实时荧光定量 PCR 检测人肿瘤细胞 NKG2D 配体基因表达 *

刘 枫[1] 郑冰蓉[1] 杨举伦[2] 王 力[2] 陈 玥[2] 赵稳兴[2△]

(1 云南大学生命科学学院 云南 昆明 650091;2 解放军昆明总医院病理科 云南昆明 650032)

摘要 目的：建立人肿瘤细胞 NKG2D 配体基因（MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3）表达的实时荧光定量 PCR（real-time fluorescence quantitative PCR）检测方法。方法 根据 NCBI 基因库中 NKG2D 配体基因序列，设计合成引物。用 Trizol 法从培养的肿瘤细胞（BEC-7402、HeLa、MDA-MB-435、XWLC-05）中提取总 RNA，逆转录成 cDNA，建立实时荧光定量 PCR 检测 NKG2D 配体基因表达的方法，并检测 NKG2D 配体在肿瘤细胞株中的表达。结果 经过琼脂糖凝胶电泳、熔解曲线和标准曲线分析，用所设计的引物和 SYBR Green I 能够特异扩增和定量检测 NKG2D 配体基因的表达。该方法成功检测 4 种肿瘤细胞 NKG2D 配体基因的表达。结论 建立了人 NKG2D 配体基因表达的实时荧光定量 PCR 检测方法，为进一步研究人 NKG2D 配体在肿瘤免疫中的作用提供了有效手段。

关键词：NKG2D 配体；实时荧光定量 PCR；肿瘤细胞

中图分类号：R392.11，R730.231 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273（2011）19-3621-04

Real-Time Fluorescence Quantitative PCR Assay for Human NKG2D Ligand mRNA Quantification*

LIU Feng[1], ZHENG Bing-rong[1], YANG Ju-lun[2], WANG Li[2], CHEN Yue[2], ZHAO Wen-xing[2△]

(1 College of Life Science, Yunnan University, 650091, Kunming,China;

2 Department of pathology , Kunming general hospital of PLA, 650032, Kunming, China)

ABSTRACT Objective: This study aimed to develop a real-time fluorescence quantitative PCR assay for NKG2D ligand mRNA in human. Methods: The primers for NKG2D ligands and keeping-home gene GAPDH were designed and synthesized according to the gene sequences from NCBI, The total RNA of tumor cells was extracted by Trizol protocol, and cDNA was synthesized by reverse transcriptase, then the real-time fluorescence quantitative PCR assay was established using SYBR Green I. Results: The method was efficient and sensitive for NKG2D ligand detection, which was assessed using standard curve, melting curve and gel electrophoresis analysis. Conclusion: We successfully detected the NKG2D ligand mRNA in tumer cell lines such as BEC-7402, HeLa, MDA-MB-435 and XWLC-05 by the method.

Key words: NKG2D ligand; Real-time fluorescence quantitative PCR; Tumor cell

Chinese Library Classification: R392.11, R730.231 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)19-3621-04

前言

NKG2D（natural killer group 2 member D）受体在人的所有 NK 细胞、大多数 NKT 细胞、巨噬细胞、γ δ +T 细胞及一些 CD8+T 细胞中均有表达[1]。NKG2D 能特异地与肿瘤细胞表面 NKG2D 配体结合而被活化，从而杀伤肿瘤，在肿瘤免疫监视方面发挥重要作用。最早发现的人 NKG2D 配体是 MHC I 类相关分子 MIC（MHC class I chain-related），其基因包括 7 个成员（MICA-MICG），其中 5 个是假基因，只有 MICA 和 MICB 是功能性基因[2]。另一类人 NKG2D 配体为 ULBPs（ULl6-binding protein），目前发现 ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、RAET1G 为功能性基因[3]。

近几年的研究表明，肿瘤细胞表达 NKG2D 配体，可增强其对 NK 细胞杀伤的敏感性[4]。国内对 NKG2D 配体 mRNA 的检测多为半定量 PCR 法，缺乏准确性。本研究利用 SYBR Green I 和内参基因 GAPDH 建立了一种检测人主要 NKG2D 配体，包括 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2 和 ULBP3 表达的实时荧光定量 PCR 方法，并比较了这些基因在肿瘤细胞系 BEC-7402、HeLa、MDA-MB-435 和 XWLC-05 中的表达情况。为进一步研究人 NKG2D 配体在肿瘤免疫中的作用提供了有效手段，为相关药物的开发提供了基础[5-6]。

1 材料与方法

1.1 细胞系与材料

人肿瘤细胞系 BEC-7402、HeLa、MDA-MB-435 和 XWLC-05 为本室保存细胞系。RPMI-1640 为 HyClone 公司产品，标准胎牛血清为 Gibcol 产品。Trizol、M-MLV 逆转录试剂盒和 Platinum? SYBR? Green qPCR SuperMix-UDG 购自 Invit-

* 基金项目：云南省自然科学基金（2010ZC186）

作者简介：刘枫，(1986-)，男，在读研究生，主要研究方向：疾病相关基因研究

△通讯作者：赵稳兴，E-mail：wenxing-zhao@sohu.com

收稿日期：2011-05-13 接受日期：2011-06-08）

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

rogen 公司。

1.2 引物设计与合成

从 NCBI 数据库查找 NKG2D 配体基因序列，用 Primer Premier 5 软件设计引物，所有目的基因的引物均跨内含子设计，以避免实时荧光定量 PCR 中由于基因组 DNA 的污染造成的假阳性。引物序列及扩增片段长度见表 1，引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

将肿瘤细胞系 BEC-7402、HeLa、MDA-MB-435 和 XWLC-05 培养至细胞处于对数生长期，采用 Trizol 法提取细胞总 RNA，进行琼脂糖凝胶电泳检测，用 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计检测 RNA 浓度，并用 0.1%的 DEPC 水标化到 1μg/μl。取 2μg 总 RNA，用 M-MLV 逆转录成 cDNA，用去离子水稀释 cDNA 产物，-20℃储存备用。

表 1 用于荧光定量 PCR 检测的引物序列和扩增产物大小

Tab 1 Primer sequences for real-time fluorescence quantitative PCR and products length

Gene		Sequences of primers	Products length
GAPDH	Forward	5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'	258bp
	Reverse	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	
MICA	Forward	5'-AGCGGGAATCACAGCACTCACC-3'	104bp
	Reverse	5'-TAGCAGCAGCCAGCAGCAACAG-3'	
MICB	Forward	5'-GCTGGTGCTTCAGAGTCAACG-3'	186bp
	Reverse	5'-GCATCCCTGTGGTCTCCTGTC-3'	
ULBP1	Forward	5'-GCTGGCAGATGAGGAGAGTTG-3'	126bp
	Reverse	5'-AAAGGCACAGTGGTGAGTAGACA-3'	
ULBP2	Forward	5'-AATGGGAGACTGTATAGGATGG-3'	153bp
	Reverse	5'-ATGATGAGGAGGCAGCAAAGG-3'	
ULBP3	Forward	5'-TGGCTTAGGGACTTCCTGATGC-3'	99bp
	Reverse	5'-GGTGGCTATGGCTTTGGGTTG-3'	

1.4 常规 PCR

以 cDNA 为模板，进行 PCR 反应，反应体系为：1.5μl 10× Buffer，1μl dNTPMix (2.5mM)，0.2μl Taq DNA 聚合酶 (5U/μl)，各 0.1μl 上下游引物 (10mM)，4μl cDNA (稀释 13 倍)，加 ddH_2O 到 15μl。反应条件为：95℃ 5 min；95℃ 30s，60℃ 30s，72℃ 30s，共 35 个循环；72℃ 5min。取 5μl PCR 产物，琼脂糖凝胶电泳鉴定其大小是否为目的基因片段。

1.5 制备标准曲线

相对定量分析采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法[7]，该方法的前提条件是目的基因和内参基因的扩增效率都接近 100%，且偏差在 5%以内。取稀释 3 倍的 XWLC-05 cDNA，然后按 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 浓度梯度稀释，制备 5 个浓度的 cDNA 模板。用所合成引物，建立 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法，于 ABI 7300 制备 NKG2D 配体 5 个基因的标准曲线。

1.6 肿瘤细胞 NKG2D 配体基因表达的检测

每个标本分别对 6 个基因进行检测，每个样品设 3 个重复。反应体系为 20μl，含 4μl cDNA (稀释 13 倍)，10μl Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG，0.4μl 10μM 上、下游引物，加去离子水到 20μl，混匀。反应条件：50℃ 2min；95℃ 2min；95℃ 15s，60℃ 30s，共 40 个循环；60℃-95℃绘制熔解曲线。

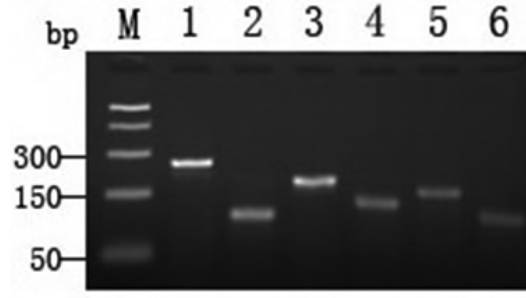
1.7 数据分析

由于目标基因和内参基因扩增效率相似且接近 100%，可利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算目标基因在 4 种细胞系中表达水平的相对差异。首先，用内参基因的 Ct 值均一目标基因的 Ct 值：$\triangle Ct = Ct_{,Target} - Ct_{,GAPDH}$。接着，选择 BEC-7402 为对照，用对照样本的△Ct 值均一其他细胞中各个基因的△Ct 值：$\triangle\triangle Ct = (Ct_{,Target} - Ct_{,GAPDH})_{HeLa、MDA-MB-435、XWLC-05} - (Ct_{,Target} - Ct_{,GAPDH})_{BEC-7402}$。计算表达水平比率：$2^{-\triangle\triangle Ct}$= 表达量的比值。得到的结果是通过内参基因校准的 HeLa、MDA-MB-435、XWLC-05 中目标基因表达水平相对于 BEC-7402 的增加或减少的倍数。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳检测

PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳，结果见图 1。如图可以看出，PCR 产物均为单一条带，分子量大小与所设计的目的基因片段大小一致，表明 PCR 检测 NKG2D 配体基因是特异的，所设计的引物可以用于荧光定量 PCR 检测。



注：M，New England Biolabs PCR Marker; 1，GAPDH; 2，MICA; 3，MICB; 4，ULBP1; 5，ULBP2; 6，ULBP3

图 1 PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 1 Gel electrophoregram of PCR products

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 目的基因和内参基因的扩增效率一致性分析

标准曲线的 R2 值显示实验数据的线性相关程度，用于衡量不同拷贝数的模板在同一温度下是否具有相同的扩增效率。用该实时荧光定量 PCR 扩增 10 倍梯度稀释模板的实验数据，分别作内参基因 GAPDH 及目的基因 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2 和 ULBP3 的标准曲线（图 2），它们的 R2 值均在 0.99 以上。因此，目的基因及内参基因的扩增效率一致，可采用 2-△△Ct 进行实验结果分析。

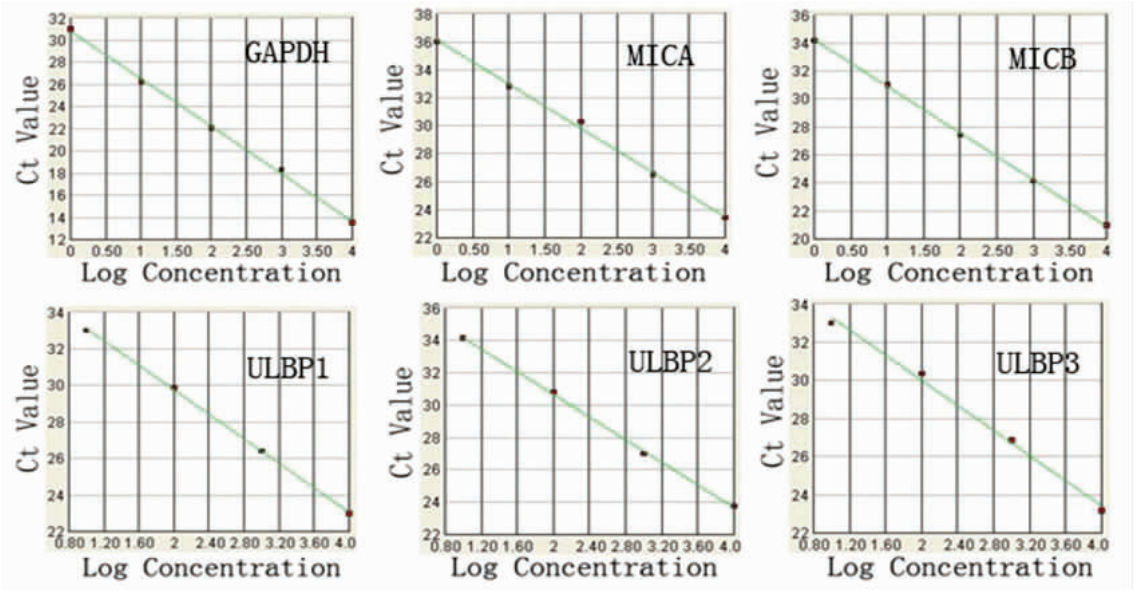


图 2 目的基因和内参基因的的标准曲线图

Fig. 2 Standard curves of target genes and reference gene

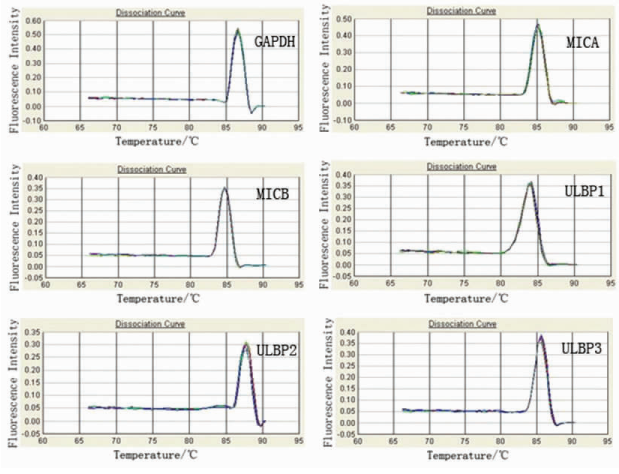


图 3 目的基因和内参基因的熔解曲线图

Fig. 3 Melting curve of target gene and reference gene

2.3 熔解曲线分析

实时荧光定量 PCR 产物的熔解曲线分析结果见图 3，GAPDH、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2 和 ULBP3 的溶解曲线均为单一峰，峰值分别为 86.5℃、85℃、84.8℃、84℃、87℃、85.5℃，表明定量 PCR 检测是特异的。

2.4 NKG2D 配体基因在肿瘤细胞中的表达

以 BEC-7402 为对照，根据 $2^{-\triangle\triangle}$Ct 法计算，分别得到目的基因在 HeLa、MDA-MB-435、XWLC-05 细胞与 BEC-7402 细胞中的相对表达情况（图 4）。结果显示，对于 MICA：BEC-7402 表达最高，其次是 XWLC-05，Hela 和 MDA-MB-435 较低；MICB：XWLC-05 表达最高，HeLa 表达最低，MDA-MB-435 是 BEC-7402 的 1.03 倍，二者表达水平相近；ULBP1：HeLa 表达水平最高，是 BEC-7402 的 5.12 倍，其次是 XWLC-05 和

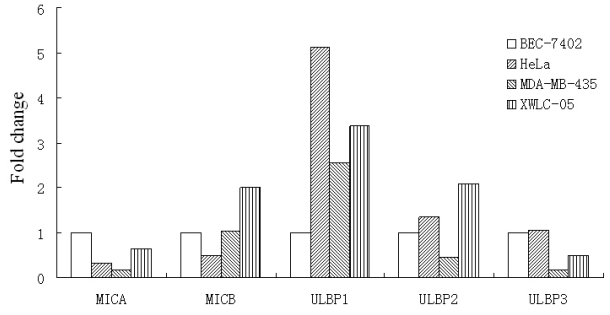


图 4 NKG2D 配体基因在 4 种肿瘤细胞中的表达

Fig. 4 Expression of NKG2D ligand genes in 4 tumor cells

MDA-MB-435，BEC-7402 最低；ULBP2：XWLC-05 是 BEC-7402 的 2.09 倍，表达最多，MDA-MB-435 是 BEC-7402 的 0.44 倍，表达最少；ULBP3：HeLa 是 BEC-7402 的 1.04 倍，两者表达水平相近，且与其他细胞相比为最高。

3 讨论

由于 NKG2D 受体及其配体的发现，人们对免疫细胞作用于肿瘤的分子机制有了新的认识。NKG2D 是 II 型 C- 凝集素样受体，属于 NKG2 家族，但 NKG2D 是一个独特的受体，与其他受体不同的是，它不需要 CD94 的辅助，也不与 CD94 结合，而以自身形成同源二聚体形式表达细胞表面，主要识别一些和主要组织相容性复合物 MHC-I 类分子存在较远亲缘性的细胞表面分子。人 NKG2D 受体依靠转接蛋白 DAP10 作为传递活化信号介导淋巴细胞的杀伤作用[8]。DAP10 在胞浆内含有 YXXM（Tyr-X-X-Meth）基序，NKG2D 识别并结合感染细胞及肿瘤细胞表面诱导表达的配体，使 DAP10 的 YXXM 基序磷酸

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

化，继而激活磷脂酰肌醇 3 激酶（PI3K）的 P85 亚基，下游 Akt 磷酸化、启动 ERK1/2MAP 激酶旁路，动员 Ca^{2+} 内流，传递活化信号，激活或者协同激活 NK、T 等细胞，继而杀伤靶细胞。NKG2D 受体可与许多不同的配体结合，目前发现的人功能性配体有 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4 和 RAET1G，这些配体一般认为不表达于正常组织中，但各种形式的细胞刺激如热休克、病毒感染、DNA 损伤以及离子辐射等可诱导 NKG2D 配体的表达[4]。NKG2D 配体广泛表达于肿瘤细胞中，研究发现，随着恶性神经胶质瘤 WHO 分级的升高，MICA 和 ULBP2 的表达逐渐减弱[9] 结直肠癌组织中有 MICA 表达的患者，其预后好于没有表达者，MICA 是结直肠癌预后良好的重要指标 [10]。NKG2D 配体的表达增加了肿瘤细胞对 NK 细胞和 T 细胞的敏感性，有利于淋巴细胞识别并杀伤肿瘤细胞。

目前，对于 NKG2D 配体 mRNA 表达的检测，国内学者多采用常规 PCR 技术，这种传统的 PCR 技术是以产物的电泳条带亮度及 OD 值大小来计算其相对表达量，但是，由于进入平台期后 PCR 的扩增效率会大大降低，而每个标本进入平台期时的循环数不同，所以这种以最终循环时的产物的量来判断样本起始模板量的方法是不准确的。而实时荧光定量 PCR 技术融合了 PCR 高灵敏性和光谱技术的高精确定量等优点，直接探测 PCR 过程中荧光信号的变化，以进入指数期时的循环数（Ct 值）来推导起始模板的拷贝数，从而获得特定区段扩增产物定量的结果。这种方法不需要 PCR 后处理或电泳检测，完全闭管操作（整个过程中仅有加入样品的一次开盖），能够减少外界环境污染的可能性，并能准确定量[11]。我们建立的检测 NKG2D 配体 mRNA 表达的荧光定量 PCR 方法，其熔解曲线均为单一峰，经琼脂糖凝胶电泳检测，产物条带均为单一条带，分子量大小与所设计的目的基因片段大小一致，表明定量 PCR 检测是特异的。另外，在 RNA 提取过程中，基因组 DNA 的污染是不可避免的，本研究所有目的基因的引物均跨内含子设计，有效防止基因组 DNA 的污染，避免假阳性现象的出现，确保准确定量。

云南省宣威地区是肺癌高发区，具有地区特异性，其中女性肺癌死亡率居全国首位[12]。本研究首次检测了 XWLC-05（宣威肺癌）细胞株的 NKG2D 配体表达情况，发现 5 种配体在 XWLC-05 细胞株中均有表达。与 BEC-7402、HeLa 和 MDA-MB-435 相比，XWLC-05 的 NKG2D 配体基因的整体表达水平较高：MICB 和 ULBP2 的表达水平为最高；MICA 和 ULBP1 的表达水平为第二。但是，NKG2D 配体在体内宣威肺癌细胞中的表达情况、NKG2D 配体的表达是否随着肺癌 WHO 分级的升高而逐渐减弱，以及 NKG2D 配体是否与宣威肺癌的预后情况相关需进一步研究。

参 考 文 献(References)

[1] Ehrlich LI, Ogasawara K, Hamerman JA, et al. Engagement of NKG2D by cognate ligand or antibody alone is insufficient to mediate costimulation of human and mouse CD8+T cells[J]. J Immunol, 2005, 174(4): 1922-1931

[2] Wei L, Lu J, Feng L, et al. HIF-1alpha accumulation upregulates MICA and MICB expression on human cardiomyocytes and enhances NK cell cytotoxicity during hypoxia-reoxygenation [J]. Life Sci, 2010, 87 (3-4): 111-119

[3] Schwinn N, Vokhminova D, Sucker A, et al. Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytolysis of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells[J]. Int J Cancer, 2008, 124(7): 1594-1604

[4] Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance[J]. Oncogene, 2008, 27(45): 5932-5943

[5] Zhou Hong-hao, Liu Jie.Gene targeting tailored therapy for the anti-tumor drugs[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011,1(1):6-11

[6] 孙燕. 肿瘤治疗的新里程碑 - 靶向药物治疗[J].肿瘤药学,2011,1(1): 1-5
Sun Yan.New Milestone in the development of Clinical Oncology-Molecular Targeted Therapy[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011,1(1):1-5

[7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C (T)) Method[J]. Methods, 2002, 25(4): 402-408

[8] Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M, et al. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D[J]. Nat Immunol, 2002, 3(12): 1142-1149

[9] Watson NF, Spendlove I, Madjd Z, et al. 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

[10] Eisele G, Wischhusen J, Mittelbronn M, et al. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells[J]. Brain, 2006, 129(Pt 9): 2416-2425

[11] Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR(RT-PCR): trends and problems[J]. J Mol Endocrinol, 2002, 29(1): 23-39

[12] 吕任齐，赵体德. 云南省 9 县市肺癌死亡率趋势分析[J]. 中国肿瘤, 2002, 11(12):700-701
Lu Ren-qi , Zhao Ti-de. An Analysis on the Trend of Mortality with LungCancer in 9 Counties of Yunnan Province[J]. Bulletin of Chinese Cancer, 11(12):700-701

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net