

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.01.013

· 基础研究 ·

MICA 基因多态性与乳腺癌细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性

陈淑萍, 周智锋, 林万松, 李洁羽, 刘枋, 叶韵斌(福建省肿瘤医院 福建医科大学附属肿瘤医院 肿瘤免疫学研究室 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福建 福州 350014)

[摘要] **目的:** 探讨 MHC-I 类链相关分子 A (MHC class I chain-related molecule A, MICA) 多态性与乳腺癌细胞对 NK 细胞杀伤敏感性的关系。 **方法:** 测序分析乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S 和 SK-BR-3 的 MICA 等位基因, 用 Western blotting 和流式细胞术检测 MICA 重组表达载体转染 293T 细胞 (分别命名为 pMCFA5.1、pMCFA4、p231A5R、p231A9 和 p435A5P) MICA 蛋白的表达水平, 用 LDH 法检测 NK 细胞对转染 MICA 的 293T 细胞的杀伤活性, 酶联免疫斑点法检测 NK 细胞穿孔素、颗粒酶 B 分泌水平。 **结果:** MCF-7 细胞表达 MICA*008/A5.1 和 MICA*001/A4, MDA-MB-231 和 SK-BR-3 细胞均表达 MICA*019/A5 和 MICA*002/A9, MDA-MB-435S 细胞表达 MICA*010/A5。转染 MICA 后, pMCFA5.1 组 293T 细胞 MICA 蛋白的表达水平最低 ($P < 0.05$), p435A5P 组次之 ($P < 0.05$), pMCFA4 组、p231A5R 组和 p231A9 组表达水平较高 (均 $P < 0.05$)。NK 细胞对转染 MICA 的 293T 细胞杀伤活性及穿孔素、颗粒酶 B 分泌: p435A5P 组对 NK 细胞杀伤的敏感性最低 ($P < 0.05$), 穿孔素、颗粒酶 B 分泌水平最低 (均 $P < 0.05$); pMCFA5.1、pMCFA4、p231A5R 和 p231A9 各组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论:** MICA 基因多态性与乳腺癌细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性密切相关。

[关键词] 乳腺癌细胞; MICA 基因; 多态性; 自然杀伤细胞

[中图分类号] R737.9; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)01-0073-06

Associations of MICA gene polymorphism with susceptibility of breast cancer cells to NK cell-mediated cytotoxicity

CHEN Shuping, ZHOU Zhifeng, LIN Wansong, LI Jieyu, LIU Fang, YE Yunbin (Tumor Immunology Laboratory, Fujian Cancer Hospital & Affiliated Cancer Hospital of Fujian Medical University, Fujian Key Laboratory of Translational Cancer Medicine, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] Objective: To investigate the associations of MHC class I chain-related molecule A (MICA) gene polymorphism with susceptibility of breast cancer cells to NK cell-mediated cytotoxicity. **Methods:** MICA alleles of breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435S and SK-BR-3) were analyzed by DNA sequencing. MICA protein expression in 293T cells transfected with MICA recombinant expression vectors (namely pMCFA5.1, pMCFA4, p231A5R, p231A9 and p435A5P) was detected by Western blotting and Flow cytometry; the cytotoxicity of NK cells against the above 293T cells were measured by lactate dehydrogenase (LDH) assay and the release of perforin (PFN) and granzymes B (Gzm B) were measured by ELISPOT assay. **Results:** DNA sequencing result showed that MICA*008/A5.1 and MICA*001/A4 were expressed in MCF-7 cells, MICA*019/A5 and MICA*002/A9 were expressed in both MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells while MICA*010/A5 was expressed in MDA-MB-435S cells. After the MICA recombinant expression vectors were transfected into 293T cells, the level of MICA were the lowest in pMCFA5.1 group ($P < 0.05$), following after p435A5P group ($P < 0.05$), and highly expressed in the pMCFA4, p231A5R and p231A9 groups ($P < 0.05$). NK cell-mediated cytotoxicity and the release of PFN and Gzm B: NK cell-mediated cytotoxicity were the lowest in p435A5P group ($P < 0.05$), and the ability of inducing NK cells to release PFN and Gzm B was also the lowest in p435A5P group ($P < 0.05$), but there were no statistical difference among the other transfected groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** MICA gene polymorphism is closely associated with susceptibility of breast cancer cells to NK cell-mediated cytotoxicity.

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目资助(国卫办医函[2013]544号);福建省自然科学基金资助项目(No. 2015J01433)。Project supported by the National Clinical Key Specialty Construction Program of China (Letter of the National Health Office [2013] 544), and the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2015J01433)

[作者简介] 陈淑萍(1980-),女,硕士,主管技师,主要从事肿瘤免疫学研究,Email: csp2214@163.com

[通信作者] 叶韵斌(YE Yunbin, corresponding author),博士,教授、主任医师,博士生导师,主要从事肿瘤免疫学研究, E-mail: zjyunbin@189.cn

[Key words] breast cancer cell; MHC class I chain-related molecule A (*MICA*) gene; polymorphism; natural killer cell (NK cell)

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(1): 73-78. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.01.013]

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤,其发病率有逐年上升的趋势。乳腺癌可以通过多种机制逃逸机体免疫监视,包括自身抗原改变、不表达共刺激分子、诱导机体T淋巴细胞凋亡和机体免疫耐受等,但仍有许多机制尚未明了。NK细胞是机体抗肿瘤天然免疫的重要效应细胞,是机体防御的第一道屏障,在控制肿瘤生长方面发挥重要作用。MHC-I类链相关分子A (MHC class I chain-related molecule A, *MICA*)是非经典的HLA-I类分子,是NK细胞表面主要活化受体NKG2D的配体,可高表达于上皮源性的肿瘤细胞^[1-2]。*MICA*与NKG2D结合后,激活NK细胞,促进对表达*MICA*分子的肿瘤细胞的杀伤^[3]。*MICA*基因具有高度多态性,并与肿瘤、自身免疫病及人类对某些病毒的易感性相关^[4-6]。*MICA*基因多态性可能影响其蛋白与NKG2D的结合。笔者前期检测了乳腺癌细胞株MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S和SK-BR-3的*MICA*表达,发现表达部位不同,而流式细胞术或Western blotting检测293T细胞均不表达*MICA*蛋白。因此,本研究检测了乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S和SK-BR-3的*MICA*等位基因,构建*MICA*基因真核表达载体并转染293T细胞,旨在探讨*MICA*基因多态性与乳腺癌细胞对NK细胞杀伤敏感性的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S和SK-BR-3购自中国科学院上海细胞库,293T细胞株来自福建医科大学。MEM、高糖DMEM、L-15及1640培养基和胎牛血清购自美国GIBCO公司,大肠杆菌DH5 α 菌株、载体pcDNA3.1/myc-His(-)A及LipofectamineTM 2000购自美国Invitrogen公司,载体pMD 18-T Vector购自TaKaRa公司,*Xho* I、*Kpn* I购自美国BioLab公司,Rneasy Mini Kit、质粒抽提纯化试剂盒购自德国Qiagen公司,DC蛋白定量试剂盒购自美国Bio-Rad公司,乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒购自美国Roche公司,*MICA*单克隆抗体及流式抗体PE-*MICA*、PE-IgG_{2B}购自美国R&D公司,流式抗体FITC-CD3、PE-CD56、APC-NKG2D购自美国BD公司,NK Cell Isolation Kit购自德国Miltenyi Biotec公司。

1.2 细胞培养

乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S和SK-BR-3为本实验室常规培养。MCF-

7、SK-BR-3细胞分别培养于含10%胎牛血清的MEM、DMEM培养基,在37℃、5%CO₂培养箱中培养。MDA-MB-231、MDA-MB-435S细胞培养于含10%胎牛血清的L-15培养基,在37℃中培养箱中培养。每种细胞均2~3 d进行一次细胞传代(0.25%胰蛋白酶-EDTA消化)。

1.3 PCR扩增*MICA*基因

收集对数生长期MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S和SK-BR-3细胞,用Rneasy Mini Kit提取总RNA,逆转录合成cDNA,PCR扩增全长*MICA*基因。引物由上海Invitrogen公司合成,*MICA*引物序列:*F*为5'-ATGGGGCTGGGCCCGGTCTTCCT-3',*R*为5'-CTAGGTGCCCTCAGTGGA-3'。扩增程序为:95℃预变性5 min;95℃ 5 min,55℃ 30 s,72℃ 90 s,共25个循环;72℃延伸7 min后冷却至4℃。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后进行胶回收。纯化回收的*MICA*基因PCR产物与pMD 18-T Vector在4℃连接过夜,次日转化DH5 α ,经酶切鉴定后,4个细胞株各挑取10个阳性克隆,送至上海Invitrogen公司进行测序,获得*MICA*基因序列。用DNAMAN分析软件将获得的*MICA*序列与*MICA*基因数据库进行比对,分析*MICA*基因的多态性。

1.4 Western blotting检测转染293T细胞的*MICA*表达

将*MICA*等位基因*MICA**008/A5.1、*MICA**001/A4、*MICA**019/A5、*MICA**002/A9、*MICA**010/A5分别克隆入pcDNA3.1/myc-His(-)A载体,构建*MICA*等位基因重组表达载体,分别命名为pMCF A5.1、pMCF A4、p231A5R、p231A9和p435A5P。质粒大量抽提后,用脂质体法转染293T细胞。以未转染的293T细胞为空白对照(Ctrl),转染pcDNA3.1的293T细胞为阴性对照(negative control, NC),转染不同*MICA*等位基因的293T细胞作为实验组。

收集未转染及转染*MICA*的293T细胞,提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。SDS-PAGE分离蛋白后转膜,5%BSA室温封闭2 h后弃去封闭液。加入一抗*MICA*单克隆抗体(1:500)及内参 β -Tubulin,室温1~2 h或4℃过夜。除去未结合一抗,加入二抗Anti-mouse IgG(1:4 000),室温孵育1~2 h。除去未结合二抗,TBST洗3次,每次5 min。加入显色液,避光振荡5 min,用化学发光成像系统扫描图像。

1.5 流式细胞术检测转染293T细胞的*MICA*表达

收集未转染及转染*MICA*的293T细胞,PBS洗涤后每管加100 μ l细胞悬液(约 1×10^6 个),检测管加10 μ l PE-*MICA*,同型对照管加10 μ l PE IgG_{2B},混匀,

室温避光孵育 15 min。加 PBS 洗涤后,每管加 200~400 μ l PBS 重悬,流式细胞仪检测 *MICA* 的表达水平。

1.6 LDH 法检测 *MICA* 基因多态性对 NK 细胞杀伤的影响

NK 细胞培养参考本科室常规方法^[7]:LDH 法检测 NK 细胞对不同 *MICA* 等位基因转染的 293T 细胞的杀伤作用,效靶比 20:1。以培养 17~20 d 的 NK 细胞为效应细胞,未转染及转染 *MICA* 的 293T 为靶细胞。空白对照组:100 μ l 培养液;靶细胞自发 LDH 释放组:50 μ l 靶细胞 + 50 μ l 培养液;靶细胞最大 LDH 释放组:50 μ l 靶细胞 + 50 μ l 培养液 + 5 μ l 裂解液;效应细胞自发 LDH 释放组:50 μ l NK 细胞 + 50 μ l 培养液;实验组:50 μ l NK 细胞 + 50 μ l 靶细胞。每组设 3 个复孔。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 及饱和湿度条件下培养 4 h。每孔加 100 μ l 反应混合物(新鲜配制),15~25 $^{\circ}$ C 避光孵育 5~30 min 后,每孔加 50 μ l 终止液,振摇 10 s,用酶标仪检测波长为 490 nm 或 492 nm 处的光密度(*D*)值。按照下述公式计算 NK 细胞杀伤率:杀伤率(%)=(实验组 *D* 值 - 效应细胞自发 LDH 释放组 *D* 值 - 靶细胞自发 LDH 释放组 *D* 值)/(靶细胞最大 LDH 释放组 *D* 值 - 靶细胞自发 LDH 释放组 *D* 值) \times 100%

1.7 酶联免疫斑点(ELISPOT)法检测 NK 细胞穿孔素、颗粒酶 B 分泌水平

在预包被抗体的 PVDF 孔板中,每孔加入 100 μ l PBS,室温孵育 10 min,去液体。每孔加入 100 μ l 细胞悬液(50 μ l 2×10^6 NK 细胞/ml,50 μ l 5×10^4 靶细胞/ml);在 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中孵育 18 h,去液体,加入 100 μ l PBS-0.1% Tween 20/孔,4 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,每孔加 100 μ l 稀释 100 倍的检测抗体/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min,去液体,再加入 100 μ l 链霉亲和素碱性磷酸酶稀释液(1:5 000)/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,去液体后加入 100 μ l BCIP/NBT/孔。洗膜、干燥后用 ELISPOT 分析仪读取斑点。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较应用配对 *t* 检验,多组样本均数的比较应用方差分析,同时进行多重均数比较 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌细胞株 *MICA* 基因的 4 种等位基因

来源于 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S、SK-BR-3 的 pMD 18-T-*MICA* 重组质粒,各挑 10 个阳

性克隆测序,用 DNAMAN 分析软件将 *MICA* 序列与 *MICA* 基因数据库(<http://hla.alleles.org/alleles/classo.html>)进行比对结果见表 1。

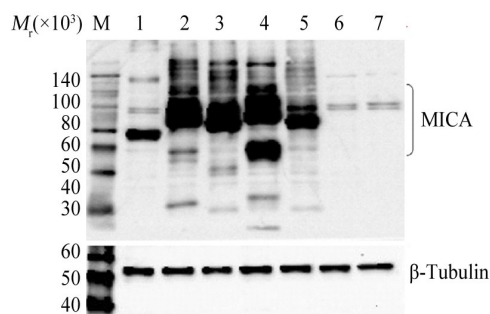
表 1 乳腺癌细胞系的 *MICA* 等位基因

Tab. 1 *MICA* alleles of breast cancer cell lines

Breast cancer cell line	<i>MICA</i> allele
MCF-7	<i>MICA</i> *008/A5.1, <i>MICA</i> *001/A4
MDA-MB-231	<i>MICA</i> *019/A5, <i>MICA</i> *002/A9
MDA-MB-435S	<i>MICA</i> *010/A5
SK-BR-3	<i>MICA</i> *019/A5 和 <i>MICA</i> *002/A9

2.2 转染 *MICA* 后 293T 细胞 *MICA* 蛋白的表达变化

Western blotting 检测结果(图 1)显示,转染不同 *MICA* 等位基因的 293T 细胞均有不同程度的 *MICA* 蛋白表达,其中以 pMCFA5.1 组表达最低($P < 0.05$),p435A5P 组其次($P < 0.05$),而 pMCFA4、p231A5R 和 p231A9 组表达水平较高(均 $P < 0.05$)。



M:Marker; 1:pMCFA5.1; 2:pMCFA4; 3:p231A5R; 4:p231A9; 5:p435A5p; 6:NC; 7:Ctrl

图 1 转染与未转染 *MICA* 组 293T 细胞的 *MICA* 蛋白表达
Fig. 1 Protein levels of *MICA* in 293T cells transfected with or without *MICA* were measured by Western blotting

流式细胞术检测检测结果(图 2)表明,*MICA* 转染后,293T 细胞膜表面 *MICA* 蛋白的表达水平,以 p435A5P 组表达水平最低($P < 0.05$),其次是 pMCFA5.1 组和 pMCFA4 组($P < 0.05$),而 p231A5R 组和 p231A9 组表达水平较高($P < 0.05$)。

2.3 NK 细胞对转染 *MICA* 的 293T 细胞的杀伤作用

用 LDH 法检测结果(图 3)显示,转染 *MICA* 后,与空白对照组及阴性对照组相比,靶细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性明显升高($P < 0.05$);在 *MICA* 转染的 293T 细胞中,p435A5P 组对 NK 杀伤的敏感性最低($P < 0.05$),pMCFA5.1、pMCFA4、p231A5R、p231A9 各组对 NK 杀伤的敏感性之间相比差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

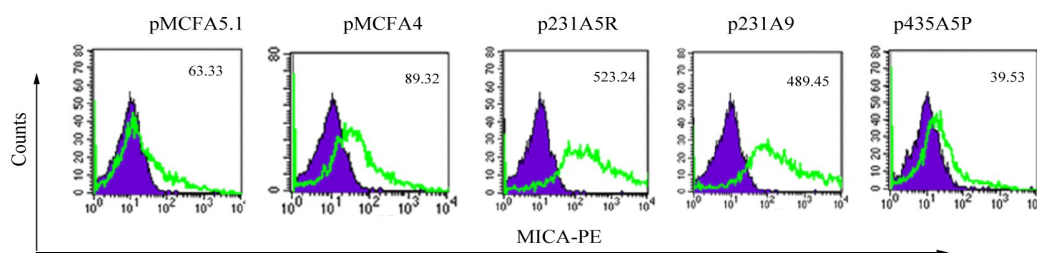
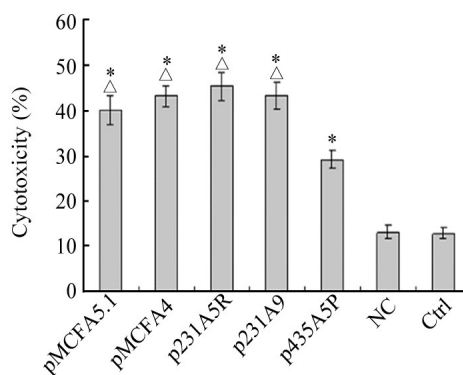


图2 流式细胞术检测转染MICA后293T细胞膜表面的MICA蛋白表达

Fig.2 Protein levels of MICA on 293T cell membrane after MICA transfection were measured by flow cytometry

2.4 转染MICA的293T细胞诱导NK细胞分泌穿孔素和颗粒酶B

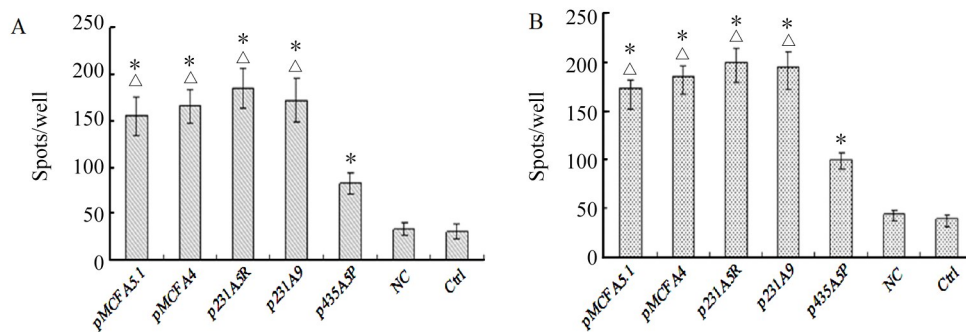
将不同MICA等位基因转染的293T细胞与NK细胞共培养后, ELISPOT法检测结果(图4)显示, 与空白对照组及阴性对照组相比, 实验组中, 以p435A5P组诱导NK细胞分泌穿孔素和颗粒酶B的能力最低($P < 0.05$)外, 其余各组(pMCFA5.1、pMCFA4、p231A5R、p231A9组)诱导NK细胞分泌穿孔素和颗粒酶B的能力均较高($P < 0.05$), 且各组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



* $P < 0.05$ vs Ctrl group or NC group, $\Delta P < 0.05$ vs p435A5P group

图3 NK细胞对转染MICA基因的293T细胞的杀伤作用

Fig. 3 Cytotoxicity of NK cells to 293T cells transfected with MICA gene



* $P < 0.05$ vs Ctrl group or NC group, $\Delta P < 0.05$ vs p435A5P group

图4 转染MICA的293T细胞诱导NK细胞释放穿孔素(A)和颗粒素(B)

Fig. 4 293T cells transfected with MICA gene induces NK cells releasing perforin(A) and granzyme B(B)

3 讨论

NKG2D表达于所有NK细胞、 $\gamma\delta T$ 细胞、 $CD8^+ \alpha\beta T$ 细胞表面。MICA/B是NKG2D的主要配体, 正常情况下仅在胃肠道上皮细胞表面有少量表达, 感染、肿瘤恶性转化等条件能诱导MICA/B表达^[8-9]。MICA分子对NK细胞杀伤的敏感性与肿瘤细胞表面MICA/B的表达水平呈正相关, 肿瘤细胞表面MICA/B的表达水平影响NK细胞的杀伤活性^[10-11]。MICA基因具有高度多态性, 目前已发现并命名的MICA等位基因多达90多个, 编号

为MICA*001~MICA*076。编码胞外区的外显子2、3、4是MICA等位基因多态性的集中区域; 另外, 穿膜区有一个三核苷酸重复序列的微卫星多肽位点(GCT)。根据GCT的差异至少已发现8个等位基因, 分别命名为A4、A5、A5.1、A6、A7、A8、A9和A10等^[12], 数字代表GCT的重复数目。A5.1是在A5基础上插入一个G, 在2个GCT重复顺序后插入一个碱基G, 导致在穿膜区提前出现终止密码子, 编码产生可溶性蛋白^[13]。

NK细胞的杀伤敏感性与肿瘤细胞表面MICA/B的表达水平呈正相关, 提高MICA/B的表达水平, 可

使肿瘤细胞对NK细胞杀伤的敏感性明显增强。但本课题组以往研究^[14]发现,乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S和SK-BR-3的MICA表达部位及表达水平与NK细胞杀伤的敏感性不一致,究其原因,*MICA*基因存在多态性,可能影响它与NKG2D的结合,导致乳腺癌细胞对NK细胞杀伤的敏感性各不相同。所以本研究将乳腺癌细胞来源的MICA等位基因克隆入pcDNA 3.1/myc-His(-)A真核表达载体,进一步进行功能研究。

转染MCF-7来源的pMCFA5.1后MICA蛋白表达水平最低,可能是由于A5.1编码截短型蛋白,产生可溶性MICA分泌至上清。但pMCFA5.1仍有部分结构锚定在细胞膜上,固定在细胞膜上的MICA仍可与NKG2D结合,诱导NK细胞活化,促进NK细胞对靶细胞的杀伤。另外,MCF-7来源的pMCFA4蛋白表达水平较高,膜蛋白的表达水平相对不高,提示MICA*001/A4基因编码的蛋白可能在结构上不稳定,导致MICA蛋白部分降解,分泌至细胞质中。

MDA-MB-231来源的MICA*019/A5、MICA*002/A9都编码全长MICA,因此这两种等位基因构建的重组载体(p231A5R、p231A9)转染293T细胞后,Western blotting和流式细胞术检测结果一致,显示MICA蛋白表达水平较高,对NK细胞杀伤的敏感性也较高。MDA-MB-231和SK-BR-3细胞同样表达这两种基因,本课题组前期研究^[14]结果显示,MDA-MB-231对NK杀伤的敏感性高于SK-BR-3,而前者膜MICA的表达水平高于后者。推测其原因,当细胞中表达的是编码全长蛋白的MICA等位基因时,决定NK细胞杀伤敏感性的主要是膜MICA的表达水平。

本课题前期对蛋白序列分析比对发现,MDA-MB-231表达的MICA*019/A5和MDA-MB-435S表达的MICA*010/A5仅在蛋白N端(膜外区)第29位氨基酸有差异,MICA*019/A5在该位点为精氨酸(arginine, Arg),而MICA*010/A5在该位点为脯氨酸(proline, Pro)。可能由于Pro破坏蛋白质的二级结构,影响整个蛋白的稳定以及与NKG2D的结合,因此由该等位基因所构建的p435A5P组的Western blotting和流式细胞术检测结果都显示该蛋白低表达,并且对NK细胞杀伤相对不敏感。本课题前期^[14]的研究结果显示,MDA-MB-435S对NK细胞杀伤的敏感性最低,而该细胞的MICA只表达在细胞质中。这与MICA*010/A5结构分析的结果一致。

MICA是NK细胞表面主要的活化性受体NKG2D的配体。在课题组以往的研究^[15]中检测到乳腺癌细胞系自身都表达MICA蛋白,因此选择不表达MICA蛋白的非乳腺癌293T细胞,构建了MICA等位

基因的真核表达载体来转染293T细胞,初步探讨了MICA基因多态性与NK细胞杀伤乳腺癌细胞的关系。研究结果表明,MICA基因多态性与乳腺癌细胞对NK细胞杀伤的敏感性有关。通过检测MICA等位基因,筛选对NK细胞治疗敏感的肿瘤患者,有望指导以NK细胞为主的过继免疫治疗,是实现NK细胞个体化治疗的有效手段。但本研究仍有许多机制尚未阐明,如乳腺癌患者的MICA基因多态性与其对NK细胞治疗的敏感性,将是后续研究的重点。

[参考文献]

- [1] XU X, RAO G S, GROH V, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A/B (MICA/B) expression in tumor tissue and serum of pancreatic cancer: role of uric acid accumulation in gemcitabine-induced MICA/B expression[J/OL]. BMC Cancer, 2011, 11: 194[2017-05-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3118197/>. DOI: 10.1186/1471-2407-11-194.
- [2] WANG J, LI C, YANG D, et al. Clinico-pathological significance of MHC-I type chain-associated protein A expression in oral squamous cell carcinoma[J/OL]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(2): 715-718 [2017-05-02]. http://journal.waocp.org/article_26210_657a_546_deac420d734eff54bfd0d9f65.pdf. DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.2.715.
- [3] CHAUVEAU A, AUCHER A, EISSMANN P, et al. Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells[J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(12): 5545-5550[2017-05-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2851811/>. DOI: 10.1073/pnas.0910074107.
- [4] RAACHE R, BELANTEUR K, AMROUN H, et al. Association of major histocompatibility complex class I chain-related gene a dimorphism with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults in the Algerian population[J/OL]. Clin Vaccine Immunol, 2012, 19(4): 557-561[2017-05-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3318287/>. DOI: 10.1128/0144-5498.010074107.
- [5] GARCÍA G, DEL PUERTO F, PÉREZ A B, et al. Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection[J]. Hum Immunol, 2011, 72(10): 904-907. DOI: 10.1016/j.humimm.2011.06.010.
- [6] CHO W K, JUNG M H, PARK S H, et al. Association of MICA alleles with autoimmune thyroid disease in Korean children[J/OL]. Int J Endocrinol, 2012: 235680[2017-05-20]. <http://www.hindawi.com/journals/ije/2012/235680>. DOI: 10.1155/2012/235680.
- [7] 周智锋, 柳硕岩, 郑庆丰, 等. NKG2D配体在中晚期食管癌患者术后NK细胞免疫治疗中的作用[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40(22): 1373-1377. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.20130898.
- [8] IBANA J A, AIYAR A, QUAYLE A J, et al. Modulation of MICA on the surface of Chlamydia trachomatis-infected endocervical epithelial cells promotes NK cell-mediated killing[J/OL]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 65(1): 32-42[2017-05-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5029121/>. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00930.x.
- [9] RAULET D H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(10): 781-790. DOI: 10.1038/nri1199.

- [10] 王新利, 李卿, 蒋涛, 等. NK 细胞杀瘤活性与肿瘤细胞表面 MICA/B 表达的相关性研究[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(2): 95-97.
- [11] YAMANEGI K, YAMANE J, KOBAYASHI K, et al. Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, augments the expression of cell-surface NKG2D ligands, MICA/B, without increasing their soluble forms to enhance susceptibility of human osteosarcoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity[J/OL]. *Oncol Rep*, 2010, 24(6): 1621-1627[2017-05-02]. <http://www.spandidos-publications.com/or/>. DOI: 10.3892/or_00001026.
- [12] CAMPILO J A, LOPEZ-HERNANDEZ R, MARTINEZ-BANACLOCHA H, et al. MHC class I chain-related gene a diversity in patients with cutaneous malignant melanoma from southeastern Spain [J/OL]. *Dis Markers*, 2015, 2015: 831864[2017-05-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4370202/>. DOI: 10.1155/2015/831864.
- [13] COX S T, MADRIGAL J A, SAUDEMONT A. Diversity and characterization of polymorphic 5' promoter haplotypes of MICA and MICB genes[J/OL]. *Tissue Antigens*, 2014, 84(3): 293-303[2017-05-02]. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1399-0039](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1399-0039). DOI: 10.1111/tan.12400.
- [14] 张丽平, 周智锋, 李洁羽, 等. 调节性 T 细胞对 NK 细胞体外杀伤乳腺癌细胞的影响[J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(1): 58-62. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20100014.
- [15] 叶韵斌, 周智锋, 郑蕊蕊, 等. KIR 不相合的 NK 细胞对乳腺癌细胞的体外杀伤作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(1): 26-30. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2007.01.006.

[收稿日期] 2017-09-04

[修回日期] 2017-11-15

[本文编辑] 党瑞山

· 读者·作者·编者·

常见参考文献著录格式示例

1 专著

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 其他责任者(例如翻译者). 版本项(1版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 起页—止页.

- [1] ABRAMS W B, BEERS M H, BERKOW R. 默克老年病手册[M]. 陈灏珠, 王赞舜, 刘厚钰, 等. 译. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 22-25.

2 专著析出文献

著录格式: 析出文献主要责任者. 文献题名[文献类型标志]//专著主要责任者. 专著题名. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 起页—止页.

- [1] WEINSTEIN L, SWARTZ M N. Pathogenic properties of invading microorganisms[M]//SODERMAN W A Jr, SODEMAN W A. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

3 期刊文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页—止页. 数字对象唯一标识符.

- [1] NOBLES K N, GUAN Z, XIAO K, et al. The active conformation of beta-arrestin 1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and-2[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (29): 21370-21381. DOI: 10.1074/jbc.M611483200.

4 专利文献

著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[文献类型标志]. 公告日期或公开日期.

- [1] 钱其军, 李琳芳, 吴红平, 等. 一种多功能免疫杀伤转基因细胞(PIK)、其制备方法及其用途: 中国, 2010101496839[P]. 2010-10-14.

5 学位论文

著录格式: 责任者. 题名[文献类型标志]. 学位授予单位所在地: 学位授予单位, 年.

- [1] 曹新广. Cathepsin L 和 Cystatin B 的表达与大肠癌生物学行为的关系[D]. 郑州, 郑州大学, 2007.

6 电子文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页—止页(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问路径. 数字对象唯一标识符.

- [1] KALOS M, LEVINE B L, PORTER D L, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2011, 3: 95ra73[2016-06-08]. <http://stm.sciencemag.org/content/3/95/95ra73.long>. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002842.

- [2] HOPKINSON A. UNIMARC and metadata: Dublin core[EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.