

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.016

· 短篇论著 ·

## 同种异体 NK 细胞 KIR2DL1 表达差异对其杀伤 KG1A 细胞活性的影响

Effect of different expression of killer immunoglobulin-like receptor 2DL1 on cytotoxicity of allogenic natural killer cells against KG1A cells

何颖芝<sup>1</sup>, 薛同圆<sup>2</sup>, 忻勇杰<sup>2</sup>, 张佳佳<sup>2</sup>, 张轩煜<sup>2</sup>, 陆艺<sup>3</sup>, 李玉华<sup>1</sup> (1. 南方医科大学珠江医院血液科, 广东广州 510282; 2. 南方医科大学第二临床医学院二教班, 广东广州 510515; 3. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院 2008 级预防医学班, 广东广州 510515)

**[摘要]** **目的:** 研究同种异体自然杀伤(natural killer, NK)细胞对人急性髓系白血病细胞株 KG1A 的杀伤率, 探讨供者 NK 细胞表面杀伤细胞免疫球蛋白样受体 2DL1(killer immunoglobulin-like receptor 2DL1, KIR2DL1)表达差异对 NK 细胞杀伤 KG1A 细胞活性的影响。**方法:** 自 9 名健康志愿供者分离外周血 NK 细胞, 流式细胞术检测 NK 细胞表面 KIR2DL1 的表达率, LDH 释放法测定 NK 细胞在效靶比为 20:1 时对 KG1A 细胞的杀伤活性。**结果:** NK 细胞表面 KIR2DL1 的表达率存在个体差异, 9 名供者的表达范围为(33.20 ± 1.95)% ~ (92.69 ± 1.47)%; 9 名健康供者 NK 细胞对 KG1A 细胞的杀伤活性不同, 杀伤率范围为(44.40 ± 1.97)% ~ (93.70 ± 1.12)%。不同个体 NK 细胞 KIR2DL1 表达率与其对 KG1A 细胞的杀伤率呈负相关( $r = -1.00, P = 0.00$ )。**结论:** 不同个体 NK 细胞其表面 KIR2DL1 表达率与 NK 细胞对 KG1A 细胞的杀伤率呈负相关。

**[关键词]** NK 细胞; KIR2DL1; KG1A 细胞; K562 细胞

**[中图分类号]** R733.7; R730.51

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)04-0433-04

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者体内存在一群异质性细胞组成的一个细胞亚群, 即白血病干细胞, 其是 AML 复发的重要因素<sup>[1]</sup>。KG1A 细胞株来源于一男性 AML 患者, 部分表达 CD34 抗原, 对化疗药物不敏感<sup>[2]</sup>, 可作为比较理想的研究白血病的细胞模型。NK 细胞是机体天然免疫的主要承担者, 在杀伤靶细胞过程中, 杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR)传导抑制信号, 其配体为 HLA I 类分子, 该信号能阻断杀伤信号的传递<sup>[3]</sup>。KIR-HLA 信号通路在 NK 细胞抗白血病效应中发挥的作用受到越来越多的关注, 尤其是在异基因造血干细胞移植领域。吴德沛等<sup>[4]</sup>分析表明, 供受者的 KIR-HLA 基因型不匹配引发的 NK 细胞异源反应, 能够有效清除受者体内残存的白血病细胞, 在移植抗白血病效应(graft versus leukemia, GVL)中发挥重要的作用。由于 KIR 在 NK 细胞上的分布呈克隆性, 同种异体 NK 细胞表面表达的 KIR 表达率存在个体差异, 而且目前移植供者来源有限, 那么当供、受者的 KIR-HLA 基因型匹配时, 不同个体 KIR 表达率的差异对 NK 细胞杀伤活性会产生怎样的影响? 牛新清等<sup>[2, 5]</sup>通过流式细胞仪检测发现, 人白血病 KG1A 细胞表面存在的主要为杀伤细胞免疫球蛋白样受体 2D 配体 1(killer cell immunoglobulin-like receptor 2D

L1, KIR2DL1), 推测 KIR2DL1 为抑制 NK 细胞其对 KG1A 细胞杀伤功能的抑制性受体。但 KIR2DL1 表达率差异对 KG1A 细胞杀伤活性的影响, 国内尚无报道。本研究通过检测 KG1A 细胞表面 HLA I 类分子 HLA-Cw 位点表型及 NK 细胞表面 KIR2DL1 的表达率, 用纯化的 NK 细胞对 KG1A 细胞进行体外杀伤实验, 分析 KIR2DL1 表达差异对 NK 细胞杀伤活性的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂和细胞株

人急性髓系白血病细胞株 KG1A 由中国医学科学院血液学研究所惠赠。分离 NK 细胞的磷酸盐缓冲液(pH 7.2, 含 0.5% BSA 和 2 mmol/L EDTA)、抗 CD56 免疫磁珠购自 Miltenyi Biotec 公司, 抗 CD3 单

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 30500607); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(No. NCET-09-0087)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30500607), and the Program for New Century Excellent Talents of Ministry of Education(No. NCET-09-0087)

**[作者简介]** 何颖芝(1981-), 女, 湖南省永州市人, 硕士, 主治医师, 主要从事血液肿瘤免疫学方面的研究。E-mail: kucky1113@yahoo.com.cn

**[通信作者]** 李玉华(LI Yu-hua, corresponding author)。E-mail: li\_yuhua@yahoo.com

抗和抗 CD16/56 单抗购自 BD Pharmingen 公司, 杀伤活性检测试剂盒购自 Promega 公司, RPMI 1640、抗人 KIR2DL1 单抗购自美国 Biologend 公司, PE 标记的山羊抗鼠 IgG1 二抗、淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂, HLA-Cw SSP 试剂盒购自德国 Biotest 公司。

1.2 PCR-SSP 法检测 KG1A 细胞的 HLA-Cw 位点

KG1A 细胞 HLA-Cw 基因的分型按 HLA-Cw 特异性引物试剂盒说明操作。KG1A 细胞 DNA 提取按 QIAamp DNA 提取试剂盒说明操作。PCR 反应体系: PCR 鸡尾酒 478  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 598  $\mu$ l、Taq 酶 7.6  $\mu$ l, 混匀, 阴性对照孔加此混合物 10  $\mu$ l, 混合物中加 127  $\mu$ l DNA, 混匀后实验孔分别加 10  $\mu$ l。密封片密封引物板, PE9700 扩增仪进行 PCR 反应。PCR 产物加入含溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 的 2% 琼脂糖凝胶, 分析电泳结果, 拍照保留结果。

1.3 NK 细胞的分离、纯化及鉴定

采用常规密度梯度离心法从 9 名健康志愿者 (均为南方医科大学健康志愿者, 男性) 外周静脉血中分离单个核细胞, 计数, PBS 洗涤 2 次, 分选 CD56<sup>+</sup> 细胞并计数, 分管。按每 1  $\times$  10<sup>6</sup> 细胞 1  $\mu$ g 的比例加入 CD3-FITC、CD16-PE、CD56-PE 单抗, 4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 加入 PBS 2 ml, 300  $\times$  g 离心 10 min, 弃上清液, 悬浮细胞。同型 IgG1 作为阴性对照抗体, 流式细胞仪检测 CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞的表达率, 鉴定 NK 细胞。

1.4 流式细胞术检测 NK 细胞的纯度和 KIR2DL1 的表达率

收集健康志愿者的单个核细胞, 按每 1  $\times$  10<sup>6</sup> 个细胞 1  $\mu$ g 的比例加入鼠抗人 KIR2DL1 单抗, 4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗涤; 加入 PE 标记的山羊抗鼠 IgG1 二抗 (1:100), 4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗涤, 300  $\times$  g 离心 10 min, 弃上清, 悬浮细胞。同型 IgG1 作为阴性对照抗体, 流式细胞仪分析样本中 KIR2DL1 在 CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞上的表达率。

1.5 LDH 释放法检测 NK 细胞对 KG1A 细胞的杀伤

取对数生长期的 KG1A 细胞为靶细胞, 以 NK 细胞为效应细胞, 按效靶比 20:1 分别将相应量的 NK 和 KG1A 细胞加于 96 孔板中, 设立自然释放组、靶细胞最大释放组、培养基对照组。各组均设 3 复孔。按照 CytoTox96<sup>®</sup> 非放射性细胞毒性检测试剂盒说明书进行操作。使用 ELX-800 酶标仪测波长 492 nm 处的 D 值, 按公式计算 NK 细胞杀伤活性。杀伤率 (%) = (实验孔 D - 效应细胞自然释放组 D - 靶细胞自然释放组 D) / (靶细胞最大释放组 D - 靶细胞自然释放组 D)  $\times$  100%

1.6 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS13.0 统计软件, 以 Spearman 法进行双变量相关分析。P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 KG1A 细胞株的 HLA-Cw 位点检测

应用 PCR-SSP 法检测 KG1A 细胞株 HLA-Cw 分子, 确定 KG1A 细胞株 HLA-Cw 位点。结果所示, 其位点判定为: HLA-Cw\*04 (C2 群) 和 HLA-Cw\*16 (C1 群)。

2.2 NK 细胞的纯度

取外周血通过人淋巴细胞分离液分离单个核细胞后, 用抗 CD56 免疫磁珠分得 NK 细胞。流式细胞术检测 CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞, 显示 NK 细胞的纯度达 (92.5  $\pm$  2.3)% (图 1)。

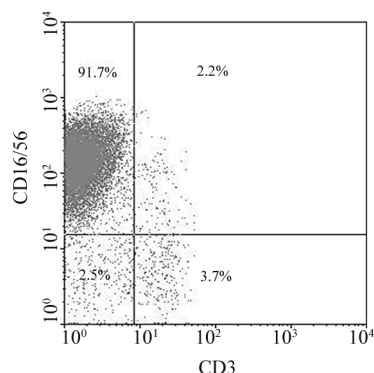


图 1 流式细胞术检测分选后 NK 细胞的纯度

2.3 不同个体 NK 细胞 KIR2DL1 的表达率

流式细胞术分析 9 例标本中 KIR2DL1 在 NK 细胞上的表达率为 (33.20  $\pm$  1.95)% ~ (92.69  $\pm$  1.47)% (图 2, 表 1), 说明 NK 细胞中 KIR2DL1 的表达率存在个体差异。

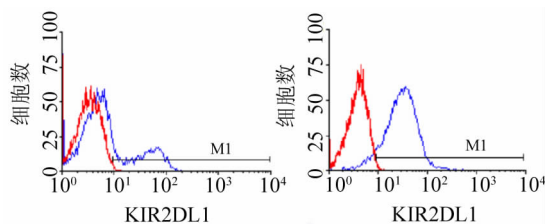


图 2 2 例标本中 NK 细胞 KIR2DL1 的表达率

2.4 NK 细胞对 KG1A 细胞的杀伤

LDH 释放法检测结果 (表 1) 显示, 9 例健康志

愿者 NK 细胞对 KG1A 细胞的杀伤活性也有很大差异,杀伤率范围为(44.40 ± 1.97)% ~ (93.70 ± 1.12)%。相关性分析结果表明,效靶比 20:1 时, NK 细胞对 KG1A 细胞的杀伤活性与其 KIR2DL1 的表达率存在负相关( $r = -1.00, P = 0.00$ )。

表 1 NK 细胞 KIR2DL1 表达率与其对 KG1A 细胞的杀伤率(%)

供者	KIR2DL1 表达率	对 KG1A 细胞的杀伤率
1	33.20 ± 1.95	93.70 ± 1.12
2	39.52 ± 1.54	88.67 ± 0.49
3	46.04 ± 1.12	86.38 ± 0.85
4	55.09 ± 1.40	73.69 ± 0.66
5	57.25 ± 0.66	71.49 ± 0.35
6	66.36 ± 1.22	70.40 ± 0.89
7	76.50 ± 0.87	51.62 ± 1.58
8	83.48 ± 1.65	49.28 ± 1.09
9	92.69 ± 1.47	44.40 ± 1.97

### 3 讨论

NK 细胞是机体抗感染及抗肿瘤的第一道防线, NK 细胞的杀伤作用受到其抑制性信号和活化性信号的调节,生理情况下,抑制性信号占优势地位。KIR 是 NK 细胞表面主要的抑制性受体,其配体为 HLA I 类分子<sup>[6-7]</sup>。生理情况下, NK 细胞通过其表面 KIR 识别并结合 HLA I 类分子,传递抑制信号,阻止其对机体正常细胞的杀伤作用。不同的 KIR 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-Bw4; KIR3DL2 识别 HLA-A3, A11; 其余的 KIR 配体尚未明确<sup>[8]</sup>。HLA I 类分子表达缺失或下降的靶细胞,因 KIR 不能传递抑制信号, NK 细胞被活化,从而杀伤靶细胞。这种识别模式称为错配(missing-self)模式<sup>[9]</sup>。在异基因造血干细胞移植中, KIR-HLA 信号通路对 NK 细胞功能的影响受到国内外学者的重视。

目前,根据供受者的 HLA I 类分子配型,可分为 2 大类情况:(1)受者不表达供者的 KIR 表型的配体,即 KIR 配体错配;(2)受者表达供者的 KIR 表型的配体。在临床上, Pende 等<sup>[10]</sup>分析了 21 例白血

病儿童外周血干细胞移植供者的 KIR 配受体,在大多数患者中,在移植与供者来源 KIR-HLA 错配的 NK 细胞后,显示了不同程度的抗白血病效应,改善了异基因造血干细胞移植的预后。另一方面, Parham 等<sup>[11]</sup>发现, KIR2DL1 识别 KG1A 细胞株表面 HLA-C2 表型,可抑制 NK 细胞杀伤 KG1A 细胞的活性。而 KIR2DL1 作为 NK 细胞表面主要的抑制性分子,在各种恶性肿瘤患者免疫效应中起到重要的作用<sup>[12-13]</sup>。已有研究<sup>[14]</sup>表明,不同个体 NK 细胞表面 KIR2DL1 表达率具有差异,但 KIR2DL1 的表达对 NK 细胞杀伤 KG1A 细胞的影响国内尚无报道<sup>[15-17]</sup>。

已有研究<sup>[18]</sup>表明, NK 细胞与鼻咽癌细胞株 CNE2 持续性接触,导致 NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性减低,这与 NK 细胞表面与 CNE2 细胞表面特定 HLA I 类分子结合的 KIR 分子表达上调有关。本研究用 PCR-SSP 法检测发现, KG1A 细胞的基因型为 HLA-Cw05,即 KG1A 细胞表达 KIR2DL1 的配体。KIR 在 NK 细胞上的分布呈克隆性。本实验通过流式细胞术测定不同个体 NK 细胞表面的 KIR2DL1 表达,证实了不同个体 NK 细胞表面的 KIR2DL1 表达率存在明显差异。KIR2DL1 表达率较低者,其 NK 细胞杀伤 KG1A 细胞活性明显高于表达率高者; KIR2DL1 表达率越低,与配体 HLA-Cw05 匹配程度越小,即 KIR-HLA 的错配程度增大, KIR2DL1 传递的抑制信号越弱,导致 NK 细胞被活化,从而发挥杀伤靶细胞的作用。说明 NK 细胞对 KG1A 细胞的杀伤与其表面的 KIR2DL1 表达呈负相关。

本研究结果表明,同种异体 NK 细胞对 KG1A 细胞的杀伤活性差异,与 NK 细胞表面 KIR2DL1 的表达率有关,也就是说与 NK 抑制性信号强弱有关。由此推论,在临床同种异体 NK 细胞输注治疗中,选择供者时应考虑其 KIR-HLA 匹配程度,选择匹配程度越小的供者有助于增强移植抗白血病效应<sup>[19-20]</sup>,改善白血病患者的预后,但其在临床上的应用还有待于进一步大样本的研究。

### [参考文献]

- [1] Ravandi F, Estrov Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(2): 340-344.
- [2] 牛新清, 郭坤元, 周健, 等. 同种异体 NK 细胞对 CD34<sup>+</sup> 早期急性髓系白血病细胞的细胞毒效应 [J]. 南方医科大学学报, 2008(2): 173-175.
- [3] Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of

innate and adaptive immunity [ J ]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 217-251.

[ 4 ] 鲍晓晶, 何军, 陈子兴, 等. 非血缘关系 HLA 全相合造血干细胞移植中供者—受者 NK 细胞 KIR 的研究 [ J ]. *中华血液学杂志*, 2007( 8 ): 510-513.

[ 5 ] 周健, 牛新清, 梅家转, 等. 同种异体 NK 细胞对不同肿瘤细胞的体外杀伤活性及其机制的初步探讨 [ J ]. *现代免疫学*, 2008( 1 ): 7-11.

[ 6 ] Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors [ J ]. *Curr Opin Immunol*, 2004, 16( 5 ): 626-633.

[ 7 ] Lanier LL. Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition [ J ]. *Nat Immunol*, 2008, 9( 5 ): 495-502.

[ 8 ] Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules [ J ]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, 367( 1590 ): 800-811.

[ 9 ] Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: Regulation by the killer cell Ig-like receptors ( KIR ) [ J ]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8( 23 ): 2211-2220.

[ 10 ] Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: Evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity [ J ]. *Blood*, 2009, 113( 13 ): 3119-3129.

[ 11 ] Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: Hindrance and help for haematopoietic transplants [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3( 2 ): 108-122.

[ 12 ] Junevik K, Werlenius O, Hasselblom S, et al. The expression of NK cell inhibitory receptors on cytotoxic T cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia ( B-CLL ) [ J ]. *Ann Hematol*, 2007, 86( 2 ): 89-94.

[ 13 ] Al Omar S, Middleton D, Marshall E, et al. Associations between genes for killer immunoglobulin-like receptors and their ligands in patients with solid tumors [ J ]. *Hum Immunol*, 2010, 71( 10 ): 976-981.

[ 14 ] 何颖芝, 郭坤元, 梅家转, 等. 同种异体 NK 细胞对人脐静脉内皮细胞 ECV304 的杀伤活性差异及分子机制探讨 [ J ]. *免疫学杂志*, 2007( 6 ): 649-651.

[ 15 ] Almeida CR, Ashkenazi A, Shahaf G, et al. Human NK cells differ more in their KIR2DL1-dependent thresholds for HLA-Cw6-mediated inhibition than in their maximal killing capacity [ J ]. *PLoS One*, 2011, 6( 9 ): e24927.

[ 16 ] Golden-Mason L, Bambha KM, Cheng L, et al. Natural killer inhibitory receptor expression associated with treatment failure and interleukin-28B genotype in patients with chronic hepatitis C [ J ]. *Hepatology*, 2011, 54( 5 ): 1559-1569.

[ 17 ] Petlichkovski A, Djulejic E, Trajkov D, et al. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Roma from republic of macedonia [ J ]. *Int J Immunogenet*, 2011, 38( 6 ): 493-500.

[ 18 ] 郭坤元, 梅家转, 姚开泰, 等. 人鼻咽癌细胞株 CNE2 对 NK 细胞 KIR/NKG2D 受体免疫编辑作用及其对 NK 细胞杀伤功能的影响 [ J ]. *南方医科大学学报*, 2007, ( 3 ): 247-249.

[ 19 ] Yoon SR, Lee YS, Yang SH, et al. Generation of donor natural killer cells from CD34( + ) progenitor cells and subsequent infusion after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic cell transplantation: A feasibility study [ J ]. *Bone Marrow Transplant*, 2010, 45( 6 ): 1038-1046.

[ 20 ] Nguyen S, Beziat V, Norol F, et al. Infusion of allogeneic natural killer cells in a patient with acute myeloid leukemia in relapse after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation [ J ]. *Transfusion*, 2011, 51( 8 ): 1769-1778.

[ 收稿日期 ] 2012 -03 -11                      [ 修回日期 ] 2012 -05 -16

[ 本文编辑 ] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

### 文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》，全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定，正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示( pH 用正体除外)，例如 *m*( 质量)、*t*( 时间)、*c*( 浓度)、*V*( 体积)、*p*( 压力)、*F*( 力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示，例如 kg( 千克)、m( 米)、h( 小时)、mol/L( 摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的浓度或质量浓度时，一般使用 L( 升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时，不能写成 mg/kg/d 的形式，应写成 mg/( kg · d) 或 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 的形式。(5)单位符号常见书写错误：长度单位符号 A° ( 埃)已不用，应写作 0.1 nm；时间单位“小时”符号为 h( 不是 hr)、“秒”符号为 s( 不是 sec)；转速单位符号为 r/min( 不是 rpm)；量浓度单位符号为 mol/L( 不是 M、N，也不是 mol/mm<sup>3</sup>)；力的单位“牛顿”符号为 N[ 不是 dyn( 达因)、kgf( 千克力)，换算 1 dyn = 10<sup>-5</sup> N]；热量单位“焦耳”符号为 J[ 不是 cal( 卡)、kcal( 千卡)，换算 1 cal = 4. 187 J]；放射性活度单位符号为 Bq[ 不是 Ci( 居里)，换算 1 Ci = 3. 7 × 10<sup>10</sup> Bq ]。

( 本刊编辑部 )