

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.02.008
文章编号: 1005-8982 (2022) 02-0038-05

实验研究·论著

ADAM17下调影响NK细胞对非小细胞肺癌 杀伤作用的实验研究

罗小宁, 刘洁文, 张羽, 王祥财, 涂福平
(赣南医学院第一附属医院, 江西 赣州 341000)

摘要: **目的** 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)中解聚素-金属蛋白酶17(ADAM17)下调对自然杀伤(NK)细胞杀伤作用的影响。**方法** 体外培养人NSCLC A549细胞株,分为正常对照组(未转染)、阴性对照组(转染nonsense siRNA)和ADAM17下调组(转染ADAM17 siRNA)。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组A549细胞ADAM17 mRNA表达, Western blotting检测各组A549细胞ADAM17蛋白表达。制备NK细胞,加入各组A549细胞中,检测NK细胞杀伤活性, Western blotting检测各组细胞中 γ 干扰素(IFN- γ)、颗粒酶B(GraB)、穿孔素(PFP)蛋白表达。**结果** 各组细胞ADAM17 mRNA、蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),正常对照组与阴性对照组细胞ADAM17 mRNA、蛋白相对表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),ADAM17下调组较正常对照组、阴性对照组降低($P < 0.05$)。各组NK细胞对A549细胞的杀伤活性比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),正常对照组与阴性对照组NK细胞对A549细胞的杀伤活性比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),ADAM17下调组较正常对照组、阴性对照组升高($P < 0.05$)。各组细胞中IFN- γ 、GraB、PFP蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),正常对照组与阴性对照组细胞中IFN- γ 、GraB、PFP蛋白相对表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),ADAM17下调组较正常对照组、阴性对照组升高($P < 0.05$)。**结论** NSCLC A549细胞株中ADAM17下调能增强NK细胞的杀伤作用。

关键词: 非小细胞肺癌; 解聚素-金属蛋白酶17; 自然杀伤细胞; 杀伤作用

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Effect of the down-regulation of ADAM17 on the killing effect of NK cells in non-small cell lung cancer

Xiao-ning Luo, Jie-wen Liu, Yu Zhang, Xiang-cai Wang, Fu-ping Tu
(First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of the down-regulation of A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) on the killing effect of natural killer (NK) cells in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Human NSCLC A549 cells were cultured in vitro and divided into normal control group (without transfection), negative control group (transfected with nonsense siRNA) and ADAM17 down-regulation group (transfected with ADAM17 siRNA). The mRNA level of ADAM17 in A549 cells was detected via quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), while the protein level of ADAM17 was determined via Western blotting (WB). NK cells were prepared and co-cultured with A549 cells of each group. The killing activity of NK cells was measured, and the protein levels of interferon- γ (IFN- γ), granzyme B (GraB) and perforin (PFP) were also detected via WB. **Results** The mRNA and protein levels of ADAM17, the protein levels of IFN- γ , GraB and PFP, and the killing activity of NK cells against A549 cells were different among the groups as a whole ($P < 0.05$). Specifically, there were no

收稿日期: 2021-08-20

significant differences in the mRNA and protein levels of ADAM17, the protein levels of IFN- γ , GrB and PFP, or the killing activity of NK cells against A549 cells between normal control group and negative control group ($P > 0.05$), while the mRNA and protein levels of ADAM17, the protein levels of IFN- γ , GrB and PFP, and the killing activity of NK cells against A549 cells were lower in the ADAM17 down-regulation group compared with those in the normal control group and negative control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The down-regulation of ADAM17 in NSCLC A549 cells can enhance the killing effect of NK cells.

Keywords: non-small cell lung cancer; A disintegrin and metalloproteinase 17; natural killer cells; killing effect

肺癌是常见的呼吸系统恶性肿瘤,其发病率、病死率高,严重威胁人类健康^[1]。而非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌的亚型,占肺癌的80%~85%^[2]。在现有治疗模式下,肺癌患者的总体治愈率<20%,晚期患者5年生存率<5%,因此,探索新的治疗模式具有重要意义^[3]。随着肿瘤免疫理论逐渐走向成熟,免疫治疗作为一种新兴的治疗模式,在肿瘤治疗中展现出较大潜力。目前,免疫检查点抑制剂的应用已在晚期肺癌治疗中取得突破性进展^[4]。自然杀伤(natural killer, NK)细胞是机体固有免疫系统的一种效应细胞,具有强大的抗肿瘤、抗感染等作用,是机体免疫的作用屏障^[5-6]。研究发现,细胞因子可选择性地提高NK细胞数量和抗肿瘤功能的有效性^[7]。解聚素-金属蛋白酶17(a disintegrin and metalloprotease 17, ADAM17)可介导黏附因子、细胞因子、生长因子等多种膜分子水解脱落,在调节肿瘤细胞的增殖、凋亡、黏附、转移等过程中发挥重要作用^[8]。研究发现,ADAM17在非小细胞肺癌组织中高表达,并且与淋巴结转移密切相关^[9]。肿瘤细胞的免疫逃逸往往是肿瘤复发、转移的总根源,而NK细胞在宿主抵抗肿瘤生长、转移的免疫反应中起关键作用^[10]。本研究将通过研究NSCLC A549细胞株中ADAM17下调对NK细胞杀伤作用的影响,以期为NSCLC免疫治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人NSCLC A549细胞株(货号:HZ-H122)购自美国ATCC细胞库,胎牛血清(货号:FBS500-S)购自澳大利亚AusGeneX公司,RPMI-1640培养液(货号:GMS12052.4.1)购自美国GENMED公司,Lipofectamine 2000转染试剂(货号:11668019)购自

美国Invitrogen公司,Ficoll密度梯度分离液试剂盒、NK细胞激活扩增试剂盒(货号:P1114、TBDNK-KIT)购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,磁性激活细胞分离(MACS)试剂盒(货号:130-097-240)购自德国Miltenyi Biotec公司,实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒(货号:K1002S)购自美国Promega公司,nonsense siRNA、ADAM17 siRNA与ADAM17、GAPDH引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成,ADAM17抗体、 γ 干扰素(IFN- γ)抗体、颗粒酶B(GrB)抗体、穿孔素(PFP)抗体、GAPDH抗体(货号:ab57484、ab25101、ab4059、ab7203、ab181602)购自美国Abcam公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔(货号:0295G-HRP)购自美国Santa公司,CCK-8试剂(货号:CK-04)购自日本同仁化学研究所,MIR-162-PC/MIR-262-PC型恒温培养箱购自日本松下株式会社,荧光定量PCR仪(型号:ABI 7500)购自美国Applied Biosystems公司,酶标仪、化学发光成像系统(型号:MODEL550/ChemiDocXRS)购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 将A549细胞培养于含10%胎牛血清、100 u/mL青霉素、100 u/mL链霉素的RPMI 1640培养基中,37℃、5%二氧化碳培养箱培养,细胞融合率达到70%~80%时,用胰蛋白酶消化、传代培养。

取对数期A549细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种于96孔培养板,分为正常对照组、阴性对照组和ADAM17下调组。其中正常对照组A549细胞不进行转染,阴性对照组、ADAM17下调组A549细胞使用Lipofectamine 2000转染试剂分别转染nonsense siRNA、ADAM17 siRNA。

1.2.2 NK细胞制备 取健康成年捐赠人外周静脉血10 mL于肝素抗凝管中,加预冷PBS,混匀后采用Ficoll密度梯度离心法离心外周血单个核细胞

(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 预冷 PBS 洗涤, 按照 MACS 试剂盒操作步骤分离 NK 细胞 (CD56⁺CD3⁻), 使用 NK 细胞激活扩增试剂盒激活 NK 细胞, 使用含 10% 胎牛血清、500 u/mL 重组白细胞介素 2 的 RPMI 1640 培养基进行培养, 保持细胞浓度为 1×10^6 个/mL。

1.2.3 qRT-PCR 检测各组 A549 细胞 ADAM17 mRNA 表达 将细胞培养 48 h, 收集细胞, 提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 采用 qRT-PCR 检测 ADAM17 mRNA 表达水平, 内参基因为 GAPDH。反应条件: 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 拉伸 1 min, 共 34 次循环。ADAM17 正向引物: 5'-ATCAAACCTTTCCTGCG-3', 反向引物: 5'-CAAACCCATCCTCGTCCA-3', 分别为 17 和 18 bp; 内参 GAPDH 正向引物: 5'-GAAGGT-GAAGGTCCGAGTC-3', 反向引物: 5'-GAAGAT-GGTGATGGGATTTTC-3', 分别为 19 和 20 bp。Ct 值为扩增产物的荧光信号达到临界阈值时对应的循环数, 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。

1.2.4 Western blotting 检测各组 A549 细胞 ADAM17 蛋白表达 使用蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白, 使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度并定量。电泳分离等量蛋白质并转至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, 分别加入 ADAM17 抗体、GAPDH 抗体 (1:500), 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h, 免疫反应化学发光法显色, Tanon 600 图像分析系统拍摄图像并分析条带灰度值, 目的蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/内参 GAPDH 灰度值。

1.2.5 NK 细胞杀伤活性检测 以正常对照组、阴性对照组和 ADAM17 下调组 A549 细胞为靶细胞, NK 细胞为效应细胞, 在正常对照组、阴性对照组和 ADAM17 下调组基础上按 20:1 的效靶比加入 100 μ L NK 细胞, 同时设立相应的空白正常对照组、NK 细胞正常对照组和 A549 细胞正常对照组。孵育 24 h 后, 每孔加入 CCK-8 试剂 20 μ L, 继续孵育 4 h 后, 在酶标仪 450 nm 处检测每孔光密度 (optical density, OD) 值, 计算杀伤活性。杀伤活性 (%) = $1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{NK 细胞正常对照组 OD 值}) / (\text{A549 细胞正常对照组 OD 值} - \text{空白正常对照组 OD 值}) \times 100\%$ 。

1.2.6 Western blotting 检测各组细胞 IFN- γ 、GraB、PFP 蛋白表达 将各组细胞按 20:1 的效靶比加入 100 μ L NK 细胞, 培养 48 h, 收集细胞, 使用蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白, 使用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度并定量。电泳分离等量蛋白质并转至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, 分别加入 IFN- γ 抗体、GraB 抗体、PFP 抗体、GAPDH 抗体 (1:500), 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h, 免疫反应化学发光法显色, Tanon 600 图像分析系统拍摄图像并分析条带灰度值, 目的蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/内参 GAPDH 灰度值。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 ADAM17 mRNA 相对表达量比较

正常对照组、阴性对照组、ADAM17 下调组细胞中 ADAM17 mRNA 相对表达量分别为 (1.03 ± 0.12) 、 (1.01 ± 0.10) 、 (0.65 ± 0.07) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 28.096, P = 0.000$), 正常对照组与阴性对照组细胞 ADAM17 mRNA 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), ADAM17 下调组较正常对照组、阴性对照组降低 ($P < 0.05$)。

2.2 各组细胞 ADAM17 蛋白相对表达量比较

正常对照组、阴性对照组、ADAM17 下调组细胞中 ADAM17 蛋白相对表达量分别为 (0.86 ± 0.11) 、 (0.83 ± 0.13) 、 (0.38 ± 0.07) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 38.389, P = 0.000$), 正常对照组与阴性对照组 A549 细胞中 ADAM17 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), ADAM17 下调组较正常对照组、阴性对照组降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 各组 NK 细胞对 A549 细胞的杀伤活性比较

正常对照组、阴性对照组、ADAM17 下调组 NK 细胞对 A549 细胞的杀伤活性分别为 $(30.52 \pm 2.85)\%$ 、 $(32.07 \pm 2.99)\%$ 、 $(46.88 \pm 3.31)\%$, 经方差

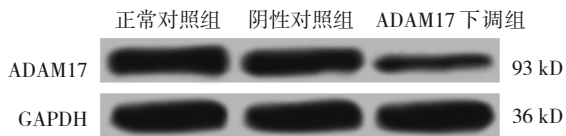


图1 各组A549细胞中ADAM17蛋白表达

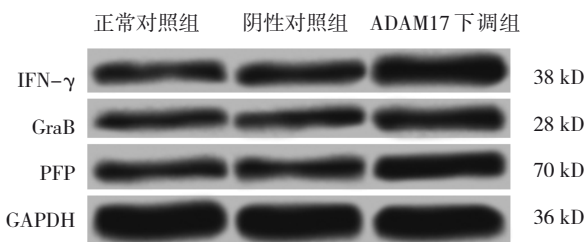
分析, 差异有统计学意义 ($F=52.399, P=0.000$), 正常对照组与阴性对照组NK细胞对A549细胞的杀伤活性比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), ADAM17下调组较正常对照组、阴性对照组升高 ($P<0.05$)。

2.4 各组细胞中IFN- γ 、GraB、PFP蛋白相对表达量比较

各组细胞中IFN- γ 、GraB、PFP蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 正常对照组与阴性对照组细胞中IFN- γ 、GraB、PFP蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), ADAM17下调组较正常对照组、阴性对照组升高 ($P<0.05$)。见表1和图2。

表1 各组细胞中IFN- γ 、GraB、PFP蛋白相对表达量比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	IFN- γ	GraB	PFP
正常对照组	0.31 ± 0.09	0.30 ± 0.06	0.36 ± 0.09
阴性对照组	0.36 ± 0.08	0.28 ± 0.06	0.37 ± 0.08
ADAM17下调组	0.88 ± 0.12	0.74 ± 0.10	0.80 ± 0.14
F值	62.055	70.744	33.308
P值	0.000	0.000	0.000

图2 各组细胞中IFN- γ 、GraB、PFP蛋白表达

3 讨论

NSCLC是最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率、病死率在全球范围内均居恶性肿瘤首位, 严重影响患者的生命健康^[11]。NSCLC发病隐匿, 多数患者确诊时已处于癌症中晚期, 只能尽量延长其生存时间^[12]。目前, 手术切除已非最佳治疗方式, 而化

学治疗在杀伤肿瘤细胞的同时也在杀死健康细胞, 严重的毒性反应会导致患者免疫功能降低, 严重影响患者的生存质量^[13]。因此, 寻找一种疗效较好、不良反应少的方法对提高NSCLC患者生存率、延长生存期、改善生活质量具有重要意义。

肿瘤存在免疫监视、免疫逃逸等机制, 使肿瘤细胞在机体中避开免疫系统的清除, 隐匿地发生、发展。而免疫治疗是一种通过重新激活抵抗癌症的免疫系统, 以达到治疗的目的^[14]。NK细胞是具有直接杀伤功能的天然免疫效应细胞, 通过识别细胞固有表达受体, 无需致敏即可特异性识别病变细胞, 发挥快速杀伤病变细胞的功能^[15]。由于NK细胞具有异体细胞回输、体内存活周期短、无细胞因子风暴、不可预期风险低等优势, 其在肿瘤免疫治疗中具有巨大的应用潜力^[16]。增强NK细胞对肿瘤细胞的杀伤作用是免疫治疗的主要手段之一, YAO等^[5]研究表明, 罗格列酰胺是癌症免疫疗法中有希望的治疗候选药物, 可以通过阻止对NK细胞介导的杀伤的自噬免疫抵抗发挥作用。

ADAM17是一种膜结合蛋白酶, 通过对一些与细胞膜结合的细胞因子、配体的膜外功能区进行剪切, 使这些细胞因子、配体被活化而调控下游信号转导途径, 从而影响肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移^[17]。TSUKERMAN等^[18]研究表明, ADAM17缺陷患者的NK细胞杀伤力增加。MISHRA等^[19]研究表明, 抗ADAM17单克隆抗体MEDI3622与肿瘤细胞结合后, 能增强NK细胞与肿瘤细胞结合, 进而增强人NK细胞的IFN γ 的释放。本研究结果显示, ADAM17下调组ADAM17 mRNA及蛋白相对表达量较正常对照组、阴性对照组降低, 同时NK细胞对A549细胞的杀伤活性较正常对照组、阴性对照组升高, 提示下调A549细胞中ADAM17表达水平可能有助于NK细胞识别, 并结合A549细胞发挥杀伤作用。有研究发现, NK细胞中含有大量GraB、PFP蛋白, 活化后的NK细胞不仅产生IFN- γ , 还会释放GraB、PFP蛋白, 在天然免疫及杀死靶细胞过程发挥重要作用^[20]。本研究发现, 成功下调A549细胞中ADAM17表达水平后, 细胞IFN- γ 、GraB、PFP蛋白相对表达量均升高, 推测下调A549细胞ADAM17表达水平后, 增强了NK细胞对A549细胞的识别, 导致NK细胞活化释放IFN- γ 、GraB、

PFP增多,增强NK细胞对A549细胞的杀伤作用。

综上所述,NSCLC A549细胞株中ADAM17下调可以增强NK细胞的杀伤作用,抑制肿瘤免疫逃逸,这可能为NSCLC免疫治疗提供新靶点。

参 考 文 献 :

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] 李伟,刘文斌,刘海丹.白藜芦醇靶向EGFR和c-Met信号通路抑制非小细胞肺癌细胞增殖的机制[J].肿瘤防治研究,2017,44(1): 11-16.
- [3] 王丽萍.肺癌免疫治疗现状及展望[J].中华实用诊断与治疗杂志,2017,31(2): 105-110.
- [4] 尚聪聪,张力.非小细胞肺癌免疫治疗进展[J].中国肿瘤临床,2018,45(4): 205-208.
- [5] YAO C, NI Z Y, GONG C Y, et al. Rocaglamide enhances NK cell-mediated killing of non-small cell lung cancer cells by inhibiting autophagy[J]. Autophagy, 2018, 14(10): 1831-1844.
- [6] CHA H F, QIN W J, YANG Q, et al. Differential pulmonic NK and NKT cell responses in schistosoma japonicum-infected mice[J]. Parasitol Res, 2017, 116(2): 559-567.
- [7] FANG F, XIAO W H, TIAN Z G. NK cell-based immunotherapy for cancer[J]. Semin Immunol, 2017, 31(1): 37-54.
- [8] 曹君,凌志强,葛明华.ADAM17在肿瘤转移中的作用及相关分子机制[J].国际肿瘤学杂志,2014,41(10): 721-724.
- [9] 王卿,闫凯.非小细胞肺癌组织中ADAM17的表达变化及意义[J].山东医药,2016,56(6): 48-49.
- [10] KRASNOVA Y, PUTZ E M, SMYTH M J, et al. Bench to bedside: NK cells and control of metastasis[J]. Clin Immunol, 2017, 177(1): 50-59.
- [11] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [12] 陈蕊,赵达,王丽娜.非小细胞肺癌EGFR-TKI耐药机制及治疗策略[J].肿瘤防治研究,2017,44(3): 225-230.
- [13] 类成海,颜慧.胸腺法新联合化疗对中晚期NSCLC伴胸腔积液患者免疫功能及生存质量的影响[J].现代中西医结合杂志,2018,27(6): 621-623.
- [14] LIU X X, WANG B L, LI Y Y, et al. Powerful anticolon tumor effect of targeted gene immunotherapy using folate-modified nanoparticle delivery of CCL19 to activate the immune system[J]. ACS Cent Sci, 2019, 5(2): 277-289.
- [15] MARTINET L, SMYTH M J. Balancing natural killer cell activation through paired receptors[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(4): 243-254.
- [16] 方芳,肖卫华,田志刚.NK细胞肿瘤免疫治疗技术的挑战[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2018,25(1): 1-8.
- [17] SHEN H Y, LI L P, ZHOU S Y, et al. The role of ADAM17 in tumorigenesis and progression of breast cancer[J]. Tumor Biol, 2016, 37(12): 1-12.
- [18] TSUKERMAN P, EISENSTEIN E M, CHAVKIN M, et al. Cytokine secretion and NK cell activity in human ADAM17 deficiency[J]. Oncotarget, 2015, 6(42): 44151-44160.
- [19] MISHRA H K, PORE N, MICHELOTTI E F, et al. Anti-ADAM17 monoclonal antibody medi3622 increases IFN γ production by human NK cells in the presence of antibody-bound tumor cells[J]. Cancer Immunol Immunother, 2018, 67(9): 1407-1416.
- [20] 许琳,王营,陈复兴,等.汉黄芩素对人NK细胞杀伤胃癌MKN45细胞的影响及其机制研究[J].免疫学杂志,2014,30(9): 804-808.

(李科 编辑)

本文引用格式: 罗小宁,刘洁文,张羽,等. ADAM17下调影响NK细胞对非小细胞肺癌杀伤作用的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(2): 38-42.

Cite this article as: LUO X N, LIU J W, ZHANG Y, et al. Effect of the down-regulation of ADAM17 on the killing effect of NK cells in non-small cell lung cancer[J]. China Journal of Modern Medicine, 2022, 32(2): 38-42.