

B₁₆黑色素瘤对 NK 耐受力的形成与 MHC- I 恢复表达有关^①

唐西明^② 董 郡

(中山医科大学病理学教研室;广州, 510089)

提 要 研究了生长在不同自然杀伤(NK)细胞活性小鼠皮下的 B₁₆黑色素瘤细胞对 NK 细胞毒抵抗力、体内生长转移能力及其组织相容性 I 类抗原(MHC- I)表达情况。结果表明,肿瘤生长小鼠体内 NK 活性越大,瘤细胞对 NK 抵抗力越强,生长转移能力越强,其表达的 MHC- I 抗原也越多。这说明瘤细胞在体内经过 NK 细胞杀伤后,残余的瘤细胞能通过表达 MHC- I 抗原形成对 NK 细胞毒的耐受,从而表现出更强的生长力和转移力。

主题词 黑素瘤,实验性/免疫学;杀伤细胞,天然;组织相容性抗原 I 类;免疫耐受性

中图分类号 R36; 73-354; 73-37

自然杀伤(NK)细胞对 B₁₆黑色素瘤细胞具有细胞毒作用,抑制肿瘤生长和转移,然而肿瘤生物学特性(包括对 NK 的敏感性、生长转移能力)也会因生长环境中 NK 活性不同而改变^[1]。来自高 NK 活性小鼠的 B₁₆细胞对 NK 耐受;来自低 NK 活性小鼠者对 NK 敏感。肿瘤这种对 NK 敏感性依环境中 NK 活性改变而改变的特性的机理尚不清。有人认为瘤细胞组织相容性 I 类抗原(MHC- I)的表达与其对 NK 的敏感性呈负相关^[2]。本文将就生长在不同 NK 活性小鼠的 B₁₆瘤细胞的 MHC- I 抗原表达情况进行探讨,以揭示肿瘤细胞在 NK 环境中降低 NK 敏感性的机制。

1 材料和方法

1.1 动物及瘤细胞株

C57BL/6J 小鼠,雌性,12~15g,4~8 周龄,中国医学科学院动物所提供。B₁₆黑色素瘤,由中国医学科学院药物所提供,在

C57BL/6J 小鼠体内传代。

1.2 培养试剂

RPMI1640(Gibco),加 20%小牛血清(广州光明畜牧场)、青霉素、链霉素各 100U/ml,HEPES 0.02mmol。

1.3 动物及瘤细胞的处理

小鼠随机分 3 组,每组 5 只,分别于接种肿瘤前 1d 静脉注射聚肌胞苷酸 0.25mg(光华制药厂)、生理盐水 0.2ml 和 anti-asialo GM1 (10 μ g,日本和光公司),以制造成高、中、低 NK 活性。动物模型(NK 细胞毒分别为 21.1%、12.5%和 4.42%)。将 B₁₆细胞(2×10^5)接种在上述模型鼠皮下,此后每 3d 加注上述药物一次。3 周后取下肿瘤匀浆供实验用,并分别命名为 B₁₆-P, -S, -G 亚群。未经上述处理的 B₁₆细胞作为对照组。

1.4 体外 NK 敏感性试验

按常规方法^[1]制备 C57BL 小鼠淋巴细胞,将原代培养至指数分裂期的各 B₁₆亚群细胞分别用¹²⁵I UdR 标记,按 1:100 将已标记的瘤细胞与脾淋巴细胞混合孵育 16h,收取

① 中山医科大学科研基金资助;

② 第一作者,1958 年出生,男,副教授

上清液和脱落细胞在 FT613 放免仪上测定 I 释放量(Bq)。每个样本设 5 复份,取平均值,同时设自发释放组和最大释放组。按下式计算 NK 敏感性。

$$\text{NK 敏感性}(\%) = \frac{\text{实验组 Bq} - \text{自发释放 Bq}}{\text{最大释放 Bq} - \text{自发释放 Bq}} \times 100\%$$

NK 耐受性(%) = 100 - (NK 敏感性 + 自发释放率)

1.5 实验性肺转移

小鼠尾静脉内接种各亚群瘤细胞(5×10^4), 4 周后处死,解剖显微镜下计数各肺叶表面的瘤结节数。

1.6 肿瘤体积

2×10^5 各亚群瘤细胞接种于小鼠皮下, 2 周后用测微尺测定肿瘤最大横径 a 和最大直径 b,按下式计算肿瘤体积。

$$V = \frac{a \times a \times b \pi}{6}$$

1.7 流式细胞术分析

各亚群 B_{16} 细胞(5×10^5)分别加 120 μ l 杂交瘤上清液(20-8-4s, H-2KD 特异性, Dr. Taniguch 赠)置冰上孵育 45min,洗涤后加荧光结合的兔抗鼠免疫球蛋白(1:10, Dako)置冰上孵育 45min,洗 3 次后用荧光激活细胞分类器(FACS IV)分别测定细胞荧光强度。

1.8 统计学处理

采用 SPSS/PC 软件包对材料进行方差分析及回归分析。

2 结果

2.1 不同环境下生长的 B_{16} 黑色素瘤细胞对 NK 的敏感性及其生物学行为

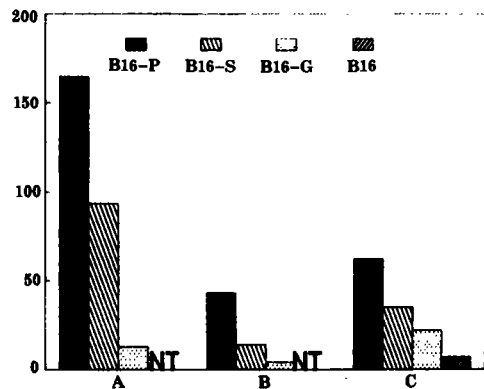
B_{16} 黑色素瘤细胞在不同 NK 活性小鼠体内生长一段时间后,对 NK 细胞毒的敏感性和生物学行为发生了很大的变化。从附表、

附图可见,长期体外培养(无 NK)的 B_{16} 细胞对 NK 高度敏感,缺乏体内生长和转移能力;生长在低 NK 活性小鼠的 B_{16} -G 对 NK 较敏感,生长转移能力较弱;生长在高 NK 活性小鼠的 B_{16} -P 对 NK 耐受,生长转移能力最强。

2.2 不同 NK 敏感性的 B_{16} 黑色素瘤细胞 MHC-I 抗原表达

B_{16} 黑色素瘤细胞对 NK 的敏感性与 MHC-I 抗原表达有关。体外长期培养的 B_{16} 细胞基本上不能表达 MHC-I 抗原,大多数 B_{16} -P 细胞都能表达,说明瘤细胞 NK 敏感性与其 MHC-I 抗原呈负相关。

B_{16} 细胞对 NK 敏感的变化、MHC-I 抗原的恢复表达均与其生长环境中 NK 活性有关(附表)。环境中 NK 活性越大,瘤细胞 MHC-I 表达越多,获得的 NK 抵抗力越强。



附图 B_{16} 细胞生物学行为与 H-2 抗原表达

每一亚群来自 5 个宿主,同一宿主来源的亚群细胞分别接种于 10 只小鼠。方差分析,每项各亚群之间(包括两两两两比较)存在非常显著差异, $P < 0.01$ 。A. 肿瘤体积(mm^3 , 皮下接种 2 周后), $F = 275.54$, $P = 0.0000$, $n = 50$; B. 实验性肺转移结节数(尾静脉接种 4 周后), $F = 96.37$, $P = 0.0000$, $n = 50$; C. H-2 表达强度(流式细胞术分析), $F = 46.70$, $P = 0.0000$, $n = 5$; NT: 未检测到。长期体外培养的 B_{16} 细胞不能在体内生长和转移

附表 B₁₆细胞 H-2 表达、NK 敏感性及其源宿主 NK 活性¹⁾

亚群	源宿主 NK 活性 [(x±s)%] (A)				NK 耐受性 [(x±s)%] (B)				H-2 表达强度 [(x±s)%] (C)			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1. B ₁₆ -P	19.56±3.36				82.96±2.25				62.4±4.71			
2. B ₁₆ -S	11.07±3.03				78.00±1.50				34.6±2.14			
3. B ₁₀ -G	4.47±2.01				73.47±2.65				21.8±2.15			
4. B ₁₆	0 ²⁾				49.12±5.77				6.6±4.07			
F	61.426				97.163				46.701			
P	0.0001				0.0001				0.0001			
两两比较 ³⁾												
2	*								*			
3	*	*	*			*			*	*		
4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

1)单因素方差分析,各项每群之间的差异有显著意义, $P<0.01$,相关系数: $r_{(A,B)}=0.85$, $r_{(A,C)}=0.995$, $r_{(B,C)}=0.85$, $P<0.01$, $n=5$; 2)长期体外培养,环境NK活性=0; 3)方差分析,* $P\leq 0.05$

点。

3 讨论

肿瘤对NK细胞毒的敏感性在很大程度上影响着肿瘤细胞的生物学行为。而影响肿瘤对NK敏感性的因素很多,MHC-I抗原的表达^[2]、某些癌基因的表达^[3]、 γ -干扰素^[4]、 β_2 -微球蛋白^[5]等都能使肿瘤细胞获得相对较大的对NK抵抗力。许多实验指出,MHC-I抗原的表达是其中的关键,不少因素都是通过诱导瘤细胞表达MHC-I抗原而起作用的。过去的工作发现B₁₆瘤细胞对NK的敏感性会因其生活环境中NK活性的变化呈逆向变化,也就是说B₁₆细胞对NK的耐受性与其经历过的NK杀伤呈正相关。本实验证实,B₁₆细胞这种NK抵抗性的获得与MHC-I抗原的恢复表达密切相关。

实际上,NK细胞主要杀伤对象是某些MHC-I抗原表达不足的靶细胞^[6],所以,瘤细胞表达的MHC-I抗原的质或量的变化都会影响其对NK的敏感性。不过,MHC-I抗原如何影响瘤细胞对NK的敏感性尚不清楚。目前有两种模式^[7,8],一是表达的MHC-I抗原封闭了NK细胞结合点(靶细胞干扰模式),二是NK细胞与靶细胞MHC-I的识别和结合对NK的活化产生负调节作用(效应细胞抑制模式)。大多数人已接受第二种观

许多迹象表明,效应细胞与靶细胞是相互作用的。靶细胞的死亡是效应细胞杀伤的结果;残存的靶细胞恢复MHC-I的表达也是NK细胞作用的结果;MHC-I抗原的表达又通过NK细胞的结合而发挥其自身NK敏感性的负调节作用。机体内对NK敏感的瘤细胞被NK细胞杀伤后,残余的瘤细胞对NK越来越耐受,其生物学行为将越来越恶化,这是临床上肿瘤防治中值得注意的问题。

参 考 文 献

- 1 唐西明,董 郡. 一种新的B₁₆黑色素瘤NK细胞毒耐受株的产生及其意义. 中山医科大学学报, 1994, 15(1): 24
- 2 Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, et al. Selective rejection of H-2 deficient lymphomavariants suggests alternative immune defense strategy. Nature, 1990, 319: 675
- 3 Versteeg R, Kruse-Wolters KM, Plomp AC, et al. Suppression of class I human histocompatibility leukocyte antigen by c-myc is locus specific. J Exp Med, 1989, 170: 621
- 4 Revel M, Chebath J. Interferon-activated genes. Trends Biochem Sci, 1986, 11: 166
- 5 Quillet A, Presse F, Marchiol-Fournigault C, et al. Increased resistance to non-restricted cytotoxicity related to HLA-A, -B expression. Di-

- rect demonstration using β 2-microglobulin transfected Daudi cells. *J Immunol*, 1988, 141 : 17
- 6 Ljunggren H-G, Karre K. In search of the missing self; MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 1990, 11 : 237
- 7 Storkus WJ, Dawson JR. Target structures involved in natural killing: characteristics, distribution, and candidate molecules. *CRC Crit Rev Immunol*, 1991, 10 : 393
- 8 Kaufman DK, Schoon RA, Leibson PJ. MHC class I expression on tumor targets inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity without interfering with target recognition. *J Immunol*, 1993, 150(4) : 1429

(1993-09-25 收稿 1994-10-30 修回)

THE RESISTANCE OF B₁₆ MELANOMA TO NATURAL KILLING AFTER BEING ATTACKED BY NK CELLS IS ASSOCIATED WITH THE RE-EXPRESSION OF MHC- I ANTIGEN

Tang Ximing Dong Jun

(Department of Pathology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

By comparing the resistance to natural killer cytotoxicity (NK), the growth and metastatic ability, and the expression of class I major histocompatibility complex (MHC- I) antigen on cell membrane of the B₁₆ melanoma subsets inoculated in mice with different NK, we found that the tumor cells can modulate their susceptibilities to NK as well as their biobehaviors by expressing MHC- I antigen according to the NK activity in their living environment. The investigation shown that after killing by natural killer cells, the residual tumor cells can resist NK and become more malignancy as they express MHC- I antigen on their cytomembranes.

Subject headings melanoma, experimental/immunology; killer cells, natural; histocompatibility complex antigen class I; immune tolerance