

H2AX 参与白血病细胞诱导 NK 细胞凋亡的研究

乔婷婷¹, 罗 渊², 陆承荣², 段连宁¹

摘要 目的 初步探讨 H2AX 磷酸化水平是否参与白血病细胞系诱导自然杀伤(NK)细胞凋亡。方法 体外培养 NK92 细胞,利用 Fas 激活性抗体 CH11 作用于 NK92 细胞,用流式细胞术检测 NK92 细胞的凋亡情况;检测 NK92 细胞凋亡的同时用流式细胞学技术检测 H2AX 磷酸化的水平。结果 随着 CH11 浓度(0、2.5、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)的升高,NK92 细胞凋亡现象明显增加,并呈剂量依赖性,表明 NK 细胞凋亡随着 CH11 浓度的升高而增加;同时 H2AX 的磷酸化水平也随 CH11 浓度(0、5、10、40、80 $\mu\text{g/ml}$)逐步增高,并呈剂量依赖性,提示 H2AX 的磷酸化作用参与细胞凋亡过程,并且随浓度的增加而增加。结论 H2AX 的磷酸化作用参与白血病细胞诱导 NK 细胞的凋亡过程。

关键词 NK 细胞;细胞凋亡;H2AX 磷酸化;流式细胞术;白血病

中图分类号 R 733.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0051-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.011

自然杀伤(natural killer cell, NK)细胞是体内重要的淋巴细胞亚群^[1],可直接通过释放细胞毒性颗粒包括颗粒酶和穿孔素等途径来杀伤肿瘤细胞。活化的 NK 细胞在免疫治疗中,对多种肿瘤细胞具有明显的杀伤作用^[2]。而 NK 细胞在杀伤肿瘤细胞的同时,自身又发生了什么改变,细胞最后的归宿如何,仍然不详。

相关研究^[3]表明红白血病细胞系 K562 采用 Fas 激活性抗体 CH11 作用于 NK 细胞可以诱导活化的 NK 细胞凋亡,其作用机制可能与 FasL/Fas 途径有关。近年,组蛋白 H2A 家族的一个分子 H2AX,因为参与细胞核内 DNA 分子的损伤修复作用而引起人们的关注。大量报道^[4-5]表明,H2AX 的主要功能受控于其 C 末端第 139 位点丝氨酸磷酸化作用(Ser139)。H2AX 的磷酸化修饰也被命名

为 γ H2AX。H2AX 除了参与 DNA 分子损伤修复作用外,还存在一种新的功能,即凋亡调控^[4]。对于其是否参与通过诱导 NK 细胞凋亡致使白血病免疫逃逸,该研究对 NK 细胞凋亡和 H2AX 磷酸化及其之间的关系进行检测,初步探讨 H2AX 是否参与白血病细胞诱导 NK 细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和器材 造血干细胞 α -MEM 培养基 [含 12.5% 新生牛血清、12.5% 马血清、100 U/ml rh 白介素(interleukin, IL)-2]; DMEM 培养液购自美国 HyClone 公司;特级胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Fas 激活性抗体 CH11、PE AnnexinV 凋亡检测试剂盒和 $10 \times$ 红细胞裂解液均购自美国 Becton Dickinson 公司;红白血病细胞株 K562 由本实验中心常规保存和传代。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 ① NK-92 细胞用 α -MEM 培养基培养,调整纯化的 NK 细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,每孔 2 ml 加于 6 孔培养板中,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,隔日换 1 次新鲜培养基,培养至培养皿中细胞数在 80% 左右开始实验;② 白血病细胞 K562 培养用含 5% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 培养液按适当浓度置于 25 cm^2 培养皿中,在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,隔 48 h 换 1 次新鲜培养液,培养至对数生长期时开始实验。

1.2.2 实验方法 ① 培养 NK-92 细胞,用 Fas 激活性抗体 CH11 模拟 K562 细胞系诱导凋亡,在不同 CH11 浓度(0、2.5、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)的培养条件下检测细胞凋亡,该实验至少重复 3 次;② 在 Fas 激活性抗体 CH11 不同浓度(0.5、10、40、80 $\mu\text{g/ml}$)分别培养后,收集每组细胞,检测 H2AX 的磷酸化水平,该实验至少重复 3 次。

1.2.3 流式细胞术检测 NK 细胞凋亡 干细胞 α -MEM 培养基培养 NK92 细胞,加入 Fas 激活性抗体 CH11,按照上述实验方法用不同的浓度培养后,收集细胞上流式机检测 NK 细胞凋亡。

1.2.4 流式细胞术检测 H2AX 磷酸化 在用 Fas

2017-10-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30873014)

作者单位:¹安徽医科大学空军临床学院,合肥 230000

²空军总医院中心实验室,北京 100142

作者简介:乔婷婷,女,硕士研究生;

段连宁,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: duanlianning@hotmail

激活性抗体 CH11 作用于 NK92 细胞的同时,收集不同浓度的细胞,重悬细胞使细胞密度达 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml,37 °C 培养一段时间;取 1×10^6 个细胞/100 μ l,先加入一抗混匀,置室温下避光反应 30 min;室温 12 000 r/min 离心 4 min,弃上清液;100 μ l PBS 重悬细胞,再加入 PE 标记荧光二抗混匀,室温下反应 30 min;PBS 再洗涤细胞 2 次,加入 500 μ l PBS 重悬成单细胞悬液,上机检测 H2AX 的磷酸化水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式检测 K562 细胞诱导活化 NK92 细胞的凋亡情况 肿瘤细胞表面表达的 Fas-L 分子可以结合 NK 细胞表面的 Fas 受体,进而反向攻击 NK 细胞。为了模拟肿瘤靶细胞对 NK 细胞的诱导作用,本研究使用 anti-Fas 激活性抗体激活 Fas-L/Fas 信号转导通路,然后检测 NK 细胞凋亡。结果表明,随着 Fas 激活性抗体 CH11 浓度的增加,K562 细胞诱导 NK 细胞凋亡的情况明显增加,且随着时间的增加凋亡的情况更加显著并呈剂量依赖性。CH11 不同浓度下,NK92 细胞的凋亡情况与不加抗体相比较差异有统计学意义 ($F = 159.8, P < 0.05$)。见

图 1、2。

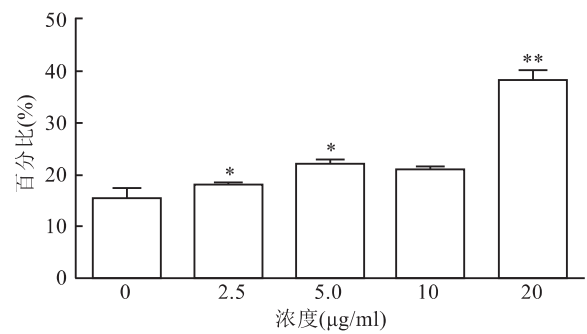


图 1 CH11 不同浓度下,NK92 细胞的凋亡情况与不加抗体比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

2.2 流式检测 H2AX 磷酸化 为了验证 anti-Fas 激活性抗体诱导 NK 细胞凋亡的同时,H2AX 是否也发生磷酸化作用,本研究通过间接荧光标记法对 NK 细胞内磷酸化 Ser139 的 H2AX 蛋白进行标记,然后用流式细胞仪检测细胞平均荧光强度值。结果表明,NK 细胞 H2AX 磷酸化呈 anti-Fas 剂量依赖性,即随着 anti-Fas 剂量的升高,NK 细胞凋亡越来越显著,同时 H2AX 的磷酸化水平也越来越强。不同浓度下 H2AX 的磷酸化情况与 0 μ g/ml 浓度比较差异有统计学意义 ($F = 154.0, P < 0.05$)。见图 3、4。

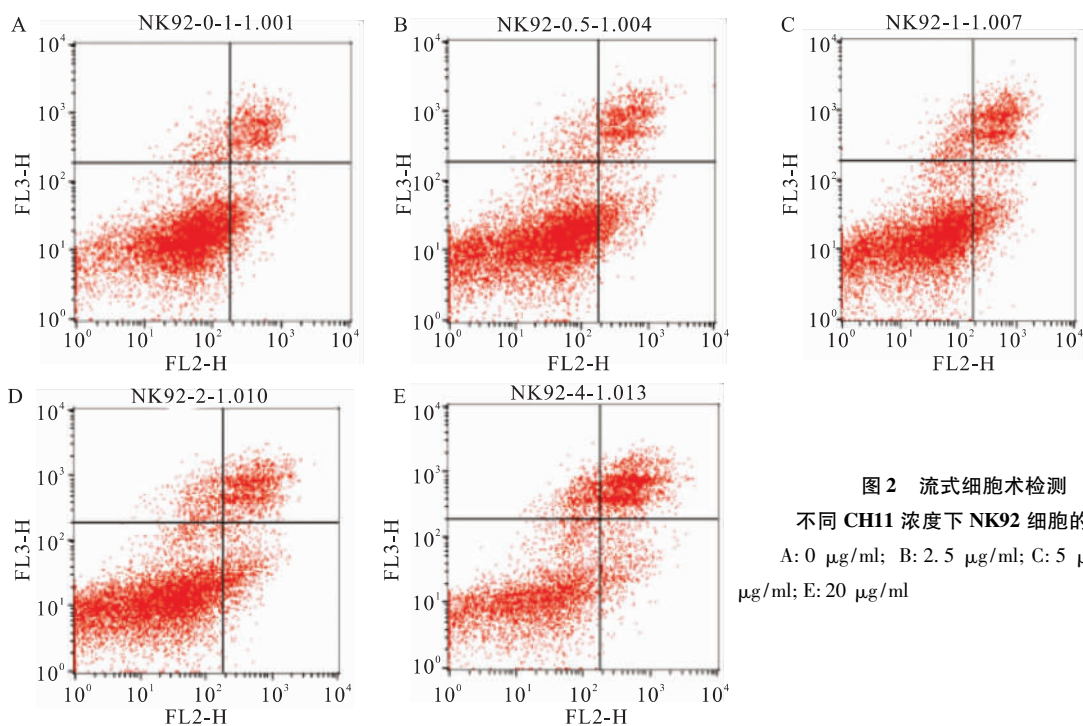


图 2 流式细胞术检测不同 CH11 浓度下 NK92 细胞的凋亡 A: 0 μ g/ml; B: 2.5 μ g/ml; C: 5 μ g/ml; D: 10 μ g/ml; E: 20 μ g/ml

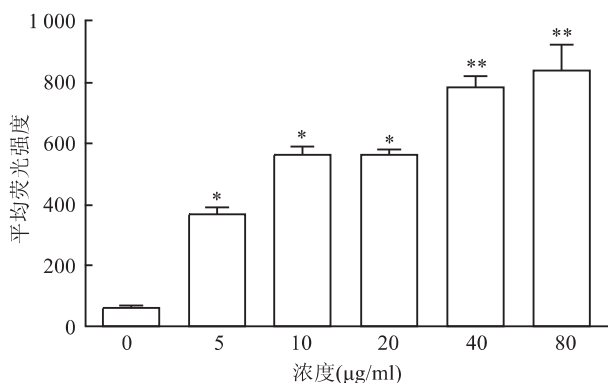


图3 不同浓度下 H2AX 的磷酸化情况
与 0 浓度比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

3 讨论

在体内, NK 细胞通过活化作用聚集并浸润到肿瘤组织内部及病灶周围, 起到杀伤肿瘤的作用^[6]。另外 NK 细胞对从肿瘤组织内新生的肿瘤细胞同样具有明显的杀伤作用^[7]。其肿瘤杀伤效应机制研究较多, 特别是 NK 细胞受体与靶细胞配体机制研究较为深入, 即“Missing self”机制。然而 NK 细胞在执行杀伤作用的同时, 本身也受到肿瘤细胞的调控从而导致凋亡。

关于活化的 NK 细胞与肿瘤细胞相互作用后, NK 细胞的存活及状态如何, 人们较少重视。Demp-

sey et al^[8] 利用 NK 细胞群与黑色素瘤细胞 Fol 在不同时间点共孵育, 发现活化 NK 细胞在发挥杀伤活性后, 自身也随之凋亡。

相关的实验结果也证实了这一点: 随着 NK 细胞与白血病细胞相互作用时间延长, NK 的凋亡率显著增加, 表明 IL-2 激活的 NK 细胞与红白血病细胞系 K562 相互作用时 K562 可以诱导 NK 细胞凋亡^[9]。这也与文献^[1,10] 的研究结果一致。本文结果显示, 随着体系中 CH11 浓度的升高, 细胞凋亡明显增加, 并呈剂量依赖性。

抑癌蛋白 H2AX 是组蛋白家族 H2A 的一个变异分子, 是细胞核内基因组的保护蛋白。如果缺乏组蛋白 H2AX, 基因组的稳定性就会减弱, 使得正常细胞和组织对肿瘤易感性增加, 因而被认为是一个肿瘤抑制因子或抑癌蛋白^[11]。越来越多的证据表明, 组蛋白 H2AX 调节肿瘤细胞凋亡的功能与 H2AX C 末端磷酸化作用有关。相关研究^[5] 结果已经证明, 组蛋白 H2AX 在 Ser139 的磷酸化作用, 在细胞凋亡过程中起着关键调控作用。

本实验结果表明随着 CH11 浓度的升高, 细胞凋亡明显增加, 并呈剂量依赖性, 与此同时 H2AX 的磷酸化水平也随逐步增高, 并呈剂量依赖性。因此, 在白血病 K562 细胞诱导活化的 NK92 细胞凋亡的过程中, H2AX 的磷酸化是参与其中的可能机制。

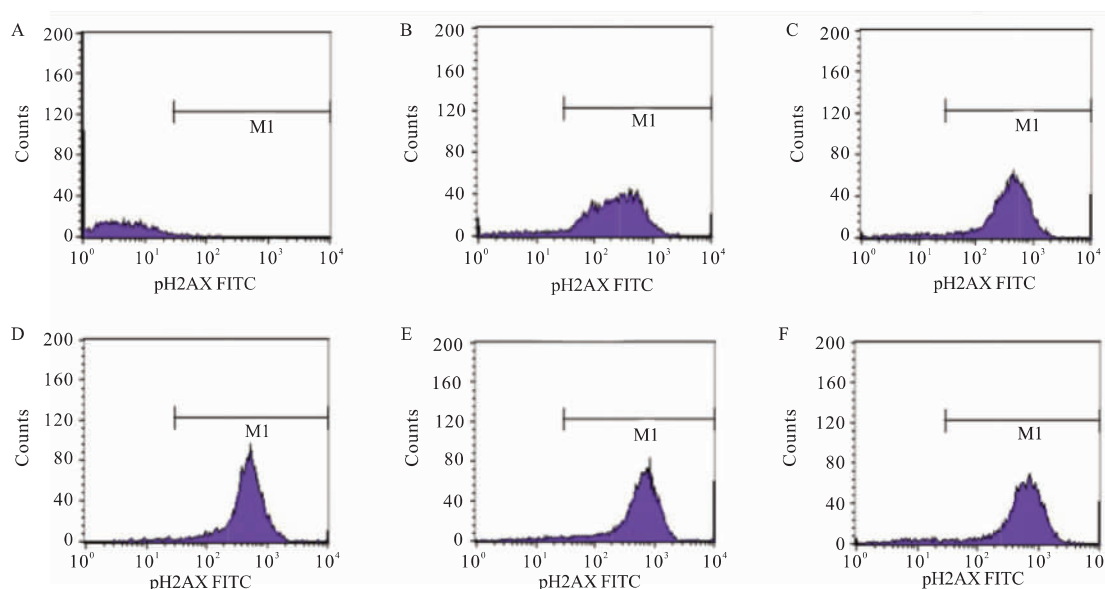


图4 流式细胞术检测 H2AX 的磷酸化水平

A: 0 μg/ml; B: 5 μg/ml; C: 10 μg/ml ; D: 20 μg/ml; E: 40 μg/ml; F: 80 μg/ml

结合前期研究^[3,6],表明 Fas/Fas-L 与 H2AX 共同参与白血病诱导 NK 细胞凋亡。但是, H2AX 的磷酸化作用是如何调控编辑凋亡途径的尚需深入研究。

参考文献

- [1] Groth A, Klöss S, von Strandmann E P, et al. Mechanisms of tumor and viral immune escape from natural killer cell-mediated surveillance [J]. *J Innate Immun*, 2011, 3(4): 344–54.
- [2] Farag S S, Caligiuri M A. Human natural killer cell development and biology [J]. *Blood Rev*, 2006, 20(3): 123–37.
- [3] 曹燕, 段连宁, 陆承荣, 等. 白血病细胞系 K562 可以诱导外周血 NK 细胞凋亡 [J]. *南京医科大学学报*, 2012, 32(9): 1245–9.
- [4] Zhang Y J, Lu C R, Cao Y, et al. Imatinib induces H2AX phosphorylation and apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells *in vitro* via caspase-3/Mst1 pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(4): 551–7.
- [5] Lu C, Shi Y, Duan L, et al. MAPKs and Mst1/Caspase-3 pathways contribute to H2B phosphorylation during UVB-induced apoptosis [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(6): 663–8.
- [6] Carlsten M, Malmberg K J, Ljunggren H G. Natural killer cell mediated lysis of freshly isolated human tumor cells [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(4): 757–62.
- [7] Pietra G, Manzini C, Vitale M, et al. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(7): 793–801.
- [8] Dempsey E C, Newton A C, Mochly-Rosen D, et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(3): L429–38.
- [9] Chen Y, Tian Q. The role of protein kinase C epsilon in neural signal transduction and neurogenic diseases [J]. *Front Med*, 2011, 5(1): 70–6.
- [10] Minshall R D, Vandenbroucke E E, Holinstat M, et al. Role of protein kinase C zeta in thrombin-induced RhoA activation and interendothelial gap formation of human dermal microvessel endothelial cell monolayers [J]. *Microvasc Res*, 2010, 80(2): 240–9.
- [11] 罗渊, 索塔林, 李燕, 等. 白血病细胞系 NK 细胞配体表达及其对 NK-92 细胞杀伤敏感性的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(6): 507–11.

Mechanism of H2AX involvement in NK cell apoptosis induced by leukemia cells *in vitro*

Qiao Tingting¹, Luo Yuan², Lu Chengrong², et al

(¹*Air Force Clinical College of Anhui Medical University, Hefei 230000;*

²*Central Laboratory of Air Force General Hospital, Beijing 100142)*

Abstract Objective To discuss the possible mechanism of H2AX involved in the NK cells apoptosis induced by leukemia cells K562. **Methods** NK92 cells cultured *in vitro* with Fas-activated antibody CH11, the NK cells apoptosis detected by flow cytometry; during NK cell apoptosis, H2AX phosphorylation also detected. **Results** As the concentration of CH11 (0, 2.5, 5, 10, 20) $\mu\text{g/ml}$ increased, cell apoptosis was significantly increased in a dose-dependent manner, similarly; suggested that CH11 induced apoptosis of NK cells in a dose-dependent manner; Additionally, the phosphorylation level of H2AX also increased gradually with the concentration of CH11 (0, 5, 10, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$), and in a dose dependent manner, disclosed that phosphorylation of H2AX involved in the apoptosis. **Conclusion** Phosphorylation of H2AX participates in the process of apoptosis of NK-92 cells induced by leukemia cells.

Key words natural killer cells; apoptosis; H2AX phosphorylation; flow cytometry; leukemia