

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.009

· 基础研究 ·

## 硼替佐米提高耐药 K562/ADM 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性及其机制

张虹丽, 曾鹏云, 邓黎黎, 张连生, 柴晔, 岳玲玲, 吴重阳, 李莉娟, 郝正栋, 李亮亮(兰州大学第二附属医院血液科, 甘肃兰州 730000)

**[摘要]** **目的:**探讨硼替佐米提高耐药 K562/ADM 细胞对 NK 细胞杀伤敏感性的可能机制。**方法:**流式细胞术和 real-time PCR 检测硼替佐米处理前后 K562/ADM 细胞表面 MHC I 类链相关分子 A (major histocompatibility complex class I chain-related molecule A, MICA) 蛋白和 mRNA 的表达, LDH 释放法检测硼替佐米处理前后 K562/ADM 细胞对 NK 细胞的杀伤敏感性。**结果:**硼替佐米处理后, K562/ADM 细胞表面 MICA 蛋白表达率上升[ (17.03 ± 4.94)% vs (23.77 ± 5.26)% ,  $P < 0.05$  ]; 处理后 K562/ADM 细胞 MICA mRNA 的表达水平是处理前的 (2.03 ± 0.33) 倍。效靶比为 10:1、20:1 时, NK 细胞对硼替佐米处理后的 K562/ADM 细胞的杀伤率上升[ (23.22 ± 3.03)% 、(30.30 ± 0.74)% vs (33.69 ± 1.28)% 、(41.40 ± 1.97)% ,  $P < 0.05$  ]。**结论:**硼替佐米提高耐药 K562/ADM 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性, 其机制可能与硼替佐米上调 K562/ADM 细胞 MICA 表达有关。

**[关键词]** 硼替佐米; NK 细胞; MHC I 类链相关分子 A (MICA); 耐药 K562/ADM 细胞

**[中图分类号]** R733.7; R730.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)05-0513-04

## Bortezomib increases cytotoxic sensitivity of drug-resistant K562 /ADM cells to NK cells and its mechanisms

ZHANG Hong-li, ZENG Peng-yun, DENG Li-li, ZHANG Lian-sheng, CHAI Ye, YUE Ling-ling, WU Chong-yang, LI Li-juan, HAO Zheng-dong, LI Liang-liang (Department of Hematology, Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of bortezomib on the cytotoxic sensitivity of drug-resistant K562/ADM cells to natural killer (NK) cells and the underlying mechanisms. **Methods:** The expressions of MICA protein and mRNA on K562/ADM target cells before and after incubation with bortezomib were detected by flow cytometry and real-time PCR, respectively. The cytotoxic sensitivity of K562/ADM cells treated with or without bortezomib to NK cells was measured by LDH releasing assay. **Results:** The expression rates of MICA protein on K562/ADM cells incubated with bortezomib increased from (17.03 ± 4.94)% to (23.77 ± 5.26)% ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression of MICA on K562/ADM cells treated with bortezomib increased (2.03 ± 0.33) times. At the E:T ratio of 10:1 and 20:1, the cytotoxic sensitivity of K562/ADM cells to NK cells increased from (23.22 ± 3.03)% and (30.30 ± 0.74)% in untreated cells to (33.69 ± 1.28)% and (41.40 ± 1.97)% in bortezomib-treated cells, respectively, showing significant differences ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Bortezomib can up-regulate the MICA expression in K562/ADM cells and thus may enhance the cytotoxicity of NK cells against K562/ADM cells.

**[Key words]** bortezomib; nature killer cell; major histocompatibility complex class I chain-related molecule A (MICA); drug-resistant K562/ADM cell

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 513-516]

**[基金项目]** 甘肃省科技支撑计划资助项目(No.0804NKCA115)。Project supported by the Science and Technology Supporting Program of Gansu Province (No.0804NKCA115)

**[作者简介]** 张虹丽(1985-),女,陕西汉中,硕士生,主要从事肿瘤生物免疫治疗方面的研究。E-mail: zhlpxt@163.com

**[通信作者]** 张连生(ZHANG Lian-sheng, corresponding author), E-mail: zls2170@yahoo.com

硼替佐米(bortezomib, velcade 或 PS2341)是美国 FDA 批准应用于临床肿瘤治疗的第一个蛋白酶体抑制剂,它主要通过特异性阻断泛素-蛋白酶体通路,从而影响核因子 NF- $\kappa$ B、ERK/MAPK 通路、细胞周期相关蛋白、Bcl-2 蛋白家族以及抑制肿瘤血管生成等多种途径,发挥逆转耐药和促细胞凋亡的作用<sup>[1-2]</sup>,临床主要用于复发难治性多发性骨髓瘤的治疗,但对白血病的治疗仍处于研究和探索阶段。最近研究<sup>[3]</sup>显示,硼替佐米能够增加白血病细胞对免疫治疗的敏感性,逆转白血病细胞对免疫细胞的免疫耐受,其机制尚不清楚。NK 细胞在机体免疫作用中形成第一道防线,但其在白血病免疫治疗中的作用备受关注。本课题探讨硼替佐米对耐药 K562/ADM 细胞 MHC I 类链相关分子 A(major histocompatibility complex class I chain-related molecule A, MICA)表达及其对 NK 细胞杀伤敏感性的影响,并研究其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

人白血病多药耐药株 K562/ADM 以及 NK 细胞株 NK-92 均购自中国科学院上海细胞库。NK-92 细胞培养在含有 10% 的小牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100  $\mu$ g/ml、RPMI 1640 培养基,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中传代培养。耐药 K562/ADM 细胞培养于含有 1.0  $\mu$ g/ml 多柔比星的上述培养基中,培养条件相同;于实验两周前将其培养于无多柔比星的培养液中。实验所用细胞均处于对数生长期。

### 1.2 主要材料

硼替佐米购于西安杨森制药有限公司,胎牛血清购于杭州四季青有限公司,RPMI 1640 购于 Gibco 公司,鼠抗人 MICA 单抗购于 BD 公司,FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购于 eBioscience 公司,LDH 释放法细胞毒性定量检测试剂盒购于上海杰美基因有限公司,real-time PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司。

### 1.3 流式细胞仪检测硼替佐米作用前后 K562/ADM 细胞表面 MICA 的表达

分别收集未经硼替佐米处理及经硼替佐米 400 ng/ml 处理 48 h 后的 K562/ADM 细胞,PBS 洗涤 2 次,计数,分管;每  $1 \times 10^6$  个细胞加入 1  $\mu$ g 鼠抗人 MICA mAb,4  $^{\circ}$ C 30 min,PBS 洗涤 2 次;以 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗 100  $\mu$ l,4  $^{\circ}$ C、30 min,PBS 洗涤,同型 IgG1 作为阴性对照抗体,用流式细胞仪分析样本中  $1 \times 10^4$  个细胞中的阳性细胞数,计算 MICA 表达率。

### 1.4 Real-time PCR 法检测硼替佐米作用后 K562/ADM 细胞 MICA mRNA 的表达

收集硼替佐米作用前后的 K562/ADM 细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /ml,用 TRIzol 一步法直接提取总 RNA,控制样本  $D_{260}/D_{280}$  在 1.7~2.2 之间,并调整 RNA 浓度。引物由宝生物公司合成,MICA 上游引物为 5'-GAGCCCCACAGTCTTCGTTAT-3',下游引物为 5'-CCTGACGTTTCATGGCCAA-3'。内参照  $\beta$ -actin 上游引物为 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCATCTA-3',下游引物为 5'-CTAGAAGCATTTCGCGGTGGACGATGGAGGG-3'。实验步骤严格按照 real-time PCR 反应试剂盒说明书进行。

采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示 MICA mRNA 相对表达量,其中  $\Delta Ct = Ct \text{ MICA} - Ct \beta\text{-action}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \text{实验组 } \Delta Ct - \text{对照组 } \Delta Ct$ 。

### 1.5 LDH 释放法检测 NK-92 细胞对硼替佐米处理后 K562/ADM 细胞的杀伤活性

按 LDH 检测试剂盒说明书操作,以 NK-92 细胞为效应细胞。取硼替佐米作用前后对数生长期的 K562/ADM 细胞,调整细胞密度至  $1 \times 10^5$ /ml,作为效应细胞,分别按 10:1、20:1 效靶比加入 96 孔板。设 NK 细胞和靶细胞的正常对照组,即效、靶细胞自然释放组;培养基为基准空白组,靶细胞最大释放孔加 10  $\mu$ l 裂解液,各组均设 3 个复孔,置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 4 h,1 000 rpm,离心 5 min 后,吸取 50  $\mu$ l 上清,加入新的 96 孔平底酶标板中,再加入 50  $\mu$ l LDH 底物反应液,室温下放置 30 min,每孔加 50  $\mu$ l 反应终止液。以空白组为基准调零,自动酶标仪测定  $D_{490}$  值。NK 细胞杀伤活性(%) = [(实验组  $D$  值 - 靶细胞自然释放组  $D$  值 - 效应细胞自然释放组  $D$  值) / (靶细胞最大释放组  $D$  值 - 靶细胞自然释放组  $D$  值)]  $\times$  100%。

### 1.6 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用配对样本  $t$  检验法,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 硼替佐米作用前后 K562/ADM 细胞 MICA 的表达

未经硼替佐米作用的 K562/ADM 细胞 MICA 表达率为(17.03  $\pm$  4.94)%;经硼替佐米处理后,MICA 表达率明显上升为(23.77  $\pm$  5.26)% ,差异有统计学意义( $t = 5.986, P = 0.027$ ) (图 1)。

### 2.2 硼替佐米作用后 K562/ADM 细胞 MICA

mRNA 的表达

经硼替佐米处理后, K562/ADM 细胞 *MICA* mRNA 的表达水平是处理前的(  $2.03 \pm 0.33$  )倍(  $P < 0.05$  )。由此可见, 硼替佐米处理后 K562/ADM 细胞 *MICA* mRNA 表达上升。

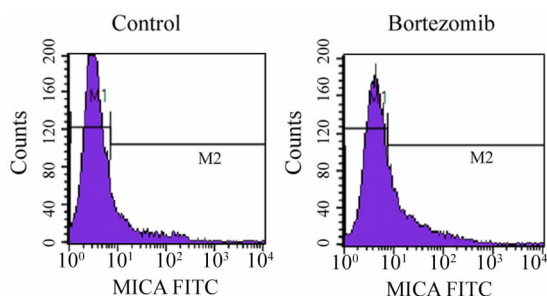


图1 硼替佐米处理前后 K562/ADM 细胞 MICA 的表达

Fig. 1 Expression of MICA on K562/ADM cells before and after bortezomib treatment

### 2.3 硼替佐米提高 K562/ADM 细胞对 NK-92 细胞的杀伤敏感性

结果(表1)显示, NK-92 细胞对 K562/ADM 细胞的杀伤活性随着效靶比升高而增强, K562/ADM 靶细胞经硼替佐米处理后, 效靶比为 10:1、20:1 时, 杀伤率由处理前的(  $23.22 \pm 3.03$  )%、(  $30.30 \pm 0.74$  )% 上升到(  $33.69 \pm 1.28$  )%、(  $41.40 \pm 1.97$  )% ; 效靶比上升时杀伤敏感性也显著提高(  $P < 0.05$  )。

表1 硼替佐米作用前后 NK-92 细胞

对 K562/ADM 细胞的杀伤作用(  $n=3, \bar{x} \pm s, \%$  )

Tab.1 Cytotoxicity of NK-92 cells against K562/ADM cells before and after bortezomib treatment(  $n=3, \bar{x} \pm s, \%$  )

| E: T  | Pre-treatment    | Post-treatment   | <i>t</i> | <i>P</i> |
|-------|------------------|------------------|----------|----------|
| 10: 1 | $23.22 \pm 3.03$ | $33.69 \pm 1.28$ | 4.548    | 0.045    |
| 20: 1 | $30.30 \pm 0.74$ | $41.40 \pm 1.97$ | 7.311    | 0.018    |

## 3 讨论

白血病细胞多药耐药( multidrug resistance, MDR)是化疗失败和预后差的主要原因。近年来, 随着白血病免疫机制的深入研究, 免疫治疗已经成为目前治疗白血病, 尤其是清除其微小残留病灶、减少复发和耐药等的重要手段。NK 细胞在肿瘤免疫中形成了第一道杀伤防线, 具有广泛的抗肿瘤作用, 并且在动物移植瘤模型中表现出良好的抑瘤活性, 其在白血病控制和治疗中的作用备受关注<sup>[3]</sup>。Dedoussis 等<sup>[4]</sup>

发现, NK 细胞对耐顺铂的 K562/B6、K562/C9 细胞株的杀伤作用较敏感株 K562 细胞降低。因此, 降低白血病细胞对 NK 细胞的免疫耐受性, 增强 NK 细胞的杀伤活性是提高肿瘤免疫治疗疗效的有效途径。

NK 细胞的活化及功能的发挥是由其表面活化性受体和抑制性受体所传递的信号决定的。抑制性受体包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体( killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR )及异质性的 C 型凝集素受体二聚体 CD94/NKG2, 它们识别的配体分别为 HLA I 分子和 HLA E 分子。活化性受体包括 MHC I 类分子特异性受体, 这类受体一般与 MHC 抑制性受体交联表达于 NK 细胞表面; 非 MHC I 类分子特异的受体, 包括 C 型凝集素样家族成员 NKG2D 受体和自然细胞毒性受体( natural cytotoxicity receptor, NCR ) NKP46、NKP 44、NKP30。NK 细胞的活化受体 NKG2D 在所有 NK 细胞、大多数 NKT 细胞、巨噬细胞以及  $\gamma\delta$ T 细胞表面均有表达。人 NKG2D 配体分为两大类, 第一类包括 MICA、MICB, 为非经典的 HLA I 类基因, 主要表达于胃肠道上皮细胞表面, 在大多数上皮性肿瘤细胞组织中也都有表达<sup>[6]</sup>; 第二类人 NKG2D 配体由人巨细胞病毒 UL16 蛋白的结合蛋白 1( human cytomegalovirus glycoprotein UL16 binding protein 1, ULBP1 )、ULBP2、ULBP3 组成, 其表达较广泛, 可以表达于多种细胞、组织、肿瘤<sup>[7]</sup>。NKG2D 与其配体交联, 可触发 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, 因此 NKG2D 的活化决定了机体的抗肿瘤细胞免疫水平。但有一些白血病细胞表达低表达或不表达 NKG2D 配体, 可逃逸 NK 细胞的监视<sup>[8-9]</sup>。有研究<sup>[10-11]</sup>表明, 一些细胞因子( IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 )以及抗肿瘤分子靶向药物, 如全反式维甲酸、曲古霉素 A、羟基脲等可以上调白血病细胞表面 NKG2D 配体的表达<sup>[12]</sup>。

硼替佐米是蛋白酶体抑制剂类抗肿瘤药物, 能够增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[13]</sup>, 并通过影响信号转导通路、细胞周期相关蛋白、Bcl-2 家族蛋白等促进细胞凋亡作用<sup>[14]</sup>, 提高其他抗肿瘤药物的治疗效果<sup>[15-16]</sup>, 或逆转肿瘤细胞耐药<sup>[17]</sup>。目前在复发和难治性多发性骨髓瘤以及 B 细胞淋巴瘤的治疗中取得了令人瞩目的疗效。近年来研究表明, 硼替佐米对白血病同样起到抗肿瘤作用, 但具体机制仍在不断探索中。Terzah 等<sup>[18]</sup>用 MTT 法检测了 5 种急性淋巴细胞白血病细胞株对硼替佐米的 IC<sub>50</sub> 值, 结果显示这 5 种细胞株对硼替佐米都具有高度敏感性。Dai 等<sup>[19]</sup>实验发现, 硼替佐米可能通过促

进 MAPK、JNK 和 ERK 的磷酸化、抑制 STAT3 等途径来有效抑制 K562 和 LAMA84 细胞的生长。还有研究<sup>[20-21]</sup>表明, 硼替佐米抑制慢性 B 淋巴细胞白血病的机制包括激活 Caspase-8, 上调线粒体 Bax 浓度诱导其凋亡等。但硼替佐米能否通过诱导白血病耐药细胞株 MICA 高表达并增强 NK 细胞对其杀伤活性尚未见报道。

本研究采用流式细胞仪检测硼替佐米作用前后耐药 K562/ADM 细胞上 MICA 的表达, real-time PCR 检测 *MICA* mRNA 表达, 以及 LDH 释放法检测其对 NK 细胞杀伤敏感性的变化。实验结果显示, 硼替佐米作用后 K562/ADM 细胞的 *MICA* mRNA 和蛋白水平表达均较前增高, 效靶比为 10:1、20:1 时, NK-92 细胞对其杀伤活性均较硼替佐米作用前显著升高 ( $P < 0.05$ )。提示, 硼替佐米可能通过诱导耐药 K562/ADM 细胞 MICA 表达升高, 达到增强 NK 细胞对其杀伤的效果。

目前, 对白血病耐药免疫效应的相关报道较为有限, 亟待深入研究。本研究为提高白血病细胞 MICA 表达以抵抗白血病免疫逃逸, 以及临床治疗白血病提供了新的思路。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Markovina S, Callander NS, Oconnor SL, et al. Bortezomib-resistant nuclear factor-kappaB activity in multiple myeloma cells Mol [ J ]. *Cancer Res*, 2008, 6( 8 ): 1356-1364.
- [ 2 ] Uddin S, Ahlmed M, Bavi P, et al. Bortezomib ( Velcade ) induces P27Kipl expression through S-phase kinase protein 2 degradation in colorectal cancer [ J ]. *Cancer Res*, 2008, 68( 9 ): 3379-3388.
- [ 3 ] Messinger YH, Gaynon PS, Sposto R, et al. Bortezomib with chemotherapy is highly active in advanced B-precursor acute lymphoblastic leukemia; Therapeutic advances in childhood leukemia & lymphoma ( TACL ) study [ J ]. *Blood*, 2012, 120( 2 ): 285-290.
- [ 4 ] Romagné F, Vivier E. Natural killer cell-based therapies [ J ]. *F1000 Med Rep*, 2011, 3( 1 ): 9-17.
- [ 5 ] Dedoussis GV, Menounos P, Papadopoulos N, et al. Reduction of susceptibility to NK lysis in cisplatin-resistant K562 cell lines [ J ]. *Anticancer Res*, 1998, 18( 4C ): 3081-3085.
- [ 6 ] Diefenbach A, Raulet DH. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T cell immunity [ J ]. *Immunol Rev*, 2002, 188( 1 ): 9-21.
- [ 7 ] Sutherland CL, Chalupny NJ, Sehooley K, et al. ULI6-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells [ J ]. *J Inununol*, 2002, 168( 2 ): 671-679.
- [ 8 ] Nowbakht P, Ionescu MC, Rohner A, et al. Ligands for natural killer cells-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias [ J ]. *Blood*, 2005, 105( 9 ): 3615-3622.
- [ 9 ] Saito H, Osaki T, Ikeguchi M. Decreased NKG2D expression on NK cells correlates with impaired NK cell function in patients with gastric cancer [ J ]. *Gastric Cancer*, 2012, 15( 1 ): 27-33.
- [ 10 ] Decot V, Voillard L, Latger-Cannard V, et al. Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: Comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression [ J ]. *Exp Hematol*, 2010, 38( 5 ): 351-362.
- [ 11 ] Muntassell A, Magri G, Pende D, et al. Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection [ J ]. *Blood*, 2010, 115( 25 ): 5170-5179.
- [ 12 ] Lu X, Ohata K, Kondo Y, et al. Hydroxyurea upregulates NKG2D ligand expression in myeloid leukemia cells synergistically with valproic acid and potentially enhances susceptibility of leukemic cells to natural killer cell mediated cytotoxicity [ J ]. *Cancer Sci*, 2010, 101( 3 ): 609-615.
- [ 13 ] Li T, Ho L, Piperdi B, et al. Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib in chemotherapy-naive patients with advanced stage non-small cell lung cancer [ J ]. *Lung Cancer*, 2009, 68( 1 ): 89-93.
- [ 14 ] Ooi MG, Hayden PJ, Kotoula V, et al. Interactions of the Hdm2/p53 and proteasome pathways may enhance the antitumor activity of bortezomib [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15( 23 ): 7153-7160.
- [ 15 ] Reece DE, Sullivan D, Lonial S, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of two doses of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma [ J ]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 67( 1 ): 57-67.
- [ 16 ] Golden EB, Lam PY, Kardosh A, et al. Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors [ J ]. *Blood*, 2009, 113( 23 ): 5927-5937.
- [ 17 ] Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells [ J ]. *Cancer Res*, 2001, 61( 7 ): 3071-3076.
- [ 18 ] Tezah Y, Horton TM, Gannavarapu A, et al. Bortezomib interactions with chemotherapy agents in acute leukemia *in vitro* [ J ]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 58( 1 ): 13-23.
- [ 19 ] Dai Y, Rahman iM, Pei XY, et al. Bortezomib and flavopiridol interact synergistically to induce apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib mesylate through both Bcr/Abl2 dependent and independent mechanisms [ J ]. *Blood*, 2004, 104( 2 ): 509-518.
- [ 20 ] Lenz HJ. Clinical update: Proteasome inhibitors in solid tumors [ J ]. *Cancer Treat Rev*, 2003, 29( 1 ): 41-48.
- [ 21 ] Dewson G, Snowden RT, Almond JB, et al. Conformational change and mitochondrial translocation of Bax accompany proteasome inhibitor induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemic cells [ J ]. *Oncogene*, 2003, 22( 17 ): 2643-2654.

[ 收稿日期 ] 2012-05-18

[ 修回日期 ] 2012-07-12

[ 本文编辑 ] 韩丹, 周玲琳