

[文章编号] 1007-385X(2007)05-0000-

人类自然杀伤细胞活化性配体 ULBPs 的表达与调控

Expression and reulation of ULBPs, a human active ligand of the NKG2D receptor

商平平¹综述;张彩^{1,2*}审阅(1. 山东省医学科学院基础医学研究所,济南 250062; 2. 山东大学药学院免疫药理学与免疫治疗研究所,济南 250012)

[摘要] 人类自然杀伤细胞活化性配体 UL16 结合蛋白(UL16-binding proteins, ULBPs)家族至少由 6 个成员组成,其中 ULBP1、ULBP2、ULBP3(UL16-binding protein 1-3)分子含有 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域,通过糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)与细胞膜相连。ULBP4(UL16-binding protein 4)分子含有跨膜和胞质结构域。正常组织中广泛表达 ULBPs。T 淋巴细胞瘤、结肠癌、卵巢癌等肿瘤细胞表面也有 ULBPs 的高表达。化学药物、细胞因子、细菌和病毒感染等众多因素都可以调控 ULBPs 的表达,其中紫外线辐射、化疗药物等诱发的 DNA 损伤反应可以活化 3-磷脂酰肌醇激酶家族类成员(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)或(ataxia-telangiectasia and Rad3-related, ATR)激酶,进一步活化下游的 Chk1、Chk2 节点激酶和其他的凋亡相关分子,从而诱导 ULBPs 的表达,引起肿瘤细胞的生长周期停滞,诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。另外,ULBP1 启动子中 CRE1 位点活化也是上调 ULBP1 转录和表达的关键因素。对 ULBPs 表达与调控因素进一步深入探讨将为阐明肿瘤逃逸机制、寻求抗肿瘤有效药物提供新的作用靶点和思路。

[关键词] 人类自然杀伤细胞; ULBPs; 活化性受体; 活化性配体; 抗肿瘤

[中图分类号] R392.12 **[文献标识码]** A

人类自然杀伤(nature killer cells, NK)细胞在早期免疫监视中发挥重要作用,是机体抵御病毒清除肿瘤细胞的第一道防线^[1,2]。NK 细胞杀伤功能的实现受活化性和抑制性信号的平衡调节,其中以活化性受体 NKG2D 与配体 MHC I 类相关分子(MHC class I-related molecules, MICs)和 UL16 结合蛋白(UL16-binding proteins, ULBPs)相互作用所介导的活化信号最为关键。NKG2D 可以在肿瘤细胞表达正常水平 MHC I 类分子的情况下,阻抑抑制性信号的抑制作用,活化 NK 细胞,直接对肿瘤细胞进行杀伤^[3-6]。对 NK 细胞活化性配体 MICs 和 ULBPs 的研究发现,两者在许多病毒感染和恶性肿瘤细胞表面都表达上调,是重要的压力诱导蛋白^[7-8]。许多生物活性因子都可以通过上调细胞表面 ULBPs 分子的表达,增强感染细胞对 NK 细胞的杀伤敏感性^[9-10]。深入探讨 ULBPs 分子的表达和调控机制将为肿瘤的生物治疗提供新的启示。

1 ULBPs 的结构特点

NK 细胞活化性受体 NKG2D 的配体包括 MHC I 类分子相关蛋白 A/B(major histocompatibility complex class I chain-related protein, MICA/B)和 ULBPs, 其中 MICA/B 是最早被发现与 NKG2D 结合的配体。MIC 基因具有高度多态性,其基因座位有 7 个成员基因,其中只有 MICA、MICB 编码、转录和表达产物,但功能尚不清楚。

ULBPs 家族至少由 6 个成员组成,其编码基因位于人类第 6 号染色体 6q24. 2-q25. 3 之间^[11-13]。对

ULBPs 进行氨基酸序列分析发现, ULBP1、ULBP2、ULBP3 分子中有 55% ~ 60% 的氨基酸序列相同,具有很高的同源性。新发现的 ULBP4 分子在氨基酸序列上与 ULBP3 相似,与 ULBP1 和 ULBP2 却有很大差异性。将 ULBPs 与 MICs 比较,两者的同源性较低,但有趣的是在共有的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域中有 20% 的氨基酸残基高度保守。

ULBPs 家族的 ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4 分子都含有 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域,缺乏 $\alpha 3$ 结构域。ULBP1、ULBP2、ULBP3 分子不含跨膜结构域,只能通过 GPI 与细胞膜相连。ULBP4 与 MICs 分子相似,两者都含有跨膜和胞质结构域,不同之处在于 ULBP4 分子缺乏 $\alpha 3$ 结构域,因而不能像 MICs 分子那样与 $\beta 2$ 微球蛋白结合^[12]。各 ULBPs 分子与受体 NKG2D 的亲合力不同, ULBP2 与 NKG2D 的亲合力最强, ULBP3 的亲合力最弱。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30371302, 30471527);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(No. 2005BS03015);中国博士后基金资助项目(No. 20060390309);山东省博士后基金资助项目(No. 200603071)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30371302, 30471527); the Distinguished Young Scientists Foundation of Shandong Province (No. 2005BS03015); the National Postdoctoral Research Foundation of China (No. 20060390309), the Postdoctoral Research Foundation of Shandong Province(No. 200603071)。

[作者简介] 商平平(),女,山东省烟台人,硕士,主要从事肿瘤免疫学和天然免疫调节方面的研究

* Corresponding author. E-mail: caizhangsd@yahoo. com. cn

2 ULBPs 的表达

MICs 家族在大多数正常组织中不表达,只有在肠上皮或病毒感染细胞、肿瘤细胞表面才表达。与 MICs 不同,ULBP1、ULBP2、ULBP3 分子的转录在许多正常组织中都能够检测到^[12-14]。心肌、脑、肝脏、睾丸、淋巴结、胸腺、扁桃体、骨髓等组织中广泛表达 ULBPs,在胎儿的心肌、脑、肺和肝脏中也有 ULBPs 表达。ULBP4 分子的表达有明显的限制性,它主要分布于皮肤、睾丸、呼吸道气管和小肠的上皮中。此外,不同细胞 ULBPs 的表达水平也并不一致。B 细胞高表达 ULBP1、ULBP2、ULBP3 分子,而 T 细胞和 NK 细胞则不表达这 3 种分子;红细胞不表达 ULBP1、ULBP2、ULBP3;血小板 ULBP2 的表达水平较高,而 ULBP1、ULBP3 的表达较低;单核细胞和粒细胞高表达 ULBP1,低表达 ULBP2。

在肿瘤细胞中,T 淋巴细胞瘤表面高表达 ULBP1 和 ULBP2^[14-15];结肠癌、卵巢癌、宫颈癌等细胞表面高表达 ULBP2 和 ULBP3;黑色素瘤患者淋巴结内成熟的 CD83 阳性树突细胞表面也有 ULBP1 的表达上调^[16]。细胞内 ULBPs 的转录水平与膜蛋白的表达水平并不完全一致,在 Raji 肿瘤细胞中虽然可以检测到高水平的 ULBP mRNA 转录,但在细胞表面却检测不到 ULBPs 分子的表达。

3 影响 ULBPs 表达的因素

化学药物能明显上调 ULBPs 分子的表达。研究发现,肿瘤细胞分化诱导剂维甲酸能够上调鼠 MHC 相关分子 RAE-1 的表达^[17]。为了观察它是否对 ULBPs 表达有影响,将慢性淋巴细胞白血病(B-cell chronic lymphocytic leukemia, B-CLL)患者给予维甲酸处理,发现在处理后 20 min ULBP3 mRNA 的量增加了 2 倍,40 min 后 ULBP3 mRNA 的转录达到最高峰,为原来的 4 倍。但处理前后都没有发现其他 3 种 ULBPs 分子的转录。进一步体外分离 B-CLL 患者的 B 细胞,检测到很低的 ULBP3 表达;反式维甲酸处理后,ULBP3 的表达水平在 2~3 d 内达到最高峰。

细胞因子也参与 ULBPs 分子的表达调控^[9-10]。IFN- γ 是一种重要的细胞因子,它可以明显上调单核细胞和白血病细胞表面 ULBP1 分子的表达。另有研究表明 ULBP2 和 ULBP3 的表达不受 IFN- γ 及 IFN- α 、IL-1 β 、TNF- α 、LPS 等单核细胞活化因子的影响。细菌和病毒感染也能够影响 ULBPs 分子的表达。绿铜假单胞菌的分泌物可以直接刺激人支气管上皮细胞 NKG2D 配体的表达^[18]。体外实验证明,感染绿铜假单胞菌素 24 h 后,ULBP2 的表达水平明显增加。NK 细

胞通过 NKG2D 受体与感染细胞结合杀伤病原体,并通过释放 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、NO 等细胞因子和生物活性剂杀伤感染细胞。这一受体配体介导的杀伤效应并不依赖于巨噬细胞的吞噬作用。当机体感染人巨细胞病毒时,病毒自身编码的糖蛋白 UL16 通过胞外区与 ULBPs 结合,使 UL16 和 ULBPs 组成复合体稳定滞留于内质网和高尔基体中^[19-21],导致 ULBPs 蛋白的转运发生阻抑,不能由内质网转运到细胞内进而表达于感染细胞表面,不能与 NKG2D 结合,发挥 NK 细胞介导的杀伤作用。此外,其他许多病毒也都有逃逸 NK 细胞杀伤作用的机制。人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV-1)感染患者中 HIV-1 Nef 可以下调 MICA、ULBP1、ULBP2 的表达,对后者的作用更为强大^[22]。实验证明,在 HIV-1 野生型病毒感染细胞表面 NKG2D 配体的表达较 HIV-1 Nef 缺陷型病毒感染细胞明显升高。对 Nef 进行突变分析发现,NKG2D 配体的下调是一种结构性需求,Nef 的表达改变了对 NK 细胞的识别,降低了感染细胞对 NK 细胞的杀伤敏感性,是病毒逃逸机体天然免疫监视的有利途径。

细胞的分化状态也影响 ULBPs 的表达^[23]。ULBPs 的表达量与造血细胞的分化程度呈正相关,分化程度越高 ULBPs 的表达量越大。在正常人类骨髓中,早期 CD43 阳性的骨髓前体细胞不表达 ULBPs,随着细胞的分化成熟,骨髓前体细胞获得 CD33、CD14 分子后开始表达 ULBPs。与此类同,在生长因子诱导的 CD34 阳性的骨髓细胞分化过程中也伴随着 ULBPs 表达的增加。急性淋巴细胞白血病(acute myelogenous leukemia, AML)细胞表面 ULBPs 分子的密度与造血细胞的分化阶段密切相关,在分化较好的单核细胞白血病 M5 型和巨核细胞白血病 M7 型中,表达 ULBPs 的阳性集落较多;而分化较差的 M1-M4 型白血病中,ULBPs 的表达呈阴性或低表达。

4 调控 ULBPs 表达的分子机制

目前已经观察到许多因素可以影响 NKG2D 配体的转录与表达,但一直以来对于调控其表达的分子机制的研究甚少。通过比较各种 NKG2D 配体中启动子区域和 5'UTR 序列的差异,研究者发现,启动子可能在这一转录调控过程中起关键作用^[24]。尽管从整体角度来看,各启动子中转录因子结合位点序列有部分的相似性,但都共有一个相同的碱性核蛋白(BNC)结合区域,碱性核蛋白是一种广泛存在于复层鳞状上皮细胞的基底层转录因子,当上皮细胞发生恶变时出现高表达。启动子中其他转录结合位点碱基序列的改变,尤其是那些启动子中位置保守的基因位点的改变会影响蛋白的表达,最终导致功能的改变。例如,热休

克蛋白(hot shock protein, HSP)在发生休克时被激活;当内质网中出现较多未折叠的蛋白时活化转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)位点发生活化,骨髓锌指蛋白1位点(myeloid zinc finger protein 1, MZF1)是一种可以被维甲酸诱导的转录结合位点,对于调节造血系统有重要作用。

最新研究^[25]发现,ULBP_s的最小启动子由一个标准的TATA盒、3个GC盒、1个重叠的GC(4)/AP-2 α 序列、2个CRE样序列CRE1和CRE2及1个NF-B结合位点构成。ULBP1转录与最小启动子中CRE1位点的活化密切相关。在Hela和HEK293及其他一些细胞系中,与启动子CRE1位点结合的SP1和SP3转录因子可以明显增强启动子活性,上调ULBP1的表达。

SP1和SP3是细胞内普遍表达的转录活化因子,具有高度保守的DNA结合锌指结构域,其结合位点的突变和缺失严重影响ULBP1分子的转录。同时SP3的过度表达也降低自身对ULBP1启动子的反式激活作用。SP1和SP3与GC盒有相同的亲和力,有人预想两者具有相同的功能属性;利用SP1或SP2敲除鼠,对其进行功能分析发现,这两种活化因子的作用并不完相同;在SP3中存在抑制性结构域,这就与单纯的活化因子SP1不同,它具有活化或抑制双重作用。

SP3的转录调控机制很复杂,它至少含有4种类似物。其中短类似物因为缺乏反式激活结构域,处于失活或活性较弱状态;而长类似物则是强大的ULBP1转录活化因子,转录活性是ULBP1启动子的500倍。因此,SP3的型别和SP1与SP3的相对水平直接影响ULBP1的表达调控。其他因素也可以通过调节SP3的活性间接影响ULBP1分子的转录。通过SUMO化方法对SP3中的抑制性结构域进行处理,导致SP3失活。强大的组蛋白乙酰化活化剂P300可以直接乙酰化SP3,促进它的转录活性。HDAC1和HDAC2则相反,能够使SP3去乙酰化,抑制转录活性。

AP-2 α 是含有保守的DNA结合蛋白结构域螺旋-环-螺旋的转录抑制因子,由AP-2 α 、AP-2 β 、AP-2 γ 组成。AP-2 α 结合于Hela细胞的GC/AP-2位点,这些位点的突变和AP-2 α 、AP-2 β 、AP-2 γ 过度表达将通过DNA依赖或非依赖的方式抑制ULBP1分子的转录。

另外,紫外线辐射、DNA损伤剂、DNA合成抑制剂等诱发的DNA损伤可以激活DNA损伤反应通路^[26-29],对于维持基因的完整性、抑制肿瘤生长、调节细胞周期起着举足轻重的作用。研究证明,离子辐射、紫外线照射、热休克、缺氧状态、化疗药物等能够明显上调小鼠癌基因转化细胞和肿瘤细胞表面ULBP_s分子的表达^[29],其机制为DNA损伤剂和DNA合成抑制剂诱发的DNA损伤反应能够活化ATM或ATR激酶,

进而活化下游的节点激酶Chk2、Chk1和其他的凋亡相关分子P53等,从而诱导ULBP_s的表达,引起肿瘤细胞的生长周期停滞,诱导细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。

5 结 语

目前,对NK细胞活化型配体MIC_s的研究较多,已从分子结构、表达、调控机制等多个层面进行了分析。但对ULBP_s的研究还不深入,尤其对调控ULBP_s转录和表达的机制研究甚少,仍有很多问题有待解决。如IL-21可以增强鼠内源型配体H60和RAE-1的表达,是否对人ULBP_s的表达有影响;部分化学药物下调NKG2D配体表达的分子机制是什么?恶性转化细胞形成过程中影响ULBP_s表达的调节因素有哪些?肿瘤细胞ULBP_s转录和表达量不一致的原因是什么?等等。进一步对ULBP_s的结构、表达、调控因素进行探讨将为阐明肿瘤逃逸机制和寻求抗肿瘤、抗病毒的有效药物提供新的作用靶点和思路。

[参考文献]

- [1] Smyth MJ, Swann J, Cretney E, *et al.* NKG2D function protects the host from tumor initiation[J]. *J Exp Med*, 2005, 202(5): 583-588.
- [2] Radaev S, Kattah M, Zou Z, *et al.* Making sense of the diverse ligand recognition by NKG2D[J]. *J Immunol*, 2002, 169(11): 6279-6285.
- [3] Vivier E, Tomasello E, Paul P, *et al.* Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition [J] ? *Curr Opin Immunol*, 2002, 14(3): 306-311.
- [4] Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, *et al.* UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells[J]. *J Immunol*, 2002, 168(2): 671-679.
- [5] Eleme K, Taner SB, Onfelt B, *et al.* Cell surface organization of stress-inducible proteins ULBP and MICA that stimulate human NK cells and T cells via NKG2D[J]. *J Exp Med*, 2004, 199(7): 1005-1010.
- [6] Maghazachi AA. Insights into seven and single transmembrane-spanning domain receptors and their signaling pathways in human natural killer cells[J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(3): 339-357.
- [7] Long EO, Rajagopalan S. Stress signals activate natural killer cells [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(11): 1399-1402.
- [8] Bahram S, Inoko H, Shiina T, *et al.* MIC and other NKG2D ligands: from none to too many[J]. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17(5): 505-509.
- [9] 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.
- [10] Bui JD, Carayannopoulos LN, Lanier LL, *et al.* IFN-dependent down-regulation of the NKG2D ligand H60 on tumors[J]. *J Immunol*, 2006, 176(2): 905-1013.

- [11] Bacon L, Eagle RA, Meyer M, *et al.* Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D[J]. *J Immunol*, 2004, 173(2): 1078-1084.
- [12] Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, *et al.* ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(1): 129-135.
- [13] Cao W, He W. UL16 binding proteins[J]. *Immunobiology*, 2004, 209(3): 283-290.
- [14] Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, *et al.* NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(2): L222-231.
- [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] Schrama D, Terheyden P, Otto K, *et al.* Expression of the NKG2D ligand UL16 binding protein-1 (ULBP-1) on dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(1): 65-72.
- [17] Poggi A, Venturino C, Catellani S, *et al.* Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 9172-9179.
- [18] Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, *et al.* The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(5): 2578-2586.
- [19] Dunn C, Chalupny NJ, Sutherland CL, *et al.* Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity[J]. *J Exp Med*, 2003, 197(11): 1427-1439.
- [20] Rolle A, Mousavi-Jazi M, Eriksson M, *et al.* Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein[J]. *Immunol*, 2003, 171(2): 902-908.
- [21] Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, *et al.* ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor[J]. *Immunology*, 2001, 14(2): 123-133.
- [22] Cerboni C, Neri F, Casartelli N, *et al.* Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity[J]. *J Gen Virol*, 2007, 88(1): 242-250.
- [23] Nowbakht P, Ionescu MC, Rohner A, *et al.* Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias[J]. *Blood*, 2005, 105(9): 3615-3622.
- [24] Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, *et al.* Regulation of NKG2D ligand gene expression[J]. *Hum Immunol*, 2006, 67(3): 159-169.
- [25] Lopez-Soto A, Quinones-Lombrana A, Lopez-Arbesu R, *et al.* Transcriptional regulation of ULBP1, a human ligand of the NKG2D receptor[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(41): 30419-30430.
- [26] Kim JY, Son YO, Park SW, *et al.* Increase of NKG2D ligands and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity of tumor cells by heat shock and ionizing radiation[J]. *Exp Mol Med*, 2006, 38(5): 474-484.
- [27] Gasser S, Raulet D. The DNA damage response, immunity and cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16(5): 344-347.
- [28] Gasser S, Raulet DH. The DNA damage response arouses the immune system[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(8): 3959-3962.
- [29] Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, *et al.* The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor[J]. *Nature*, 2005, 436(7054): 1186-1190.
- [收稿日期] 2007 - 06 - 12 [修回日期] 2007 - 08 - 20
[本文编辑] 郁晓路