

可溶性 MICA 在胆管癌患者外周血中表达及其临床意义

龚伟智 段小辉[△] 陈 晨 廖春红 刘初平

(湖南省人民医院 肝胆外科 湖南 长沙 410005)

摘要 目的 探讨可溶性 MICA(sMICA)在胆管癌患者外周血中的表达及其临床意义。方法 应用酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测 42 例胆管癌患者的外周血 sMICA 的表达水平,分析其与临床病理特征的关系。结果 胆管癌患者血清 sMICA 水平显著高于正常对照组($P<0.01$) 胆管癌患者血清中 sMICA 的表达水平与血清中 CA19-9 水平、肿瘤浸润及淋巴结转移等临床病理特征密切相关($P<0.05$) 手术后胆管癌患者血清中 sMICA 水平明显下降。结论 胆管癌患者血清中 sMICA 水平明显增高,血清 sMICA 可作为胆管癌诊断的一种重要的指标。

关键词 胆管癌;可溶性 MICA;临床病理

中图分类号:R735.8 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)14-2699-03

Expression of Serum Soluble MICA Protein in Patients with Cholangiocarcinoma and Its Significance

GONG Wei-zhi, DUAN Xiao-hui[△], CHEN Chen, LIAO Chun-hong, LIU Chu-ping

(Department of Hepatobiliary Surgery, Hunan Provincial People's Hospital Changsha 410005, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of serum soluble MICA protein in peripheral blood in the patients with cholangiocarcinoma and its clinical significance. **Methods:** Samples of 42 cholangiocarcinoma patients and 40 healthy persons were collected to detect Serum levels of sMICA by MICA-specific enzyme-linked immunosorbent assay. The association of serum sMICA levels with clinical features were statistically analyzed. **Results:** The serum levels of sMICA was found to be significantly elevated in the patients with cholangiocarcinoma compared with healthy subjects ($P<0.01$). The levels of sMICA correlated significantly with CA19-9 level, tumor infiltration and lymph node metastasis (all $P<0.05$). The successful tumor resection significantly decreased serum levels of soluble MICA. **Conclusion:** Serum MICA levels of patients with cholangiocarcinoma are significantly increased, it is one of the important parameters for clinical evaluation in patients with cholangiocarcinoma.

Key words: Cholangiocarcinoma; Soluble MICA; Clinical Pathology

Chinese Library Classification: R735.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)14-2699-03

前言

近年来人类 MHC-Ⅱ类分子链相关基因 A 蛋白(MICA)越来越受关注。肿瘤细胞表面 MICA 蛋白脱落形成可溶性 MICA (sMICA)不仅下调 NK 细胞上 NKG2D 受体的表达,而且下调其细胞毒性,对 NK 细胞抗肿瘤起阻碍作用,可能是肿瘤免疫逃逸的一种新的机制^[1]。所以,对肿瘤患者血清中 sMICA 测定有助于对肿瘤的诊断。本研究通过检测胆管癌患者血清中 sMICA 含量的变化,探讨血清 sMICA 与胆管癌的关系,评价其对胆管癌的临床诊断价值,为诊断胆管癌提供依据。

1 材料和方法

1.1 分组及一般资料

1.1.1 胆管癌组 42 例,为湖南省人民医院肝胆外科 2010 年 1 月~2010 年 10 月手术切除并经病理证实为胆管细胞癌患者,术前均未进行放化疗和免疫治疗,其中男 20 例,女 22 例,年龄 36-78 岁,中位年龄 55 岁;所有患者中肝内胆管癌 15 例,肝外胆管癌 27 例,病理类型高分化腺癌 14 例,中分化腺癌 11 例,低分化腺癌 17 例,存在肿瘤周围浸润 26 例,有淋巴结转移 25 例,28 例 CA19-9 升高,其中 19 例大于 300 KU/L。

1.1.2 健康对照组 40 例,男 23 例,女 17 例,年龄 26-70 岁,中位年龄 49 岁,为健康志愿者或体检者。

1.2 实验方法

1.2.1 标本的制备 胆管癌组患者在手术前清晨、健康对照组在检测当日凌晨空腹抽血,胆管癌患者于术后 2 周再次抽血,促凝管取 2~3 mL 外周血,促凝管所采血液夜待血液凝固后以 3000 r/min×15 min 离心,取血清于 1.5 mL 的冻存管中,-80℃ 保存备用。

1.2.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 sMICA 的水平 采用双抗体夹心 ELISA 测定患者及健康对照组血清 sMICA 水平。试剂盒由武汉中美科技公司提供,实验步骤按试剂盒说明书进行。

作者简介 龚伟智(1976-)男,本科,主治医师,主要研究方向:肝胆胰肿瘤基础与临床研究。电话:13974801267,

E-mail:gwzlg110@yahoo.com

△通讯作者 段小辉,电话:13574830242,

E-mail:dlmdxh0306@126.com

(收稿日期 2011-01-05 接受日期 2011-01-28)

1.2.3 化学发光法检测血清 CA19-9 的水平 采用电化学发光免疫分析法。仪器为罗氏 Modular E170 全自动电化学发光免疫分析仪,试剂盒为罗氏公司提供。

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 17.0 软件进行分析。sMICA 水平以中位数与最大值和最小值表示,变量间比较采用 Mann-Whitney U 检验或 Kruskal-Wallis H 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 sMICA 水平

42 例胆管癌患者血清 sMICA 水平中位值为 205.0 pg/ml (79.9 pg/ml~526.0 pg/ml),40 例健康对照组 sMICA 水平中位

值为 65.5 pg/ml(29.7pg/ml~105.1 pg/ml),差异有统计学意义(U=39.500,P<0.01)。

2.2 胆管癌患者血清 sMICA 水平与临床病理特征的关系

胆管癌患者血清 sMICA 水平与患者年龄(P=0.253)、性别(P=0.406)、肿瘤分化程度(P=0.411)等无明显相关。但与患者血清 CA19-9 水平(P=0.029),肿瘤浸润(P=0.016)及是否淋巴结转移(P=0.037)密切相关,详见表 1。

2.3 手术切除对胆管癌患者血清 sMICA 水平的影响

42 例胆管癌患者手术后血清 sMICA 水平中位值为 126.3 pg/ml(48.9 pg/ml~370.6 pg/ml),明显低于手术前,两者差异有显著意义(U=529.000,P<0.01)。

表 1 血清 sMICA 水平与胆管癌临床病理特征关系
Table 1 Relationship between sMICA and clinical features

Parameters	Number	sMICA values(pg/ml)	P value
Age(years)			
≤ 60	18	240.6(79.9~526.0)	0.253
>60	24	177.4(80.4~395.2)	
Gender			0.406
Male	20	190.2(79.9~498.0)	
Female	22	260.7(80.4~526.0)	
Histological grade			0.411*
Well	14	173.1(79.9~315.7)	
Moderately	11	192.9(98.5~368.2)	
Poorly	17	219.3(81.8~526.0)	
CA19-9(ng/ml)			0.029
≤ 300	23	160.2(79.9~404.6)	
>300	19	245.5(132.0~526.0)	
Tumor infiltration			0.016
Absent	16	159.0(79.9~395.2)	
Present	26	253.1(100.0~526.0)	
Lymph node metastasis			0.037
Absent	17	153.8(79.9~452.7)	
Present	25	257.3(80.4~526.0)	

Note: *Kruskal-Wallis test

3 讨论

NK 细胞是天然免疫的主要效应细胞,在控制肿瘤的发生、发展中起主要作用,其表面存在识别肿瘤细胞表面分子的活化和抑制性受体,杀瘤功能取决于活化与抑制信号的综合。NK 细胞对靶细胞的识别无 MHC 限制性,可以在无预先致敏的情况下杀伤肿瘤细胞,是机体抗肿瘤免疫的第一道天然防线^[2]。NKG2D 是 NK 细胞表面一个重要的激活性受体。研究表明,NKG2D 的单独活化即足以刺激 NK 细胞的活化,并能克服抑制性受体的强势信号^[3]。MHC-I 类链相关分子 A (MHC class I chain-related A,MICA)为 NKG2D 最主要配体之一。MICA 是含有 383 个氨基酸、分子量为 46KD 的一种高度糖基化的由

MHC 基因编码的跨膜糖蛋白,尽管具有与 MHC-I 类分子重链相似的结构,但它不与β2 微球蛋白相连,缺少 CD8 结合区,且不行使抗原递呈功能^[4]。MICA 分子组织分布局限,主要表达在胸腺和胃肠上皮组织,应激、病毒或细菌感染可上调其表达^[5]。近年来发现 MICA 在许多上皮及非上皮来源的肿瘤细胞,如乳腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、肝细胞癌以及黑色素瘤均有表达或上调^[6-11]。

机体内 MICA 以膜型和可溶型两种形式存在,膜型 MICA 与 NKG2D 相互作用可有效地激活 NK 细胞的杀瘤作用,在肿瘤免疫监视中起着非常重要的作用,它通过与 NKG2D 结合可以直接活化 NK 细胞、提高 NK 细胞对靶细胞的杀伤活性,被认为是一种肿瘤相关性抗原^[12]。然而,肿瘤细胞表达 MICA 却

继续发展意味着肿瘤在进展过程中获得了逃避免疫系统攻击的能力。研究证实肿瘤在进展过程中会形成可溶性 MICA (soluble MHC class I chain-related A β MICA), 形成的 sMICA 可以诱导免疫细胞表面 NKG2D 的内化和降解, 从而下调 NKG2D 的表达, 影响免疫细胞通过 MICA-NKG2D 途径杀伤肿瘤细胞, 发生肿瘤免疫逃逸, 这可能是肿瘤免疫逃逸的一种新的机制^[13]。本研究结果显示胆管癌患者血清中 sMICA 水平明显升高, 提示在胆管癌患者存在肿瘤免疫逃逸。

可溶性 MICA 形成的原因可能是因为肿瘤细胞膜过表达 MICA 而自发性释放入血清, 或肿瘤细胞死亡后膜上的 MICA 溶解于血清中等等。但到目前为止, 导致肿瘤细胞表面膜型 MICA 分子脱落到血清中的具体机制以及启动和调节 MICA 脱落的具体信号通路目前仍不清楚。Salih^[14]等用基质金属蛋白酶抑制剂抑制金属蛋白酶后, 发现细胞表面表达明显升高, 而脱落受到抑制。最近研究发现肿瘤细胞表面的 MICA 的作用与影响细胞内新合成蛋白折叠、与二硫化物异构酶类似的内质网蛋白 5 (ERp5) 相关。用药理学方法抑制硫氧还原酶的活性或 ERp5 基因沉默的研究结果表明, 细胞表面 ERp5 参与肿瘤细胞水解释放 MICA 的过程。ERp5 与细胞膜上锚定的 MICA 短时间组成复合物, 在细胞膜附近进行蛋白水解剪切后, 释放可溶性 MICA。在此过程中, MICA 与细胞膜邻近的 $\alpha 3$ 结构域发生构象变化, 从而促使了蛋白的水解和剪切^[15]。D. Robert Siemens 等在前列腺癌研究中发现低氧促进 MICA 的脱落, 而 NO-cGMP 信号通路的激活可逆转 MICA 的脱落, 低氧是通过抑制 NO-cGMP 信号通路参与 MICA 的脱落^[16]。从基因角度分析, β MICA 与 MICA 基因跨膜区微卫星 (GCT) 的多态性有关, 根据其跨膜区微卫星 (GCT) 的重复数目发现了多个等位基因, 分别命名为 A4, A5, A5.1, A6, A9, A6v 和 A10, A5.1 是由 5 个 GCT 重复顺序再加上 1 个额外核苷酸插入成的序列 (GGCT), 导致框移突变, 在跨膜区产生提前出现的终止密码子, 编码的即为 sMICA 分子^[17-18]。

本研究结果同时显示, 胆管癌患者血清中 sMICA 水平与年龄、性别及肿瘤分化程度无关 ($P>0.05$)。而与血清 CA19-9 水平、淋巴结转移及肿瘤浸润密切相关 ($P<0.05$)。这提示, 血清 sMICA 的含量与肿瘤恶性程度关系密切, 肿瘤分期愈晚, 恶性程度愈高, 从瘤细胞表面释放的 sMICA 分子愈多, 进一步证实 sMICA 参与了肿瘤免疫逃逸。与术前比较, 术后血清 sMICA 值明显下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 提示血清 sMICA 与肿瘤的存在密切相关。下调血清 sMICA 水平可能有助于改善 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤功能, 肿瘤根治性切除不仅可以降低机体内肿瘤负荷, 也许还可以改善 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性, 增强患者自身免疫系统对肿瘤的免疫。

我们认为, 血清 sMICA 的含量可作为胆管癌的一个辅助诊断指标; 血清中 sMICA 水平的测定可能成为预测胆管癌患者免疫功能状态及肿瘤临床分期的指标之一。尽管术后患者血清中 sMICA 水平明显下降, 但其是否能判断手术治疗的效果, 预示肿瘤是否转移或复发, 尚待进一步研究。MICA 以可溶性的方式从细胞膜上脱落可能是导致胆管癌细胞发生免疫逃逸的原因之一。进一步深入研究影响胆管癌细胞 MICA 脱落的因素和 sMICA 水平与胆管癌治疗效果的相关性, 逆转胆管癌的免疫逃逸状态, 可能为研究胆管癌新的生物治疗方法及药物提

供新的思路。

参考文献 (References)

- [1] González S, Groh V, Spies T. Immunobiology of Human NKG2D and Its Ligands[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 298: 121-138
- [2] Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, et al. Soluble MICA in malignant diseases[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(3): 684-687
- [3] Stastny P. Introduction: MICA/MICB in innate immunity, adaptive immunity, autoimmunity, cancer, and in the immune response to transplants[J]. *Hum Immunol*, 2006, 67(3): 141-144
- [4] Vetter CS, Groh V, Straten P, et al. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma [J]. *J. Invest. Dermatol*, 2002, 118: 600-605
- [5] Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, et al. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid[J]. *Int. J. Cancer*, 2003, 104: 354-361
- [6] Groh V, Wu J, Yee C, et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation[J]. *Nature*, 2002, 419: 734-738
- [7] Watson NF. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(6): 1445-1452
- [8] Madjd Z, Spendlove I, Moss R, et al. Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma [J]. *Cancer Immun*, 2007, 7(6): 17-19
- [9] Clayton A, Tabi Z. Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2005, 34(3): 206-213
- [10] Fuertes MB, Girart MV, Molinero LL, et al. Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity[J]. *J Immunol*, 2008, 180(7): 4606-4014
- [11] Groh V, Rhinehart R, Secrist H, et al. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, 96: 6879-6884
- [12] Vivier E, Tomasello E, Paul P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition ? [J]. *Curr Opin Immunol.*, 2002, 14(3): 306-311
- [13] Wu JD, Higgins LM, Steinle A, et al. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114: 560-568
- [14] Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding [J]. *J Immunol*, 2002, 169(8): 4098-4102
- [15] Kaiser BK, Yim D, Chow IT, et al. Disulphideisomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands[J]. *Nature*, 2007, 447: 482-486
- [16] D. Robert Siemens. Hypoxia Increases Tumor Cell Shedding of MHC Class I Chain-Related Molecule: Role of Nitric Oxide[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(12): 4746-4753
- [17] Gasser S, Orsulic S, Brown EJ. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor [J]. *Nature*, 2005, 436(7054): 1186-1190
- [18] Duan X, Deng L, Chen X, et al. Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer [J]. *Med Oncol*, 2010 Mar 31. [Epub ahead of print]