

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.12.002

顺铂对鼻咽癌细胞 NKG2D 配体表达和 NK 细胞杀伤活性的增强作用

梅家转¹, 刘桂举¹, 冯睿婷¹, 郭坤元²

Cisplatin Induces Up-regulation of NKG2D Ligands and Enhances Natural Killer Cell Lysis of Nasopharyngeal Carcinoma Cells

MEI Jia-zhuan¹, LIU Gui-ju¹, FENG Rui-ting¹, GUO Kun-yuan²

1. Department of Oncology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, China; 2. Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University

Corresponding Author: GUO Kun-yuan, E-mail: gzyuan@pub.guangzhou.gd.cn

Abstract: Objective To explore the effects of Cisplatin(DDP) on the expression of NKG2D ligands and HLA-class I molecules on human nasopharyngeal carcinoma cell line (CNE2) and natural killer (NK) cells cytotoxicity. **Methods** The IC_{50} of DDP against CNE2 cells were measured by MTT assay. Cytotoxicities of NK cells isolated from 3 healthy volunteers against CNE2 cells before and after cultured by DDP were analyzed by LDH releasing assay at effector-to-target cell ratio(E:T) of 20:1. The expression of NKG2D ligands(MICA/B, ULBP1, ULBP2, ULBP3), HLA-class I molecules before and after treated by DDP were assayed by flow cytometry. **Results** DDP could decrease the proliferation and survival rate of CNE2 cells. The IC_{50} was 5 mg/L. The cytotoxicity of NK cells against CNE2 cells cultured by DDP was significantly enhanced. The expression of NKG2D ligands(MICA/B, ULBP1, ULBP3) of CNE2 cells were up-expressed after cultured with DDP. There were no significant difference of expression of ULBP2 and HLA-class I molecules before and after treated by DDP($P>0.05$). **Conclusion** The results indicate that DDP up-regulated the expressions of MICA/B, ULBP-1, ULBP-3, which enhanced the susceptibility of CNE2 cells to natural killer cell-mediated lysis.

Key words: Nasopharyngeal Carcinoma; Cisplatin; Natural Killer Cell; NKG2D ligands

摘要:目的 研究顺铂(Cisplatin, DDP)作用前后人鼻咽癌细胞 CNE2 NKG2D 配体和 HLA-I 类分子表达的改变及 NK 细胞杀伤活性的变化。**方法** MTT 法测定 DDP 对 CNE2 细胞的 50% 抑制量(IC_{50}); 以此浓度 DDP 作用 CNE2 细胞 24h, 乳酸脱氢酶释放法检测效靶比 20:1 时, NK 细胞对 DDP 作用前后的 CNE2 细胞的杀伤活性; 流式细胞仪检测 DDP 作用前后的 CNE2 细胞表面 NKG2D 配体(MICA/B、ULBP1、ULBP2、ULBP3)和 HLA-I 类分子表达的变化。**结果** DDP 对 CNE2 细胞的 IC_{50} 为 5 mg/L。效靶比 20:1 时, NK 细胞对 5 mg/L DDP 作用前后的 CNE2 细胞的杀伤活性分别为(38.11 ± 1.41)%, (47.71 ± 1.53)%, 差异有统计学意义($P<0.05$), DDP 作用后 CNE2 细胞表面 MICA/B、ULBP1、ULBP3 表达显著升高, 与作用前相比差异有统计学意义($P<0.05$)。ULBP2、HLA-I 类分子无明显变化($P>0.05$)。**结论** DDP 能提高 CNE2 细胞 NKG2D 配体(MICA/B、ULBP1、ULBP3)的表达, 从而增强 CNE2 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感度。

关键词: 鼻咽癌; 顺铂; 自然杀伤细胞; NKG2D 配体

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2009)12-0996-03

0 引言

鼻咽癌是中国南方常见的恶性肿瘤, 放疗、化疗

是治疗的主要手段。早期患者通过单纯放疗可达到根治; 晚期患者采用了多种方式的放、化疗联合治疗, 虽然提高了局部控制率, 但远处转移并未明显减少, 严重影响了患者的生存。因此, 仍需寻找新的方法提高晚期鼻咽癌患者的治愈率。我们的前期研究表明^[1]人鼻咽癌 CNE2 细胞表达 NKG2D 配体, NK 细胞通过 NKG2D 配体途径杀伤 CNE2 细胞。有研究表明^[2]用诱导分化剂 VD3、AZA、Bryo-1 等不同

收稿日期: 2009-02-12; 修回日期: 2009-09-10

作者单位: 1. 450003 郑州人民医院肿瘤内科; 2. 南方医科大学珠江医院血液科

通信作者: 郭坤元, E-mail: gzyuan@pub.guangzhou.gd.cn

作者简介: 梅家转(1966-), 男, 博士, 主任医师, 主要从事恶性肿瘤的生物治疗

药物联合,提高了 HL60 细胞表面 NKG2D 配体 ULBP5 表达,增加了 NK 细胞对其杀伤的敏感度。顺铂(Cisplatin, DDP)是治疗鼻咽癌最常用的化疗药物之一,本研究旨在观察 DDP 作用前后人鼻咽癌细胞 CNE2 表面 NKG2D 配体表达的改变及 NK 细胞杀伤活性的变化,为鼻咽癌的化疗联合生物治疗提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

NK 细胞分离缓冲液(磷酸盐缓冲液,PH 7.2,含 0.5% BSA 和 2mM EDTA)及 CD56 MicroBeads (Miltenyi Biotec 公司),FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG1(eBioscience 公司),RPMI1640 (Gibco 公司),淋巴细胞分离液(上海试剂二厂),rhIL-2 (上海华新公司),NK 细胞杀伤活性检测试剂盒(Cyto-Tox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega 公司),流式细胞仪(coulter 公司),抗人 HLA-I 类分子单克隆抗体、抗 MICA/B 单抗、抗 ULBP1 单抗、ULBP2 单抗、抗 ULBP3 单抗均为 BD 公司产品。人鼻咽癌细胞株 CNE2 由本实验室冻存。

1.2 方法

1.2.1 NK 细胞的分离纯化 常规密度梯度离心法分离 3 例健康人外周血单个核细胞,PBS 洗涤两次,计数细胞,CD56 MicroBeads 作细胞阳性分选,获得 CD3⁻ CD56⁺ 细胞,流式细胞仪检测 CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ 细胞的纯度。

1.2.2 细胞培养 细胞培养液为含 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640。培养 NK 细胞时加入 1000 u/ml 的 rhIL-2。

1.2.3 DDP 对 CNE2 细胞生长抑制率的检测 取对数生长期的 CNE2 细胞,以 1×10^5 /ml 的浓度接种于 96 孔培养板,培养过夜后,分别加入 $100 \mu\text{l} \times 10$ 倍药物浓度梯度的培养液,每孔总体积 $200 \mu\text{l}$,共设 7 个浓度梯度,1 个空白对照,各种药物浓度做 3 个平行孔。培养 48 h 后,每孔加入 $20 \mu\text{l}$ MTT 溶液,再培养 4 h 后,离心去除培养液,每孔加入二甲亚砜 $150 \mu\text{l}$,用震荡器震荡 10 min 后,在全自动酶标仪上选择波长 490 nm 测定吸光值(A 值),比色时空白孔调零,全部实验重复 3 次,取平均值。根据 A 值计算细胞存活率,计算公式为:细胞存活率(%) = 用药组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$ 。求出 DDP 的半数抑制浓度(IC_{50})。

1.2.4 NKG2D 配体和 HLA-I 类分子的检测 对数期生长的 CNE2 细胞以 1×10^5 /ml 的浓度接种

于 96 孔板,加入 DDP,使其终浓度相当于 IC_{50} ,以不加药物组做对照,培养 24 h 后,收集 DDP 处理前后的 CNE2 细胞,PBS 洗涤,计数细胞,分管,用间接标记法检测 NKG2D 配体和 HLA-I 类分子的表达,按 $1 \mu\text{g}/10^6$ 细胞浓度分别加入抗人 HLA-I 类分子单克隆抗体、抗 MICA/B 单抗、抗 ULBP1 单抗、抗 ULBP2 单抗、抗 ULBP3 单抗,4 °C 作用 30 min,PBS 洗涤后再加 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG1 二抗,4 °C 孵育 30 min,PBS 洗涤后上机,以同型 IgG1 抗体为阴性对照。用流式细胞仪分析 1×10^4 细胞中阳性细胞数,计算百分率。为减少误差,重复实验 3 次。

1.2.5 NK 细胞的细胞毒实验 免疫磁珠阳性分选 NK 细胞,按乳酸脱氢酶杀伤试剂盒说明进行 NK 细胞的细胞毒实验^[3]。以 IC_{50} 浓度的 DDP 作用前、后的 CNE2 细胞为靶细胞,检测效靶比 20:1 时,NK 细胞对 DDP 作用前后的 CNE2 细胞的杀伤活性。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS10.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,DDP 处理前后靶细胞表面 NKG2D 配体表达率比较采用配对样本 *t* 检验,NK 细胞杀伤率比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DDP 对 CNE2 细胞的半数抑制浓度

DDP 对 CNE2 细胞的 IC_{50} 为 5 mg/L。

2.2 DDP 作用前后的 CNE2 细胞对 NK 细胞的杀伤敏感度

效靶比 20:1 时,NK 细胞对 DDP 作用前后的 CNE2 细胞的杀伤率分别为 $(38.11 \pm 1.41)\%$ 、 $(47.71 \pm 1.53)\%$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 DDP 作用前后 CNE2 细胞表面 NKG2D 配体和 HLA-I 类分子的表达情况

CNE2 细胞与 5 mg/L DDP 共孵育 24 h 后,CNE2 细胞表面 MICA/B、ULBP1、ULBP3 的表达均有统计学意义($P < 0.05$); ULBP2 和 HLA-I 类分子的表达无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

3 讨论

NK 细胞是免疫系统的主要效应细胞,不仅对多种恶性肿瘤细胞系有杀伤活性,且在动物移植瘤模型中表现出良好的抗肿瘤活性^[4]。NK 细胞识别肿瘤细胞无 MHC 限制性,其对靶细胞的杀伤活性与其细胞表面的抑制性和活化性受体密切相关。抑

表 1 5 mg/L DDP 对 CNE2 细胞 NKG2D 配体和 HLA- I 类分子表达的影响(%, n=3, x±s)

Table 1 Effects of 5 mg/L DDP on the expressions of NKG2D ligands and HLA- I molecules on CNE2 cells(%, n=3, x±s)

	MICA/MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3	HLA- I molecules
Control	87.47 ± 1.80	3.47 ± 0.80	47.40 ± 0.66	2.53 ± 1.06	99.77 ± 0.12
5 mg/L	96.93 ± 1.33	19.57 ± 4.16	46.80 ± 0.61	22.23 ± 5.35	99.71 ± 0.18
<i>t</i>	5.446	6.503	1.134	7.182	0.349
<i>P</i>	0.032	0.023	0.374	0.019	0.760

制性受体主要为杀伤细胞免疫球蛋白样受体,其配体为 MHC- I 类分子,两者结合后,向 NK 细胞传递抑制性信号,使其不杀伤靶细胞。NKG2D 是 NK 细胞表面的主要活化性受体,其配体为 MICA/B 和 ULBP1~3。NKG2D 与肿瘤细胞表面的相应配体结合后,可以直接活化 NK 细胞,触发 NK 细胞的细胞毒性,在很大程度上 NKG2D 的活化决定了机体的抗肿瘤细胞免疫水平。目前很多研究发现^[5-8]细胞因子、分子靶向药物能够调节 NK 细胞与靶细胞表面活化性受体、配体的表达,增强 NK 细胞对靶细胞的杀伤活性。

本研究结果显示,DDP 可抑制 CNE2 细胞的生长,DDP 对 CNE2 细胞的 IC₅₀ 为 5 mg/L。5 mg/L DDP 作用 CNE2 细胞后,NK 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性明显提高,和 DDP 作用前相比两者的差异有显著统计学意义(P<0.05),表明 DDP 提高了 CNE2 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感度。我们进一步对 DDP 提高 CNE2 细胞对 NK 细胞杀伤敏感度的机制进行了研究,结果显示,DDP 作用后 CNE2 细胞表面 NKG2D 配体(MICA/B、ULBP1、ULBP3)表达上调,而 HLA- I 类分子的表达无变化,说明 DDP 主要通过上调 CNE2 细胞表面的活化性配体 MICA/B 和 ULBPs 的表达,增强 NK 细胞对其杀伤的敏感度。启示化疗可与 NK 细胞组成过继性免疫化疗方案,有望成为治疗鼻咽癌的新的方法,值得进行深入研究。

参考文献:

- [1] 梅家转, 郭坤元, 魏红梅. NKG2D 介导 NK 细胞对鼻咽癌细胞杀伤作用的体外研究 [J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(4): 233-236.
- [2] Rohner A, Langenkamp U, Siegler U, et al. Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid. Leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis [J]. Leuk Res, 2007, 31(10):1393-1402.
- [3] 梅家转, 郭坤元, 魏红梅, 等. 不同肿瘤细胞表面 MICA 的表达及 NK 细胞杀伤活性的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(1): 34-37.
- [4] 梅家转, 郭坤元, 吴远彬, 等. 同种异体 NK 细胞对人鼻咽癌细胞 CNE2 裸鼠皮下移植瘤的抑制作用 [J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(6):425-427.
- [5] Valés-Gómez M, Chisholm SE, Cassady-Cain RL, et al. Selective induction of expression of a ligand for the NKG2D receptor by proteasome inhibitors [J]. Cancer Res, 2008, 68(5): 1546-1554.
- [6] Roda JM, Joshi T, Butchar JP, 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):6419-6428.
- [7] Chrul S, Polakowska E, Szadkowska A, et al. 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(4):469-457.
- [8] Chen XM, Xu XQ, Sun K, et al. NKG2D ligands expression and NKG2D mediated cytotoxicity in human laryngeal squamous carcinoma cells [J]. Scand J Immunol, 2008, 67(5): 441-447.

[编辑:周永红;校对:黄国玲]