R, Sechrist H, *et al*. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gd T cells of MICA and MICB [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96( 12 ): 6879-6884.
- [ 15 ] Pende D, Rivera P, Marcenaro S, *et al*. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: Analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity [ J ]. *Cancer Res*, 2002, 62( 21 ): 6178-6186.
- [ 16 ] Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U, *et al*. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses *in vivo* [ J ]. *Immunol*, 2005, 175( 2 ): 720-729.
- [ 17 ] Classen CF, Falk CS, Friesen C, *et al*. Natural killer resistance of a drug-resistant leukemia cell line, mediated by up-regulation of HLA class I expression [ J ]. *Haematologica*, 2003, 88( 5 ): 509-521.
- [ 18 ] Sedlak J, Hunakova L, Sulikova M, *et al*. Protein kinase inhibitor-induced alterations of drug uptake, cell cycle and surface antigen expression in human multidrug-resistant ( Pgp and MRP ) promyelocytic leukemia HL-60 cells [ J ]. *Leuk Res*, 1997, 21( 5 ): 449-458.

[ 收稿日期 ] 2006-06-28

[ 修回日期 ] 2006-09-06

[ 本文编辑 ] 郁晓路