

厄洛替尼增强肺腺癌 A549 细胞对 CIK 细胞杀伤的敏感性*

刘桂举 梅家转 张晓娟 赵继智 冯睿婷

摘要 目的:研究表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂厄洛替尼对人肺腺癌 A549 细胞 NKG2D 配体表达及 CIK 细胞杀伤活性的影响及其分子机制。方法:流式细胞仪检测厄洛替尼、EGFR 下游分子 LY294002 (PI3K 抑制剂)、SB203580 (MAPK 抑制剂)、STAT21 (STAT3 抑制剂)作用 A549 细胞 24 h 后 A549 细胞 NKG2D 配体的表达。乳酸脱氢酶释放法测定不同效靶比时,CIK 细胞对 10 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼作用前、后 A549 细胞的杀伤活性。结果:厄洛替尼下调 A549 细胞 MICA 表达,上调 MICB、ULBP1 表达,EGFR 下游分子 MAPK、STAT3 抑制剂不影响 A549 细胞 NKG2D 配体的表达,PI3-K 抑制剂下调 A549 细胞 MICA 表达,厄洛替尼增强 A549 细胞对 CIK 细胞杀伤的敏感性。结论:EGFR TKI 抗肺癌作用与其增强肺癌细胞对免疫细胞杀伤的敏感性有关。

关键词 肺癌 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 细胞因子诱导杀伤细胞 NKG2D 配体

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.11.001

Erlotinib enhanced the susceptibility of human lung cancer A549 cells to CIK cell-mediated lysis

Guiju LIU, Jiazhan MEI, Xiaojuan ZHANG, Jizhi ZHAO, Ruiting FENG

Correspondence to: Jiazhan MEI; E-mail: mjzhan@163.com

Department of Oncology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, China.

This work was supported by Zhengzhou Science and Technology Program Research Project (No. 2010SFXM154).

Abstract Objective: This study aims to explore the effects of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR TKI) on the expression of natural killer group 2, member D receptor (NKG2D) ligands in human lung cancer A549 cells and on the cytotoxicity mediated by cytokine-induced killer (CIK) cells. **Methods:** The expression of NKG2D ligands (i.e., major histocompatibility complex class I chain-related molecules A or B (MICA, MICB), up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1, ULBP2, and ULBP3) on A549 cells were analyzed before and after treatment with erlotinib, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) selective inhibitors, mitogen-activated protein kinases (MAPK), and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3). The cytotoxicities of CIK cells against A549 cells before and after treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ of erlotinib were detected by lactate dehydrogenase releasing assay at 10:1, 20:1, and 30:1 effect-to-target cell ratios. **Results:** After treatment with 5 or 10 $\mu\text{mol/L}$ of erlotinib, the MICB and ULBP1 expressions on A549 cells increased, whereas the MICA expression decreased ($P < 0.05$). Minimal changes were observed on ULBP2 and ULBP3 ($P > 0.05$). The inhibitors of EGFR downstream molecules, namely, MAPK inhibitors (SB203580) and STAT3 inhibitors (STAT21), had no effect on the expression of NKG2D ligands, whereas the PI3-K inhibitors (LY294002) decreased the MICA expression. The cytotoxicity of CIK cells against A549 cells treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ of erlotinib was significantly enhanced ($P < 0.05$). **Conclusion:** Results indicate that the therapeutic efficacy of EGFR TKI in lung cancer may be mediated by increasing the susceptibility of cells to immune-cell-mediated cytotoxicity. Therefore, combination therapies with erlotinib and CIK cells may have clinical therapeutic significance for lung cancer patients.

Keywords: lung cancer, epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, cytokine-induced killer cells, NKG2D ligands

化疗和靶向药物是治疗晚期非小细胞肺癌的主要手段。对于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变的患者,表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂能够延长患者的生存期。亚裔人群中 EGFR 突变也仅占晚期 NSCLC 患者的 20% ~ 30%^[1],如何寻找有效人群,进一步发挥表皮生长因

子受体酪氨酸激酶抑制剂的疗效是未来研究的方向。肿瘤细胞表面表达 NKG2D 配体,是机体免疫细胞攻击的靶点^[2]。有研究表明^[3-6]化疗及靶向治疗药物均能够诱导肿瘤细胞表面 NKG2D 配体的表达,增强免疫细胞的杀伤活性,提高抗肿瘤效果。然而传统化疗药物的骨髓抑制作用限制了化疗和免疫细胞

作者单位:郑州人民医院肿瘤内科(郑州市 450003)

*本文课题受郑州市科技计划项目(编号:2010SFXM154)资助

通信作者:梅家转 mjzhan@163.com

的联合应用。人肺腺癌 A549 细胞表达野生型 EGFR^[7], 本研究探讨表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂厄洛替尼对 A549 细胞表面 NKG2D 配体表达及 CIK 细胞杀伤活性的影响, 为厄洛替尼联合免疫细胞治疗肺癌提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

基因重组人白细胞介素 2(IL-2, 辽宁卫星生物制品研究所); 干扰素- γ (IFN- γ , 上海克隆生物高技术有限公司); 淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品有限公司); RPMI 1640(Gibco 公司); 四甲基偶氮唑蓝(Sigma 公司); CD3 单抗(ProSpec-Tany TechnoGene 公司); FITC-CD4/PE-CD8/PerCP-CD3、FITC-CD56、PE-CD3、PerCP-CD3、NKG2D-PE、FITC-IgG1、PE-IgG1、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 单抗、流式细胞分析仪(BD 公司); LDH 释放试验试剂盒(Promega 公司); 厄洛替尼(罗氏公司), LY294002、SB203580(Sigma 公司), STAT21(Biomol 公司)。上述药物, DMSO 溶解, -20℃ 保存, 用前解冻, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释到所需浓度, 使 DMSO 的终浓度 < 0.1%; 人肺腺癌 A549 细胞由本中心常规传代保存。

1.2 方法

1.2.1 CIK 细胞的制备 CIK 细胞的制备参照文献[8]进行, 培养 14 d, 流式细胞仪检测 CIK 细胞表型。

1.2.2 A549 细胞培养 A549 细胞接种于 100 mL 培养瓶中, 细胞培养液为含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640, 置入 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育, 待细胞长满培养瓶的 70% ~ 80%, 用胰酶进行消化、计数和传代。

1.2.3 流式细胞仪测定厄洛替尼作用前后 A549 细胞 NKG2D 配体的表达 对数期生长的 A549 细胞, 以 5×10^4 个/mL 的浓度接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 加入厄洛替尼, 使其终浓度相当于 5 μ mol/L、10 μ mol/L, 以不加药物组做对照, 再培养 24 h 后, 收集厄洛替尼处

理前、后的 A549 细胞, PBS 洗涤, 计数细胞, 分管。按 1 μ g/ 10^6 个细胞浓度分别加入 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 单抗, 4℃ 作用 30 min, PBS 洗涤后再加 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG1 二抗, 4℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤后上机, 以同型 IgG1 抗体为阴性对照。用流式细胞仪分析 1×10^4 个细胞中阳性细胞数, 计算百分率。为减少误差, 重复实验 3 次。

1.2.4 流式细胞仪测定表皮生长因子信号通路下游分子对 A549 细胞 NKG2D 配体表达的影响 对数期生长的 A549 细胞, 以 5×10^4 个/mL 的浓度接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 分别加入 STAT21 30 μ mol/L, LY294002 15 μ mol/L, SB203580 25 μ mol/L, 以不加药物组做对照, 再培养 24 h 后, 收集 A549 细胞, 流式细胞仪测定 A549 细胞表面 NKG2D 配体的表达。

1.2.5 CIK 细胞杀伤活性 采用 4 h 乳酸脱氢酶释放测定法^[9], 参照 Cytotox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 说明操作, 观察不同效靶比时, CIK 细胞对 10 μ mol/L 浓度厄洛替尼作用前后的 A549 细胞的杀伤活性。效靶比 20:1 时, 观察 NKG2D 单抗先与 CIK 细胞室温孵育 15 min, 然后再加入 10 μ mol/L 浓度的厄洛替尼作用前后的 A549 细胞, 测杀伤率。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 药物处理前、后 A549 细胞表面 NKG2D 配体表达率及 CIK 细胞杀伤率比较采用配对样本 *t* 检验。不同效靶比时 CIK 细胞杀伤活性的组间比较采用 One-Way ANOVA, 以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CIK 细胞表型

流式细胞仪测定结果如图 1 所示: CD3⁺>90%、CD3⁺CD8⁺>80%、CD3⁺CD56⁺>30%、CD3⁺CD4⁺<25%、NKG2D>80%。

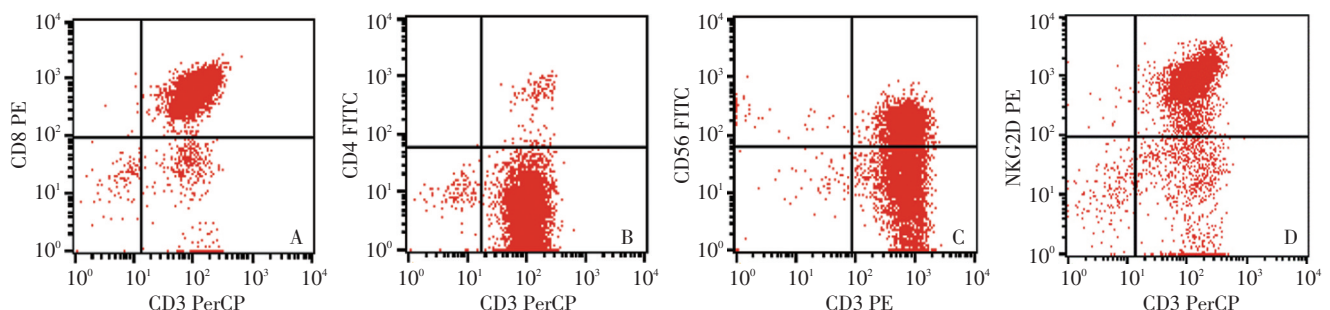


图1 CIK 细胞表型

Figure 1 Phenotype of CIK cells

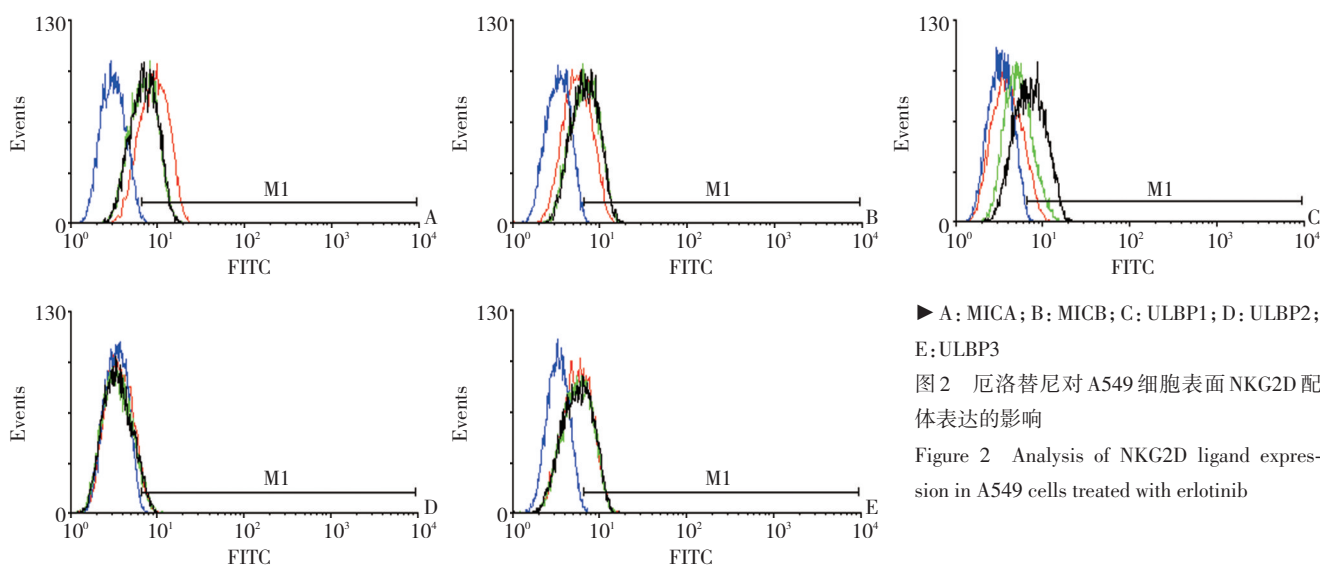
2.2 厄洛替尼调节 A549 细胞表面 NKG2D 配体表达

厄洛替尼处理前 A549 细胞 NKG2D 配体表达(蓝色曲线代表同型对照单抗,红色曲线代表原表达)如图 2 显示: MICA (66.62 ± 1.42)%、MICB (32.75 ± 2.37)%、ULBP1 (9.80 ± 2.40)%、ULBP2 (4.09 ± 1.94)%、ULBP3 (34.96 ± 4.22)%。5 $\mu\text{mol/L}$ (绿色曲线)、10 $\mu\text{mol/L}$ (黑色曲线)浓度的厄洛替尼与 A549 细胞共孵育 24 h 后, A549 细胞表面 MICB、ULBP1 表达较厄洛替尼作用前明显增强($P < 0.05$), MICA 表达较厄洛替尼作用前下降($P < 0.05$), ULBP2、ULBP3 无明显变化; 5、10 $\mu\text{mol/L}$

厄洛替尼对比, NKG2D 配体表达无统计学差异($P > 0.05$)。

2.3 EGFR 下游分子对 A549 细胞 NKG2D 配体表达的影响

流式细胞仪检测结果显示: 无论是 STAT21 (STAT3 抑制剂)、SB203580 (MAPK 抑制剂) 与 A549 细胞培养 24 h 后, A549 细胞表面 NKG2D 配体表达无明显变化($P > 0.05$), LY294002 (PI3K 抑制剂) 下调 A549 细胞表面 MICA 表达($P < 0.05$), 不影响其它配体的表达, 见表 1。



► A: MICA; B: MICB; C: ULBP1; D: ULBP2; E: ULBP3

图 2 厄洛替尼对 A549 细胞表面 NKG2D 配体表达的影响

Figure 2 Analysis of NKG2D ligand expression in A549 cells treated with erlotinib

表 1 EGFR 下游分子对 A549 细胞 NKG2D 配体表达的影响 (% , $\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Expression of NKG2D ligands in A549 cells treated with inhibitors of EGFR downstream molecules (% , $\bar{x} \pm s, n=3$)

Group	MICA	MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3
Control	66.62±1.41	32.75±2.37	9.80±2.40	4.09±1.94	34.96±4.22
STAT21	67.37±0.54	31.59±0.41	10.58±0.86	4.19±0.19	32.86±0.35
LY294002	42.90±3.49*	32.40 ±0.30	9.58±1.22	4.40±0.07	34.65±0.35
SB203580	66.08±0.28	31.79±0.19	9.15±0.39	4.36±0.10	34.97±0.40

* $P < 0.05$ vs. control

2.4 厄洛替尼增强 A549 细胞对 CIK 细胞的杀伤敏感性

效靶比 10:1、20:1、30:1 时, CIK 细胞对 A549 细胞的杀伤活性分别为 (11.08 ± 1.22)%、(36.22 ± 0.91)%、(45.73 ± 2.00)%; CIK 细胞对 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度厄洛替尼作用后的 A549 细胞杀伤活性分别为 (18.24 ± 0.96)%、(48.49 ± 0.78)%、(56.67 ± 2.11)%, 同一效靶比时, CIK 细胞对厄洛替尼作用后的 A549 细胞的杀伤活性明显增强($P < 0.05$)。效靶比 20:1 时, NKG2D 单抗封闭 CIK 细胞表面 NKG2D 受体, CIK 细胞对厄洛替尼作用前后的 A549 细胞杀伤活性分别为 (7.29 ± 0.73)%、

(7.99 ± 0.11)%, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

NKG2D-NKG2D 配体信号通路在抗肿瘤免疫中发挥重要作用, NKG2D 是 NK 细胞、抗肿瘤的主要活化性受体^[2,10]。NKG2D 配体包括两大类^[2]: MHC-I 类链相关分子 A 或 B (MHC class I chain-related molecule A or B: MICA, MICB) 及人巨细胞病毒糖蛋白 UL16 结合蛋白 (human cytomegalovirus glycoprotein UL16 binding proteins: ULBP1, ULBP2, ULBP3)。NKG2D 配体广泛表达于肿瘤细胞表面, 免疫细胞表面 NKG2D 受体与肿瘤细胞表面 NKG2D 配体结合, 激发抗肿瘤免疫应答。

CIK细胞是人外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子共同培养一段时间后获得的异质细胞群。与NK细胞相比,CIK细胞低表达抑制性免疫球蛋白受体,群体CIK细胞都表达NKG2D受体^[11],都能发挥抗肿瘤作用^[12],且CIK细胞在体外容易大量扩增,便于临床应用^[13-14]。CIK细胞对肿瘤细胞的杀伤活性与肿瘤细胞表面相应NKG2D配体的表达密切相关^[13]。化疗药物、分子靶向治疗药物能通过多种信号通路,诱导肿瘤细胞表面NKG2D配体的表达,增强免疫细胞的杀伤活性^[15]。

EGFR过表达于众多肿瘤细胞表面,EGFR调节下游信号通路相关分子活性,其中重要信号通路包括Ras-Raf-MAPK和PENT-PI3K-AKT通路,另外JAK/STAT3分子也参与EGFR信号通路,上述信号通路与肿瘤细胞分化、增殖、凋亡、侵袭、新生血管形成密切相关,近年来靶向EGFR药物已成为肺癌治疗的热点。

NKG2D配体表达受多种因素调节,MICA表达受STAT3,PI3K,MAPK分子活性调节^[16-17]。本研究单独应用STAT3分子抑制剂STAT21、MAPK抑制剂SB203580均未影响NKG2D配体的表达,但是PI3K抑制剂LY294002下调了A549细胞表面MICA表达,表明厄洛替尼处理后的A549细胞MICA表达下调与EGFR/PI3K信号抑制有关,而MICB、ULBP1上调与上述分子无关,表明EGFR信号通路其它分子调节MICB、ULBP1表达,有待进一步研究。

尽管厄洛替尼处理后的A549细胞MICA表达下调,但CIK细胞对其杀伤活性明显提高,当阻断CIK细胞表面NKG2D受体后,CIK细胞对厄洛替尼处理前后的A549细胞的杀伤活性无差异,说明CIK细胞对A549细胞的杀伤是通过NKG2D受体与NKG2D配体结合发挥作用,厄洛替尼主要通过上调A549细胞表面的活化性配体MICB、ULBP1的表达,增强了A549细胞对CIK细胞杀伤的敏感性。

基于本研究结果,提示EGFR TKIs在体内有可能激发免疫细胞的抗肿瘤作用,EGFR TKIs联合CIK细胞有望成为肺癌过继性免疫治疗方案。

参考文献

- Han SW, Kim TY, Hwang PG, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(11): 2493-2501.
- Bae DS, Hwang YK, Lee JK. Importance of NKG2D-NKG2D ligands interaction for cytolytic activity of natural killer cell[J]. *Cell Immunol*, 2012, 276(1-2):122-127.
- Morisaki T, Onishi H, Koya N, et al. Combinatorial cytotoxicity of gemcitabine and cytokine-activated killer cells in hepatocellular carcinoma via the NKG2D-MICA/B system[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(7):2505-2510.

- 梅家转,刘桂举,冯睿婷,等.顺铂增强鼻咽癌细胞NKG2D配体表达和NK细胞杀伤活性的增强作用[J].*肿瘤防治研究*,2009,36(12):996-998.
- Huang Y, Wang Y, Li Y, et al. Role of sorafenib and sunitinib in the induction of expressions of NKG2D ligands in nasopharyngeal carcinoma with high expression of ABCG2[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011,137(5):829-837.
- Inagaki A, Ishida T, Yano H, et al. Expression of the ULBP ligands for NKG2D by B-NHL cells plays an important role in determining their susceptibility to rituximab-induced ADCC[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(1):212-221.
- Rho JK, Choi YJ, Choi YR, et al. The effect of acquired cisplatin resistance on sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutant lung cancer cells[J]. *Oncol Res*, 2011, 19(10-11):471-478.
- Linn YC, Yong HX, Niam M, et al. A phase I/II clinical trial of autologous cytokine-induced killer cells as adjuvant immunotherapy for acute and chronic myeloid leukemia in clinical remission[J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(7):851-859.
- 梅家转,郭坤元,魏红梅,等.不同肿瘤细胞表面MICA的表达及NK细胞杀伤活性的研究[J].*中国免疫学杂志*,2007,23(1):37-40.
- Morisaki T, Onishi H, Katano M. Cancer immunotherapy using NKG2D and DNAM-1 systems[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(6): 2241-2247.
- 梅家转,刘桂举,李瑞君,等.IL-15上调NKG2D表达增强CIK细胞对食管癌EC9706细胞的杀伤活性[J].*肿瘤防治研究*,2011,38(5):243-245.
- Franceschetti M, Pievani A, Borleri G, et al. Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EM-RA lymphocytes[J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(5):616-628.
- Mesiano G, Todorovic M, Gammaitoni L, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(6):673-684.
- Laport GG, Sheehan K, Baker J, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011, 17(11):1679-1687.
- Bae JH, Kim SJ, Kim MJ, et al. Susceptibility to natural killer cell-mediated lysis of colon cancer cells is enhanced by treatment with epidermal growth factor receptor inhibitors through UL16-binding protein-1 induction[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(1):7-16.
- Bedel R, Thiery-Vuillemin A, Grandclement C, et al. Novel role for STAT3 in transcriptional regulation of NK immune cell targeting receptor MICA on cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5):1615-1626.
- Boissel N, Rea D, Tieng V, et al. BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia[J]. *J Immunol*, 2006, 176:5108-5116.

(2012-08-20收稿)

(2012-12-06修回)

(本文编辑:杨红欣)