论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0794-03

自然杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因与白血病的关联性研究

刘 佳[1],王全立[1],刘广贤[2],孙雪冬[2],谭 燕[2] (解放军第307医院:[1]输血科,[2]血液科,北京 100071)

摘 要:目的 分析自然杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptor,KIR)基因与白血病的关联性。**方法** 采用序列特异性引物PCR法(PCR-SSP)对46例白血病患者和46例健康人行KIR基因低分辨率检测,统计不同KIR基因在2种人群中的表现频率,并进行比较。**结果** 健康人群和白血病患者中,2DL4、3DL2、3DL3、2DP1基因的表现频率均为100%,存在于所有个体,除2DL2与2DS2以外其余的KIR基因表现频率都相似;健康人群2DL2与2DS2的表现频率均为47.8%,白血病患者2DL2与2DS2的表现频率均为89.1%,明显高于健康人群($P<0.01$),其余基因表现频率无显著性差异。**结论** 2DL2、2DS2基因频率升高可能与白血病发生相关。

关键词: 杀伤细胞免疫球蛋白样受体;白血病;基因频率

中图法分类号: R392-33; R392.13; R733.7 **文献标识码:** A

Association of killer immunoglobulin-like receptors with leukemia

LIU Jia[1], WANG Quan-li[1], LIU Guang-xian[2], SUN Xue-dong[2], TAN Yan[2] ([1]Department of Blood Transfusion, [2]Department of Hematology, No. 307 Hospital of PLA, Beijing 100071, China)

Abstract: Objective To study the correlation between the genes of killer immunoglobulin (Ig)-like receptors (KIR) in natural killer cells and leukemia. Methods Primers of 16 KIR genes, including KIR2DL1-5, KIR3DL1-3, KIR2DS1-5, KIR3DS1 and 2 pseudogenes 2DP1 and 3DP1, were designed and synthesized. A polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) was developed to detect the mRNA expressions of the 16 genes. Totally 46 healthy individuals and 46 leukemic patients (15 cases of acute myelocytic leukemia, 13 cases of chronic myelocytic leukemia and 18 cases of acute lymphocytic leukemia) were detected and the frequencies of the KIR genes were analyzed. Results The frequency of 2DL4, 3DL2, 3DL3 and 2DP1 in healthy and leukemic patients were 100%, and were detected in all patients and healthy individuals. The other KIR genes had similar frequencies except those of 2DL2 and 2DS2, which were 47.8% of the healthy individuals and 89.1% in leukemic patients. There was a significant difference between the 2 groups. Conclusion There may be an association between pathogenesis of leukemia and 2DL2 and 2DS2 genes.

Key words: killer immunoglobulin-like receptor; leukemia; gene frequency

杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptor,KIR)是主要表达于人类NK细胞和部分活化T细胞表面的免疫球蛋白样超家族受体,分为抑制型和活化型,能够特异性识别并结合靶细胞表面的HLA-Ⅰ类分子,传导抑制或激活信号,从而调节活性细胞的杀伤功能,在抗感染、抗肿瘤、清除老化变异细胞、妊娠耐受、造血干细胞移植和自身免疫疾病方面有着重要的意义[1,2]。研究发现,当表达能识别相应MHC-I类等位基因的特异KIR的NK细胞与缺乏此类等位基因的靶细胞(如白血病细胞)相互作用时,NK细胞将改变抑制状态并杀伤靶细胞,被称为"丢失自我"(missing-self)识别[3],所以,NK细胞表面KIR的类型、表达量及与HLA-Ⅰ类分子的组合也是决定NK细胞对靶细胞识别和杀伤的重要因素。因此,我们设想KIR基因在白血病患者中的表现频率与免疫逃逸可能存在一定的关系。我们设计并合成了16个KIR基因,包括抑制性基因KIR2DL1-5、KIR3DL1-3,激活性KIR基因KIR2DS1-5、KIR3DS1及2个假基因2DP1和3DP1的特异性引物,建立了PCR-SSP方法,

基金项目:国家自然科学基金(30672387,30772457)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30672387, 30772457)

作者简介:刘 佳,女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤免疫方面的研究。E-mail:wabblj2006@gmail.com

通信作者:王全立,电话:(010)66947206,E-mail:wangql77@yahoo.com.cn
刘广贤,电话:(010)66948216

收稿日期:2008-11-26;修回日期:2008-12-22

用于分析 KIR 基因多态性,并对 46 例白血病患者和 46 例健康人进行了 KIR 基因检测并对它们的表现频率进行对比分析,从而探讨 KIR 基因与白血病的关系。

1　材料与方法

1.1　样本来源

白血病组:从我院 2007 年 6 月至 2008 年 6 月收治的白血病患者中随机选择 46 例,其中男性 27 例,女性 19 例,年龄 10 ~46 岁,平均 28 岁;急性髓性白血病(AML)15 例,慢性髓性白血病(CML)13 例,急性淋巴细胞白血病(ALL)18 例。健康对照组:从我院 2008 年 2 -4 月全军采供血中心无偿献血者中选择 46 例,征得其同意后,抽取全血 2 ~3 ml,采用 EDTA 抗凝。

1.2　DNA 提取

采用 DNA 提取试剂盒(北京天根公司)抽提,严格按照说明书操作。样本光密度 $D(260)/D(280)$ 比值为 1.8 ~1.9。

1.3　引物

参考文献[4 -6]的合成方案,合成 KIR2DL1 ~5、KIR3DL1 ~3、KIR2DS1 ~5、KIR3DS1、KIR2DP1 和 KIR3DP1 共 16 对引物(表 1),所有引物均由北京三博公司合成,均经过 BLAST 验证。PCR 扩增产物都由三博公司测序,实际扩增产物与设计产物相符。每条引物的终浓度为 10 μmol/L。

1.4　PCR/SSP 法

用 PCR/SSP 法进行基因位点低分辨率检测分析,PCR 反应体系包括 DNA 模板 100 ng,10 μl PCR 缓冲液,dNTP 0.1 mmol/L,DNA 聚合酶 1U,$MgCl_2$ 15 mmol/L,上下游引物各 10 μmol/L,加 ddH_2O 至 25 μl,相关试剂购自北京天根公司,用 PCR 扩增仪(eppendorf)扩增,程序如下:95 ℃预变性 5 min;95℃变性 30 s、退火 30 s(各引物退火温度见表 1)、72 ℃延伸 1 min、循环 35 次;72 ℃延伸 4 min。因 KIR2DL4、3DL2、3DL3 表现频率都为 100%,所以用作内参对照。2DL3、2DS2、2DS4、2DS5 用 KIR2DL4 作为内参对照,其余用 KIR3DL2 作为内参对照。同时,每次实验设置阴性对照。扩增产物用 1.5% 琼酯糖凝胶 12 mV/cm 电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察、拍照。

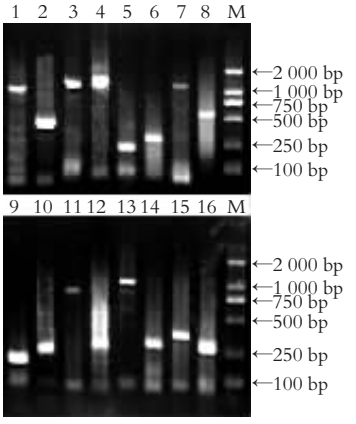
1.5　基因频率的计算及统计学分析

KIR 基因的表现频率(q)通过计数测得;KIR 基因频率(gene frequency,p;即某种基因在某个种群中出现的比例)的计算公式:$p = 1 - (1 - q)1/2$[4]。两样本率的比较用 SPSS 10.0 统计软件行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　KIR 扩增结果

如图 1 所示,通过 PCR-SSP 方法能有效地检测出预期的 16 个 KIR 基因,PCR 扩增产物电泳条带均清晰、特异,符合设计引物的扩增片段长度。



1:2DS1;2:2DS2;3:2DS3;4:2DS4;5:2DS5;6:3DS1;7:2DP1;8:3DP1;9:2DL1;10:2DL2;11:2DL3;12:2DL4;13:2DL5;14:3DL1;15:3DL2;16:3DL3;M:DNA 标准(DL 2000)

图 1　KIR 扩增产物电泳图

2.2　白血病组与健康对照组 KIR 基因频率比较

白血病组与健康对照组比较,KIR2DL4、3DL2、3DL3 基因在两类人群中的表现频率均为 100%,其余基因在两类人群中的表现频率都不相同,其中 2DL2 和 2DS2 在白血病组和健康对照组均存在显著性差异($P < 0.01$),其余基因表现频率在两组间无显著性差异($P > 0.05$,表 2)。

表 1　不同 KIR 基因引物序列

基因	正义链 5′→3′	反义链 5′→3′	产物大小(bp)	退火温度(℃)
2DL1	GTTGGTCAGATGTCATGTTTGAACAC	AGGTCCCTGCCAGGTCTTGCG	145	63
2DL2	TCAAGACAATGGGCGTCACATACAA	TAGAGCTTGGTTCAGTGGGTGAAGG	213	63
2DL3	TCTCCTTCATCGCTGGTGCTG	TCAGGGCTCAGCATTTGGAAG	798	62
2DL4	CAGGACAAGCCCTTC TGCTG	CTGGGTGCCGACCACTCA	254	60
2DL5	CTTCTTCTTTCTCCTTCATTGCTGC	GAGAGAGGCATGTTCAGATTTGTGG	991	64
3DL1	CAAGACACCCCCTACAGATACCATC	CATTTGTAAGCAAGAGAGAGGCACC	254	63
3DL2	GGTGGTTCACGGTTGTAATCTTGG	AAGGGAAGGGTGGAAGGTAACAAA	329	64
3DL3	AACACGGAACTTCCA AATGCTGAGC	GCAGGCAGTGGGGACCTT AGACA	250	65
2DS1	AAGAGTGTCTCCCAGTCCCTACCAG	CTCTTTCTGTCTTTTCAAACTCCCG	992	63
2DS2	GACAGTGGGCGTCACATAAAAAAAT	AGGAAGTCTCAGCTCCATAAAATGA	430	62
2DS3	ATGAGTGGTGGTGGAAATGAAGGGAC	TCCAGGGCATTCTTGAGTCAAACAAC	1 011	65
2DS4	GTCAAACAGCCAGGAAATAGTGTTGA	AGTGACTGACAAGAAAATAAGGGAGG	1 191	61
2DS5	ACAGAGAGGGGACGTTTAACCAC	ACCTGTGATCACGATGTCCAGAG	191	61
3DS1	ACCTCGCTGTTCACTTCTGTTCCCTG	GTGGGAGATAGAATCAATGGAATGGG	259	65
2DP1	GCTTATTTTCATTCAGGCATCGG	GAATCATTTCCTTGACTTTTCCAGCC	1 075	63
3DP1	GAGGTTGAGGGCAGGAGAATCACTTG	AGTAGCTCCTGATTCCCTTGACGCTG	546	65

表2 白血病组和健康对照组KIR基因频率的比较($n=46$)

KIR基因	健康对照组			白血病组			P值
	例数	表现频率(%)	基因频率	例数	表现频率(%)	基因频率	
2DL1	38	82.6	0.58	38	82.6	0.58	1.000
2DL2	22	47.8	0.28	41	89.1[a]	0.67	0.001
2DL3	29	63.0	0.39	27	58.7	0.56	0.831
2DL4	46	100.0	1.00	46	100.0	1.00	1.000
2DL5	29	63.0	0.39	22	47.8	0.28	0.208
3DL1	42	91.3	0.71	40	87.0	0.64	0.739
3DL2	46	100.0	1.00	46	100.0	1.00	1.000
3DL3	46	100.0	1.00	46	100.0	1.00	1.000
2DS1	22	47.8	0.28	20	43.5	0.25	0.834
2DS2	22	47.8	0.28	41	89.1[a]	0.67	0.001
2DS3	19	41.3	0.23	14	30.4	0.17	0.385
2DS4	18	39.1	0.22	27	58.7	0.56	0.095
2DS5	14	30.4	0.17	15	32.6	0.18	1.000
3DS1	17	37.0	0.21	18	39.1	0.22	1.000
2DP1	46	100.0	1.00	46	100.0	1.00	1.000
3DP1	45	97.8	0.85	44	95.7	0.79	1.000

a: $P<0.01$, 与健康对照组比较

3 讨论

我们结合Uhrberg等[5-7]的引物,通过修改和完善,建立了PCR-SSP方法,并有效地检测出预期的8个抑制性KIR基因KIR2DL1-5、KIR3DL1-3和6个激活性KIR基因KIR2DS1-5,KIR3DS1及2个假基因2DP1和3DP1KIR基因。16个KIR基因在人群中的表现频率不同,KIR2DL4、3DL2、3DL3的基因表现频率为100%,表现频率较高的有KIR3DL1、2DP1、3DP1,都在90%以上,KIR2DL2、2DS1、2DS2、2DS3、2DS4、2DS5、3DS1的表现频率都较低,在50%以下。虽然本研究采用引物与其他报道有所不同,但这16个KIR基因的表现频率与国内报道的汉族人群的KIR基因表现频率是相似的。

研究表明,KIR基因型具有丰富的多态性,而且不同种族的KIR基因分型及表现频率也不同,由于KIR受体在NK等细胞活化中的重要作用,其多态性及与HLA-Ⅰ类分子的配对组合、表达量等差异都将影响NK细胞的活性,也因此可能产生各种生理及病理方面的影响。本研究结果显示白血病组和健康对照组之间、个体之间KIR基因组合及基因表现频率都是不同的,验证了KIR基因型存在的多态性及功能上的多样性。自然杀伤细胞在识别和清除表达异常的MHC-Ⅰ类分子的靶细胞时具有异质,它的分子学基础就是KIR基因具有多基因性和等位基因多态性[8]。

在各种KIR相关因素中,KIR的基因型是决定KIR功能状态的主要因素,对NK细胞及部分T细胞的功能的影响较大。研究表明KIR基因型及表现频率与多种疾病相关。van-der-Slik等[9]研究表明,激活型KIR2DS2基因和其HLA配体结合在糖尿病患者中出现的频率较高,而抑制型KIR与HLA配体结合缺乏,与1型糖尿病的危险性增高密切相关。Yen等[10]发现类风湿性关节炎并发血管炎患者的KIR2DS2表现频率显著高于健康人群。Martin等[11]发现KIR3DS1的表现频率增高有利于延缓AIDS的进展。Guerra等[12]发现肾细胞癌组织中,KIR2DL2、2DL3的表达水平显著性增高,可以抑制NK细胞及CTL细胞对肿瘤的杀伤。而本研究表明,白血病患者的KIR2DL2与KIR2DS2基因的表现频率显著高于健康人群,说明KIR基因分型与白血病可能存在关联性。

另有研究表明,白血病细胞可以低表达或不表达HLA-Ⅰ类分子,从而逃避T细胞的杀伤,但NK细胞却可以通过KIR发现HLA-Ⅰ类分子的低表达,阻断抑制信号,激活NK细胞的杀伤活性。但白血病细胞还是可能逃脱NK细胞的杀伤,其中的机制可能很复杂,KIR2DL2基因的表现频率显著增高,可能有助于抑制功能的优势,使KIR细胞无能。并且KIR2DL2与KIR2DS2的HLA-Ⅰ配体都是HLA-C1类分子,可以推断白血病细胞上HLA-C1类分子的表现频率也可能增高,但这还需要进一步的研究验证。

参考文献:

[1] Biassoni R. Natural killer cell receptors[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 640:35-52.

[2] Khakoo S I, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? [J]. Immunol Rev, 2006, 214(1):186-201.

[3] Lanier L L. NK cell recognition[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 225-274.

[4] 杜传书. 医学遗传学基础[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998:91-95.

[5] Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes[J]. Immunogenetics, 2002, 54(4): 221-229.

[6] Hsu K C, Liu X R, Selvakumar A, *et al*. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets [J]. J Immunol, 2002, 169(9): 5118-5129.

[7] 姜 侃,朱发明,章 伟,等. 人类杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因PCR-SSP分型方法的建立及其应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(12): 1044-1048.

[8] Slhilling H G, Guethlein L A, Cheng N W, *et al*. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype[J]. J Immunol, 2002, 168(5): 2307-2315.

[9] van-der-Slik A R, Koeleman B P, Verduijn W, *et al*. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects[J]. Diabetes, 2003, 52(10): 2639-2642.

[10] Yen J H, Moore B E, Nakajima T, *et al*. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis[J]. J Exp Med, 2001, 193(10): 1159-1167.

[11] Martin M P, Gao X, Lee J H, *et al*. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS[J]. Nat Genet, 2002, 31(4): 429-434.

[12] Guerra N, Guillard M, Angevin E, *et al*. Killer inhibitory receptor (CD158b) modulates the lytic activity of tumor-specific T lymphocytes infiltrating renal cell carcinomas[J]. Blood, 2000, 95(9): 2883-2889.

(编辑 汪勤俭)