

多发性骨髓瘤患者NK细胞杀伤功能异常的研究

韩文敏 张修文 贾祝霞 何金媛 晁红颖 杨建和 肖溶 卢绪章

【摘要】 目的 探讨多发性骨髓瘤(MM)患者NK细胞杀伤功能下降的机制。方法 以13例MM患者为研究对象,以30名健康志愿者为正常对照,采用流式细胞术检测外周血单个核细胞中CD3⁺CD56⁺(NK细胞)表面抑制性受体(CD158a和CD158b)以及活化性受体NKG2D、NCRs(NKp30、NKp44、NKp46)的表达水平;ELISA法检测血清可溶性NKG2D配体水平;流式细胞术检测NK细胞对MM细胞株U266细胞杀伤作用的变化。结果 MM患者外周血中NK细胞比例及绝对数、CD158a和CD158b表达水平与对照组比较差异无统计学意义(P 值均 >0.05),两组NK细胞表面均不表达NKp44;与对照组比较,MM患者NK细胞表面活化性受体(NKG2D、NKp30和NKp46)水平均明显降低,血清中可溶性NKG2D配体水平明显升高,差异均有统计学意义(P 值均 <0.05);用MM患者血清培养后的正常对照者NK细胞对U266细胞的杀伤能力较共培养前明显下降[(25.4±5.9)%对(38.5±6.5)%],差异有统计学意义($P=0.044$)。结论 MM患者血清可溶性NKG2D配体水平可能是导致NK细胞杀伤活性下降的原因。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 杀伤细胞,天然; 受体,NK细胞凝集素样; 杀伤功能

Study of NK cells dysfunction in multiple myeloma patients Han Wenmin, Zhang Xiuwen, Jia Zhuxia, He Jinyuan, Chao Hongying, Yang Jianhe, Xiao Rong, Lu Xuzhang. Department of Hematology, Changzhou No.2 People's Hospital, The Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213003, China

Corresponding author: Lu Xuzhang, Email: luxuzhang2008@163.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of NK cell dysfunction in patients with multiple myeloma (MM). **Methods** The expression of inhibitory receptors (CD158a and CD158b) and activating receptors NKG2D and NCRs (NKp30, NKp44 and NKp46) on CD3⁺CD56⁺ NK cell of 13 MM patients and 30 healthy controls were analyzed by flow cytometry. The concentration of soluble NKG2D ligands (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 and ULBP3) in serum was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the cytotoxicity of NK cell against MM cell line by flow cytometry. **Results** There are no significant differences of percentage and absolute number of NK cells, and the expression level of CD158a and CD158b between MM patients and healthy individuals ($P>0.05$). No NKp44 expression was detected on fresh isolated NK cells from both groups. There is no difference in inhibitor receptors expression between MM patients and healthy individuals but the expression of NKG2D, NKp30 and NKp46 on NK cells were higher in MM patients as compared with that in healthy individuals. The concentration of soluble NKG2D ligands in serum was higher in MM patients as compared with that in healthy individuals ($P<0.05$). Cultured healthy individual's NK cells with MM patient's serum could significantly decrease its cytotoxicity against MM cell line U266 cells [(38.5±6.5)% vs (25.4±5.9)%, $P=0.044$]. **Conclusion** The higher level of soluble NKG2D ligands in serum may be the mechanism of NK cell dysfunction in MM patient.

【Key words】 Multiple myeloma; Killer cells, natural; Receptors, NK cell lectin-like; Cytotoxicity

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.11.007

基金项目:博士后科学基金(20110491337);常州市卫生局重大科技项目(ZD201311);常州市卫生局青年科技项目(QN201203);南京医科大学重点项目(2012NJMU127)

作者单位:213003 南京医科大学附属常州市第二人民医院血液科

通信作者:卢绪章,Email:luxuzhang2008@163.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是血液系统常见的恶性肿瘤,虽然近年来硼替佐米、来那度胺等新药的出现明显改善了MM患者的生存,但仍是一种不可治愈的疾病^[1]。体外研究表明NK细胞具有很好的抗MM瘤细胞的能力^[2-3],但是通过体内临床试验并没有得到预期的效果,说明MM患者体内NK细胞抗肿瘤能力得到抑制,但MM患者中NK细胞抗肿瘤能力下降的机制并不明确。NKG2D是NK细胞表面重要的活化性受体,与肿瘤细胞表面配体结合,杀伤肿瘤细胞^[4-6]。我们通过检测初诊或复发MM患者NK细胞的免疫表型、功能及血清可溶性NKG2D配体水平变化,旨在探讨MM患者NK细胞功能下降的机制。

病例和方法

1. 病例:选取2009年3月至2013年12月在我院确诊的13例MM患者,所有患者均符合国内MM诊断标准。其中男7例,女6例,中位年龄63(41~89)岁。免疫球蛋白分型IgG κ 型5例,IgG λ 型4例,IgA λ 型1例, κ 轻链型2例,IgG κ 和 κ 轻链双表达1例。据Salmon和Durie分期I期3例,II期6例,III期4例。以30名健康志愿者为正常对照,男18名,女12名,中位年龄59(45~82)岁,对照者均无肿瘤及自身免疫性疾病史。

2. 标本采集和细胞培养:采集患者及正常对照者外周静脉血(EDTA抗凝),采用密度梯度法分离外周血单个核细胞(PBMNC)备用。MM细胞株U266细胞由上海长征医院侯健教授惠赠,用含10%灭活胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 mg/ml链霉素的RPMI 1640培养基,于37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养。

3. 主要试剂:MICA/B-PE、BIBP-1-PE、ULBP2-PE、ULBP3-PE抗体为美国R&D公司产品。CD3-Percep、CD56-FITC、NKG2D-PE、CD158a-PE、CD158b-PE、NKp30-PE、NKp44-PE、NKp46-PE抗体和流式细胞仪(BD FACS Canto II型)为美国Becton Dickinson公司产品。用于sMICA、sMICB、sULBP1、sULBP2、sULBP3检测的ELISA试剂盒购于北京百奥莱博科技有限公司。NK细胞磁珠分离试剂盒为美国Invitrogen公司产品。

4. 流式细胞术检测NK细胞比率及表面受体:取分离的PBMNC,调整细胞密度为 $2 \times 10^6/L$,100 ml细胞悬液中加入相应抗体各2 μ l,4℃避光孵育30

min,用PBS洗涤2次后上流式细胞仪进行检测。以淋巴细胞群体设门,检测CD3⁻CD56⁺细胞(NK细胞)在淋巴细胞中的比例。NK细胞表面受体检测包括:检测CD3⁻CD56⁺细胞表面抑制性受体(CD158a、CD158b)和活化性受体(NKG2D、NCRs)的表达水平。实验设3个复孔。

5. NK细胞的分离纯化和培养:将正常对照组PBMNC用PBS洗涤2次,按NK细胞分离试剂盒说明书进行操作,分离纯化NK细胞,采用流式细胞术检测分离纯化后的NK细胞纯度,纯度>95%的NK细胞用含有10%FBS、100 U/ml IL-2、50 U/ml青霉素、50 μ g/ml链霉素的RPMI 1640培养基培养72 h后作为效应细胞,并检测其表面NKG2D受体的表达水平。实验设3个复孔。

6. 流式细胞术检测NK细胞的细胞毒性作用:参照文献[7]方法,将效应细胞预先用MM患者血清培养24 h后,用流式细胞术检测效应细胞表面NKG2D受体表达水平以及NK细胞杀伤功能的变化。靶细胞(U266细胞)预先用0.1 μ mol/L钙黄绿素乙酰胺酯孵育15 min后用PBS洗涤2次,在96孔板中每孔加入 5×10^5 个细胞,按效、靶细胞比1:10的比例加入效应细胞,在培养箱中共孵育6 h后用PBS洗涤1次,加入7-AAD抗体在常温中孵育15 min后上流式细胞仪检测效应细胞对U266细胞的特异性杀伤活性。实验设3个复孔。特异性杀伤活性计算公式:

$$\text{特异性杀伤活性(\%)} = \frac{\text{活细胞率}_{\text{对照组}} - \text{活细胞率}_{\text{实验组}}}{\text{活细胞率}_{\text{对照组}}} \times 100\%$$

7. ELISA方法检测可溶性NKG2D配体水平:按照ELISA试剂盒说明书进行操作,用酶标仪于波长450 nm处测定吸光度(A)值,并计算出待测标本可溶性NKG2D配体(sMICA、sMICB、sULBP1、sULBP2、sULBP3)的表达水平。实验设3个复孔。

8. 统计学处理:采用SPSS13.0软件进行统计学分析,患者组和正常对照组之间NK细胞比例及其细胞杀伤活性的比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MM患者外周血NK细胞的变化:流式细胞术检测结果显示,MM患者组与正常对照组比较,外周血中NK细胞比例[(16.8 \pm 9.3)%对(18.2 \pm 7.3)%、 $P=0.512$]、NK细胞绝对数[(1.08 \pm 0.60) $\times 10^9/L$ 对

$(1.12 \pm 0.80) \times 10^9/L$, $P = 0.879$] 差异均无统计学意义。

2. MM患者NK细胞表面受体水平的变化:流式细胞术检测结果显示,MM患者组NK细胞表面抑制性受体CD158a、CD158b表达水平与正常对照组比较,差异均无统计学意义(P 值均 >0.05),活化性受体除NKp44外,NKG2D、NKp30、NKp46两组间差异均有统计学意义(P 值均 <0.001)(表1)。

3. MM患者血清可溶性NKG2D配体水平的变化:ELISA法检测结果显示,患者血清可溶性NKG2D配体水平较正常对照组明显增高,差异均有统计学意义(P 值均 <0.001)(表2)。

4. MM患者血清可溶性NKG2D配体对正常人NK细胞表面NKG2D受体和杀伤功能的影响:流式细胞术检测结果显示,与共培养前比较,共培养后正常人NK细胞表面NKG2D受体表达水平明显降低[(86.4 \pm 4.3)%对(62.5 \pm 3.9)%, $P < 0.001$],NK细胞对U266细胞的杀伤活性也明显下降[(38.5 \pm 6.5)%对(25.4 \pm 5.9)%, $P = 0.044$]。

讨 论

MM免疫缺陷状态被大家所熟知,不仅可引起严重的感染并发症,还可以降低机体的免疫细胞对自身瘤细胞的杀伤。近来的研究表明,意义未明的单克隆免疫球蛋白疾病(MGUS)和早期MM患者的NK细胞抗肿瘤细胞能力并无明显改变,而晚期患者的NK细胞抗肿瘤细胞能力明显下降^[8-10]。NK细胞活性依赖于表面的抑制性受体(inhibitory Killer Immunoglobulin-like Receptors, iKIRs)和活化性受体与其相应的配体相互作用介导的抑制性和活化性信号间的平衡,靶细胞表面的MHC I类分子表达

异常,靶细胞缺乏iKIR的特定配体(KIR-KIR-Ligand mismatch)将激发NK细胞对靶细胞的杀伤活性^[11]。此外,NK细胞活化性受体与其配体分子的相互作用可解除NK细胞抑制性受体对NK细胞活性的抑制,从而激活NK细胞杀伤靶细胞^[12-13]。在本研究中我们发现MM患者外周血NK细胞的比例及绝对数较正常对照者物明显变化,但其NK细胞表面活化性受体(包括NKG2D、NKp30及NCRs)水平均明显降低。NKG2D是NK细胞表面重要的活化性受体,体外实验证明表达NKG2D配体的肿瘤细胞可以被NK细胞通过NKG2D介导活化性信号对其实施杀伤作用^[4-6]。MM患者NK细胞表面NKG2D受体表达降低可能会削弱NK细胞的抗肿瘤能力。

NK细胞对MM肿瘤细胞的杀伤作用部分是通过NKG2D受体和配体的相互作用介导的^[14-15]。NKG2D配体有两种存在形式,一种是表达于肿瘤细胞表面的膜结合蛋白,另一种主要是肿瘤细胞分泌的金属蛋白酶水解膜结合蛋白使之脱落至血清中的可溶性形式^[16],可溶性NKG2D配体和NK细胞表面的NKG2D受体结合可阻滞NK细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤^[17-18]。我们在以前的研究中发现MM患者肿瘤细胞和肿瘤细胞株细胞中均表达一定水平的NKG2D配体^[15]。在本研究中我们发现MM患者血清可溶性NKG2D配体水平较正常对照者明显升高,而可溶性NKG2D配体可能会影响NK细胞对MM肿瘤细胞的杀伤作用。

为进一步验证MM患者血清可溶性NKG2D配体对NK细胞杀伤作用的影响,我们用血清可溶性NKG2D配体高表达患者的血清对正常对照者的NK细胞进行24 h培养,并检测NK细胞对MM细胞

表1 流式细胞术检测多发性骨髓瘤(MM)患者NK细胞表面受体表达水平(%、 $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD158a	CD158b	NKG2D	NKp30	NKp44	NKp46
MM患者组	13	2.3 \pm 1.2	30.3 \pm 19.9	61.2 \pm 9.4	1.6 \pm 0.9	0.8 \pm 0.2	15.4 \pm 2.9
正常对照组	30	1.9 \pm 1.2	26.2 \pm 23.1	78.5 \pm 8.5	8.4 \pm 2.5	0.9 \pm 0.2	36.7 \pm 5.8
P 值		0.392	0.168	<0.001	<0.001	0.360	<0.001

表2 ELISA法检测多发性骨髓瘤(MM)患者血清可溶性NKG2D配体水平(ng/L、 $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	sMICA	sMICB	sULBP1	sULBP2	sULBP3
MM患者组	13	166.4 \pm 43.1	110.2 \pm 38.2	312.5 \pm 63.8	788.4 \pm 97.5	143.0 \pm 52.2
正常对照组	30	61.2 \pm 36.7	47.1 \pm 25.7	102.3 \pm 47.2	94.4 \pm 32.5	86.5 \pm 32.2
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

株 U266 细胞(表达一定 NKG2D 配体水平)的杀伤活性,结果显示培养后 NK 细胞表面 NKG2D 受体的表达水平较培养前明显降低, NK 细胞对 U266 细胞的杀伤作用明显降低,表明 MM 患者血清可溶性 NKG2D 配体可能通过阻滞 NK 细胞表面 NKG2D 受体从而降低了对 MM 肿瘤细胞的杀伤作用。

我们在研究中发现 MM 患者血清中升高的可溶性 NKG2D 配体可引起 NK 细胞表面活化性受体 NKG2D 表达下降,从而导致 NK 细胞的杀伤活性下降,这可能是 MM 患者病情进展及肿瘤细胞免疫逃逸的机制之一,同时也可能是 MM 患者体内 NK 细胞输注治疗效果不佳的原因。如果能在降低 MM 患者血清可溶性 NKG2D 配体水平的基础上联合 NK 细胞输注,将为 MM 的免疫治疗提供新的思路和方法。

参考文献

- [1] Rollig C, Knop S, Bornhauser M. Multiple myeloma[J]. Lancet, 2015, 385(9983): 2197-2208.
- [2] Alici E, Konstantinidis KV, Sutlu T, et al. Anti-myeloma activity of endogenous and adoptively transferred activated natural killer cells in experimental multiple myeloma model [J]. Exp Hematol, 2007, 35(12): 1839-1846.
- [3] Garg TK, Szmania S, Mkhani JA, et al. Highly activated and expanded natural killer cells for multiple myeloma immunotherapy[J]. Haematologica, 2012, 97(9): 1348-1356.
- [4] 马玲娣, 朱志超, 卢绪章, 等. 苦参碱对 K562 细胞 NKG2D 配体表达的影响及其机制研究[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(5): 438-442.
- [5] 卢绪章, 蔡晓辉, 马玲娣, 等. NKG2D 介导正常人 NK 细胞对白血病细胞的杀伤作用[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(6): 444-447.
- [6] Ashiru O, Boutet P, Fernandez-Messina L, et al. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes[J]. Cancer Res, 2010, 70(2): 481-489.
- [7] Cholujová D, Jakubíková J, Kubes M, et al. Comparative study of four fluorescent probes for evaluation of natural killer cell cytotoxicity assays[J]. Immunobiology, 2008, 213(8): 629-640.
- [8] Frohn C, Hoppner M, Schlenke P, et al. Anti-myeloma activity of natural killer lymphocytes[J]. Br J Haematol, 2002, 119(3): 660-664.
- [9] King MA, Radicchi-Mastroianni MA. Natural killer cells and CD56 + T cells in the blood of multiple myeloma patients: analysis by 4-colour flow cytometry [J]. Cytometry, 1996, 26(2): 121-124.
- [10] Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, et al. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(4): 1285-1290.
- [11] Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR) [J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(23): 2211-2220.
- [12] Boerman GH, van Ostaijen-Ten Dam MM, Kraal KC, et al. Role of NKG2D, DNAM-1 and natural cytotoxicity receptors in cytotoxicity toward rhabdomyosarcoma cell lines mediated by resting and IL-15-activated human natural killer cells [J]. Cancer Immunol Immunother, 2015, 64(5): 573-583.
- [13] Nielsen N, Pascal V, Fasth AE, et al. Balance between activating NKG2D, DNAM-1, NKp44 and NKp46 and inhibitory CD94/NKG2A receptors determine natural killer degranulation towards rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. Immunol, 2014, 142(4): 581-593.
- [14] 何金媛, 贾祝霞, 蔡晓辉, 等. NKG2D 在细胞因子诱导的杀伤性细胞(CIK)抗血液肿瘤细胞的作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(6): 1380-1384.
- [15] Lu X, Zhu A, Cai X, et al. Role of NKG2D in cytokine-induced killer cells against multiple myeloma cells [J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(8): 623-629.
- [16] Zhao J, Guo Y, Yan Z, et al. Soluble MHC I and soluble MIC molecules: potential therapeutic targets for cancer [J]. Int Rev Immunol, 2011, 30(1): 35-43.
- [17] Salih HR, Holdenrieder S, Steinle A. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact [J]. Front Biosci, 2008, 13: 3448-3456.
- [18] Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, et al. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas [J]. J Hepatol, 2005, 43(6): 1013-1020.

(收稿日期: 2015-05-11)

(本文编辑: 刘志红)