

放疗对食管癌患者血清可溶性 MICA 含量 及外周血 NK 细胞功能的影响

刘晓静¹, 龚卫娟^{2*}, 龚春香², 范敏其², 黄普文¹

(1. 南京医科大学研究生院, 江苏 南京 210029; 2. 扬州大学医学院免疫学教研室, 江苏 扬州 225001)

摘要:目的 探讨经不同剂量高能 X 线照射后食管癌患者血清可溶性 MHC-I 类分子链相关基因 A (sMICA) 含量、自然杀伤细胞 (NK 细胞) 表面 NK 细胞 2 族成员 D (NKG2D) 受体的表达及其杀伤毒性的变化。方法 采用 ELISA 法检测中晚期食管癌患者 (n=28) 和正常对照 (n=21) 血清 sMICA 的含量, 并动态分析 6 例食管癌患者经不同剂量高能 X 线照射后血清 sMICA 含量的变化。采用流式细胞术检测 NK 细胞 NKG2D 受体的表达, 胞内染色法分析 NK 细胞杀伤靶细胞功能的变化。结果 与正常对照相比, 食管癌患者血清 sMICA 含量明显升高, 但不同放疗剂量对食管癌患者血清 sMICA 含量无显著影响。食管癌患者外周血阳性表达 NKG2D 的 NK 细胞比例与正常对照相比显著降低, 同时其细胞毒活性亦明显降低。而且与治疗前相比, 40~60 Gy 的放疗剂量时 NKG2D 阳性的 NK 细胞数增加, 同时其 NK 细胞毒活性最强。结论 放疗对食管癌患者血清 sMICA 含量无明显影响, 但适量放疗可使 NK 细胞毒活性增强。

关键词: 食管肿瘤; 放射治疗; MHC-I 类分子链相关基因 A; 自然杀伤细胞

中图分类号: R392.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2065(2009)08-0508-04

Effects of irradiation on the serum soluble MICA level and the peripheral NK cell cytotoxicity in esophageal cancer patients

LIU Xiaojing¹, GONG Weijuan^{2*}, GONG Chunxiang², FAN Minqi², HUANG Puwen¹

(1. Graduate School Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China;

2. Department of Immunology, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225001)

Abstract: Objective To investigate the variations in the level of serum soluble MHC class I chain-related gene A (sMICA), the expression of the surface receptor natural killer group 2 member D (NKG2D) on natural killer (NK) cells and the cytotoxicity of peripheral NK cells in esophageal cancer patients by irradiation. Methods The concentration of serum sMICA protein from medium and advanced esophageal cancer patients (n=28) and normal controls (n=21) were determined by ELISA, and the variations in the serum sMICA level were dynamically observed throughout the treatment with different doses of irradiation in 6 esophageal cancer patients. The NKG2D expression on NK cells were measured by flow cytometry, and the cytotoxicity on target cells was evaluated by intracellular staining with perforin antibody. Results In contrast to normal controls, serum sMICA level significantly increased in esophageal cancer patients, however, irradiation at different doses did not markedly affect the serum sMICA levels. The percentage of NKG2D-positive NK cells and their cytotoxicity significantly decreased. Furthermore, although there was no statistic variations in serum sMICA before and after irradiation, the percentage of NK cells and their cytotoxicity were enhanced at the irradiation dose of 40-60 Gy subsequent to the treatment and meanwhile, the NK cell cytotoxicity was at its peak. Conclusions Irradiation has no direct effects on the serum sMICA levels, whereas irradiation at adequate doses will promote the cytotoxicity of NK cells.

Key words: esophageal neoplasms; irradiation; MHC class I chain-related gene A; natural killer cells

MHC-I 类分子链相关基因 A (MHC class I chain-related gene A, MICA) 位于 HLA-B 位点上

① 基金项目: 国家自然科学基金 (30671917); 江苏省自然科学基金 (BK2004404, BK2008215); 江苏省高校自然科学基金 (04KJB320162)

* 通信作者, E-mail: gwj1974@126.net

游约 46 kb 其编码分子结构类似 HLA-I 类分子, 但不与 β_2 微球蛋白结合, 不递呈抗原肽。MICA 主要表达于绝大多数肿瘤细胞、病毒感染的细胞、受诱导分化药物处理的细胞及射线照射引起 DNA 损伤的细胞, 代表着机体的一种应激反应^[1]。MICA 通过与 NK 细胞、 $CD8^+$ T 细胞表面的活化性受体 NK 细胞 2 族成员 D(NKG2D) 相结合, 激活免疫系统而清除肿瘤及其他基因组损伤的细胞, 在抗肿瘤和抗感染中发挥重要作用^[2]。然而研究发现, 肿瘤细胞表面的 MICA 分子可受到金属蛋白酶的降解而成为可溶性分子 (sMICA), sMICA 与 NKG2D 结合后促进了受体的内吞和降解, 进而抑制 NK 细胞的功能^[3]。在前列腺癌^[4]、肠癌^[5]、宫颈癌^[6]及头颈癌^[7]中均显示血清内 sMICA 含量与患者预后呈负相关。另外, 我们的前期研究发现, 放疗可促进食管癌细胞株 ECA-109 表达 MICA 分子^[8], 但其是否对食管癌患者血清 sMICA 的含量产生影响, 目前尚不清楚。

研究发现, NKG2D 是 NK 细胞表面重要的活化性受体, 其表达量高低可反映 NK 细胞的活性状态^[9]。在食管癌的放疗过程中, 放疗剂量决定其局部肿瘤控制率, 但过高剂量的照射往往损伤患者的免疫功能。因此本研究探讨食管癌患者在接受放疗时对血清 sMICA 含量、NKG2D 阳性表达的 NK 细胞比例及 NK 细胞毒功能的影响, 从而深入了解食管癌患者放疗过程中患者体内 NK 细胞功能的变化, 为进一步研究放疗联合免疫增强治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂和药品 ELISA 双抗体夹心法检测试剂盒, 购自德国 Immatics Biotechnologies 公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG, 购自深圳晶美公司。淋巴细胞分离液购自上海生物工程公司; 小牛血清和胎牛血清为杭州四季青公司产品; RPMI-1640 培养基为 Invitrogen 公司产品; 青霉素、链霉素、 β 巯基乙醇为上海生物工程公司产品; K562 细胞为本室常规保存; FITC-CD56 单克隆抗体 (mAb)、PE-Cy5-穿孔素 mAb、PE-NKG2D mAb 购自 eBioscience 公司。

1.2 分组 正常对照组: 21 例正常人, 男 12 例, 女 9 例, 年龄 18~62 岁。收集血清 5 ml 其中 11 例同时收集外周抗凝血 5 ml。食管癌组: 28 例中晚期食管癌患者 (均为食管病灶长度 >5 cm, 未发现其他的转移灶), 男 16 例, 女 12 例, 年龄 51~78 岁。

1.3 方法

1.3.1 直线加速器照射食管癌患者 所有食管癌患者予以瓦利安直线加速器 6 MV X 线进行放疗。放疗后收集血清 5 ml 中 25 例同时收集外周抗凝血 5 ml。另外, 6 例食管癌患者在治疗前、治疗剂量累计达 20~30 Gy 及 40~60 Gy 时均收集血清 5 ml 外周抗凝血 5 ml。

1.3.2 ELISA 法检测血清 sMICA 浓度 双抗体夹心法, 包被抗体为 AMO1, 检测抗体为 BAMO3 (针对 MICA 分子的 $\alpha 3$ 结构域), 酶标抗体为 HRP 标记的羊抗鼠抗体。取标准品、患者血清、正常对照组血清及 PBS 各 100 μ l 加入各孔。封盖后 37°C 孵育 2 h; 冲洗 3 次, 用试剂稀释液将检测抗体稀释成终浓度为 400 μ g/L 各孔加入 100 μ l 封盖 37°C 孵育 2 h; 冲洗 3 次, 加酶, 冲洗 3 次, 加底物, 当显色满意后每孔加入终止液 (1 mol/L 硫酸) 50 μ l 终止反应; 轻拍使之混匀后立即上机检测, 以 450 nm 读取光密度值。经标准品曲线拟合后获得每份标本中 sMICA 的含量。

1.3.3 流式细胞仪检测 NKG2D 的表达 取 5 ml 外周抗凝血, Ficoll 常规分离外周血单个核细胞 (PBMC), 分别用 PE-NKG2D 单抗、PE-Cy5-CD56 单抗, FACS Aria 流式细胞仪检测 NKG2D 阳性表达的 NK 细胞比例。

1.3.4 NK 细胞毒活性测定 当 NK 细胞杀伤靶细胞时, 释放其细胞内的穿孔素, 胞内染色法分析穿孔素阳性 NK 细胞减少的数量 (即释放穿孔素的 NK 细胞) 占总 NK 细胞的比例, 可代表 NK 细胞的杀伤毒性。具体方法为: 取外周抗凝血 5 ml Ficoll 常规分离 PBMC, 与对数期 K562 细胞按 10:1 比例 37°C 5% CO_2 孵育 2 h 加入高尔基体阻断剂 brefeldin A (BFA, 10 mg/L), 4 h 后按照 eBioscience 公司胞内染色法的操作说明标记 NK 细胞内的穿孔素。

1.4 统计学处理 用 Graphpad 4.0 软件进行数据处理。组间血清 sMICA 含量、NKG2D 阳性表达的 NK 细胞数、NK 细胞毒活性的比较均用团体 t 检验。食管癌患者不同剂量照射后血清 sMICA 含量的变化用 ANOVA 方差分析和 q 检验。食管癌患者经不同剂量照射后 NKG2D 表达率、NK 细胞功能的变化采用团体 t 检验。P < 0.05 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 食管癌患者血清 sMICA 含量的变化 与正常对照组相比, 食管癌组血清内 sMICA 含量显著升高

($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 2组血清 sMICA 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清 sMICA 含量 (ng/L)
正常对照组	21	258.8 ± 26.69
食管癌组	28	899.2 ± 89.13

2.2 不同剂量放疗后食管癌患者血清 sMICA 含量的变化 我们动态观察了 6 例患者在治疗前、治疗剂量分别累计到 20~30 Gy 和 40~60 Gy 时血清 sMICA 含量的变化。结果显示, 6 例患者于治疗前、20~30 Gy 及 40~60 Gy 的治疗剂量时血清内 sMICA 含量无明显变化 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 不同放疗剂量对食管癌患者血清 sMICA 含量的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

照射剂量 (Gy)	sMICA 含量 (ng/L)
0	843.0 ± 374.7
20~30	833.8 ± 262.2
40~60	854.5 ± 359.6

2.3 食管癌患者外周血 NK 细胞 NKG2D 阳性表达率及 NK 细胞毒功能的变化 利用流式细胞术分析食管癌组和正常对照组外周血 NK 细胞表达 NKG2D 的阳性率, 结果显示食管癌组 NKG2D 阳性率显著降低 ($P < 0.05$), 见表 3。同时利用胞内染色法分析 NK 细胞接触 K562 细胞时, 释放穿孔素的 NK 细胞比例作为评价 NK 细胞杀伤毒性, 比较 2 组 NK 细胞的杀伤毒性, 发现食管癌组 NK 细胞毒性明显降低 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 3 2组 NK 细胞 NKG2D 阳性表达率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NKG2D 阳性 NK 细胞比例 (%)
食管癌组	25	23.1 ± 17.7**
正常对照组	11	84.5 ± 9.8

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$

表 4 2组 NK 细胞杀伤毒性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	释放穿孔素的 NK 细胞比例 (%)
食管癌组	25	25.8 ± 19.9**
正常对照组	11	49.6 ± 15.3

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$

2.4 40~60 Gy 的放疗剂量时 NKG2D 阳性表达率及 NK 细胞毒功能的变化 对 6 例食管癌患者动态检测其体内 NKG2D 的表达率及 NK 细胞毒功能, 分别比较治疗前、20~30 Gy 和 40~60 Gy 的治疗剂量时 NKG2D 阳性表达的 NK 细胞数, 发现 40~60 Gy

的治疗剂量时 NKG2D 表达率最高, 与治疗前相比差异有显著性 ($P < 0.05$), 见图 1。与之对应的是, 此时 NK 细胞杀伤毒性亦最高, 与治疗前相比明显提高 ($P < 0.05$), 见图 2。

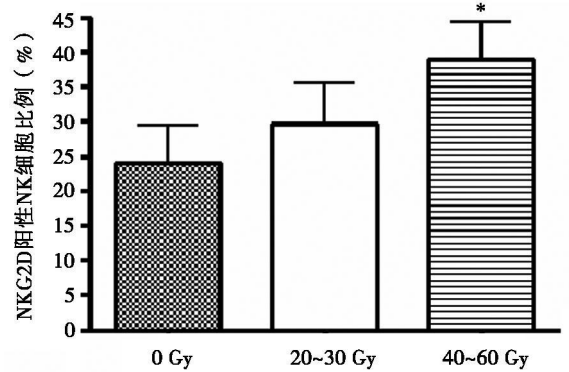


图 1 不同放疗剂量对 NK 细胞 NKG2D 阳性表达率的影响 (n=6) 与治疗前 (0 Gy) 比较: * $P < 0.05$

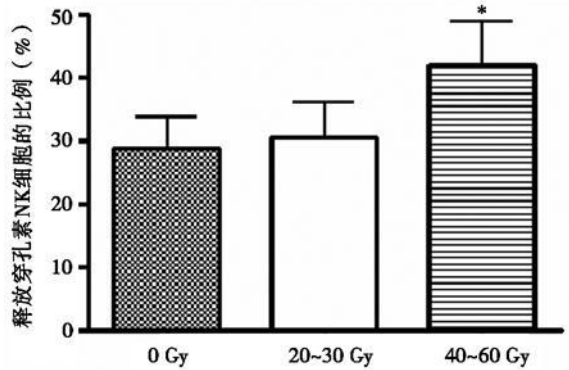


图 2 不同放疗剂量对 NK 细胞杀伤毒性的影响 (n=6) 与治疗前 (0 Gy) 比较: * $P < 0.05$

3 讨论

我们采用回顾性研究的手段, 不仅分析中晚期食管癌患者与正常个体血清内 sMICA 含量、NKG2D 阳性表达的 NK 细胞数及 NK 细胞毒活性, 还观察了接受不同放疗剂量治疗后, 患者血清内 sMICA 含量的变化、NKG2D 的表达及 NK 细胞功能变化, 从而在整体水平研究高能 X 线照射对患者体内肿瘤抗原表达及免疫功能的影响, 为在放射治疗过程中及时监测患者体内肿瘤负荷及评估免疫功能提供理论依据。

前期研究表明, sMICA 下调 NK 细胞的功能, 而且随着多数肿瘤病程的进展, sMICA 在血清中的含量升高。Groh 等^[3]发现 sMICA 能诱导 T 细胞表面

NGK2D的内吞和降解,并发现在胃肠恶性肿瘤患者的血清中含高水平的 sMICA 分子,且浸润至肿瘤部位的肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL)和外周血 T 淋巴细胞表面 NGK2D 受体的表达明显低下,从而认为是这些从肿瘤细胞表面释放的 sMICA 分子导致了 NGK2D 的下调,并进一步严重影响了抗原特异性 T 细胞的活性^[10]。Salih 等^[11]证实白血病患者肿瘤细胞亦表达 NGK2D 受体的配体 MHC-I 类分子链相关基因 (MIC)和 UL16 结合蛋白 (ULBP),且患者血清中亦含有高水平的 sMICA 分子。Dobrovina 等^[5]发现结肠癌患者血清中的高水平 sMICA 还可引起细胞毒性受体 NKp44 的表达下调,影响 NK 细胞的细胞毒功能。Jinushi 等^[12]发现,晚期肝癌患者血清中 sMICA 含量明显高于早期患者。本研究结果显示,食管癌患者与正常人相比,血清 sMICA 含量明显升高,说明 sMICA 同样与食管癌的进程相关。但不同剂量放疗后食管癌患者血清 sMICA 的含量无明显变化,提示放疗虽然可以促进肿瘤细胞上调膜表面 MICA 抗原表达,但对 MICA 自肿瘤细胞表面脱落无重要影响。

MICA 与 NGK2D 在抗肿瘤免疫中占有重要地位。NGK2D 在结肠癌患者的 NK 细胞/T 细胞上的表达降低已得到证实^[13]。本研究结果显示,与正常人相比食管癌患者外周血 NK 细胞 NGK2D 表达降低,同时外周血 NK 细胞毒活性降低,提示食管癌可通过下调 NK 细胞功能而逃逸免疫系统的监视。40~60 Gy 的放疗剂量时 NK 细胞表面 NGK2D 表达显著上调, NK 细胞毒活性最强,提示放疗剂量不是越高越好,过高的剂量不但损伤周围正常的组织,而且损伤了患者的免疫功能,结果虽然提高了肿瘤的局部控制率,反而降低了患者的远期生存率。

另一方面,40~60 Gy 的放疗剂量引起 NGK2D 阳性的 NK 细胞数增加及 NK 细胞毒功能增强的原因并不清楚,可能与放疗杀死肿瘤组织、降低肿瘤负荷有关。而 sMICA 在放疗后无明显变化可能与本研究收集样本相对较少有关,扩大样本量可带来更明确的结果。同时,本研究亦提示自肿瘤细胞脱落的 sMICA 仅是下调 NK 细胞功能的原因之一,而肿瘤细胞分泌的转化生长因子 $-\beta$ (TGF- β) 和 IL-10 可能是抑制免疫功能的更重要因素^[14]。总之,在肿瘤的临床治疗中,当我们为了提高肿瘤的局部控制率不得不予以高剂量的放疗时,可与免疫增强疗法联用,不仅可提高肿瘤的局部控制率,还可延长患者的远期生存率。

参考文献:

- [1] Gasser S, Raulet DH. The DNA damage response arouses the immune system [J]. *Cancer Res* 2006, 66 (8): 3959-3962.
- [2] 龚卫娟,范丽安. MICA 基因研究进展 [J]. *国外医学·遗传学分册*, 2001, 24 (4): 181-187.
- [3] Groh V, Wu J, Yee C, et al. Tumor-derived soluble MIC ligands impair expression of NGK2D and T-cell activation [J]. *Nature* 2002, 419 (9): 734-738.
- [4] Wu JD, Higgins LM, Steink A, et al. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer [J]. *J Clin Invest* 2004, 114(4): 560-568.
- [5] Dobrovina ES, Dobrovina MM, Vidler E, et al. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma [J]. *J Immunol* 2003, 171(12): 6891-6899.
- [6] Jumnainsong A, Rumphuk AV, Jearanaikoon P, et al. Association of polymorphic extracellular domains of MICA with cervical cancer in northeastern Thai population [J]. *Tissue Antigens* 2007, 69(4): 326-333.
- [7] Tamaki S, Sanefuji N, Kawakami M, et al. Association between soluble MICA levels and disease stage IV oral squamous cell carcinoma in Japanese patients [J]. *Hum Immunol* 2008, 69(2): 88-93.
- [8] 刘晓静,龚卫娟,龚春香,等. 高能 X 线照射对肿瘤细胞表达 MICA 及 NK 细胞功能的影响 [J]. *实用临床医药杂志*, 2009, 13(5): 21-23.
- [9] González S, López-Soto A, Suárez-Alvarez B, et al. NGK2D ligands: key targets of the immune response [J]. *Trends Immunol* 2008, 29 (8): 397-403.
- [10] Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, et al. Soluble MICA in malignant diseases [J]. *Int J Cancer* 2006, 118 (3): 684-687.
- [11] Salih HR, Antropius H, Gieseke F, et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NGK2D in leukemia [J]. *Blood* 2003, 102(4): 1389-1396.
- [12] Jinushi M, Hodi FS, Dranoff G. Therapies-induced antibodies to MHC class I chain-related protein A antagonize immune suppression and stimulate antitumor cytotoxicity [J]. *PNAS* 2006, 103 (6): 9190-9195.
- [13] 刘丹,贾筱琴,龚卫娟,等. 不同淋巴细胞亚群 NGK2D 的表达与结肠癌发病关系的研究 [J]. *实用临床医药杂志*, 2008, 12 (1): 47-51.
- [14] Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, et al. Sustained localized expression of ligand for the activating NGK2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance [J]. *Nat Immunol* 2004, 6(9): 928-937.

收稿日期: 2009-07-16 修回日期: 2009-08-15

本文编辑: 吴进