

网络出版时间:2016-3-8 8:29:02 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160308.0829.062.html>

# NKG2D 和分泌型 MICA 在胰腺癌组织中的表达及其临床意义

徐弘, 陈炯, 赵跃, 朱兴兴, 方恒忠, 赵金钱

**摘要** 目的 研究 NK 细胞活化性受体(NKG2D)及其分泌型主要组织相容性复合体 I 类相关基因 A(MICA)在胰腺癌和癌旁组织中的表达及其临床意义。方法 通过免疫组织化学方法检测 70 例胰腺癌组织和癌旁组织中 NKG2D 及分泌型 MICA 表达情况,并分析两者之间的关系及与临床病理因素之间的关系。结果 NKG2D 和分泌型 MICA 在胰腺癌组织中的阳性表达率为 32.9% (23/70) 和 67.1% (47/70);而在癌旁组织中的阳性表达率为 60.0% (42/70) 和 31.4% (22/70);差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。NKG2D、分泌型 MICA 在胰腺癌组织中的表达与肿瘤分化程度、神经侵犯、淋巴结转移和 TNM 分期显著相关( $P < 0.05$ ),而与年龄、性别、肿瘤病变部位及大小均无关。NKG2D 的表达与分泌型 MICA 的表达呈负相关性( $P < 0.05$ )。结论 NKG2D 的表达与分泌型 MICA 的表达呈显著相关性,与胰腺癌侵袭转移能力有关,分泌型 MICA 可能通过下调 NKG2D 在肿瘤中的表达,从而逃避机体对肿瘤的免疫应答。

关键词 胰腺癌;NKG2D;MICA

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)04-0591-04

胰腺癌是消化系统中恶性程度高、早期诊断率低、治疗极其困难且预后效果较差的恶性肿瘤之一,其发病率逐年升高,5 年生存率小于 5%<sup>[1]</sup>。胰腺癌早期即可发生转移导致其常规治疗效果不佳,寻求更为有效的治疗方法成为目前研究热点。肿瘤过继免疫治疗是指在体外将抗肿瘤效应细胞进行诱导、

激活和扩增后再回输给肿瘤患者,来提高患者抗肿瘤能力,达到治疗和预防复发的目的。双阴性 T 细胞(double negative T cell, DNT)是一种既具有免疫抑制调节功能又可以杀伤肿瘤细胞的 T 细胞亚群<sup>[2]</sup>,其抗肿瘤效应逐渐被研究者关注。DNT 细胞可以通过 NK 细胞活化性受体(NK cell activating receptor, NKG2D)途径参与杀伤肿瘤细胞<sup>[3]</sup>。该研究通过免疫组织化学法联合检测 NKG2D 和相关配体,即分泌型主要组织相容性复合体 I 类相关基因 A(major histocompatibility complex class I chain-related A, MICA)在胰腺癌和癌旁组织中的表达,研究两者之间的关系及与胰腺癌临床病理参数之间的关系,为胰腺癌免疫治疗提供思路。

## 1 材料与方法

**1.1 病理标本** 胰腺癌组织及相应的癌旁组织(距离癌组织 > 1 cm)的石蜡标本 70 例,取自 2008 年 7 月~2013 年 7 月安徽医科大学附属省立医院普外科收治经手术治疗后,经病理证实为胰腺癌的标本。其中男 37 例,女 33 例;年龄 42~78(60.24 ± 9.72)岁; < 60 岁 33 例, ≥ 60 岁 37 例;胰头癌 39 例,胰体尾癌 31 例;肿瘤  $\phi < 20$  mm 25 例, ≥ 20 mm 45 例;病理学组织学分型:高分化 22 例,中低分化 48 例;有淋巴转移 42 例,无淋巴转移 28 例;有神经侵犯 45 例,无神经侵犯 25 例。患者术前均未行化疗或放疗。本实验的 70 例标本的病理参数均按照国际抗癌协会(UICC)2013 年标准<sup>[4]</sup>进行分级。

**1.2 主要试剂** 羊抗人 NKG2D 多克隆抗体和鼠抗人 MICA 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;相应二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.3 方法** 运用免疫组织化学法检测相关蛋白的表达。5  $\mu$ m 厚组织连续切片,经脱蜡、枸橼酸盐微

2016-01-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81071985);安徽省国际科技合作项目(编号:10080703038);安徽省科技攻关课题(编号:11010402172)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院普通外科,合肥 230001

作者简介:徐弘,男,硕士研究生;

陈炯,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-

mail: ch\_jiong@126.com

stage. Multivariate analysis identified CNTN-1 was an independent risk factor for early recurrence of HCC after hepatectomy. **Conclusion** High expression of CNTN-1 is a potential predictive factor for early recurrence of HCC after hepatectomy.

**Key words** hepatocellular carcinoma; CNTN-1; early recurrence

波抗原修复后 3% 过氧化氢消除内源性过氧化物酶活性,分别滴加一抗 NKG2D(浓度 1 : 50)、一抗 MICA(浓度 1 : 50),4 ℃ 过夜,复温后滴加二抗,最后 DAB 显色、苏木精复染、封片。由两名未参与实验、经验丰富的病理科医师对切片进行分析。两种蛋白的染色主要定位于细胞质中,评估标准采用半定量评分法,即在高倍镜下随机选取 5 个区域,根据染色细胞的强度分别评分,取平均分数,再根据染色细胞的百分比分别评分,取平均分数。染色强度评分为:细胞质未染色为 0 分,淡黄色(弱)为 1 分,黄色(中)为 2 分,棕黄色(强)为 3 分;染色细胞百分比评分为:视野中无染色细胞为 0 分,染色细胞占视野细胞的 1% ~ 10% 为 1 分,11% ~ 50% 为 2 分, > 50% 为 3 分。每个组织切片的最后得分为染色强度平均分数和染色百分比平均分数的乘积,得分 ≥ 4 分者被定为高表达,得分 < 4 分者即定为低表达。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 软件进行分析。选用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法。NKG2D 与分泌型 MICA 的相关性分析采用  $\chi^2$  检验的基础上计算 Pearson 列联系数。

**2 结果**

**2.1 胰腺癌组织及癌旁组织中 NKG2D、分泌型 MICA 的表达** NKG2D 和分泌型 MICA 主要定位于染色细胞的胞质中。见图 1。NKG2D 和分泌型 MICA 分别在 70 例胰腺癌组织中的阳性表达率为 32.9% (23/70) 和 67.1% (47/70);NKG2D 和分泌型 MICA 分别在癌旁组织中的阳性表达率为 60.0%

(42/70) 和 31.4% (22/70), 差异均有统计学意义 ( $\chi^2 = 6.216, P = 0.013; \chi^2 = 10.009, P = 0.002$ )。胰腺癌组织中 MICA 和 NKG2D 均低表达 5 例, MICA 和 NKG2D 均高表达 5 例, MICA 高表达和 NKG2D 低表达 42 例, MICA 低表达和 NKG2D 高表达 18 例。相关性分析显示 NKG2D 的表达与分泌型 MICA 的表达存在负相关性 ( $r = 0.676, P < 0.001$ )。

**2.2 NKG2D、分泌型 MICA 的表达与胰腺癌临床病理参数的关系** NKG2D、分泌型 MICA 在胰腺癌组织中的表达均与肿瘤的分化程度、神经侵犯、淋巴结转移和 TNM 分期显著相关 ( $P < 0.001$ ), 而与年龄、性别、肿瘤病变部位及大小均无关。见表 1。

**3 讨论**

本研究通过免疫组织化学方法检测 70 例胰腺癌组织和癌旁组织中 NKG2D 及分泌型 MICA 表达情况,结果表明 NKG2D 在胰腺癌组织中呈低表达,而分泌型 MICA 在胰腺癌组织中呈高表达,两者在胰腺癌组织中的表达均与肿瘤分化程度、神经侵犯、淋巴结转移和 TNM 分期显著相关,而与年龄、性别、肿瘤病变部位及大小无关,提示两者与胰腺癌的侵袭、转移能力存在一定的相关性,可能成为预测和评估胰腺癌患者预后的有效指标。

NKG2D 通过识别靶细胞表面诱导产生的相关配体来传递活化信号并激活机体免疫系统,从而发挥对靶细胞的杀伤作用,其中 MICA 是 NKG2D 的最主要配体<sup>[5-6]</sup>。MICA 随着肿瘤不断进展可分为膜型 MICA 和分泌型 MICA 两类,两者在肿瘤免疫中起到的作用却截然相反<sup>[7]</sup>。在肿瘤的早期阶段 MICA 高表达于细胞表面,即膜型 MICA,随着肿瘤的进展,膜型 MICA 从细胞膜表面脱离以分泌型形式进入细胞质<sup>[8]</sup>。膜型 MICA 蛋白通过与 NKG2D 结合可以为效应细胞的活化提供共刺激信号,介导  $\gamma\delta T$  细胞等活化促进细胞杀伤效应<sup>[9]</sup>。而分泌型 MICA 却下调 NKG2D 的表达,严重损害了免疫细胞的抗肿瘤效应从而使 NKG2D-MICA 系统的作用锐减<sup>[10]</sup>。本实验显示 MICA 染色主要定位于胰腺癌细胞质中,即胞质中分泌型 MICA 呈高表达,而细胞膜染色情况(膜型 MICA)并未观察到,可能的原因是本实验中的病例大多属于进展期胰腺癌且早期胰腺癌不一定百分之百表达膜型 MICA。NKG2D 和分泌型 MICA 的表达呈负相关性,说明分泌型 MICA 可能通过下调 NKG2D 的表达,影响 NK 细胞及  $\gamma\delta T$

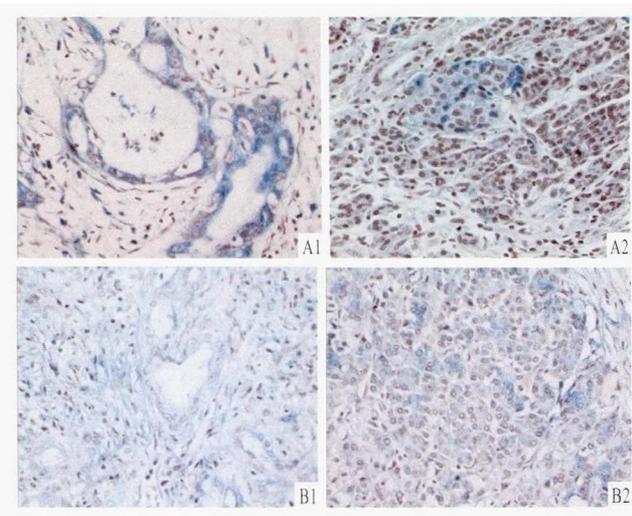


图 1 NKG2D、MICA 在胰腺癌和癌旁组织中的表达 ×400  
A: MICA; B: NKG2D; 1: 胰腺癌组织; 2: 癌旁组织

表1 MICA 和 NKG2D 表达与胰腺癌临床病理特征的相关性(n)

临床病理参数	n	MICA		$\chi^2$ 值	P 值	NKG2D		$\chi^2$ 值	P 值
		低表达	高表达			低表达	高表达		
年龄(岁)									
<60	33	14	19	2.590	0.108	19	14	2.590	0.108
≥60	37	9	28			28	9		
性别									
男	37	13	24	0.185	0.667	24	13	0.185	0.667
女	33	10	23			23	10		
肿瘤部位									
胰头	39	16	23	2.664	0.103	26	13	0.009	0.924
胰体尾	31	7	24			21	10		
肿瘤直径(mm)									
<20	25	11	14	2.189	0.139	16	9	0.174	0.676
≥20	45	12	33			31	14		
组织分化									
中、低	48	5	43	34.862	<0.001	39	9	13.777	<0.001
高	22	18	4			8	14		
神经侵犯									
无	25	18	7	27.009	<0.001	12	13	6.460	0.011
有	45	5	40			35	10		
淋巴结转移									
无	28	19	9	25.913	<0.001	10	18	20.894	<0.001
有	42	4	38			37	5		
TNM 分期									
I 期	28	19	9	25.913	<0.001	10	18	20.894	<0.001
II 期	42	4	38			37	5		

细胞的抗肿瘤效应,从而使 NKG2D-MICA 系统的作用锐减,导致促进肿瘤的免疫逃避和妥协宿主对感染的抵抗力<sup>[9-10]</sup>。

胰腺癌是一种高度恶性的消化系统肿瘤,由于患者早期症状隐匿,大部分患者在首次诊断时已发生严重的局部侵犯和远处转移,导致手术治疗效果不佳,DNT 细胞免疫治疗逐渐走入人们的视野,Li et al<sup>[11]</sup>认为 DNT 细胞可通过抑制 B 淋巴细胞的增殖和免疫球蛋白的生成来调节肿瘤免疫,并认为体外扩增的 DNT 细胞在早期分化阶段能够有效抑制多种肿瘤细胞的生长。DNT 细胞可以通过分泌可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, sTRAIL)参与杀伤肿瘤细胞的过程并受到 NKG2D 分子调节,当中和 TRAIL 时会显著降低对肿瘤的杀伤效果<sup>[3]</sup>。在前期的实验中同样证明了 DNT 细胞可以通过分泌 sTRAIL 与胰腺癌细胞所表达的 TRAIL 受体结合从而诱导胰腺癌细胞凋亡<sup>[12]</sup>,结合当前的研究表明 MICA-NKG2D 途径可能是通过介导 TRAIL 的表达来降低 DNT 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力。

综上所述,本研究表明 NKG2D 在胰腺癌组织

中呈低表达,而分泌型 MICA 在胰腺癌组织中呈高表达,两者在胰腺癌组织中的表达呈负相关性,均与肿瘤分化程度、神经侵犯、淋巴结转移和 TNM 分期显著相关。这揭露了 MICA-NKG2D 途径可能是 DNT 细胞抑制胰腺癌细胞侵袭、转移的机制之一。然而,NKG2D 和分泌型 MICA 在胰腺癌进展中的具体机制目前尚不清楚,未来仍需继续深入探索 NKG2D-MICA 途径;详细解析其发挥作用及具体的相关分子机制。

#### 参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. *Cancer J Clin*, 2012, 62(1):10-29.
- [2] Kim E Y, Juvet S C, Zhang L. Regulatory CD4(-)CD8(-) double negative T cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 677:85-98.
- [3] Dokouhaki P, Han M, Joe B, et al. Adoptive immunotherapy of cancer using *ex vivo* expanded human gammadelta T cells: a new approach[J]. *Cancer Lett*, 2010, 297(1):126-36.
- [4] Sobin L H, Compton C C. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer[J]. *Cancer*, 2010, 116(22):5336-9.
- [5] Cai X, Dai Z, Reeves R S, et al. Autonomous stimulation of cancer cell plasticity by the Human NKG2D lymphocyte receptor

- coexpressed with its ligands on cancer cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10), e108942.
- [6] Chalupny N J, Sutherland C L, Lawrence W A, et al. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D[J]. *Biochem Biophysical Res Commun*, 2003, 305(1):129-35.
- [7] Aguera-Gonzalez S, Gross C C, Fernandez-Messina I, et al. Palmitoylation of MICA, a ligand for NKG2D, mediates its recruitment to membrane microdomains and promotes its shedding[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(12):3667-76.
- [8] Jia H Y, Liu J L, Zhou C J, et al. High expression of MICA in human kidney cancer tissue and renal cell carcinoma lines[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(4):1715-7.
- [9] Xuan X Y, Zhang J F, Hu G M, et al. Upregulated expression of NKG2D and its ligands give potential therapeutic targets for patients with thymoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(7):368-74.
- [10] Chen D, Gyllensten U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(12):2633-42.
- [11] Li W, Tian Y, Li Z, et al. *Ex vivo* converted double negative T cells suppress activated B cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(1):164-9.
- [12] 赵跃, 陈炯, 杨仁保, 等. STRAIL及受体 TRAIL-R1 在 DNT 细胞抑制胰腺癌细胞中作用及意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(11):1613-7.

## Expression and clinical significances of NKG2D and secreted MICA in pancreatic carcinoma

Xu Hong, Chen Jiong, Zhao Yue, et al

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To investigate the expression and clinical significances of NK cell activating receptor (NKG2D) and secreted MHC class I chain-related A (MICA) in pancreatic cancer. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expressions of NKG2D and secreted MICA in tumor tissues and adjacent non-tumor tissues from a total of 70 patients with pancreatic carcinoma. The correlation of NKG2D and secreted MICA was analyzed. The relationships between NKG2D and secreted MICA expressions and clinicopathological parameters were evaluated. **Results** The positive expression rates of NKG2D and secreted MICA were 32.9% (23/70) and 67.1% (47/70) in pancreatic carcinoma tissues, and 60.0% (42/70) and 31.4% (22/70) in paracarcinoma tissues, respectively, both with statistical significance ( $P < 0.05$ ). The expressions of NKG2D and secreted MICA were significantly correlated with tumor differentiation, nerve invasion, lymph node metastasis and TNM staging in pancreatic carcinoma tissues ( $P < 0.05$ ). However, there was no obvious association between NKG2D or secreted MICA and age, gender, tumor location, or tumor size. NKG2D expression was negatively correlated with secreted MICA expression in pancreatic carcinoma tissues ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Down-regulated NKG2D and up-regulated secreted MICA are significantly correlated with the infiltrative capability in pancreatic carcinoma. NKG2D and secreted MICA have a negative correlation in pancreatic carcinoma tissues, which reveals that secreted MICA may inhibit the level of NKG2D expression during tumor progression, thereby reducing the immune responses against tumor cells in patients with pancreatic carcinoma.

**Key words** pancreatic carcinoma; NKG2D; MICA