

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0272-04

ICA, PJM 逆转肿瘤细胞恶性表型及其机制的研究

薛兴奎, 张玲, 王芸, 毛海婷, 李登华, 温培娥, 崔树龄(山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062)

[摘要] 目的: 研究 ICA, PJM 逆转肿瘤细胞恶性表型, 提高免疫效应细胞识别和杀伤的作用和机制。方法: MTT 法检测 ICA, PJM 对 PG 细胞增殖的影响以及对 CD3AK 杀伤敏感性的影响; RT-PCR 法检测 ICA, PJM 对 bcl-2 和 c-fos 基因 mRNA 表达水平的影响; 流式细胞术检测细胞表面 HLA-A, B, C 抗原表达的变化以及 c-fos, bcl-2 蛋白表达水平的变化。结果: ICA, PJM 对 PG 细胞有明显的增殖抑制作用, 可以提高细胞表面 HLA-A, B, C 分子的表达和 c-fos 蛋白的表达, 抑制 bcl-2 基因的表达, 提高 CD3AK 细胞对 PG 细胞的杀伤活性。结论: ICA, PJM 可以逆转肿瘤恶性表型, 提高免疫效应细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤。

[关键词] PJM; ICA; HLA-A, B, C 抗原; bcl-2; c-fos

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

The Reversion of Tumor Cells Malignant Phenotype Treated by ICA and PJM and Its Mechanism

XUE Xing-kui, ZHANG Ling, WANG Yun, MAO Hai-ting, LI Deng-hua, WEN Pei-er, CUI Shu-ling (Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250062, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism and reversion of malignant phenotypes in a highly metastatic human lung tumor cell line. **Methods:** Suppression of ICA and PJM on PG cell line and the effects of PJM and ICA on PG cells sensitivity to lysis by CD3AK effectors cell was studied by MTT assay; the expression of bcl-2 and c-fos was studied by RT-PCR and flow cytometry, the expression of HLA-A, B, C in PG cells was examined by flow cytometry. **Results:** ICA and PJM inhibited the growth of PG obviously. ICA and PJM could significantly enhance the expression of HLA-ABC antigen and c-fos gene. ICA and PJM decreased the expression of bcl-2 and enhanced the the susceptibility of PG cells to lysis by CD3AK cells. **Conclusion:** ICA and PJM can reverse the malignant phenotypes of PG cells, enhance the recognition and killing effect of T cells.

[Key words] PJM; ICA; HLA-ABC antigen; bcl-2; c-fos

* MHC-I 类分子在机体免疫细胞识别和杀伤肿瘤细胞中起着重要作用。近年来研究发现许多人类肿瘤或肿瘤细胞株的 MHC-I 类抗原表达缺失或表达量降低, 可使 CTL 细胞不能识别并对肿瘤细胞发起攻击, 从而使肿瘤细胞逃逸^[1]。本研究采用抗癌中药淫羊藿甙(icarrin, ICA)和抗癌新药济南假单胞菌代谢物(pseudomonas jinanensis metabolite, PJM)作用于人高转移肺巨细胞腺癌 PG 细胞, 探讨其抑制肿瘤增殖, 增强免疫杀伤相关分子表达, 提高免疫杀伤的机制, 为肿瘤临床和免疫治疗提供新的理论和实验依据。

1 材料与方

1.1 细胞株

人高转移肺巨细胞腺癌系 PG 细胞, 引自北京医科大学病理系, 本室常规传代培养。

1.2 主要试剂

ICA, 淡黄色结晶, 从朝鲜淫羊藿中提取, 纯度大于 96%, 性质稳定。PJM, 济南假单胞菌代谢产物, 呈针形

* [基金项目] 山东省科技厅资助项目(971226206)

[作者简介] 薛兴奎(1977-), 男, 山东泰安人, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫调控研究。现工作单位: 山东省肿瘤防治研究院, 济南 250117

[通讯作者] 张玲

结晶体,具有黑金属光泽,由本院药研所何祖泽教授惠赠。溴化二甲噻唑二苯四氮唑(MTT),Sigma公司产品。二甲基亚砜(DMSO),分析纯,北京亚太精细化工公司产品。小鼠抗人HLA-A,B,C单抗,北京大学医学院免疫室产品。小鼠抗人bcl-2单抗、小鼠抗人c-fos单抗、FITC(异硫氰酸荧光素)标记的羊抗小鼠IgG抗体为Santa Cruz公司产品。TRIzol Reagent,GIBCO公司产品;AMV Reverse Transcriptase,宝生物(大连)公司产品。Taq酶,dNTP,随机引物,sangon公司产品;DEPC,Promega公司产品。引物:c-fos sense: 5'-TCGC-TACCGTCGTGACTTC-3'; antisense: 5'-AAACAGAGGTCGCATGCTG-3'; bcl-2 sense: 5'-CCACGGTCACTGCCATCTC-3'; antisense: 5'-CCCTCTGCCAATGCTCT-3; β -actin sense: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'; antisense: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3',由上海生物工程技术有限公司合成。

1.3 MTT法检测细胞增殖

参照文献[2]进行,实验分组为ICA 200 $\mu\text{g/ml}$, PJM 0.1 $\mu\text{g/ml}$, ICA 200 $\mu\text{g/ml}$ + PJM 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 和细胞对照组,分别作用12,24,48,72,96 h。

1.4 流式细胞仪检测 PG 细胞表面抗原 HLA-A, B, C 分子

分别收集上述处理72 h各组和对照组PG细胞($>10^6$),参照文献[3]进行。

1.5 流式细胞仪检测细胞 c-fos, bcl-2 蛋白

分别收集各处理组和对照组细胞($>10^6$),参照文献[3]进行。

1.6 逆转录 PCR(RT-PCR)检测 PG 细胞中 c-fos, bcl-2 基因 mRNA 水平

参照文献[4],分别收集对照组和处理组作用72 h后的PG细胞,按照TRIzol Reagent说明操作提取总RNA, RNA定量后进行RT-PCR。逆转录反应体系总体积为20 μl 。PCR扩增的反应总体积为50 μl ,循环参数为:变性94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,退火55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,扩增34个循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。DNA凝胶电泳后紫外分析仪下观察结果并拍照。PCR产物定量:Gel Dos 1000凝胶图象分析仪扫描底片各条带,以 β -actin基因作为内参照,测定各基因mRNA的相对表达量。

1.7 MTT法检测 CD3AK 细胞对 PG 细胞的杀伤作用^[5]

常规分离外周血单个核细胞。CD3AK细胞的诱导:在上述制备好的单个核细胞中,加入rhIL-2 100 U/ml, CD3McAb 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 诱导CD3AK细胞,37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 中孵育4 d后备用。MTT法检测CD3AK细胞杀伤

活性:收集各处理组、对照组PG靶细胞,在96孔板中,按效靶比为3.125:1,6.25:1,12.5:1加入效靶细胞,并设各浓度效应细胞对照、未处理靶细胞对照、空白对照组。照方法1.3进行。按下列公式计算杀伤率:

$$\text{杀伤率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{效应细胞对照组}}}{A_{\text{靶细胞}}} \right) \times 100\%$$

1.8 统计学处理

采用t检验及 X^2 检验等对数据进行单变量分析。

2 结果

2.1 ICA, PJM 对 PG 细胞的增殖抑制作用

ICA, PJM作用于PG细胞不同时间,结果表明ICA 200 $\mu\text{g/ml}$, PJM 0.1 $\mu\text{g/ml}$, ICA 200 $\mu\text{g/ml}$ + PJM 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 作用24 h后,可表现明显的抑制作用, PJM的抑制作用较显著($P < 0.01$) (见图1)。表明ICA, PJM对PG细胞的抑制作用呈时间剂量依赖关系。

图1 PJM, ICA对PG细胞增殖影响的动态观察

Fig. 1 Influence of different time of PJM, ICA on PG cells proliferation

* $P < 0.01$

2.2 流式细胞仪检测细胞表面 HLA-A, B, C 分子

ICA 200 $\mu\text{g/ml}$, PJM 0.1 $\mu\text{g/ml}$, ICA 200 $\mu\text{g/ml}$ + PJM 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 处理PG细胞72 h后,细胞表面HLA-A, B, C抗原表达率较对照明显升高($P < 0.01$),由对照组10.91%提高至44.30%, 64.88%和68.21% (见表1)。

2.3 流式细胞仪检测细胞 c-fos, bcl-2 蛋白

ICA 200 $\mu\text{g/ml}$, PJM 0.1 $\mu\text{g/ml}$, ICA 200 $\mu\text{g/ml}$ + PJM 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 处理72 h后, PG细胞c-fos蛋白表达率较对照明显升高($P < 0.01$),表达率从7.02%分别提高至12.99%, 20.04%, 26.37% (见表2)。PJM, ICA, ICA + PJM处理72 h后, PG细胞表面bcl-2蛋白表达率较对照明显降低($P < 0.01$) (见表3)。

2.4 逆转录 PCR(RT-PCR)检测 PG 细胞中 c-fos, bcl-

2 基因 mRNA 水平

如图 2 所示,图中可见 500 bp 的 β -actin 和 196 bp 的 *c-fos* 基因片段,与对照组相比,ICA, PJM, ICA + PJM 组 *c-fos* 基因表达增高,扩增片段相对定量值从对照组的 0.42, 分别提高为 0.57, 0.62 和 0.72。如图 3 所示,图中可见 500 bp 的 β -actin 和 315 bp 的 *bcl-2* 基因片段,与对照组相比,ICA, PJM, ICA + PJM 组 *bcl-2* 基因表达下降,扩增片段相对定量值从对照组的 1.00 分别下降为 0.78, 0.73, 0.70。

表 1 PJM, ICA 处理后 PG 细胞表达 HLA-A, B, C 阳性细胞的变化

Tab. 1 Changes of HLA-ABC antigen expression of control and treated PG cells

Dose(μ g/ml)	HLA-ABC +	HLA-ABC	P
	Cell number (/8 000)	Antigen expression ratio(%)	
Control	873	10.91	
PJM 0.10	3 544	44.30	$P < 0.01$
ICA 200	5 190	64.88	$P < 0.01$
ICA200 + PJM 0.10	5 457	68.21	$P < 0.01$

图 2 *c-fos* 基因 RT-PCR 扩增片段的电泳分析结果
Fig. 2 DNA electrophoresis analysis of *c-fos* gene mRNA expression of control and treated PG cells by ICA and PJM
1: DNA marker; 2: ICA + PJM; 3: ICA; 4: PJM; 5: Control

表 2 PIM, ICA 处理后 PG 细胞表达 *c-fos* 蛋白阳性细胞的变化

Tab. 2 Changes of *c-fos* antigen expression of control and treated PG cells

Dose(μ g/ml)	c-fos + cell	Expression	P
	number(/8 000)	ratio(%)	
Control	562	7.02	
PJM 0.10	1 039	12.99	$P < 0.01$
ICA 200	1 603	20.04	$P < 0.01$
ICA200 + PJM 0.10	2 110	26.37	$P < 0.01$

图 3 *bcl-2* RT-PCR 扩增片段电泳结果
Fig. 3 DNA electrophoresis analysis of *bcl-2* gene mRNA expression of control and treated PG cells by ICA and PJM
1: DNA marker; 2: Control; 3: ICA; 4: PJM; 5: ICA + PJM

表 3 PJM, ICA 处理后 PG 细胞表达 *bcl-2* 阳性细胞的变化

Tab. 3 Changes of *bcl-2* antigen expression of control and treated PG cells

Dose(μ g/ml)	bcl-2 + cell	bcl-2 antigen	P
	number (/8 000)	expression ratio(%)	
Control	3150	39.38	
PJM 0.10	927	11.59	$P < 0.01$
ICA 200	1 866	23.33	$P < 0.01$
ICA200 + PJM 0.10	678	8.48	$P < 0.01$

图 4 PJM, ICA 对 PG 细胞杀伤敏感性的影响
Fig. 4 Effects of the ICA, PJM on the sensitivity of PG cells to CD3AK cells
* $P < 0.05$

2.5 CD3AK 细胞对 PG 细胞的杀伤作用

如图4所示,对照组 CD3AK 细胞对 PG 细胞的杀伤率在不同靶比即 3, 125, 6, 25, 12, 5 时分别为 42.95%, 63.86%, 72.15%。与对照组相比, ICA 处理组, CD3AK 细胞的杀伤率, 分别可提升至 58.39%, 80.38%, 89.72%; PJM 处理组, 杀伤率分别可提升至 50.17%, 70.05%, 91.75%; ICA + PJM 处理组, 杀伤率分别为 60.72%, 78.43%, 91.46%。结果表明, PJM, ICA 可以显著提高 CD3AK 细胞对 PG 细胞的杀伤活性。

3 讨论

MHC-I 类分子对于免疫效应细胞识别、清除体内癌变细胞有重要作用。但肿瘤细胞可以通过低表达 MHC-I 类分子逃避免疫效应细胞的识别和攻击。研究表明, 人体很多肿瘤 HLA-A, B, C 分子表达降低, 甚至完全缺失。MHC-I 类分子的表达是一系列信号分子激活, 并受数个调控元件调控的结果, 增强子 A 就是其中的一个关键调控区, 它包括几个转录因子结合的位点。如在其 3' 末端有 *rel*/*NF-kappaB* 的结合位点, 在 5' 末端有 *AP-1*/*ATF* 的识别序列。反式调控因子 *AP-1* 是由 *c-fos* 和 *c-jun* 基因家族蛋白组成的杂和体, 可以与增强子 A 上的识别序列相结合^[6]。有研究表明小鼠 MHC-I 类分子——*H-2* 启动子活性改变是 MHC-I 类分子低表达的原因之一^[7]。Barzilay 等^[8]将 *c-fos* 基因转染 3LL 肿瘤细胞后, 可以活化 MHC-I 类基因的表达, 并且降低了这种肿瘤细胞的侵袭转移倾向。在处于不同诱导分化阶段的白血病细胞中, 也发现 MHC-I 类分子的表达和 *c-fos* 基因活化有关。

本研究发现, PJM, ICA 作用于 PG 细胞后, PG 细胞 HLA-A, B, C 类抗原表达从 10.91% 分别提高至 64.88% 和 44.30%, 两者联合应用可提高至 68.21%。同时, 药物作用后的 PG 细胞 *c-fos* 基因表达也有明显提高, PJM, ICA 作用组分别由原来的 7.07% 提高至 20.04% 和 12.99%, 两者联合应用提高至 26.37%。我们同时用 RT-PCR 方法检测 PJM, ICA 作用前后的 PG 细胞内的 *c-fos* mRNA 的表达含量, 结果表明药物作用组 mRNA 表达量明显高于对照组。*c-fos* 与 HLA-A, B, C 表达的相关关系提示 *c-fos* 蛋白产物可能对 HLA-A, B, C 抗原表达有促进作用。

CD3AK 细胞是由 CD3 单抗、IL-2 诱导激活的杀伤细胞, 是以 T 淋巴细胞为主的异质性细胞群, 表型为 CD3⁺, CD8⁺ 和或 CD4⁺, 可通过对靶细胞的

直接杀伤而发挥抗肿瘤作用, 类似于 CTL 的直接杀伤方式。MHC-I 类分子对于 CTL 细胞发挥抗肿瘤作用有重要意义。但由于肿瘤细胞 MHC-I 类分子多为低表达或完全缺失, 因此可以通过调节 MHC 分子的表达而促进机体免疫监视系统对肿瘤细胞的识别和应答。本研究发现, ICA, PJM 可有效地提高 PG 细胞 HLA-A, B, C 分子的表达, 提高 PG 细胞对 CD3AK 细胞的杀伤敏感性。PJM, ICA 同时下调 PG 细胞凋亡抑制基因 *bcl-2* 的 mRNA 和蛋白的表达水平, PJM, ICA, PJM + ICA 处理组的 mRNA 相对表达值从 1.0 分别下降至 0.78, 0.70, 和 0.73; 蛋白表达率从 39.39% 分别降至 11.59%, 23.33% 和 8.48%。因为 *bcl-2* 是一种抗凋亡基因, 它的低表达提示 PJM, ICA 可能使 PG 细胞的凋亡敏感性增加。因此, PJM, ICA 提高 PG 细胞对 CD3AK 的杀伤敏感性, 可能也与下调 *bcl-2* 基因表达有关。本研究为肿瘤的生物治疗及 ICA 和 PJM 的临床应用, 提供了新的实验依据。关于 ICA, PJM 对癌基因表达的详细调控机制, 有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Suyu Shu, Plautz GE, Krauss JC, *et al.* Tumor immunology[J]. JAMA, 1997, 278(22): 1972-1981.
- [2] 李贵新, 张玲, 王芸, 等. 淫羊藿甙诱导肿瘤细胞凋亡及其机制的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6(2): 131-135.
- [3] 左连富. 流式细胞术样品制备技术[M]. 北京: 华夏出版社, 1991, 81-98.
- [4] CW Dieffenbach, GS Dveksler. PCR 技术实验指南[M]. 黄培堂等译, 北京: 科学出版社, 1998. 201-207.
- [5] 李晓燕, 张玲, 王芸, 等. 淫羊藿甙逆转转化生长因子 $\beta 2$ 免疫抑制作用的抗肿瘤研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2000, 7(2): 127-130.
- [6] Giuliani C, Saji M, Napolitano G, *et al.* Hormonal modulation of major histocompatibility complex class I gene expression involves an enhancer A-binding complex[J]. J Biol Chem, 1995, 270(19): 11453-11462.
- [7] Kushtai G, Barzilay J, Feldman M, *et al.* The *c-fos* proto-oncogene in murine 3LL carcinoma clones controls the expression of MHC genes[J]. Oncogene, 1998, 2(2): 119-127.
- [8] Barzilay J, Kushtai G, Plaksin D, *et al.* Expression of major histocompatibility class I gene in differentiating leukemic cells is temporally related to activation of *c-fos* proto-oncogene[J]. Leukemia, 1987, 1(3): 198-204.

[收稿日期] 2002-07-22

[修回日期] 2002-09-20