

人胶质瘤细胞 U251 逃逸 NK 细胞免疫杀伤机制的初步探讨

周 健,梅家转,郭坤元,牛新清,王 杨,涂三芳,周雪云

Aberrant Expression of NKG2D Ligand and High Expression HLA⁻ Molecules May Contribute to Immune Escape from Natural Killer Cell-mediated Immune Surveillance of Malignant Gliomas

ZHOU Jian, MEI Jia-zhuan, GUO Kun-yuan, NIU Xin-qing, WANG Yang, TU San-fang, ZHOU Xue-yun
Department of Hematology, Zhujiang Hospital, The Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

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

Abstract :Objective To explore the mechanism of immune escape from natural killer (NK) cell-mediated immune surveillance of malignant gliomas. **Methods** We took K562 cells cytotoxicity sensitively to NK cell as positive control, cytotoxicities of NK cells isolated from 5 healthy volunteers against U251 cells were analyzed by LDH releasing assay at different effector to-target cell ratios (E/T). The genes and proteins expression of NKG2D ligands on K562 and U251 cell line were respectively measured by RT-PCR and flow cytometry. In blocking experiments, mAbs of different NKG2D ligands and HLA⁻ molecules were added to the target cells at E/T of 20/1. **Results** Cytotoxicity of NK cells against K562 cells was much higher than that against U251 cells at the same ET ratio. There was a significant difference between them. The genes of NKG2D ligands were positive in K562 and U251 cells, All the proteins of NKG2D ligands were expressed on K562 cell surface, but only ULBP2 molecule was found on U251 cell surface. In blocking experiments, the cytotoxicity of NK cells against K562 cell was partially inhibited, that against U251 cell was not influenced when mAbs of different NKG2D ligands were added; the cytotoxicity of NK cells against U251 cell was dramatically upgraded, that against K562 cell was not influenced when mAb of HLA⁻ molecules was added. **Conclusion** Aberrant expression of NKG2D ligand and high expression HLA⁻ molecules may contribute to immune escape from NK cell-mediated immune surveillance of malignant gliomas.

Key words: Gliomas; Natural killer cell; NK cell receptor; Cytotoxicity; HLA⁻ molecules

摘 要:目的 探讨人神经胶质瘤细胞 U251 逃逸同种异体 NK 细胞免疫杀伤的机制。方法 以 K562 细胞为对照,应用 LDH 释放法检测不同效靶比时 NK 细胞体外杀伤 U251 细胞的活性。用 RT-PCR 检测 K562 和 U251 细胞 MHC⁻ 类链相关分子 A 和 B (MICA/B)、人巨细胞病毒糖蛋白 UL16 结合蛋白 (ULBP1~3) 基因,用流式细胞仪检测两细胞 MICA/B、ULBP1~3 和 HLA⁻ 分子的表达情况。效靶比 20/1 时用单抗分别阻断 K562 和 U251 细胞表面 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 和 HLA⁻ 类分子,观察 NK 细胞对其杀伤活性的变化。结果 同一效靶比时 NK 细胞杀伤 U251 细胞的活性明显低于杀伤 K562 细胞的活性,两者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); K562 和 U251 细胞均表达基因 MICA/B 和 ULBP1~3,但 U251 细胞仅低表达 ULBP2 分子。用单抗封闭 MICA/B 和 ULBP1~3 分子后,NK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性明显降低,对 U251 细胞的杀伤活性无明显改变。封闭 HLA⁻ 类分子后 NK 细胞对 U251 细胞的杀伤活性明显上升,对 K562 细胞的杀伤活性无明显改变。结论 U251 细胞逃逸 NK 细胞免疫杀伤机制可能是由于 U251 细胞高表达 HLA⁻ 类分子,不表达 NKG2D 的配体 MICA/B 和 ULBP1~3。

关键词:神经胶质瘤;自然杀伤细胞;自然杀伤细胞受体;细胞毒性试验;HLA⁻ 分子

中图分类号:R739.41;R730.51 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)04-0247-04

收稿日期:2007-04-23;修回日期:2007-09-07

作者单位:510282 广州,南方医科大学珠江医院血液科

通讯作者:郭坤元,E-mail:gzyuan@pub.guangzhou.gd.cn

cn

作者简介:周健(1974-),男,博士在读,主要从事造血干细胞移植和肿瘤生物治疗的研究

0 引言

神经胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,其发病率占全部脑部肿瘤的 50% 以上。因其生长活跃,沿神经纤维呈浸润性生长,与脑组织无

明显的界限,外科手术难以完全切除。加上脑组织对射线的耐受性差及血-脑脊液屏障对药物渗透的限制作用,恶性神经胶质瘤对化疗和放疗仅为中度敏感,大部分肿瘤会在原肿瘤周边0.5~3.0 cm 范围内复发^[1]。所以需要其他辅助治疗方法来控制肿瘤的复发,以延长生存期,改善远期疗效。NK 细胞是肿瘤免疫治疗的新的研究热点。随着临床和基础研究进展,人们发现部分神经胶质瘤细胞有逃避 NK 细胞免疫杀伤的生物学行为^[2]。本研究以 K562 细胞为对照,探讨人神经胶质瘤细胞 U251 逃逸 NK 细胞杀伤的机制,为提高 NK 细胞免疫治疗效果,寻找新的免疫治疗方案提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和细胞株

NK 细胞分离缓冲液和抗 CD56 免疫磁珠 (Miltenyi Biotec 公司), AMO-1 (anti-MICA, IgG1)、BMO-1 (anti-MICB, IgG1)、M295 (anti-ULBP1, IgG1)、M310 (anti-ULBP2, IgG1)、M551 (anti-ULBP3, IgG1) (德国 Alexander. steinle 教授惠赠), FITC 标记的鼠抗人 HLA- 类分子单抗 (W6/32, IgG2a) 和山羊抗小鼠 IgG (eBioscience 公司), RPMI1640 (Gibco 公司), LDH 杀伤活性检测试剂盒 (Promega 公司), Trizol (Invitrogen 公司), TaKaRa RNA kit (AMV) Ver. 3.0 (TaKaRa 公司), 胎牛血清 (杭州四季青公司)。人神经胶质瘤细胞株 U251 由中南大学湘雅医学院遗传研究所惠赠,人红白血病细胞株 K562 由本室冻存。用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37℃、5% CO₂、充分湿度的孵箱中培养,实验用细胞均处于对数生长期。

1.2 NK 细胞的分离纯化

用梯度密度沉淀法常规分离 5 例健康个体外周血单个核细胞, PBS 洗涤 2 次,计数细胞,按每 10⁷ 细胞加入 80 μl NK 细胞分离缓冲液和 20 μl 抗 CD56 免疫磁珠, 4℃ 孵育 15 min, 加入 1 ml 的缓冲液,离心,弃上清。然后按 10⁸ 细胞/500 μl 缓冲液悬浮细胞,加入 MiniMACS 磁场中的分选柱,进行分离。用 500 μl 缓冲液冲洗分选的阳性细胞,共 3 次。取下分选柱,置于无菌试管上,加入 RPMI1640 培养基 1 ml,用推注器推出分选的阳性细胞,获得 CD3⁺ CD56⁺ 细胞即为 NK 细胞。

1.3 NK 细胞的细胞毒实验

用 5% 胎牛血清 RPMI1640 悬浮 U251 和 K562 细胞,作为靶细胞,加于 96 孔板中,每孔 1 × 10⁴ 细胞/50 μl。以 NK 细胞为效应细胞,按不同效靶比 (5:1、10:1、20:1、40:1) 分别加入相应数量的效应细胞 50 μl。另设培养基对照孔,效、靶细胞自然释放孔,靶细胞最大释放孔,各组均设 3 个复孔。于孵箱中培养 4 h,靶细胞最大释

放孔提前 45 min 加 10 μl 裂解液,离心,每孔吸取上清 50 μl 转入另一 96 孔板中,加入 50 μl LDH 底物反应液,室温避光放置 30 min,每孔加 50 μl 反应终止液,酶标仪 490 nm 处测 OD 值。抗体封闭试验以效靶比 20:1 时, AMO1、BMO-1、M295、M310 和 M551 分别与 K562 和 U251 细胞室温孵育 15 min,再加入 NK 细胞检测杀伤率。NK 细胞杀伤率 (%) = (实验组 OD 平均值 - 靶细胞自然释放组 OD 平均值 - 效应细胞自然释放组 OD 平均值) / (靶细胞最大释放组 OD 平均值 - 靶细胞自然释放组 OD 平均值) × 100%。

1.4 MHC- 类链相关分子 A 和 B (MICA/B) 和人巨细胞病毒糖蛋白 UL16 结合蛋白 (ULBP1~3) mRNA 的检测

引物参考文献^[3]设计,由上海生工公司合成。收集 K562 和 U251 细胞,用 Trizol 一步法直接提取总 RNA,紫外分光光度计测 RNA 含量。取 2 μg 总 RNA,加入 20 μl 逆转录体系 (25 mM MgCl₂ 2 μl, 10 mM dNTP Mixture 2 μl, 10 × RT buffer 1 μl, 20 μmol/L 特异性下游引物 0.5 μl, Rnase Free ddH₂O 3.75 μl, Rnase Inhibitor 10 U, AMV Reverse Transcriptase 2.5 U) 混匀, 50℃ 20 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min 终止反应。直接在逆转录反应产物中加入 40 μl PCR 反应体系 (5 × PCR buffer 10 μl, TaKaRa Ex Taq 1.25 U, 20 μmol/L 上游特异性引物 0.5 μl, ddH₂O 29.75 μl) 混匀。95℃ 预变性 5 min, 95℃ 1 min, 65℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 10 min 终止反应。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析仪观察结果。

1.5 MICA/B 和 ULBP1~3 和 HLA- 分子测定

收集肿瘤细胞, PBS 洗涤 2 次,计数细胞,分管,用直接标记法检测 HLA- 类分子,按 1 μg/10⁶ 细胞浓度加入 W6/32, 4℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次。用间接标记法检测 MICA/B 和 ULBP1~3 分子的表达,加入 AMO-1、BMO-1、M295、M310 和 M551 一抗, 4℃ 作用 30 min, PBS 洗涤后再加 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG1 二抗, 4℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤后上机,以同型 IgG1 抗体 (Pharmingen 公司) 为阴性对照。用流式细胞仪分析 1 × 10⁴ 细胞中阳性细胞数,计算百分率。为减少误差,重复实验 3 次。

1.6 统计学方法

所有实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 13.0 软件处理数据,采用独立样本 *t* 检验以及单向方差分析。

2 结果

2.1 NK 细胞的纯度

流式细胞仪检测 NK 细胞 (CD3⁺ CD16⁺ CD56⁺) 的纯度为 (89.4 ± 3.26) %。

2.2 NK 细胞杀伤活性

2.2.1 不同效靶比时 NK 细胞杀伤 K562 和 U251 细胞的活性见表 1。同一效靶比时 NK 细胞对两种细胞的杀伤率之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。不同效靶比之间 NK 细胞对 K562 细胞杀伤率的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，对 U251 细胞杀伤率的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 不同效靶比时 NK 细胞杀伤 K562 和 U251 细胞的情况(%, $\bar{x} \pm s$)

	5 1	10 1	20 1	40 1
K562 细胞	29.32 \pm 1.17	45.33 \pm 1.78	58.37 \pm 2.35	72.37 \pm 3.06
U251 细胞	4.69 \pm 0.32	3.47 \pm 0.84	5.36 \pm 1.13	5.81 \pm 0.82

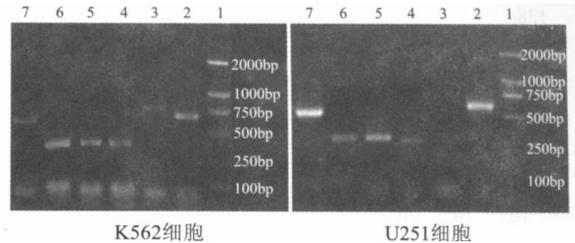
2.2.2 效靶比 20 1 时用抗体分别封闭靶细胞表面相应分子后 NK 细胞的杀伤情况见表 2。阻断靶细胞 NKG2D 的各配体, NK 细胞对 K562 细胞杀伤率有明显下降,对 U251 细胞的杀伤率无明显变化;阻断 HLA- α 分子, NK 细胞对 K562 细胞杀伤率无明显变化,对 U251 细胞的杀伤率明显上升。

2.3 K562、U251 细胞 MICA/B 和 ULBP1 ~ 3 基因的表达情况 两种细胞在 mRNA 水平均表达 5 种基因,见图 1。

2.4 K562 和 U251 细胞表面 MICA、ULBP1 ~ 3 和 HLA- α 分子的表达情况,见表 3、图 2。

3 讨论

NK 细胞是天然免疫的主要承担者,是机体抗肿瘤免疫的第一道天然防线。NK 细胞功能的发挥由其细胞表面活化性和抑制性受体传递的信号共同决定^[4]。NK 细胞表面主要抑制性受体为杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR),其共同特征是胞质区末端含有免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM),其配体为 MHC- I 分子。当抑制性 KIR 与 MHC 分子结合后,引起 KIR 分子在胞膜中聚集,使 ITIM 的酪氨酸磷酸化,向 NK 细胞传递抑制性信号,使其不杀伤靶细胞^[5]。NK 细胞表面活化性受体大致分为两大类,一类是 MHC- I 类分子特异性受体;另一类是非 MHC- I 类分子特异性受体,包括 C 型凝集素受体



1: DNA marker; 2: MICA (635bp); 3: MICB (690bp); 4: ULBP1 (319bp); 5: ULBP2 (327bp); 6: ULBP3 (321bp); 7: β -actin (510bp)

图 1 U251、K562 细胞 MICA/B 和 ULBP1 ~ 3 mRNA 的表达情况

和自然细胞毒受体 (NCR)。NKG2D 是 C 型凝集素受体超家族中的成员^[6],是 NK 细胞表面重要的活化受体,其配体为 MICA/B 和 ULBP1 ~ 3。NKG2D 与肿瘤细胞表面的配体分子相互交联后,可以直接活化 NK 细胞,触发 NK 细胞的细胞毒活性,在肿瘤免疫监视中起着非常重要的作用。

本研究结果显示,同一效靶比时 NK 细胞杀伤 U251 细胞的活性明显低于杀伤 K562 细胞的活性,两者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明以 NK 细胞杀伤敏感的细胞 K562 为对照,U251 细胞抵抗 NK 细胞的杀伤。用 RT-PCR 方法检测发现,K562 和 U251 细胞在 mRNA 水平均表达 MICA/B 和 ULBPs 基因,但流式细胞仪并未在 U251 细胞表面检测到 MICA/B 和 ULBPs 分子。另外,流式细胞仪检测发现 U251 细胞高表达 HLA- α 类分子,而 K562 细胞却不表达。因此可以推测,U251 细胞通过 HLA- α -KIR 信号途径向 NK 细胞传递抑制性信号,抑制性信号的参与会提高 NK 细胞的活化阈值。而 U251 细胞又不表达所有 5 个 NKG2D 的配体,不能向 NK 细胞传递活化性信号。因此与活化性信号相比,抑制性信号明显占优势,所以 U251 细胞抵抗同种异体 NK 细胞的杀伤。而 K562 细胞的情况则恰恰相反,其表面缺乏 HLA- α 分子,不会通过 HLA- α -KIR 系统向 NK 细胞传递抑制性信号,没有抑制性信号对活化性信号的对冲,NK 细胞活化的阈值就低。同时 K562 细胞又高表达活化性受体

表 2 效靶比 20 1 时阻断靶细胞表面相应分子后 NK 细胞的杀伤情况(%, $\bar{x} \pm s$)

	AMO-1	BMO-1	M295	M310	M551	W6/32
K562 细胞	40.82 \pm 1.47	43.26 \pm 2.41	45.42 \pm 1.58	50.74 \pm 2.16	41.72 \pm 1.66	60.08 \pm 2.76
U251 细胞	5.24 \pm 0.72	5.83 \pm 0.91	4.77 \pm 0.82	4.54 \pm 0.46	5.32 \pm 0.87	52.11 \pm 2.88

表 3 U251 和 K562 细胞表面 MICA/B 和 ULBP1 ~ 3 的表达情况(%, $\bar{x} \pm s$)

	MICA	MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3	HLA- α
K562 细胞	57.36 \pm 2.47	46.83 \pm 1.41	43.3 \pm 0.98	65.37 \pm 3.06	53.92 \pm 2.66	0.92 \pm 0.22
U251 细胞	4.05 \pm 0.32	3.43 \pm 0.21	2.72 \pm 0.12	19.4 \pm 1.43	5.43 \pm 0.75	99.41 \pm 0.52

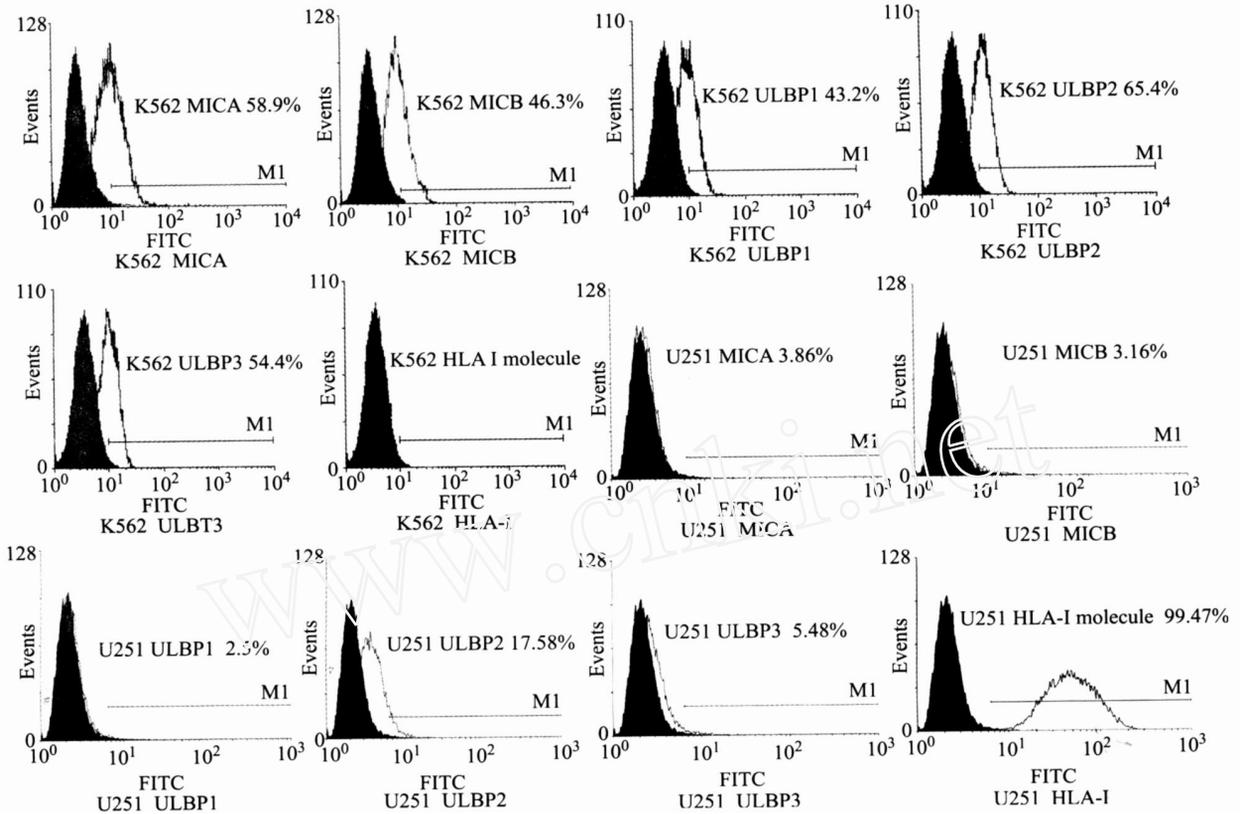


图 2 K562 细胞和 U251 细胞表面 NKG2D 的配体和 HLA-I 类分子的表达情况

NKG2D 的 5 种配体,因此任何同种异体 NK 细胞都表现出对 K562 细胞有很强的杀伤力。在效靶比为 20 : 1 时我们用 W6/32 抗体阻断肿瘤细胞表面的 HLA-I 分子后,NK 细胞对 U251 细胞的杀伤能力明显上升,而对 K562 细胞的杀伤活性没有明显变化。用 AMO-1、BMO-1、M295、M310 和 M551 抗体分别封闭靶细胞表面的相应配体,结果显示,NK 细胞对 K562 细胞的杀伤能力明显降低,而对 U251 细胞的杀伤活性没有明显变化。说明 NKG2D 配受体和 HLA-KIR 信号系统确实参与调节 NK 细胞对 U251 细胞的杀伤作用,也证实了我们上述的推理。但抗体阻断试验并没有完全阻断 NK 细胞杀伤 K562 细胞的活性,说明除了 NKG2D 介导的杀伤活性外,尚有其他信号通路参与 NK 细胞对其的杀伤作用。

本实验结果和 Friese 等^[3]的研究一致。Friese 等发现人神经胶质瘤细胞 LN-229 虽然表达 MICA,但由于该类肿瘤细胞高表达 HLA-I 类分子,因而对 NK 细胞抵抗。将转染 MICA 基因的 LN-229 细胞(LN-229/MICA)和未处理的 LN-229 细胞接种于裸鼠皮下,发现 LN-229/MICA 肿瘤生长明显延迟,体积明显缩小。该研究表明增强 NK 细胞活化性信号,可以对抗抑制性信号,提高 NK 细胞的细胞毒活性。另外本研究发现 U251 细胞在 mRNA

水平表达 MICA/B 和 ULBP 基因,但细胞表面 MICA/B 和 ULBP 蛋白的表达率极低。因此,研究如何使这些基因转录成蛋白表达在胶质瘤细胞表面,或者降低胶质瘤细胞的 HLA-I 分子,增强 NK 细胞的杀伤活性,将会为寻找新的免疫治疗方案提供新的思路。

参考文献:

- [1] Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials [J]. *Lancet*, 2002, 359 (9311): 1011-1018.
- [2] Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, et al. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape [J]. *J Immunol*, 2002, 168 (9): 4772-4780.
- [3] Friese MA, Platten M, Lutz SZ, et al. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (24): 8996-9006.
- [4] Raulet DH. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells [J]. *Semin Immunol*, 2006, 18 (3): 145-150.
- [5] Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20 (1): 217-251.
- [6] Pende D, Cantoni C, Rivera P, et al. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin [J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31 (4): 1076-1086.

[编辑:安 凤;校对:杨 卉]