

• 论 著 •

结肠直肠癌患者围手术期 NK 细胞活化性受体 NKG2D 与其配体 MICA/B 的表达

张 健¹, 马 莉^{2△}, 刘 俊³, 董明国³, 程 静³

(1. 苏州大学附属常州肿瘤医院检验科, 江苏 213001; 2. 贵阳医学院附属医院中心实验室, 贵州 550004; 3. 武汉科技大学附属天佑医院检验科, 湖北 430064)

摘 要:目的 观察结肠直肠癌(CRC)患者手术前后自然杀伤细胞(NK 细胞)活化性受体 NKG2D 与其配体 MICA/B 的表达,探讨 NKG2D-MIC 系统与肿瘤逃避免疫监视的关系。方法 流式细胞术检测 45 例 CRC 患者和 35 例健康体检者(对照组)外周血 NK 细胞活化性受体 NKG2D 的表达,组织 MICA/B 的表达;ELISA 检测血清 MICA(sMICA)的浓度。结果 CRC 组术前 NKG2D、MICA/B 的表达均降低,sMICA 浓度增高,与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。术后 NKG2D 的表达无显著增高,sMICA 浓度无显著降低,与对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 CRC 患者血清高水平的 sMICA,抑制了 NKG2D-MIC 介导的抗肿瘤免疫,导致 CRC 患者 NK 细胞抗肿瘤免疫低下。NKG2D 低表达,sMICA 高浓度的情况术后短期内不能迅速逆转。

关键词:结肠直肠肿瘤; 杀伤细胞,自然; 自然杀伤细胞凝集素样活化受体 K; 主要组织相容性复合体 I 类分子链相关蛋白 A/B; 可溶性主要组织相容性复合体 I 类分子链相关蛋白 A

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)02-0167-02

Research on Expression of the Activating Receptor NKG2D and its Ligand MICA/B of NK Cells in Patients with Colorectal Carcinoma During Perioperative Period

Zhang Jian¹, Ma Li^{2△}, Liu Jun³, Dong Mingguo³, Cheng Jing³

(1. The Clinical Laboratory, Affiliated Changzhou Tumor Hospital of Suzhou University, Jiangsu 213001, China;

2. The Central Laboratory, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guizhou 550004, China;

3. The Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Wuhan Science and Technology University, Hubei 430064, China)

Abstract:Objective To observe the expression of the activating receptor NKG2D and its ligand MICA/B of NK cells in patients with colorectal carcinoma(CRC)during perioperative period. To investigate the relation of NKG2D-MIC and carcinoma escaping from immunological surveillance. Methods To detect the activating receptor NKG2D of the NK cells in peripheral blood, the expression of the NKG2D ligand MICA/B on tissues by flow cytometry. To detect the density of soluble MICA(sMICA)by ELISA assay. Results The NKG2D are decreased in CRC group during preoperative period, the expression of the NKG2D ligand MICA/B on CRC tissues is decreased, but the level of sMICA is increased. When they were compared with control group, the distinction is significant. The expression of NKG2D did not increased and the level of sMICA did not decreased during postoperative period, the distinction is not significant. Conclusion The high expression of serum sMICA in CRC patients inhibited antitumor effect mediated by NKG2D-MIC, therefore the antitumor immune of NK cell in CRC patients was inferior. Abscise tumor could not quickly reverse the situation of decreased expression of NKG2D and high density of sMICA after operation.

Key words:colorectal neoplasms; killer cells, natural; the activating killer cell lectin-like receptor K; major histocompatibility complex class I chain-related protein A/B; soluble major histocompatibility complex class I chain-related protein A

结肠直肠癌(CRC)是消化道常见恶性肿瘤,严重威胁人类健康与生命。自然杀伤细胞(NK 细胞)作为天然免疫细胞,无须抗原激活,也不受主要组织相容性复合物(MHC)分子限制,即可直接发挥抗瘤效应;其生物学效应决定于抑制性和活化性受体群的相互竞争。自然杀伤细胞凝集素样活化受体 K(NKG2D)是触发 NK 细胞细胞毒反应的重要活化性受体,其配体为 MHC I 类分子相关蛋白(MIC)A 或 B(MICA/B)和 UL16 结合蛋白;NKG2D 与配体交联可触发 NK 细胞的细胞毒活性,在肿瘤免疫监视中具有重要作用^[1]。本研究通过检测 CRC 患者手术前后外周血 NK 细胞受体 NKG2D 与肿瘤组织上相应配体 MICA/B 的表达情况,探讨 NKG2D-MIC 系统与

肿瘤免疫逃逸的分子机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象 (1)CRC 组:2008 年 11 月至 2009 年 9 月在武汉科技大学附属天佑医院经病理检查确诊的 45 例 CRC 患者,均未接受放、化疗及激素治疗。CRC 组又分为 CRC 术前组和 CRC 术后组。(2)健康对照组:30 例体检健康者。

1.2 主要试剂和仪器 荧光标记抗体 CD16-FITC、CD56-FITC、NKG2D-PE、MICA/B-PE、CD3-PerCP、IgG1-FITC-IgG2α-PE 和 10×溶血素(美国 BD 公司);血清 MICA(sMICA)ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);Wellscan K3 酶标仪(芬兰雷勃公司);

△ 通讯作者, E-mail:gyfyzxs@yahoo.com.cn。

SYM-BIO 洗板机(上海新波公司)。

1.3 方法 (1)外周血的采集:抽取静脉血 4 mL,1 管为 ED-TA-K₂ 抗凝血 2 mL,采血后 2 h 内检测;另 1 管为非抗凝血 2 mL,分离血清置 EP 管中,−40 ℃ 保存备用。分别采集健康对照组,CRC 组患者术前和术后(术后 10~14 d)的血液标本。(2)组织的采集:CRC 患者手术切除的癌组织和良性癌旁组织(距癌组织 10~15 cm)。所有组织标本在组织切除 1 h 内采集并置生理盐水处理 EP 管中,−40 ℃ 保存备用。(3)流式细胞仪检测 NKG2D 的表达:取 100 μL 未抗凝全血,加入 CD16-FITC、CD56-FITC、NKG2D-PE、CD3-PerCP 各 20 μL,相应独特型抗体(IgG1-FITC-IgG2α-PE)作为阴性对照,避光孵育 20 min;加入稀释至 1×的溶血素 1 mL,混匀,室温避光反应 10 min;加入 PBS 缓冲液 1 mL 混匀,以离心半径 8 cm,1 000 r/min 离心 5 min 弃上清;加入 PBS 缓冲液 2 mL 混匀,相同方法离心 5 min 弃上清;加入 PBS 缓冲液 0.5 mL 混匀后上机检测。以前向角散射、侧向角散射设门,调整电压及增益,圈出淋巴细胞群,以 CD3⁺CD16⁺CD56⁺ 细胞群设门,检测 NKG2D 在 NK 细胞中的表达情况。(4)流式细胞仪检测组织 MICA/B 的表达:取 0.5 cm³ 大小组织标本,机械剪碎制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 1.0×10⁶/mL;取单细胞悬液 100 μL,加入 MICA/B-PE 20 μL 混匀,相应独特型抗体(IgG1-FITC-IgG2α-PE)作为阴性对照,避光孵育 20 min;加入 PBS 缓冲液 1 mL,混匀,以 8 cm 为离心半径,1 000 r/min 离心 5 min 弃上清;加入 PBS 缓冲液 0.5 mL 混匀后上机检测。(5)ELISA 检测 sMICA 水平:根据 ELISA 试剂盒说明书提供的方法进行血清标本 sMICA 水平的测定。

1.4 统计学处理 SPSS16.0 统计分析软件分析试验数据,结果以($\bar{x}\pm s$)表示。多组间总差异采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 时差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CRC 组手术前后及健康对照组外周血 NKG2D 的表达 结果见表 1。

表 1 CRC 术前组、术后组与健康对照组 NKG2D 阳性细胞百分比

组别	<i>n</i>	NKG2D 阳性细胞百分率(%)
健康对照组	35	14.51±5.00
CRC 术前组	45	7.33±3.25*
CRC 术后组	45	6.05±2.59* [#]

注:与健康对照组比较,**P*<0.05;与 CRC 术前组比较,[#]*P*>0.05。

2.2 CRC 癌组织及癌旁组织 MICA/B 的表达 MICA/B 阳性细胞在 CRC 癌组织及癌旁组织中所占百分比分别为(14.38±8.22)%和(45.21±18.19)%,癌组织细胞中 MICA/B 表达低于癌旁组织,差异有统计学意义(*P*<0.05)。

2.3 CRC 组手术前后与健康对照组 sMICA 的水平 结果见表 2。

表 3 CRC 术前组、术后组与健康对照组 sMICA 浓度

组别	<i>n</i>	sMICA(pg/mL)
健康对照组	35	15.11±3.72
CRC 术前组	45	33.49±4.69*
CRC 术后组	45	29.12±5.88* [#]

注:与健康对照组比较,**P*<0.05;与 CRC 术前组比较,[#]*P*>0.05。

3 讨 论

NK 细胞活化性受体 NKG2D 与肿瘤细胞膜上配体 MICA/B 的结合比 NK 细胞抑制性受体(KIR)与相应配体的结合更为牢固^[2]。王义平等^[3]证实 MICA/B mRNA 表达水平与 NK 细胞杀伤活性呈正相关,MICA/B 在肿瘤细胞表面的表达水平可能决定着 NK 细胞抗肿瘤免疫应答的强弱。

恶性肿瘤病因复杂,患者多伴有免疫抑制,肿瘤发病与免疫监视关系的研究逐渐受到重视。熊彪和邹尤宝^[4]的研究证实,大肠癌发生过程中 NK 细胞功能受抑,且与疾病进展密切相关;Clayton 等^[5]发现 NKG2D 是恶性肿瘤产生的外来物介导的免疫逃逸的靶目标,NKG2D 表达降低是肿瘤免疫逃逸的重要机制之一。本研究发现,CRC 患者表达 NKG2D 低于健康对照组,提示 NK 细胞抗肿瘤免疫功能受到抑制,MICA/B 在 CRC 癌组织的表达低于癌旁组织,CRC 患者 sMICA 浓度高于健康对照组。高水平的 sMICA 抑制 NKG2D-MIC 介导的抗肿瘤效应,可能是 CRC 逃避抗肿瘤免疫机制之一。Zhang 等^[6]发现 IFN-γ 能够下调 MICA/B 在肿瘤细胞中的表达并降低 NK 细胞的细胞毒活性。在乳腺癌患者体内,sMICA 能够抑制 NK 细胞表达 NKG2D,破坏 NK 细胞免疫监视功能,癌细胞的膜型 MICA/B 则可上调 NK 细胞 NKG2D 水平^[7]。

笔者既往研究显示,CRC 患者外周血 NKG2D 的表达与 CRC 组织分化程度呈负相关,血清 sMICA 浓度与 CRC 分期呈正相关^[8];食道癌患者随着癌症评级的增加和病程的发展,其体内 CD8⁺T 细胞表面 NKG2D 的表达降低^[9];肝癌患者 sMICA 水平与肝脏损害程度和是否合并肿瘤明显相关^[10];胃癌患者 sMICA 水平与癌症发展阶段和转移程度密切相关^[11]。上述研究结果说明 NKG2D 与 sMICA 可以作为判断消化道肿瘤恶性程度的指标。

本研究通过设置术前组和术后组,对 NKG2D 及 sMICA 在 CRC 患者围手术期的动态变化进行分析。研究发现,CRC 患者在手术治疗前后,其 NKG2D 表达及 sMICA 浓度无改变。外科手术在肿瘤免疫中具有双重作用:一方面能切除肿瘤病灶,减少肿瘤源性免疫抑制,改善患者免疫功能;另一方面手术、麻醉、药物及输血等因素有可能加重患者既有免疫功能损伤。本研究中手术未能改善 NKG2D-MIC 系统的受损情况,可能原因是患者免疫功能尚未恢复至正常水平,对 NK 细胞杀伤功能的抑制未完全解除。如果延长术后标本采集时间,将会使患者延期接受化疗,导致患者生存率下降;因此本研究在术后 10~14 d 采集 CRC 患者血液标本,有可能不能准确反映手术对 NKG2D 及 sMICA 的影响。

参考文献

[1] Gasser S,Raulet DH. Activation and self tolerance of natural killer cells[J]. Immunol Rev,2006,214(1):130-142.
[2] 丁修敬,陈晓峰,王和勇. MHC I 类链相关蛋白 A 在肿瘤免疫中的作用研究[J]. 临床肿瘤学杂志,2008,13(6):566-568.
[3] 王义平,张彩,牛家峰,等. NKG2D 配体在 13 种肿瘤细胞系中的表达及意义[J]. 癌症,2008,27(3):243-248.
[4] 熊彪,邹尤宝. 大肠癌患者外周血 T 细胞亚群和 NK 细胞活性检测的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(10):892-893.
[5] Clayton A,Mitchell JP,Court J,et al. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression[J]. (下转第 170 页)

3 讨 论

胚胎是动物个体发育的重要阶段,包括 IGF 在内的多种生长因子和激素在胚胎生长发育过程中发挥重要调控作用^[2]。IGF 具有同化作用,能增加细胞对葡萄糖和氨基酸的吸收,抑制蛋白质降解,刺激各种细胞的增殖和分化^[3]。

妊娠早期,IGF-Ⅰ等细胞因子在局部组织环境中可通过自分泌和旁分泌机制调节滋养细胞的增殖、分化等生理活动。有研究表明,IGF-Ⅰ可增加体外培养孕早期滋养细胞的增殖活性^[4];不仅可直接刺激胎儿神经、骨骼、血液和内分泌系统等的发育,还可改善胎盘功能,调节胎盘血流,增加胎盘对营养物质的摄取,从而促进胎儿生长^[5]。本研究结果表明对照组 IGF-Ⅰ浓度高于流产组,说明在正常情况下,胚胎发育早期 IGF-Ⅰ保持较高表达水平,证明 IGF-Ⅰ与早期胚胎的正常发育密切相关,在维护胚胎和胎盘正常生长方面具有重要意义。

IGF-Ⅱ可显著促进胎盘滋养细胞的浸润能力,利于胚胎着床,参与早期妊娠多个环节的调节,是胚胎发育的重要影响因素^[6]。Fang 等^[7]报道,在妊娠的前 3 个月,IGF-Ⅱ是早期合体滋养层细胞增殖和(或)分化的自分泌调节者;在孕 6 周,IGF-Ⅱ随绒毛外合体滋养层渗透入母体蜕膜,参与调节滋养层细胞的浸润过程。IGF-Ⅱ也具有抗细胞凋亡的作用^[8-9]。同胰岛素一样,IGF-Ⅱ可刺激葡萄糖在胎盘内的转运、合成,对胎盘的形成功能有显著影响,进一步影响胎儿生长发育^[10]。本研究显示,早期流产时 IGF-Ⅱ表达水平显著降低。IGF-Ⅱ低水平表达可影响胎盘的生长和功能,进而影响胚胎及滋养叶的生长、发育,同时使炎性细胞因子分泌增多,导致免疫微环境的破坏和异常的免疫排斥反应,最终导致流产。

IGFBP 作为 IGFs 的重要组成部分,不仅以高亲和力结合、转运 IGF,延长其半衰期,调控其生物活性,且具有独立的生物活性^[2]。IGFBP 在妊娠早期调节胚胎发育、内膜分化、胚泡着床、胎盘形成与发育。本研究显示,对照组 IGFBP-Ⅰ浓度高于流产组,与 Hills 等^[11]的研究结果一致,即 IGF-Ⅱ能诱导 IGFBP-1 的降解,促进胚泡植入。IGFBP-1 一方面通过抑制 IGF-Ⅱ生物活性,另一方面通过与滋养层细胞表面整合素相互作用,发挥其对滋养层细胞浸润的阻碍作用,使胚胎着床浅而易于流产。因此,IGF-Ⅱ与 IGFBP-1 共同组成一个调节网络,使胚胎精确地在子宫内膜着床并形成胎盘。

综上所述,IGFs 的发现为深入研究生殖医学开辟了新途径,但 IGFs 的作用机制仍未完全明了。本研究结果说明 IGFs

可作为预测自然流产的敏感因子,为进一步探索自然流产的发病原因及治疗开辟了新途径。

参考文献

[1] 肖琳,唐良茜.生长因子在子宫内 膜癌组织中的表达及意义[J].国外医学:妇产科学分册,2003,30(4):210-212.

[2] 张晓金,归绥琪.胎盘中的胰岛素样生长因子系统[J].国外医学:妇幼保健分册,2005,16(1):39-42.

[3] Fazleabas AT, Kim JJ, Strakova Z. Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment: a review[J]. Placenta, 2004, 25(Suppl A): 26-31.

[4] Soares DV, Conceição FL, Brasil RR, et al. Insulin-like growth factor I levels during growth hormone(GH)replacement in-GH-deficient adults: a gender difference [J]. Growth Horm IGF Res, 2004, 14(6): 436-441.

[5] Fuglsang J, Lauszus F, Flyvbjerg A, et al. Human placental growth hormone, insulin-like growth factor I and II, and insulin requirements during pregnancy in type 1 diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(9): 4355-4361.

[6] 周萍,邹丽.早孕绒毛滋养层细胞胰岛素生长因子-Ⅱ mRNA 表达与胚胎发育的关系[J].现代妇产科进展,2004,13(3):207-209.

[7] Fang Q, Wang YX, Zhou Y. Insulin-like growth factor binding protein 1 and human embryonic development during 6—10 gestational weeks[J]. Clin Med J, 2004, 117(4): 488-491.

[8] Crossey PA, Pillai CC, Miell JP. Altered placental development and intrauterine growth restriction in IGF binding protein-1 transgenic mice[J]. J Clin Invest, 2002, 110(3): 411-418.

[9] 周铁柱,康志伟,张晓光,等.胰岛素样生长因子-2 对局灶性脑缺血再灌注损伤的保护机制[J].中国老年学杂志,2010,30(8):1095-1097.

[10] Hastie PM, Onagbesan OM, Haresign W. Co-expression of messenger ribonucleic acids encoding IGF-Ⅰ, IGF-Ⅱ, type Ⅰ and Ⅱ IGF receptors and IGF-binding proteins (IGFBP-1 to-6) during follicular development in the ovary of seasonally anoestrous ewes [J]. Anim Reprod Sci, 2004, 84(1-2): 93-105.

[11] Hills FA, Elder MG, Chard T, et al. Regulation of human villous trophoblast by insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding protein-1[J]. J Endocrino, 2004, 183(3): 487-496.

(收稿日期:2010-05-04)

(上接第 168 页)

Immunol, 2008, 180(11): 7249-7258.

[6] Zhang C, Niu J, Zhang J, et al. Opposing effects of interferon-alpha and interferon-gamma on the expression of major histocompatibility complex class I chain-related A in tumors[J]. Cancer Sci, 2008, 99(6): 1279-1286.

[7] 叶韵斌,周智锋,陈强,等.可溶性 MICA 在乳腺癌免疫逃逸中的作用[J].细胞与分子免疫学杂志,2008,24(9):904-907.

[8] 张健,周有利,刘俊,等.结直肠癌患者 NKG2D 及其配体 MICA/B 的表达[J].中华实用诊断与治疗杂志,2009,9(23):862-864.

[9] Osaki T, Saito H, Fukumoto Y, et al. Inverse correlation between NKG2D expression on CD8⁺ T cells and the frequency of CD4⁺

CD25⁺ regulatory T cells in patients with esophageal cancer[J]. Dis Esophaus, 2009, 22(1): 49-54.

[10] Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, et al. Serum levels of soluble major histocompatibility complex(MHC)class Ⅰ-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Sci, 2008, 99(8): 1643-1649.

[11] 白威,王山川. NKG2D 可溶性配体水平在胃癌不同分期的表达及其与预后的关系[J].肿瘤研究与临床杂志,2009,21(11):750-752.

(收稿日期:2010-01-15)