

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.03.005

## 西妥昔单抗对耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞和 NK 细胞的双重免疫调节作用

黄宇贤<sup>1</sup>, 王 杨<sup>2</sup>, 李玉华<sup>1</sup>, 陈锦章<sup>3</sup>, 钱 敏<sup>3</sup>, 吴秉毅<sup>1</sup>, 孙彩霞<sup>1</sup>, 邓 兰<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: 探讨西妥昔单抗(cetuximab)对耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞 NKG2D 配体(natural killer group 2 member D ligands, NKG2DLs)的表达及 NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$  的影响。方法: 流式细胞术检测高、低表达 ABCG2(ATP-binding cassette superfamily G member 2)的耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞(简称 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞和 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞)表面 EGFR 的表达水平, 以及西妥昔单抗处理前后两种 CNE2/DDP 细胞表面 NKG2DLs 的表达水平。西妥昔单抗处理前后的两种 CNE2/DDP 细胞分别与 NK 细胞共培养, ELISA 检测上清中 IFN- $\gamma$  的分泌水平, LDH 释放法检测 NK 细胞对不同组 CNE2/DDP 靶细胞的杀伤。结果: ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞表面 EGFR 的表达率分别为(43.60  $\pm$  2.01)% 和 (47.20  $\pm$  2.07)%。西妥昔单抗上调 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞表面 MICA、MICB、ULBP1 和 ULBP2 的表达, 但下调 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞表面 ULBP3 的表达。西妥昔单抗处理两种 CNE2/DDP 细胞后, 与 NK 细胞的共培养体系中 IFN- $\gamma$  的分泌水平明显上调( $P < 0.01$ ); 西妥昔单抗增强两种 CNE2/DDP 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性( $P < 0.01$ )。结论: 西妥昔单抗可上调耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达, 间接刺激 NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$ , 具有双重免疫调节作用。

[关键词] 西妥昔单抗; 鼻咽肿瘤; 多药耐药; 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)03-0268-06

## Dual immunological regulation effects of cetuximab on multidrug resistant nasopharyngeal carcinoma CNE2/DDP cells and NK cells

HUANG Yu-xian<sup>1</sup>, WANG Yang<sup>2</sup>, LI Yu-hua<sup>1</sup>, CHEN Jin-zhang<sup>3</sup>, QIAN Min<sup>3</sup>, WU Bing-yi<sup>1</sup>, SUN Cai-xia<sup>1</sup>, DENG Lan<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 the effects of cetuximab on NKG2D ligands(NKG2DLs) expressions in multidrug resistant nasopharyngeal carcinoma CNE2/DDP cells and IFN- $\gamma$  production in NK cells. **Methods:** EGFR expressions on CNE2/DDP cells with high and low ABCG2 expression(ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP cells and ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells) and NKG2DLs expressions on ABCG2<sup>high</sup> and ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells before and after cetuximab treatment were detected by flow cytometry. ABCG2<sup>high</sup> and ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells were co-cultured with NK cells before and after cetuximab treatment, and then IFN- $\gamma$  levels in the supernatants of different groups were detected by ELISA. Cytotoxicity of NK cells against CNE2/DDP cells was measured by LDH releasing assay in different groups. **Results:** EGFR expressions in ABCG2<sup>high</sup> and ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells were (43.60  $\pm$  2.01)% and (47.20  $\pm$  2.07)%, respectively. The expressions of MICA, MICB, ULBP1, and ULBP2 on ABCG2<sup>high</sup> and ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells were up-regulated by cetuximab stimulation, while ULBP3 expression on ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP cells was down-regulated by cetuximab stimulation. IFN- $\gamma$

[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

levels in co-culture systems were significantly increased after ABCG2<sup>low</sup> and ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP cells were treated with cetuximab ( $P < 0.01$ ). Cetuximab enhanced cytotoxic sensitivities of ABCG2<sup>high</sup> and ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells in response to NK cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Cetuximab exerts a dual immunological regulation by up-regulating NKG2DLs expressions on nasopharyngeal carcinoma CNE2/DDP cells and stimulating IFN- $\gamma$  production by NK cells indirectly.

[ **Key words** ] cetuximab; nasopharyngeal neoplasms; multidrug resistance; natural killer group 2 member D ligand (NKG2DL); natural killer cell

[ Chin J Cancer Biother, 2010, 17(3): 268-273 ]

晚期鼻咽癌患者对化疗药物不敏感主要是由于肿瘤细胞存在多药耐药(multidrug resistance, MDR)现象<sup>[1]</sup>。三磷酸腺苷结合盒 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。ABCG2 在多种肿瘤细胞膜上高表达,可将抗肿瘤药物泵出细胞外而产生多药耐药或交叉耐药,是抗肿瘤药物治疗失败的重要因素<sup>[2]</sup>。近期研究<sup>[3-4]</sup>表明,NK 细胞对耐药肿瘤细胞的杀伤不取决于肿瘤细胞耐药蛋白表达的高低,而是取决于 NK 细胞的活化状态(活化信号的激活)和肿瘤细胞的分化状态(免疫效应细胞活化配体的表达)。NKG2D (natural killer group 2 member D, NKG2D)-NKG2DLs (NKG2D ligands)是 NK 细胞关键性活化信号通路。NKG2D 在 NK 细胞上高表达,与 NKG2DLs 相结合,激活 NK 细胞杀伤活性<sup>[5-6]</sup>。NKG2DLs 包括 MHC-I 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)<sup>[7]</sup>,低表达于多种肿瘤细胞。当肿瘤细胞受到药物、电离辐射、细胞因子等刺激时,NKG2DLs 表达上调,对 NK 细胞杀伤的敏感性增强<sup>[8-9]</sup>。

多靶点分子靶向药物(舒尼替尼、索拉非尼)作为“刺激诱导”源能诱导鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞表达 NKG2DLs,增强 CNE2/DDP 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性,而单克隆抗体类分子靶向药物是否具有相同的诱导作用仍未清楚。西妥昔单抗(cetuximab)是一种抗 EGFR 的新型人鼠嵌合性单克隆抗体,能特异性地与肿瘤细胞上的 EGFR 结合,抑制肿瘤细胞的生长<sup>[10]</sup>。西妥昔单抗还可“包被”肿瘤细胞,诱导 NKG2DLs 的表达,刺激 NK 细胞产生 IFN- $\gamma$ ,增强 NK 细胞的杀伤活性<sup>[11-12]</sup>。本研究利用免疫磁珠技术分选高、低表达 ABCG2 膜蛋白的 CNE2/DDP 细胞(简称 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞),代表不同耐药性的鼻咽癌细胞,观察西妥昔单抗对 CNE2/DDP 细胞

NKG2DLs 的诱导作用及对 NK 细胞 IFN- $\gamma$  分泌的影响,探讨西妥昔单抗对耐药鼻咽癌细胞是否具有双重免疫调节作用,为分子靶向药物联合 NK 细胞治疗鼻咽癌提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及器材

西妥昔单抗购自默克公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,RPMI 1640 购自 Gibco 公司,PE 标记的鼠抗人 ABCG2 单抗购自 eBioscience 公司,抗 CD56 免疫磁珠、CFS 标记的小鼠抗人 EGFR 单抗购自 RD 公司,抗 PE 免疫磁珠购自 Miltenyi Biotec 公司。人 IFN- $\gamma$  ELISA 检测试剂盒购自上海依科赛生物公司,杀伤活性检测试剂盒购自 Promega 公司。5810R 高速低温离心机购自 Eppendorff 公司,2010 酶标仪购自郑州赛博仪器公司,Olympus 倒置荧光显微镜购自 Olympus 公司,流式细胞仪购自 Beckman Coulter 公司。

### 1.2 实验细胞

ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞由本实验室分选及冻存。在常规培养条件下,ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞表面 ABCG2 表达率维持在 75% 以上,ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞 ABCG2 表达率在 15% 以下。细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素和 3  $\mu$ mol/L DDP 的 RPMI 1640 培养基,置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。磁珠法分选 NK 细胞方法如下:常规密度梯度离心法分离健康人外周血单个核细胞,PBS 洗涤 2 次,计数细胞,然后加入抗 CD56 磁珠作阳性细胞分选,获得 CD56<sup>+</sup> 细胞。流式细胞仪检测显示,其中 CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 细胞的纯度达 90%,能满足后续实验的要求。人慢性髓系白血病细胞株 K562 由本室冻存。实验中所用细胞处于对数生长期。

### 1.3 流式细胞术检测 CNE2/DDP 细胞 EGFR 的表达

收集 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞,PBS 洗涤后,每  $1 \times 10^6$  个细胞加入

0.25 μg CFS 标记的小鼠抗人 EGFR 单抗,同型 IgG1 作为阴性对照抗体。4 °C 孵育 30 min,加入 PBS 2 ml, 3 000 ×g 离心 10 min,弃上清液,重悬细胞,流式细胞仪检测 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞 EGFR 的表达。实验重复 3 次。

#### 1.4 流式细胞术检测 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达

实验分组如下:ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 未处理组、ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 未处理组、西妥昔单抗处理 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 组(西妥昔单抗 500 ng/ml 共孵育 4 h 的 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP)、西妥昔单抗处理 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 组(西妥昔单抗 500 ng/ml 共孵育 4 h 的 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞)。收集各组细胞,PBS 洗涤 2 次,计数,按 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞加入 2 μg 鼠抗人 NKG2DLs(包括 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2 和 ULBP3)单抗,4 °C 孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次。加入 PE 标记的山羊抗小鼠 IgG1,同型 IgG1 作为阴性对照抗体,4 °C 孵育 20 min,PBS 洗涤。流式细胞仪检测样本中每 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞中的阳性细胞数,计算阳性细胞百分率。实验重复 3 次。

#### 1.5 ELISA 检测各组细胞上清中 IFN-γ 的水平

收集人外周血 NK 细胞、ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞,实验分 5 组:NK 细胞组、NK 细胞 + ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞组(CNE2/DDP 细胞与 NK 细胞共孵育 4 h)、NK 细胞 + ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞组、NK 细胞 + 西妥昔单抗处理后 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞组(西妥昔单抗 500 ng/ml 预处理 CNE2/DDP 细胞 24 h 后,PBS 洗涤 2 次,再与 NK 细胞共孵育 4 h)、NK 细胞 + 西妥昔单抗处理后 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞组。收集各组细胞培养上清液,ELISA 试剂盒测定各组上清液 IFN-γ 的水平。

#### 1.6 LDH 释放法检测 NK 细胞对靶细胞的杀伤

收集 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP、ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 NK 细胞,实验分组:K562 细胞对照组、ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞组、ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞组、西妥昔单抗处理 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞组(经西妥昔单抗 500 ng/ml 处理 4 h 的 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞)、西妥昔单抗处理 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞组(经西妥昔单抗 500 ng/ml 处理 4 h 的 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞)。各组细胞均用含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液调整细胞密度至 1 × 10<sup>5</sup>/ml,按 50 μl/孔接种于 96 孔板中。每组设 3 个复孔。以新鲜分离的 NK 细胞为效应细胞,以上述各组中的细胞为靶细胞。按不同效靶比

(10:1、20:1)将相应量的 NK 细胞 50 μl 加入各组培养孔中,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下共孵育 4 h 后,离心,吸取 50 μl 上清,加入 96 孔板,再加入 50 μl LDH 底物反应液,室温放置 30 min,加入 50 μl/孔反应终止液。用酶标仪在波长 490 nm 处以空白孔(RPMI 1640 完全培养液 + LDH 底物反应液)为基准测光密度值(D)。NK 细胞杀伤活性(%)=(实验组 D 值 - 靶细胞自然释放组 D 值)/(靶细胞最大释放组 D 值 - 靶细胞自然释放组 D 值) × 100%。

#### 1.7 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 13.0 软件对数据进行配对 t 检验或单因素方差分析。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞 EGFR 的表达

流式细胞术检测结果(图 1)显示:ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞表面 EGFR 的表达率为(43.60 ± 2.01)%,ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞表面 EGFR 的表达率为(47.20 ± 2.07)%,前者略低于后者(t = 9.088, P = 0.012),符合文献报道<sup>[13]</sup>。

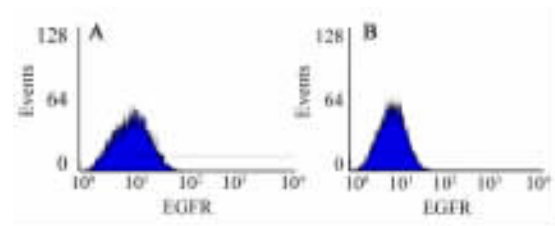


图 1 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞 EGFR 的表达

Fig. 1 Expressions of EGFR on ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP and ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells

A: ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP cells; B: ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells

#### 2.2 西妥昔单抗对两种 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 表达的影响

西妥昔单抗处理前两种 CNE2/DDP 细胞弱表达 5 种 NKG2DLs(图 2),ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞的 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 表达率分别为(2.61 ± 0.29)%、(3.10 ± 1.05)%、(1.52 ± 0.48)%、(4.18 ± 0.52)%、(2.45 ± 0.59)%和(2.92 ± 0.33)%、(4.27 ± 0.33)%、(5.80 ± 0.62)%、(11.10 ± 3.15)%、(7.75 ± 1.14)%。西妥昔单抗处理后

ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞的 MICA、MICB、ULBP1 和 ULBP2 的表达均明显升高(均  $P < 0.01$ ),分别为(  $6.35 \pm 0.71$  )%、(  $5.25 \pm 0.76$  )%、(  $5.48 \pm 0.80$  )%、(  $37.33 \pm 4.54$  )%和(  $11.30 \pm 0.89$  )%、(  $6.23 \pm 0.35$  )%、(  $12.56 \pm$

$1.06$  )%、(  $39.82 \pm 3.58$  )%;且 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 组 NKG2DLs 表达率升高幅度大于 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞组。西妥昔单抗处理后 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞 ULBP3 表达率为(  $3.37 \pm 0.32$  )%,低于未处理组和 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞组。

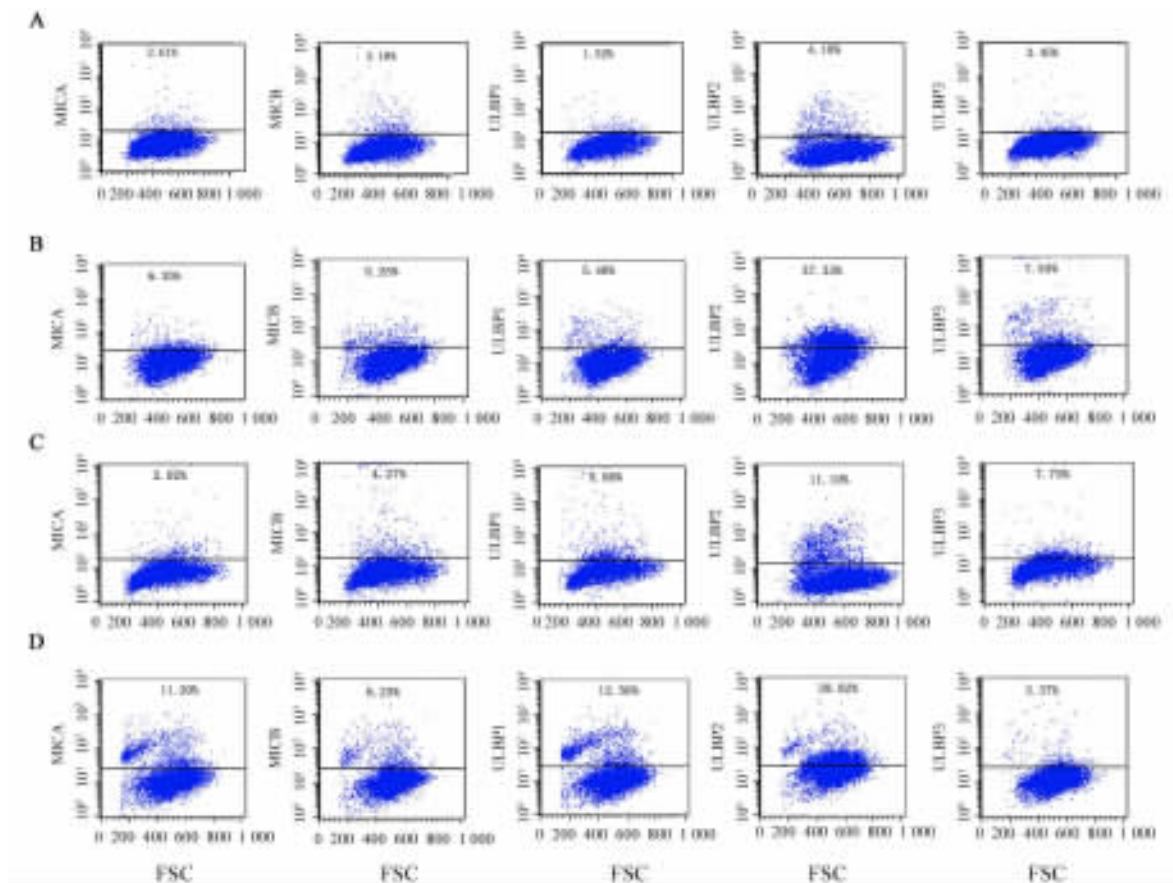


图2 西妥昔单抗对两种 CNE2/DDP 细胞不同 NKG2DLs 表达的影响

Fig.2 Effects of cetuximab on different NKG2DLs expressions on ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP and ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells

A: ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells; B: Cetuximab-treated ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP cells;

C: ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP cells; D: Cetuximab-treated ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP cells

### 2.3 西妥昔单抗对 NK 细胞 IFN- $\gamma$ 分泌的影响

单纯 NK 细胞组 IFN- $\gamma$  的分泌水平较低,为(  $13.85 \pm 4.60$  )pg/ml。NK 细胞与未处理的 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞孵育后,其 IFN- $\gamma$  分泌水平分别为(  $247.73 \pm 10.12$  )pg/ml 和(  $274.32 \pm 23.49$  )pg/ml,明显高于单纯 NK 细胞组(  $P < 0.01$  )。与西妥昔单抗预处理的 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞共孵育后,NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$  水平分别为(  $732.84 \pm 48.18$  )pg/ml 和(  $911.59 \pm 52.10$  )pg/ml,明显高于未处理组(  $P < 0.01$  )。结果说明,西妥昔单抗预处理后的耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞能刺激 NK 细胞分泌更高水平的 IFN- $\gamma$ (表 1)。

表 1 不同处理组细胞上清中 IFN- $\gamma$  的水平

Tab.1 IFN- $\gamma$  levels in different cell supernatants

Group	IFN- $\gamma$ ( $\rho_B$ /pg · ml <sup>-1</sup> )
NK	13.85 ± 2.56
ABCG2 <sup>low</sup> CNE2/DDP + NK	247.73 ± 2.37**
ABCG2 <sup>high</sup> CNE2/DDP + NK	274.32 ± 2.11**
Cetuximab + ABCG2 <sup>low</sup> CNE2/DDP + NK	732.84 ± 2.37 $\Delta\Delta$
Cetuximab + ABCG2 <sup>high</sup> CNE2/DDP + NK	911.59 ± 2.37 $\Delta\Delta$

\*\*  $P < 0.01$  vs NK;  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$  vs ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP + NK or ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP + NK

2.4 西妥昔单抗增强两种 CNE2/DDP 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性

LDH 释放法结果(表 2)显示: NK 细胞对 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞的杀伤活性均随着效靶比升高而增强。效靶比为 10:1、20:1 时, NK 细胞对 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞的杀伤率分别为( 7.15 ± 1.28 )%、( 15.99 ± 0.81 )% 和( 18.08 ± 3.00 )%、

( 27.60 ± 5.89 )%。ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 和 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞经西妥昔单抗处理后, NK 细胞对它们的杀伤率分别为( 10.96 ± 1.56 )%、( 22.13 ± 2.77 )% 和( 22.37 ± 2.42 )%、( 33.04 ± 4.16 )%。西妥昔单抗处理前后不同效靶比的 NK 细胞杀伤率的差异均有统计学意义(  $F = 54.915, P = 0.000; F = 45.088, P = 0.000$  )。表明西妥昔单抗增强 CNE2/DDP 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性。

表 2 西妥昔单抗处理前后 NK 细胞对 CNE2/DDP 细胞的杀伤( % )

Tab.2 Cytotoxicity of NK cells against CNE2/DDP cells before and after cetuximab treatment ( % )

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	7.15 ± 1.28	15.99 ± 0.81	18.08 ± 3.00	27.60 ± 5.89	54.915	0.000
Cetuximab	10.96 ± 1.56	22.13 ± 2.77	22.37 ± 2.42	33.04 ± 4.16	45.088	0.000

3 讨 论

肿瘤细胞高表达 ABCG2 是产生多药耐药的主要原因<sup>[14]</sup>。研究发现,80% 以上的鼻咽癌组织高表达表皮生长因子受体( epidermal growth factor receptor, EGFR ),肿瘤细胞恶性程度越高, EGFR 表达率越高;且 EGFR 的高表达与无病生存率降低、总生存率降低及远处转移相关,是鼻咽癌预后差的主要指标之一<sup>[15]</sup>。分子靶向药物的出现给耐药和复发性肿瘤患者带来了新的希望,但分子靶向药物治疗晚期肿瘤仅能提高部分缓解率、延缓肿瘤进展和提高患者生存质量,不能提高完全缓解率,对总生存率的贡献也有限<sup>[16]</sup>。

NK 细胞对病原体感染细胞和恶变细胞具有天然细胞毒效应。NK 细胞杀伤靶细胞受 HLA-KIR 等抑制性信号和 NKG2D-NKG2DLs 等活化性信号共同调节<sup>[17]</sup>。NK 细胞表面受体通过“内识别”模式直接与靶细胞表面的 NKG2DLs 结合,激活 NK 细胞杀伤活性。因此,提高靶细胞 NKG2DLs 的表达水平,对增强 NK 细胞杀伤功能十分关键<sup>[18]</sup>。

本课题组前期研究发现,体外某些因素刺激能提高肿瘤细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性,可能是通过诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs 和诱导 NK 细胞分泌细胞因子来实现。细胞因子( IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 等)、蛋白酶体抑制剂( bortezomib )能诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs,单克隆抗体( cetuximab、trastuzumab )作用于肿瘤细胞后能刺激 NK 细胞分泌高浓

度的 IFN- $\gamma$ ,从而使 NK 细胞的 ADCC( antibody dependent cell-mediated cytotoxicity )效应增强<sup>[11,19-21]</sup>。但单克隆抗体除了间接诱导 NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$  之外,是否还能够直接诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs 尚未清楚。本研究中,高、低表达 ABCG2 的 CNE2/DDP 细胞均表达 EGFR。西妥昔单抗是一种抗 EGFR 的新型人鼠嵌合性单克隆抗体,其 Fab 段为鼠源性,结合抗原;其 Fc 段可与 NK 细胞表面 FcR 结合,激活 NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$ 。西妥昔单抗与高表达 EGFR 的肿瘤细胞孵育后,其 Fab 段包被于整个肿瘤细胞膜表面,裸露的 Fc 段可与 NK 细胞表面 FcR 结合。本研究中,西妥昔单抗与两种耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞孵育后, NK 细胞分泌更高水平的 IFN- $\gamma$ ,提示西妥昔单抗处理后的 CNE2/DDP 细胞能够间接刺激 NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$ 。另外,研究<sup>[22]</sup>发现,耐药肿瘤细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性高于亲本肿瘤细胞,主要是耐药肿瘤细胞表面 NKG2DLs 表达水平高于亲本细胞,其机制可能是耐药肿瘤细胞 ERK 分子表达水平增高和活性增强。本研究中,未处理组 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达水平较低,与西妥昔单抗孵育后, NKG2DLs 的表达水平明显上调,并且高度耐药的 ABCG2<sup>high</sup> CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 升高幅度大于低度耐药的 ABCG2<sup>low</sup> CNE2/DDP 细胞,证明了西妥昔单抗能够诱导耐药 CNE2/DDP 细胞表达 NKG2DLs。

西妥昔单抗可诱导鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞表达 NKG2DLs,同时间接刺激 NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$ ,具

有双重免疫调节作用。因此,对于临床上难治、耐药复发的鼻咽癌患者,分子靶向药物(包括单克隆抗体)联合过继性细胞免疫治疗(如 NK 细胞治疗),可使肿瘤患者获得更好的疗效。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Afqir S, Ismaili N, Errihani H. Concurrent chemoradiotherapy in the management of advanced nasopharyngeal carcinoma: Current status [ J ]. *J Cancer Res Ther*, 2009, 5( 1 ): 3-7.
- [ 2 ] Wang J, Guo LP, Chen LZ, Zeng YX, Lu SH. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 8 ): 3716-3724.
- [ 3 ] Chen XM, Xu XQ, Sun K, Hallett WH, Zhao JD, Zhang DL. NKG2D ligands expression and NKG2D-mediated cytotoxicity in human laryngeal squamous carcinoma cells [ J ]. *Scand Immunol*, 2008, 67( 5 ): 441-447.
- [ 4 ] Treichel RS, Bunuan M, Hahn N, Wee K. Altered conjugate formation and altered apoptosis of multidrug-resistant human leukemia cell line affects susceptibility to killing by activated natural killer ( NK ) cells [ J ]. *Int J Cancer*, 2004, 108( 1 ): 78-85.
- [ 5 ] Maccalli C, Scaramuzza S, Parmiani G. TNK cells ( NKG2D<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T lymphocytes ) in the control of human tumors [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58( 5 ): 801-808.
- [ 6 ] Lankry D, Gazit R, Mandelboim O. Methods to identify and characterize different NK cell receptors and their ligands [ J ]. *Methods Mol Biol*, 2010, 61( 2 ): 249-273.
- [ 7 ] 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.
- [ 8 ] Mincheva-Nilsson L, Nagaeva O, Chen T, Stendahl U, Antsiferova J, Mogren I, et al. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: A possible novel immune escape mechanism for fetal survival [ J ]. *J Immunol*, 2006, 176( 6 ): 3585-3592.
- [ 9 ] Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity [ J ]. *Oncogene*, 2008, 27( 45 ): 5944-5958.
- [ 10 ] Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck [ J ]. *N Engl J Med*, 2006, 354( 6 ): 567-578.
- [ 11 ] Valés-Gómez M, Chisholm SE, Cassidy-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.
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] Leong JL, Loh KS, Putti TC, Goh BC, Tan LK. Epidermal growth factor receptor in undifferentiated carcinoma of the nasopharynx [ J ]. *Laryngoscope*, 2004, 114( 1 ): 153-157.
- [ 14 ] Burtneß B. The role of cetuximab in the treatment of squamous cell cancer of the head and neck [ J ]. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5( 8 ): 1085-1093.
- [ 15 ] Vokes EE, Chu E. Anti-EGFR therapies: Clinical experience in colorectal, lung, and head and neck cancers [ J ]. *Oncology*, 2006, 20( 5 ): 15-25.
- [ 16 ] Okamoto I. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR-targeted anticancer therapy [ J ]. *FEBS J*, 2010, 277( 2 ): 309-315.
- [ 17 ] Grzywacz B, Kataria N, Sikora M, Oostendorp RA, Dzierzak EA, Blazar BR, et al. Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells [ J ]. *Blood*, 2006, 108( 12 ): 3824-3833.
- [ 18 ] Bryceson YT, Ljunggren HG, Long EO. Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors [ J ]. *Blood*, 2009, 114( 13 ): 2657-2666.
- [ 19 ] 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.
- [ 20 ] 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.
- [ 21 ] 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.
- [ 22 ] Ogbomo H, Michaelis M, Klassert D, Doerr HW, Cinalt J Jr. Resistance to cytarabine induces the up-regulation of NKG2D ligands and enhances natural killer cell lysis of leukemic cells [ J ]. *Neoplasia*, 2008, 10( 12 ): 1402-1410.

[ 收稿日期 ] 2009 - 12 - 12

[ 修回日期 ] 2010 - 01 - 26

[ 本文编辑 ] 徐红梅