

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.03.002

## 分子靶向药物诱导耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达

黄宇贤<sup>1</sup>, 王 杨<sup>2</sup>, 李玉华<sup>1</sup>, 宋朝阳<sup>1</sup>, 陈锦章<sup>3</sup>, 贺艳杰<sup>1</sup>, 周雪云<sup>1</sup>, 郭坤元<sup>1</sup>(1. 南方医科大学珠江医院血液科, 广东广州 510282; 2. 广东省人民医院肺癌研究所, 广东广州 510080; 3. 南方医科大学南方医院肿瘤中心, 广东广州 510515)

**[摘要]** 目的: 探讨不同分子靶向药物对高表达与低表达 ATP 结合转运蛋白 G 超家族成员 2( ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2) 的人耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞(分别简称为 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP) 表面 NKG2D 配体( natural killer group 2 member D ligands, NKG2DLs) 表达的诱导作用及其对 NK 细胞杀伤敏感性的影响。方法: 免疫磁珠法分选 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP、ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞及 NK 细胞。流式细胞术检测分选细胞的纯度和不同分子靶向药物(硼替佐米、索拉非尼、舒尼替尼) 处理前后 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达率。LDH 释放法检测不同药物处理前后 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性。结果: ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞表面 ABCG2 的表达率分别为(91.40 ± 2.32)% 和(1.70 ± 0.24)%。分选后 NK 细胞中 CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 细胞的比例达 90% 以上。药物处理前, ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2 和 ULBP3 呈弱表达; 经不同分子靶向药物处理后, 5 种 NKG2DLs 的表达率均明显上升( *P* < 0.01 ), 以舒尼替尼处理后 NKG2DLs 的表达率升高最明显。随着 NKG2DLs 表达的上调, ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性也随之升高。结论: 不同分子靶向药物可诱导耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达, 以舒尼替尼的诱导作用最强, 且肿瘤细胞 NKG2DLs 的表达与其对 NK 细胞杀伤敏感性之间存在线性关系。**[关键词]** 分子靶向药物; 三磷酸腺苷( ATP) 结合转运蛋白 G 超家族成员 2( ABCG2 ); 鼻咽癌细胞株; NKG2D 配体; 自然杀伤细胞

[中图分类号] R730.54; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)03-0250-06

## Molecular targeted agents induce NKG2DLs expressions in multidrug resistant nasopharyngeal carcinoma CNE2/DDP cells

HUANG Yu-xian<sup>1</sup>, WANG Yang<sup>2</sup>, LI Yu-hua<sup>1</sup>, SONG Chao-yang<sup>1</sup>, CHEN Jin-zhang<sup>3</sup>, HE Yan-jie<sup>1</sup>, ZHOU Xue-yun<sup>1</sup>, GUO Kun-yuan<sup>1</sup>(1. Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China; 2. Lung Cancer Institute, Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong, China; 3. Department of Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate molecular targeted agent-induced expressions of natural killer group 2 member D ligands ( NKG2D ligands, NKG2DLs ) in multidrug resistant nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2/DDP with high or low ATP-binding cassette superfamily G member 2 expression ( ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP cells or ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells ) and its effects on their cytotoxic sensitivities to NK cells. **Methods:** ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP cells, ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells and NK cells were isolated by magnetic activated cell sorting. Purity of the isolated cells and expression rates of NKG2DLs on ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP and ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells before and after treatment with different molecular targeted agents ( bortezomib, sorafenib, sunitinib ) were examined by flow cytometry ( FCM ). Cytotoxic sensitivities of ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP and ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells were measured by LDH releasing assay. **Results:** Expression rates of ABCG2 on ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP and ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells were ( 91.40 ± 2.32 )% and ( 1.70 ± 0.24 )% ,

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目( No. 30973454 ); 广东省自然科学基金重点项目( No. 9251051501000007 )。Project supported by the National Natural Science Foundation of China ( No. 30973454 ), and the Key Program of Natural Science Foundation of Guangdong Province ( No. 9251051501000007 )

**[作者简介]** 黄宇贤( 1980 - ), 男, 广东省揭阳市人, 博士, 南方医科大学附属珠江医院细胞治疗中心负责人, 主要从事 NK 细胞受、配体调控和肿瘤免疫调控相关研究, E-mail: hyx6610@163.com

**[通信作者]** 郭坤元( GUO Kun-yuan, corresponding author ), E-mail: gzyuan@pub.guangzhou.gd.cn

respectively. More than 90% of the isolated NK cells were CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells. Expressions of 5 types of NKG2DLs (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 and ULBP3) on untreated ABCG2<sup>high</sup>CNE2/DDP and ABCG2<sup>low</sup>CNE2/DDP cells were relatively low, but their expressions were significantly up-regulated after treatment with different molecular targeted agents (bortezomib, sorafenib, sunitinib), with the highest NKG2DLs expressions found in the sunitinib-treated group cells. In addition, cytotoxic sensitivities of ABCG2<sup>high</sup>CNE2/DDP and ABCG2<sup>low</sup>CNE2/DDP cells to NK cells were increased with the up-regulated expressions of NKG2DLs. **Conclusion:** Different molecular targeted agents can up-regulate NKG2DLs expressions in human multidrug resistant nasopharyngeal carcinoma cells, with sunitinib showing the highest induction ability. A linear correlation exists between NKG2DLs expressions and tumor cell cytotoxic sensitivities to NK cells.

[ **Key words** ] molecular targeted agent; ATP-binding cassette superfamily G member 2 (ABCG2); nasopharyngeal carcinoma cell line; natural killer group 2 member D ligands (NKG2DLs); natural killer cell

[ Chin J Cancer Biother, 2010, 17(3): 250-255 ]

肿瘤细胞产生多药耐药(multidrug resistance, MDR)以及肿瘤干细胞的存在是化疗失败和肿瘤复发的主要原因,而三磷酸腺苷(ATP)结合转运蛋白G超家族成员2(ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)是介导肿瘤细胞多药耐药的主要跨膜蛋白,同时也可能是肿瘤干细胞的潜在标志<sup>[1-2]</sup>。随着新型分子靶向药物的出现,分子靶向治疗越来越受到重视,并且成为治疗耐药性和复发性肿瘤的一种新方法。硼替佐米(bortezomib)是第一个用于临床的蛋白酶体抑制剂,通过特异性阻断泛素-蛋白酶体通路抑制肿瘤细胞生长,对多发性骨髓瘤、淋巴瘤和其他类型实体瘤有一定疗效<sup>[3]</sup>。索拉非尼(sorafenib)和舒尼替尼(sunitinib)是多靶点小分子蛋白激酶抑制剂,能阻断VEGFR和Raf/MEK/ERK信号通路,抑制血管生成和肿瘤细胞增殖<sup>[4-6]</sup>。研究<sup>[7-12]</sup>显示,在NK细胞治疗之前,用低剂量分子靶向药物(硼替佐米、利妥昔单抗)预处理肿瘤细胞,能诱导肿瘤细胞表达NKG2D配体(natural killer group 2 member D ligands, NKG2DLs),激活NK细胞的杀伤活性。但是分子靶向药物舒尼替尼、索拉非尼等能否诱导肿瘤细胞表达NKG2DLs的研究甚少。

本研究用不同分子靶向药物处理高、低表达ABCG2耐药鼻咽癌细胞株CNE2/DDP,探讨分子靶向药物对CNE2/DDP细胞NKG2DLs表达的诱导作用及其效应,为分子靶向药物联合NK细胞治疗耐药鼻咽癌提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及细胞

PE标记的鼠抗人ABCG2单抗购自eBioscience公司,抗PE免疫磁珠和CD56磁珠购自Miltenyi Biotec公司,抗NKG2DLs(包括抗MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3)购自RD公司,MTT购自

Sigma公司,RPMI 1640购自Gibco公司。杀伤活性检测试剂盒购自Promega公司。硼替佐米购自西安杨森公司,舒尼替尼购自辉瑞公司,索拉非尼购自拜耳公司。舒尼替尼和索拉非尼用DMSO溶解,用不含血清的RPMI 1640稀释,使DMSO终体积分数为0.1%<sup>[13]</sup>。耐药人鼻咽癌细胞株CNE2/DDP购于军事医学科学院,用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素和3 μmol/L顺铂(cisplatin, DDP)的RPMI 1640培养基,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱中培养。实验中所用细胞均处于对数生长期。

### 1.2 高表达与低表达ABCG2分子的CNE2/DDP细胞和NK细胞的分离及鉴定

高表达与低表达ABCG2分子的CNE2/DDP细胞的分离纯化:收集CNE2/DDP细胞,PBS洗涤2次,计数细胞,重悬于PBS中。按1×10<sup>6</sup>/ml细胞加0.5 μg PE标记的鼠抗人ABCG2单抗,4℃孵育30 min。离心,弃上清,重悬,每1×10<sup>7</sup>/ml细胞加入20 μl抗PE免疫磁珠,用流式细胞仪分选高表达ABCG2的CNE2/DDP细胞(ABCG2<sup>high</sup>CNE2/DDP)和低表达ABCG2的CNE2/DDP细胞(ABCG2<sup>low</sup>CNE2/DDP)。

NK细胞的分选:取3例青年健康志愿者的外周血,采用常规密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,PBS洗涤2次,计数细胞,用CD56磁珠做阳性分选,用流式细胞仪检测分选后NK细胞中CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞的比例。

### 1.3 LDH释放法检测NK细胞杀伤活性

收集ABCG2<sup>high</sup>CNE2/DDP和ABCG2<sup>low</sup>CNE2/DDP细胞,分为未处理组、索拉非尼组(加入1 mol/L索拉非尼)、硼替佐米组(加入100 ng/ml硼替佐米)和舒尼替尼组(加入1 μmol/L舒尼替尼)。各组细胞经相应药物处理24 h后,用含5%胎牛血清的RPMI 1640调整细胞至1×10<sup>5</sup>/ml,加于96孔板

中,每孔 50  $\mu$ l。新鲜分选的 NK 细胞为效应细胞,按不同效靶比(10:1、20:1)分别加入不同数量的效应细胞各 50  $\mu$ l,各组均设 3 个复孔。细胞置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h 后离心,取 50  $\mu$ l 上清加入 96 孔平底酶标板中,加入 50  $\mu$ l LDH 底物反应液,室温放置 30 min,每孔再加入 50  $\mu$ l 反应终止液。酶标仪上波长 490 nm 处以空白组为基准测光密度(*D*)值。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) $\times$ 100%。

1.4 流式细胞术检测不同药物处理前后 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达

收集经不同药物处理的 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞,PBS 洗涤 2 次,计数细胞,按 1  $\times$  10<sup>6</sup>/100  $\mu$ l 细胞加入 2  $\mu$ g 鼠抗人 NKG2DLs 单抗(抗 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3),4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次,加入 PE 标记的羊抗鼠单抗,同型 IgG1 作为阴性对照抗体,4  $^{\circ}$ C 孵育 20 min,PBS 洗涤后用流式细胞仪分析各样本中阳性细胞数,计算荧光标记阳性细胞的百分率。实验重复 3 次。

1.5 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS13.0 软件进行数据处理,采用析因设计方差分析和线性回归分析,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞、ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞和 NK 细胞的分离及鉴定

采用流式分选术从 1  $\times$  10<sup>7</sup>/ml 的 CNE2/DDP 细胞中分离出的 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞密度为 1.5  $\times$  10<sup>6</sup>/ml,ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞密度为 6  $\times$  10<sup>6</sup>/ml。ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞的异形性明显,而 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞形态较均一,多呈圆形。流式细胞仪鉴定结果显示,ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞的 ABCG2 表达率为(91.40  $\pm$  2.32)%,而 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞的 ABCG2 表达率为(1.70  $\pm$  0.24)%(图 1)。

磁珠分选后,NK 细胞中 CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 细胞的纯度达 90% 以上,因此分选出的 NK 细胞纯度较高,可满足后续实验的要求。

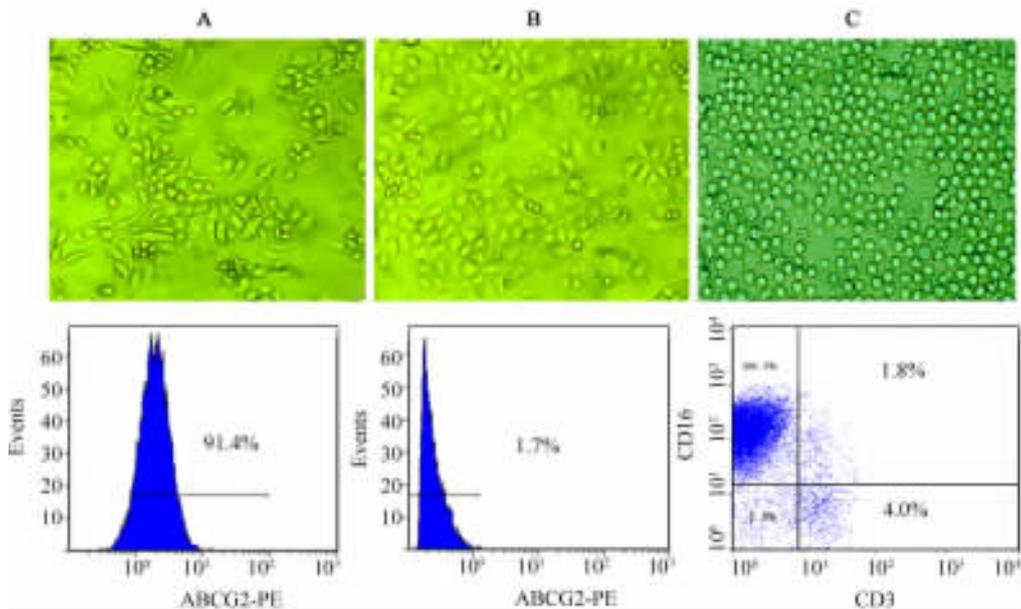


图 1 磁珠分选后的 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP( A )、ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP( B )和 NK 细胞( C )的形态和纯度(  $\times$ 100 )

Fig.1 Morphology and purity of ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP( A ), ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP( B ) and NK cells( C ) sorted by MACS(  $\times$ 100 )

2.2 不同分子靶向药物对 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 表达的影响

流式细胞术分析不同分子靶向药物处理后两种

CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达,结果(表 1)显示,ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞经不同分子靶向药物处理后,5 种

NKG2DLs( MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 )都呈不同程度升高,NKG2DLs 的表达从高到低依次为舒尼替尼组 > 硼替佐米组 > 索拉非尼组 > 未处理

组,并且 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 升高幅度高于 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞。

表 1 不同分子靶向药物处理前后两种 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达( % )

Tab.1 Expressions of NKG2DLs in different CNE2/DDP cells before and after treatment with different molecular targeted agents ( % )

NKG2DLs	CNE2/DDP cell	Control	Sorafenib	Bortezomib	Sunitinib	F	P
MICA	ABCG2 <sup>low</sup>	2.61 ± 0.29	3.52 ± 0.35	17.52 ± 2.04	84.52 ± 4.23	1 029.59	0.000
	ABCG2 <sup>high</sup>	2.92 ± 0.33	10.38 ± 1.23	28.69 ± 3.16	89.12 ± 4.56	715.60	0.000
MICB	ABCG2 <sup>low</sup>	3.10 ± 1.05	4.27 ± 0.28	12.53 ± 3.68	55.07 ± 1.22	2 743.48	0.000
	ABCG2 <sup>high</sup>	4.27 ± 0.33	10.68 ± 1.26	21.95 ± 2.56	66.10 ± 2.22	487.16	0.000
ULBP1	ABCG2 <sup>low</sup>	1.52 ± 0.47	4.39 ± 0.95	15.24 ± 2.91	57.30 ± 2.50	1 074.25	0.000
	ABCG2 <sup>high</sup>	5.80 ± 0.62	11.62 ± 1.22	29.84 ± 4.17	67.56 ± 4.19	350.64	0.000
ULBP2	ABCG2 <sup>low</sup>	4.18 ± 0.23	30.81 ± 2.34	62.02 ± 6.85	65.00 ± 1.04	233.65	0.000
	ABCG2 <sup>high</sup>	11.10 ± 0.66	43.24 ± 4.42	62.18 ± 4.98	69.37 ± 8.83	55.86	0.000
ULBP3	ABCG2 <sup>low</sup>	2.45 ± 0.59	4.84 ± 1.19	8.25 ± 2.38	53.14 ± 3.76	414.81	0.000
	ABCG2 <sup>high</sup>	7.75 ± 1.14	11.91 ± 0.88	35.69 ± 3.23	63.28 ± 3.31	308.25	0.000

2.3 分子靶向药物增强 CNE2/DDP 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性

NK 细胞杀伤活性实验结果(表 2)显示,NK 细胞对未处理的 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞的杀伤率较低;经不同分子靶向药物处理后,NK 细胞杀伤率呈不同程度地升高,依次

为舒尼替尼组 > 硼替佐米组 > 索拉非尼组 > 未处理组,并且 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞对 NK 细胞的杀伤敏感性强于 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞。结果提示,分子靶向药物能增强鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性。

表 2 分子靶向药物增强 NK 细胞对 CNE2/DDP 细胞的杀伤( % )

Tab.2 Molecular targeted agents enhanced cytotoxicity of NK cells against CNE2/DDP cells( % )

Group	E: T ( 10: 1 )		E: T ( 20: 1 )		F	P
	ABCG2 <sup>low</sup> CNE2/DDP	ABCG2 <sup>high</sup> CNE2/DDP	ABCG2 <sup>low</sup> CNE2/DDP	ABCG2 <sup>high</sup> CNE2/DDP		
Control	6.49 ± 1.68	15.32 ± 3.86	17.41 ± 2.91	27.26 ± 6.81	15.69	0.000
Sorafenib	8.96 ± 2.56	27.75 ± 4.03	17.69 ± 2.73	43.17 ± 5.92	39.08	0.000
Bortezomib	10.67 ± 2.11	35.06 ± 5.10	23.18 ± 2.44	52.34 ± 4.78	42.99	0.000
Sunitinib	36.58 ± 2.37	41.12 ± 4.12	50.43 ± 4.78	57.25 ± 2.37	39.08	0.000

2.4 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达与对 NK 细胞杀伤敏感性的相关性

如图 2 所示,随着 NKG2DLs( MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 )表达的升高,ABCG2<sup>high</sup>

CNE2/DDP 细胞和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性也随着升高,CNE2/DDP 靶细胞 NKG2DLs 的表达与其对 NK 细胞杀伤的敏感性间存在线性关系;但不同 NKG2DLs 间有差异,其中以

MICA 的线性关系最明显, MICB、ULBP1 和 ULBP3 三者的线性关系相似, ULBP2 的线性关系最弱。

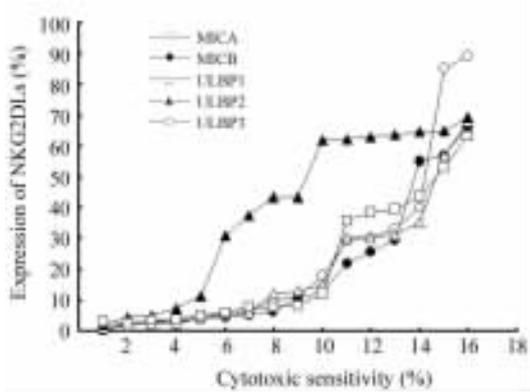


图2 ABCG2<sup>high</sup>CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup>CNE2/DDP 细胞 NK2DLs 的表达与其对 NK 细胞杀伤敏感性间的关系

Fig. 2 Relationship of NK2DLs expressions on ABCG2<sup>high</sup>CNE2/DDP and ABCG2<sup>low</sup>CNE2/DDP cells with their cytotoxic sensitivities to NK cells

### 3 讨论

肿瘤分子靶向治疗是针对可能导致细胞癌变的环节,如细胞信号转导通路、原癌基因和抑癌基因、细胞因子及其受体、肿瘤血管形成、自杀基因等,从分子水平加以逆转,从而抑制肿瘤细胞生长,甚至使肿瘤完全消退的生物治疗。目前,已有 20 余种分子靶向药物获得美国 FDA 的认证,被批准用于多种血液系统肿瘤和实体瘤的临床治疗。分子靶向药物主要分为两大类:单克隆抗体和小分子化合物。单克隆抗体主要包括群司珠单抗( trastuzumab )、利妥昔单抗( rituximab )、西妥昔单抗( cetuximab )和贝伐单抗( bevacizumab );小分子化合物主要包括伊马替尼、吉非替尼、埃罗替尼、硼替佐米、索拉非尼、舒尼替尼、拉帕替尼及尼罗替尼等<sup>[14-15]</sup>。硼替佐米的作用靶点主要是 26S 蛋白酶体,索拉非尼和舒尼替尼的作用靶点包括血管内皮生长因子受体( VEGFR )、血小板衍生生长因子受体( PDGFR )及其他酪氨酸激酶。这几种分子靶向药物可以用于治疗多种实体瘤,如肝癌、肾癌、甲状腺癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌和前列腺癌等<sup>[3-6]</sup>。

分子靶向药物多用于治疗化疗失败或复发的肿瘤,而化疗失败的主要原因是肿瘤干细胞的存在和肿瘤细胞产生 MDR。近年发现,除了 p-gp、MRP、Bcl-2、MGMT 是介导肿瘤细胞多药耐药的蛋白之外,ABCG2 也能介导肿瘤细胞的多药耐药。ABCG2

介导的多药耐药是非典型的 MDR,对米托蒽醌、柔红霉素、拓扑替康和依利替康等药物交叉耐药,而对 P-gp、MRP 介导的顺铂、长春新碱、紫杉醇不产生交叉耐药<sup>[16]</sup>。还有学者<sup>[17]</sup>认为,ABCG2 专一表达于 SP( side population )细胞,可能是干细胞的潜在标志。

对多药耐药肿瘤细胞,传统的治疗方法不能取得满意的疗效,因此,对高表达 ABCG2 的耐药鼻咽癌需要联合其他治疗方法或另辟蹊径。本研究分选了 ABCG2<sup>high</sup>CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup>CNE2/DDP 细胞,前者 ABCG2 表达率为( 91.40 ± 2.32 )%,并且对氟尿嘧啶、顺铂、长春新碱、卡铂、表柔比星、柔红霉素、紫杉醇、丝裂霉素等常用抗鼻咽癌药物均不同程度地耐药;而后者 ABCG2 表达率为( 1.70 ± 0.24 )%,对上述药物的 IC<sub>50</sub> 值明显低于 ABCG2<sup>high</sup>CNE2/DDP 细胞<sup>[18]</sup>。因此,这两种细胞为研究 NK 细胞杀伤 ABCG2 介导的耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞提供了合适的细胞模型。

NK 细胞构成了机体的第一道杀伤防线,NK 细胞发挥功能主要依赖 NK 细胞表面受体,这些受体与配体分子结合,传递抑制性或活化性信号,调节 NK 细胞的杀伤活性。NK2D 是 NK 细胞最主要的活化性受体分子,其配体为 NK2DLs, NK2D 与 NK2DLs 结合介导 NK 细胞杀伤活性。杀伤细胞免疫球蛋白样受体( killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR )是 NK 细胞主要的抑制性受体,与 MHC- I 结合后转导抑制性信号,下调 NK 细胞杀伤活性<sup>[19]</sup>。靶细胞 NK2DLs 表达的高低影响 NK 细胞对靶细胞的杀伤活性<sup>[20]</sup>。NK2DLs 主要包括 MHC- I 类链相关分子 A 或 B( MHC class I-related chain molecules A/B, MICA/B )和人巨细胞病毒糖蛋白 UL16 结合蛋白( UL16-binding proteins ULBPs, 包括 ULBP1 ~ ULBP6 )<sup>[21]</sup>。近期研究<sup>[7-12]</sup>发现,肿瘤细胞受到外界多种因素刺激后,可诱导 NK2DLs 的高表达,这些因素包括病原体感染、细胞转化、电离辐射、细胞因子和药物等。

本研究中,未处理的鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞 NK2DLs( MICA、MICB、ULBP1、ULBP2 和 ULBP3 )均为弱表达;经不同分子靶向药物处理后,ABCG2<sup>high</sup>CNE2/DDP 细胞和 ABCG2<sup>low</sup>CNE2/DDP 细胞表面 NK2DLs 的表达都呈不同程度地升高;且不同分子靶向药物诱导 NK2DLs 升高的幅度不同,以多靶点酪氨酸激酶抑制剂药物——舒尼替尼的诱导作用最强。在 NK 细胞杀伤实验中,随着 CNE2/DDP 细胞 NK2DLs 表达的升高,其对 NK 细胞的杀伤敏

感性也升高, CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 表达与其对 NK 细胞杀伤敏感性间存在良好的线性关系。本实验所采用的药物处理剂量都明显小于药物本身的 IC<sub>50</sub> 值。在此低剂量下, 分子靶向药物均能诱导肿瘤细胞 NKG2DLs 表达, 而对肿瘤细胞的生长无明显抑制作用<sup>[13,22]</sup>。为什么分子靶向药物能够诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs, 并且不同药物的诱导效果不同, 其机制有待进一步研究。

本研究发现, 不同分子靶向药物对耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达具有不同的诱导作用, 以舒尼替尼的诱导作用最强。CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 表达的高低与其对 NK 细胞杀伤的敏感性间存在良好的线性关系。因此, 对于临床上难治、耐药和复发的鼻咽癌患者, 可以先用分子靶向药物(如舒尼替尼等)进行诱导, 再联合过继性细胞免疫治疗(如 NK 细胞等), 可能获得更好的临床效果。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Ishikawa T, Nakagawa H. Human ABC transporter ABCG2 in cancer chemotherapy and pharmacogenomics [ J ]. *J Exp Ther Oncol*, 2009, 8( 1 ): 5-24.
- [ 2 ] Dai CL, Tiwari AK, Wu CP, Su XD, Wang SR, Liu DG, et al. Lapatinib ( tykerb, GW572016 ) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2 [ J ]. *Cancer Res*, 2008, 68( 19 ): 7905-7914.
- [ 3 ] Mitsiades CS, McMillin D, Kotoula V, Poulaki V, McMullan C, Negri J, et al. Anti-tumor effects of the proteasome inhibitor bortezomib in medullary and anaplastic thyroid carcinoma cells *in vitro* [ J ]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 18( 3 ): 332-336.
- [ 4 ] Hiles JJ, Kolesar JM. Role of sunitinib and sorafenib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma [ J ]. *Am J Health Syst Pharm*, 2008, 65( 2 ): 123-131.
- [ 5 ] Mitsudomi T. Advances in target therapy for lung cancer [ J ]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40( 2 ): 101-106.
- [ 6 ] Tamaskar I, Pili R. Update on novel agents in renal cell carcinoma [ J ]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009, 9( 12 ): 1817-1827.
- [ 7 ] Chrul S, Polakowska E, Szadkowska A, Bodalski J. Influence of interleukin IL-2 and IL-12 + IL-18 on surface expression of immunoglobulin-like receptors KIR2DL1, KIR2DL2, and KIR3DL2 in natural killer cells [ J ]. *Mediators Inflamm*, 2006, 2006( 4 ): 46957-46962.
- [ 8 ] Ostberg JR, Dayanc BE, Yuan M, Oflazoglu E, Repasky EA. Enhancement of natural killer ( NK ) cell cytotoxicity by fever-range thermal stress is dependent on NKG2D function and is associated with plasma membrane NKG2D clustering and increased expression of MICA on target cells [ J ]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82( 5 ): 1322-1331.
- [ 9 ] Valés-Gómez M, Chisholm SE, Cassady-Cain RL, Roda-Navarro P, Reyburn HT. Selective induction of expression of a ligand for the NKG2D receptor by proteasome inhibitors [ J ]. *Cancer Res*, 2008, 68( 5 ): 1546-1554.
- [ 10 ] Roda JM, Joshi T, Butchar JP, McAlees JW, Lehman A, Tridandapani S, et al. The activation of natural killer cell effector functions by cetuximab-coated, epidermal growth factor receptor positive tumor cells is enhanced by cytokines [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13( 21 ): 6420-6428.
- [ 11 ] Butler JE, Moore MB, Presnell SR, Chan HW, Chalupny NJ, Lutz CT. Proteasome regulation of ULBP1 transcription [ J ]. *J Immunol*, 2009, 182( 10 ): 6600-6609.
- [ 12 ] Roda JM, Parihar R, Lehman A, Mani A, Tridandapani S, Carson WE. Interleukin-21 enhances NK cell activation in response to antibody-coated targets [ J ]. *J Immunol*, 2006, 177( 1 ): 120-129.
- [ 13 ] Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the Raf/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5 [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 24 ): 11851-11858.
- [ 14 ] Ortega J, Vigil CE, Chodkiewicz C. Current progress in targeted therapy for colorectal cancer [ J ]. *Cancer Control*, 2010, 17( 1 ): 7-15.
- [ 15 ] Macfarlane RJ, Chi KN. Novel targeted therapies for prostate cancer [ J ]. *Urol Clin North Am*, 2010, 37( 1 ): 105-119.
- [ 16 ] 徐 珊, 徐昌芬. 肿瘤多药耐药性发生机制及中药逆转作用的研究进展 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13( 6 ): 404-410.
- [ 17 ] Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE. ABCG2: Determining its relevance in clinical drug resistance [ J ]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26( 1 ): 39-57.
- [ 18 ] 黄宇贤, 王 杨, 卢晓珣, 郭坤元. 高、低表达三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 的人鼻咽癌耐药细胞生物学特性差异的研究 [ J ]. *解放军医学杂志*, 2008, 33( 8 ): 987-991.
- [ 19 ] Pardoll DM. Stress, NK receptors, and immune surveillance [ J ]. *Science*, 2001, 294( 5542 ): 534-536.
- [ 20 ] Gasser S, Raulet DH. Activation and self-tolerance of natural killer cells [ J ]. *Immunol Rev*, 2006, 214: 130-142.
- [ 21 ] Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, 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.
- [ 22 ] Kancha RK, Grundler R, Peschel C, Duyster J. Sensitivity toward sorafenib and sunitinib varies between different activating and drug-resistant FLT3-ITD mutations [ J ]. *Exp Hematol*, 2007, 35( 10 ): 1522-1526.

[ 收稿日期 ] 2009 - 12 - 12

[ 修回日期 ] 2010 - 01 - 24

[ 本文编辑 ] 徐红梅