

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.29.006
文章编号: 1005-8982 (2018) 29-0031-05

万珂增强 NK 细胞对前列腺癌细胞 杀伤作用的实验研究 *

胡炜, 刘丹, 陈曲, 王崑

(辽宁省锦州市中心医院 肿瘤科, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 目的 探讨万珂是否能够增强自然杀伤细胞 (NK) 对前列腺癌细胞的杀伤作用及其作用机制。**方法** 以激素依赖性和激素非依赖性 2 种前列腺癌细胞株 LNCaP 和 DU145 为模型, 不同浓度 (0、10 和 20 nmol/L) 万珂处理 2 种前列腺癌细胞株 24 h。采用 Annexin-V/PI 法检测细胞凋亡率, 流式细胞术检测人白细胞抗原-ABC (HLA-ABC) 蛋白的表达, 实时荧光定量聚合酶链反应检测 HLA-C mRNA 的表达。**结果** 万珂能提高 2 种细胞系对 NK 细胞介导的杀伤作用的敏感性, 而且在激素非依赖性前列腺癌细胞株 DU145 细胞中表现更明显。万珂能下调 DU145 细胞表面 HLA-I 类分子水平。相对 DU145 细胞, 万珂对激素依赖性前列腺癌 LNCaP 细胞不敏感, 万珂处理后 LNCaP 细胞中 HLA-I 类分子也没有改变。**结论** 万珂通过下调 HLA-I 类分子的表达, 增强 NK 细胞对前列腺癌的杀伤能力, 特别是增强对激素非依赖性前列腺细胞的杀伤, 该作用能提高前列腺癌的治疗水平。

关键词: 万珂; 人类前列腺癌; 自然杀伤细胞; 人白细胞抗原-ABC

中图分类号: R737.25

文献标识码: A

Investigation of effect of Bortezomib on natural killer cell-mediated lysis of prostate cancer cells*

Wei Hu, Dan Liu, Qu Chen, Wei Wang

(Department of Medical Oncology, Jinzhou Central Hospital, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To investigate whether Bortezomib could sensitize NK cells to kill prostate cancer cells and its possible mechanism. **Methods** In this study, androgen-sensitive prostate cancer cell line LNCaP and androgen-insensitive human prostate cancer cell line DU145 were used as the objects of study, the prostate cancer cells were exposed to various concentrations (0, 10 and 20 nmol/L) of Bortezomib for 24 h. Apoptosis was analyzed using Annexin-V/PI method. The expression of HLA-ABC protein was detected by flow cytometry. qRT-PCR was used to detect the expression of HLA-C mRNA. **Results** Bortezomib could increase the sensitivity of these two cell lines to NK cell-mediated killing, and DU145 cells were more sensitive to Bortezomib-induced apoptosis. Treatment with Bortezomib down-regulated the HLA-I molecule on the surface of DU145 cells; in contrast, LNCaP cells were not sensitized by this treatment, their HLA-I molecule did not change. **Conclusions** Bortezomib can enhance the anti-tumor ability of NK cells by down-regulation of the cell-surface expression of HLA-I, especially in androgen-insensitive human prostate cancer cells. This effect can be utilized to sensitize androgen-insensitive human prostate cancer to NK cell-mediated killing and improve current cancer therapies.

Keywords: Bortezomib, human prostate cancer, NK cell, HLA-ABC

收稿日期: 2018-04-08

* 基金项目: 辽宁省自然科学基金 (No: 201602269)

[通信作者] 王崑, E-mail: wangwei9628@126.com

人类的先天性免疫系统中,自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)为其重要组成部分,尤其在肿瘤免疫治疗中,更发挥了重要作用。NK细胞可以通过各种有效的杀伤机制,杀伤同系、同种或异种瘤细胞,包括释放穿孔素和颗粒酶、通过死亡受体调节肿瘤细胞的凋亡等^[1-3]。NK细胞表面具有活化性受体和抑制性受体,两者间的平衡状态是其能否发挥细胞毒效应的决定因素^[4]。抑制性受体主要是杀伤细胞免疫球蛋白样受体,可以特异性地与细胞表面的人白细胞抗原-I(human leucocyte antigen-I, HLA-I)类分子结合,参与NK细胞的活化过程,抑制由活化性受体激发的细胞毒性作用。有研究证明,蛋白酶体抑制剂-万珂(化学名硼替佐米)通过促进T淋巴细胞和NK细胞上表达的死亡配体-肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)连接到死亡受体4(death receptors 4, DR4)和DR5,引起肿瘤细胞的凋亡^[5]。然而在前列腺癌细胞中,万珂致敏NK细胞杀伤肿瘤是否也是通过肿瘤细胞的抑制性配体实现,还未见报道。本研究用2种激素依赖性和激素非依赖性前列腺癌细胞株LNCaP和DU145为模型,探讨万珂是否可以致敏NK细胞对肿瘤的作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

万珂(美国Millennium Pharmaceuticals公司),NK分离试剂盒(美国RD公司RPMI 1640,胎牛血清(天津灏洋生物有限公司),胰蛋白酶(美国HyClone公司),荧光标记抗体藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)标记的抗人DR5抗体、抗人Fas抗体、抗人HLA-ABC抗体购自美国Biolegend公司,Trizol试剂(美国Invitrogen公司),实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒(日本TaKaRa公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 DU145、LNCaP细胞培养使用RPMI 1640培养基,培养基中含10%胎牛血清,2种细胞呈单层贴壁生长,用胰酶进行消化传代,待细胞呈对数生长时可进行实验。经各种因素处理后可进行指标检测。

1.2.2 NK细胞的分离及鉴定 取健康志愿者抗凝外周血20 ml,按NK细胞分离试剂盒说明书操作,分离

NK细胞。经Ficoll-Paque Plus密度梯度离心,吸取界面层的外周血单个核细胞,用预冷Reaction buffer将单个核细胞的浓度调整为 1×10^8 个/ml,加入生物素化的抗体,混匀,孵育15 min,在混悬液中加入50 μ l磁珠,再次混匀,继续孵育15 min,将对细胞混悬液进行洗涤。将洗涤后的混悬液转移至磁场中,带磁力的细胞移至磁场中,6 min后吸除上清液,剩余NK细胞。将剩余的NK细胞在含10%胎牛血清和500 u/ml重组人白介素-2的RPMI 1640培养基中培养24 h,活化NK细胞。采用FITC-CD3和PE-CD56鼠抗人单抗标记NK细胞,用流式细胞仪分析CD3⁺CD56⁺细胞百分比以检测NK的纯度。本实验纯化的细胞中NK细胞>85%。

1.2.3 Annexin-V/PI法 20 nmol/L万珂处理DU145和LNCaP细胞48 h,记数细胞后,在每孔种植相同数量的细胞,细胞贴壁24 h。NK细胞以1:1效靶比与肿瘤细胞共孵育6 d。收集所有细胞,用Annexin-V/PI法测定细胞的凋亡率。

1.2.4 流式细胞仪 取对数期生长的DU145、LNCaP细胞,不同浓度(0、10和20 nmol/L)万珂处理2种前列腺癌细胞株24 h,分别收集各组DU145、LNCaP细胞,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗2次,调整细胞浓度为 2×10^5 个/ml,取500 μ l细胞悬液,加入PE标记的HLA-ABC抗体20 μ l,避光孵育20 min。冷PBS洗细胞1次,将细胞重悬于0.5 ml PBS中,流式细胞仪检测肿瘤细胞表面HLA-ABC蛋白的表达。使用WinMDI软件进行数据分析。

1.2.5 qRT-PCR 取对数期生长的DU145、LNCaP细胞,不同浓度(0、10和20 nmol/L)万珂处理2种前列腺癌细胞株24 h,分别收集各组DU145、LNCaP细胞。采用Trizol法抽提细胞总RNA,紫外分光光度计测定RNA纯度及含量,选用OD₂₆₀/OD₂₈₀比值为1.8~2.0的RNA标本用于下一步反应。按照逆转录试剂盒说明书进行操作,合成cDNA后进行PCR反应。分别向PCR管中加入SYBR Premix Ex TaqTM II 12.5 μ l, cDNA模板2 μ l, ddH₂O 8.5 μ l,以及正反向引物各1 μ l。HLA-C正向引物:5'-TCCTGGTTGTCCTAGCTGTC-3',反向引物:5'-CAGGC-TTTACAAGTGATGAG3-';甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)正向引物:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',反向引物:5'-GAAG-ATGGTGATGGGATTC3-。引

物均由大连宝生生物工程公司有限公司合成。反应条件: 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 30 s, 共 45 个循环, 60℃ 收集荧光 5 s, 99℃、1 min, 50℃、1 min, 以 0.5℃/s 的速度升温到 99℃, 对荧光进行连续监测做熔解曲线分析。采用 qRT-PCR 仪进行检测, 以 HLA-C 与 GAPDH 相对浓度比值反映目的基因 mRNA 的表达。用双标准曲线法对目的基因进行相对定量测定。实验结果重复 3 次。

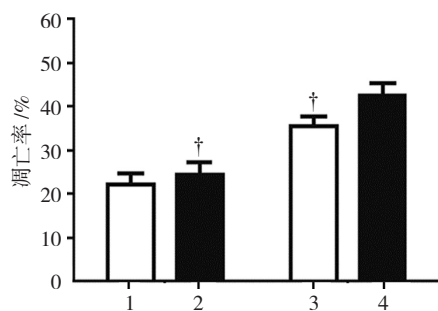
1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 11.5 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较用 t 检验, 多组比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 Tukey-HSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 万珂提高前列腺癌细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性

2.1.1 DU145 细胞 未处理组、万珂组、NK 细胞组及其共同预处理组的 DU145 细胞凋亡率分别为 (21.698 \pm 2.658) %、(34.945 \pm 2.245) %、(23.972 \pm 2.952) % 和 (41.831 \pm 2.965) %, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 36.240$, $P = 0.000$)。进一步两两比较, 万珂、NK 细胞共同预处理的 DU145 细胞凋亡率较仅万珂或 NK 细胞预处理高 ($P < 0.05$)。见图 1。

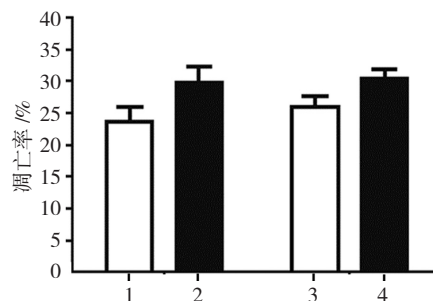


1: 未处理组; 2: NK 细胞组; 3: 万珂组; 4: 万珂、NK 细胞共同预处理组。† 与万珂、NK 细胞共同预处理组比较, $P < 0.05$

图 1 万珂致敏 NK 细胞对 DU145 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

2.1.2 LNCaP 细胞 未处理组、万珂组、NK 细胞组及其共同预处理组的 LNCaP 细胞凋亡率分别为 (23.663 \pm 2.204) %、(25.992 \pm 1.743) %、(29.729 \pm 2.581) % 和 (30.310 \pm 1.638) %, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 6.922$, $P = 0.013$)。进一步两两比较, 万珂、NK 细胞共同预处理组的 LNCaP 细胞凋亡率与万珂组、NK 细胞组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。处理过的 DU145 细胞凋亡率比 LNCaP

细胞更高。提示 NK 细胞能有效提高激素非依赖性前列腺癌细胞凋亡率, 且 NK 细胞与万珂的联合应用较单独应用凋亡率更高。见图 2。

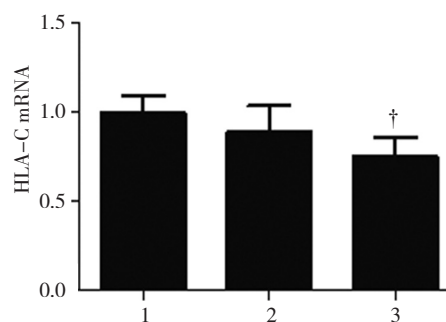


1: 未处理组; 2: NK 细胞组; 3: 万珂组; 4: 万珂、NK 细胞共同预处理组

图 2 万珂致敏 NK 细胞对 LNCaP 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 万珂对 DU145 细胞 HLA-I 类分子 mRNA 和蛋白表达的影响

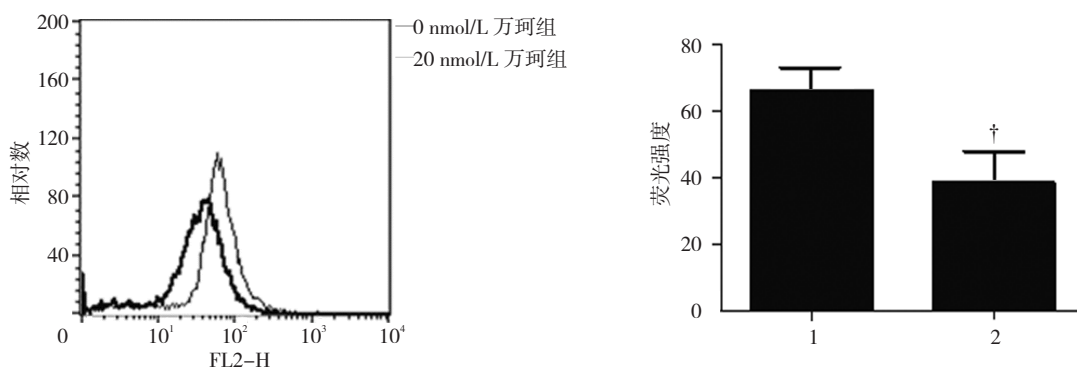
2.2.1 HLA-C mRNA 0、10 和 20 nmol/L 万珂处理后 DU145 细胞 HLA-C mRNA 相对表达量分别为 (1.017 \pm 0.107)、(0.892 \pm 0.152) 和 (0.753 \pm 0.116), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 6.256$, $P = 0.034$)。进一步两两比较, 10 nmol/L 万珂处理后 DU145 细胞 HLA-C mRNA 表达水平与 0 和 20 nmol/L 万珂组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 20 nmol/L 万珂处理后 DU145 细胞 HLA-C mRNA 表达水平较 0 nmol/L 万珂组下调 ($P < 0.05$)。见图 3。



1: 0 nmol/L 万珂组; 2: 10 nmol/L 万珂组; 3: 20 nmol/L 万珂组。† 与 0 nmol/L 万珂组比较, $P < 0.05$

图 3 不同浓度万珂对 DU145 细胞 HLA-C mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

2.2.2 HLA-ABC 蛋白 0 和 20 nmol/L 万珂处理后 DU145 细胞 HLA-C-ABC 蛋白相对表达量分别为 (65.842 \pm 0.178) 和 (38.220 \pm 0.389), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 12531.758$, $P = 0.000$), 20 nmol/L 万珂处理后 DU145 细胞 HLA-ABC 蛋白表达水平较 0 nmol/L 万珂组下调。见图 4。



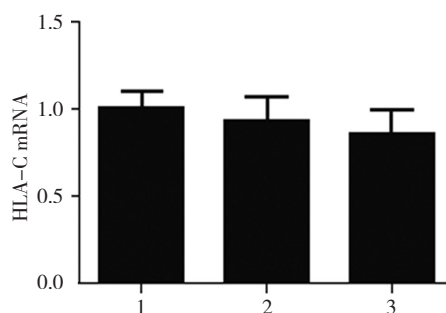
1: 0 nmol/L 万珂组; 2: 20 nmol/L 万珂组。† 与 0 nmol/L 万珂组比较, $P < 0.05$

图 4 不同浓度万珂对 DU145 细胞 HLA-ABC 蛋白表达水平的影响

2.3 万珂对 LNCap 细胞 HLA-I 类分子 mRNA 和蛋白表达的影响

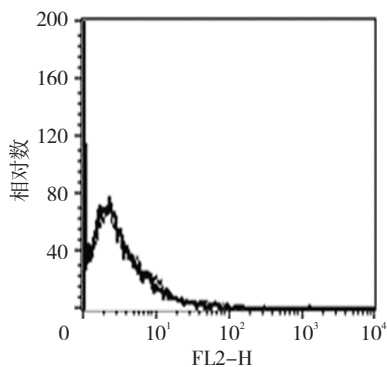
2.3.1 HLA-C mRNA 0、10 和 20 nmol/L 万珂处理后 LNCap 细胞 HLA-C mRNA 相对表达量分别为 (1.027 ± 0.101)、(0.930 ± 0.140) 和 (0.861 ± 0.130), 经单因素方差分析, 差异无统计学意义 ($F = 1.345$, $P = 0.329$)。见图 5。

2.3.2 HLA-ABC 蛋白 0、10 和 20 nmol/L 万珂处理后 LNCap 细胞 HLA-ABC 蛋白相对表达量分别为 (2.831 ± 0.428) 和 (2.110 ± 0.551), 经 t 检验, 差异无统计学意义 ($t = 3.221$, $P = 0.147$)。见图 6。



1: 0 nmol/L 万珂组; 2: 10 nmol/L 万珂组; 3: 20 nmol/L 万珂组

图 5 不同浓度万珂对 LNCaP 细胞 HLA-C mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)



1: 0 nmol/L 万珂组; 2: 20 nmol/L 万珂组

图 6 不同浓度万珂对 LNCaP 细胞 HLA-ABC 蛋白表达的影响

3 讨论

近年来, 前列腺癌的发病率越来越高。激素依赖性的前列腺癌患者可以用去势方法治疗, 而激素非依赖性的前列腺癌对激素抑制治疗和化疗无效, 患者生存率非常低, 所以急切期待着新的治疗模式产生。

蛋白酶体抑制作用引发的抗肿瘤凋亡活性的精确机制非常难分析, 似乎是多因素的。26S 蛋白酶体能对

大量的细胞通路进行调节。有研究表明, 蛋白酶体抑制参与活化核转录因子 $\kappa B^{[6-7]}$, 降低死亡区域蛋白样白介素-1 β 转换酶抑制蛋白的表达, 增加 DR5 的表达, 通过细胞内的凋亡通路活化 Caspase-3 $^{[8-9]}$, 累积前凋亡蛋白 Bik 等大范围的细胞效应。而 NK 细胞也有 TRAIL 和 Fas 配体, 其可以在靶细胞中触发凋亡。

曾经有人假设成熟的 NK 细胞表达 ≥ 1 种自体

HLA-I 类抑制性受体,特别是 HLA-C 和 Bw4 分子^[10]。当抑制信号占主导时,HLA-I 类抑制性受体能够保护健康细胞不被 NK 细胞破坏^[11]。而在相对情况下,NK 细胞能积极地溶解肿瘤细胞而不显示这些抑制性受体。自体 HLA 分子使 NK 细胞失活是恶性肿瘤细胞逃逸宿主 NK 细胞介导的免疫的一个潜在机制^[12]。

在正常的环境中,前列腺癌细胞表达自体 HLA 分子,使自体的 NK 细胞失活,这可能是肿瘤免疫逃逸机制的一个重要环节。这也有助于解释在实体肿瘤的治疗中获得性输注自体 NK 细胞相对缺乏活性^[13]。本研究结果表明,万珂处理 DU145 细胞会导致细胞表面表达的 HLA-ABC 蛋白和 HLA-C mRNA 降低。这证明万珂能够克服前列腺癌细胞对 NK 细胞的抑制,使获得性输注 NK 细胞的治疗更有效,从而使其应用更广。可是这些改变却没有在 LNCaP 细胞上出现。还有研究表明,残留的宿主淋巴细胞的有效排斥反应限制了 NK 细胞输注的持久性,这也减少了治疗的有效性。而万珂能够通过特异性清除有自体反应性的 T 淋巴细胞,从而潜在促进 NK 细胞的持久性^[14]。这些效应证明,万珂增强 NK 细胞的抗肿瘤活性。

综上所述,万珂抑制肿瘤细胞上 HLA-ABC 的表达,从而促进 NK 细胞对靶细胞的识别和杀伤。而这种效应在激素非依赖性前列腺癌细胞上表现更明显,证明万珂能成为一种有效的药物,增强肿瘤免疫治疗的效果,尤其为激素非依赖性前列腺癌的生物治疗提供新希望。

参 考 文 献:

- [1] 杨波,李婷婷,向永胜,等. 60 例自然杀伤细胞治疗恶性肿瘤的临床疗效评价[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 5(14): 107-109.
- [2] LANIER L L. NK cell recognition[J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 225-274.
- [3] STREET S E, CRETNEY E, SMYTH M J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis[J]. *Blood*, 2001, 97: 192-197.
- [4] MEHTA R S, REZVANI K. Can we make a better match or mismatch with KIR genotyping[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2016, 11(1): 106-118.
- [5] TAKEDA K, STAGG J, YAGITA H, et al. Targeting death-inducing receptors in cancer therapy[J]. *Oncogene*, 2007, 26: 3745-3757.
- [6] KAGOYA Y, YOSHIMI A, KATAOKA K, et al. Positive feedback between NF-kappa B and TNF-alpha promotes leukemia-initiating cell capacity[J]. *Clin Invest*, 2014, 124: 528-542.
- [7] ZWICKL P. The 20s proteasome[J]. *Cur Top Microbiol Immunol*, 2002, 268: 23-31.
- [8] RICCIONI R, SENESE M, DIVERIO D, et al. M4 and M5 acute myeloid leukaemias display a high sensitivity to Bortezomib-mediated apoptosis[J]. *Haematol*, 2007, 139: 194-205.
- [9] COLADO E, ALVAREZ-FERNANDEZ S, MAISO P, et al. The effect of the proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34⁺ immature phenotype[J]. *Haematologica*, 2008, 93: 57-66.
- [10] COOLEY S D, WEISDORF L A, GUETHLEIN J P, et al. Donor killer cell Ig-like receptor B haplotypes, recipient HLA-C1, and HLA-C mismatch enhance the clinical benefit of unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia[J]. *Immunol*, 2014, 192: 4592-4600.
- [11] FARAG S S, FEHNIGER T A, RUGGERI L, et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect[J]. *Blood*, 2002, 100: 1935-1947.
- [12] SHAFFER B C, HSU K C. How important is NK alloreactivity and KIR in allogeneic transplantation[J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2016, 11(29): 351-358.
- [13] BAKKER A B, PHILLIPS J H, FIGDOR C G, et al. Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL[J]. *Immunol*, 1998, 160: 5239-5245.
- [14] LUNDQVIST A, SU S, RAO S, et al. Cutting edge: bortezomib-treated tumors sensitized to NK cell apoptosis paradoxically acquire resistance to antigen-specific T cells[J]. *Immunol*, 2010, 184: 1139-1142.

(童颖丹 编辑)