

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¹, 薛同圆², 忻勇杰², 张佳佳², 张轩煜², 陆艺³, 李玉华¹(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^[1]。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^[2], 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^[3]。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^[4]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^[2, 5]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 Biolegend 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 μ l、ddH₂O 598 μ l、Taq 酶 7.6 μ l, 混匀, 阴性对照孔加此混合物 10 μ l, 混合物中加 127 μ l DNA, 混匀后实验孔分别加 10 μ 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⁺ 细胞并计数, 分管。按每 1 \times 10⁶ 细胞 1 μ 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⁻CD16⁺CD56⁺ 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 10⁶ 个细胞 1 μ 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⁻CD16⁺CD56⁺ 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[®] 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⁻CD16⁺CD56⁺ 细胞, 显示 NK 细胞的纯度达 (92.5 \pm 2.3) % (图 1)。

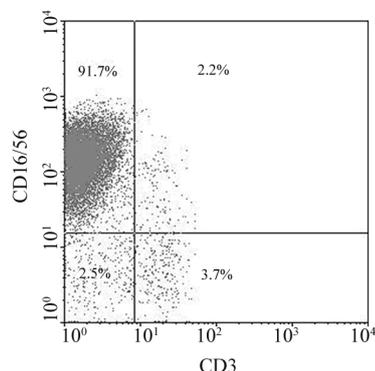


图 1 流式细胞术检测分选后 NK 细胞的纯度

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。

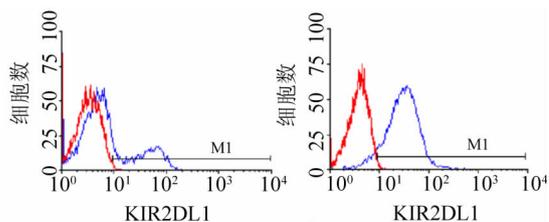


图 2 2 例标本中 NK 细胞 KIR2DL1 的表达率

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^[6-7]。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^[8]。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^[9]。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^[10]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^[11]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^[12-13]。已有研究^[14]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^[15-17]。

已有研究^[18]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^[19-20],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⁺ 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⁻¹ · d⁻¹ 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/mm³); 力的单位“牛顿”符号为 N[不是 dyn(达因)、kgf(千克力), 换算 1 dyn = 10⁻⁵ 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 × 10¹⁰ Bq]。

(本刊编辑部)