

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0124-05

HLA-G 反义基因增强免疫效应细胞杀伤活性的研究

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

[摘要] **目的:** 研究 HLA-G 反义寡核苷酸逆转肿瘤细胞免疫逃逸, 提高免疫效应细胞识别杀伤活性的作用和机制。 **方法:** 采用反义核酸技术合成 HLA-G 反义寡核苷酸(ASODN), 硫代化修饰与脂质体形成复合物, 转导入高表达 HLA-G 的绒毛膜癌细胞系 JEG-3。采用 RT-PCR 方法检测 HLA-G mRNA 表达水平的变化; 流式细胞术检测细胞表面 HLA-G 蛋白表达水平的变化; MTT 法检测 NK 杀伤活性、CD3AK 杀伤、增殖活性的变化; ELISA 方法探讨 ASODN 调节 CD3AK 细胞因子 IFN- γ 产生的变化。 **结果:** HLA-G ASODN 可显著抑制 HLA-G mRNA 和蛋白水平的表达, 逆转可溶性 HLA-G 分子对 NK 细胞杀伤活性的抑制作用; 可部分逆转 HLA-G 分子对 CD3AK 细胞产生 IFN- γ 的抑制作用, 并增强 CD3AK 的增殖活性, 增强 JEG-3 细胞对 CD3AK 的杀伤敏感性。 **结论:** HLA-G ASODN 通过抑制肿瘤细胞 HLA-G mRNA 和蛋白水平的表达, 增强 NK, CD3AK 的杀伤作用和机制, 发挥逆转肿瘤细胞免疫逃逸作用。

[关键词] 反义寡核苷酸; HLA-G; 肿瘤免疫逃逸; JEG-3

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

Enhancement of Killer Activity of Immune Effector Cells Caused by HLA-G Antisense Oligodeoxynucleotides

WEN Jian-yan, ZHANG Ling, WAGN Yun, MAO Hai-ting, WEN Pei-e, CUI Shu-ling, LI Deng-hua, GU Hong-tao (Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of HLA-G antisense oligodeoxynucleotides (ASODN) on reversion of tumour immune evasion and enhancement of killer activity of immune effector cells. **Methods:** The expression of HLA-G in JEG-3 cell line was studied by RT-PCR and flow cytometry. MTT assay was used in our studies to detect the change of NK and CD3AK killer activity after ASODN treatment. The effect of IFN- γ secreted by CD3AK after coculture of tumour-lymphocytes was explored by ELISA. **Results:** HLA-G ASODN could obviously inhibit the expression of HLA-G mRNA and protein. The supernatant of JEG-3 treated by ASODN could reverse the inhibition of soluble HLA-G molecules to NK killer activity. On the other hand, HLA-G ASODN also could reverse the inhibition of HLA-G to the production of IFN- γ secreted by CD3AK and enhanced the proliferation of CD3AK. Meanwhile, it also improved the susceptibility of JEG-3 to CD3AK. **Conclusion:** HLA-G ASODN could inhibits the expression of HLA-G mRNA and protein in tumour cells and partly restore the cytotoxicity of NK and CD3AK cells, and thereby partly reverse immune evasion of tumour cells caused by soluble HLA-G molecules.

[Key words] ASODN; HLA-G; tumour immune escape; JEG-3

* HLA-G 分子是新近开展研究的一种免疫耐受分子, HLA-G 分子在生理条件下主要由绒毛外细胞滋养层表达, 维持妊娠时母胎界面的免疫耐受。但是在肿瘤微环境中, 肿瘤细胞产生的 HLA-G 可以结合 NK 和 T 细胞表面的杀伤细胞抑制受体(killer inhibitory receptor, KIR), 强烈抑制 T 细胞和 NK 细胞对肿瘤靶细

胞的识别、杀伤等活性, 造成类似妊娠母胎界面的免疫

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(Y2001C08)

[作者简介] 温见燕(1976-), 女, 山东招远人, 硕士生, 主要从事免疫调控与抗肿瘤研究

[通讯作者] 张玲, E-mail: zhlnln@hotmail.com

耐受状态,形成了一条新的肿瘤免疫逃逸途径^[1]。为了进一步阐明 HLA-G 介导免疫逃逸的机制,抑制肿瘤细胞 HLA-G 分子的表达,切断肿瘤细胞免疫逃逸的途径,本研究采用反义核酸技术合成 HLA-G 反义寡核苷酸,硫代化修饰后与脂质体形成复合物,转导入高表达 HLA-G 的绒毛膜癌来源的细胞系 JEG-3,揭示反义 HLA-G 基因逆转 HLA-G 抑制 NK, CD3AK 细胞活化、增殖、杀伤的肿瘤免疫逃逸的作用和机制,为反义 HLA-G 基因的肿瘤生物治疗应用和丰富肿瘤治疗方法,提供新的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

JEG-3 细胞为人绒毛膜癌细胞系,引自中国医学科学院基础研究所。K562 细胞,本室常规传代培养。MTT (Sigma 公司产品)。ELISA 试剂盒,晶美生物工程有限公司产品。MEM-G/9, FITC(异硫氰酸荧光素)标记的鼠抗人 IgG1 抗体, EXBIO 公司产品。TRIzol Reagent, GIBCO 公司产品。RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas 产品。Taq DNA polymerase, 宝生物工程(大连)有限公司产品。

β -actin 引物: forward: 5' GTGGGGCGCCCCAG-GCACC 3', reverse: 5' CTCCTTAATGTCACGCACGATTT 3' 扩增片段 506 bp。HLA-G 引物: forward: G257 5' GGAAGAGGAGACACGGAACA3', reverse: G1225 5' TGAGACAGAGACGGAGACAT 3', 扩增片段 HLA-G₁ 980 bp, HLA-G₂, G₄ 700 bp, 由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2 反义基因合成

HLA-G 反义寡核苷酸序列与 HLA-G mRNA 的翻译起始密码子互补。反义寡核苷酸(ASODN)序列为: 5'CGGGGTGCCATGACCACCATCCT 3'; 无关寡核苷酸(NODN)序列为: 5'CATTCTTGTCTCTCCACG 3', 由上海生物工程公司合成,并进行硫代化修饰。采用脂质体(LipofectAMINTM 2000, LF2000, GIBCOBRL 公司产品)介导法,与 HLA-G ASODN, NODN 形成复合物(HLA-G AS/NODN-Lf)。

1.3 流式细胞仪检测 HLA-G 蛋白表达^[24]

取对数生长期 JEG-3 细胞每孔 4.5×10^5 /ml 接种 6 孔板, 37°C, 5% 的 CO₂ 培养约 40 h, 加入 HLA-G AS/NODN-Lf, 分组为①未处理对照组②HLA-G NODN-Lf (1.0 μ g/ml, 2.0 μ g/ml, 4.0 μ g/ml, 6.0 μ g/ml, 8.0 μ g/ml) 对照组 ③HLA-G ASODN-Lf (1.0 μ g/ml, 2.0 μ g/ml, 4.0 μ g/ml, 6.0 μ g/ml, 8.0 μ g/ml) 组。培养 3 h 后弃培养液, 加入不含 HLA-G AS/NODN-Lf 的新鲜培

养液继续培养 48 h, 收集上述各组 JEG-3 细胞 ($> 10^6$ /ml), 流式细胞仪检测。

1.4 逆转录 PCR (RT-PCR) 检测 HLA-G mRNA 表达^[5-6]

收集各处理组、对照组 JEG-3 细胞, 按照 TRIzol Reagent 说明提取总 RNA, 定量后进行 RT-PCR。逆转录反应体系总体积为 20 μ l, PCR 扩增的体系为 100 μ l。循环参数为: 95°C 5 min 预变性, 94°C 变性 1 min, 65°C 退火 1 min 30 s, 72°C 延伸 2 min, 扩增 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物定量: Gel Dos 1000 凝胶图象分析仪扫描, 以 β -actin 基因作为内对照, 测定各基因 mRNA 的相对表达量。

1.5 MTT 法测 NK 杀伤活性^[7]

收集对照组 AS/NODN-Lf 6.0 μ g/ml 处理的 JEG-3 细胞 24, 48, 72 h 培养上清。常规分离外周血单个核细胞(PBMC), 用收集上清调至 5×10^6 /ml, 2.5×10^6 /ml, 1.25×10^6 /ml 为效应细胞。将靶细胞 K562 调至 1×10^5 /ml。按效靶比为 50:1; 25:1; 12.5:1 加入 96 孔板, 同时设效应细胞和靶细胞对照, 作用 24 h 后检测。

1.6 MTT 法检测 CD3AK 杀伤活性^[7-8]

常规分离外周血单个核细胞, 调细胞数 1×10^6 /ml, 加入 rhIL-2 100 U/ml, CD3McAb 0.1 μ g/ml, 置 37°C 5% CO₂ 诱导培养 4 d 的 CD3AK 作为效应细胞。收集 48 h 处理及对照各组 JEG-3 为靶细胞, 按效靶比为 25:1, 12.5:1, 6.25:1 加入 96 孔板, 并设效应细胞、靶细胞对照, 作用 24 h 后检测。

1.7 ELISA 法测定肿瘤细胞-CD3AK 细胞混合培养上清中 IFN- γ 水平, MTT 法检测 CD3AK 的增殖活性^[7]

收集各处理组和对照组 JEG-3 细胞, 调为 1.25×10^5 /ml, 用 100 μ g/ml 的丝裂霉素 C (MMC) 37°C, 5% CO₂ 作用 45 min 灭活, 10% FBS DMEM 调为 1×10^5 /ml, 分组为①ASODN + MMC, ②NODN + MMC, ③未处理组 + MMC, ④未用 MMC 灭活的未处理组, ⑤CD3AK 对照组。收集培养 4 d 的 CD3AK 细胞, 调为 1×10^6 /ml, 与上述各实验组 JEG-3 各 100 μ l, 接种 96 孔板, 同时设 CD3AK 和 JEG-3 对照组, 37°C, 5% CO₂ 作用 24 h。收集各孔上清, 按 ELISA 试剂盒说明测上清中的 IFN- γ 的含量。各孔沉淀加入 MTT, 检测 CD3AK 的增殖活性。

1.8 统计学处理方法

用 SPSS 软件进行 *t* 检验, χ^2 检验。

2 结果

2.1 HLA-G AS/NODN-Lf 处理后 HLA-G 蛋白表达量的变化

流式细胞术检测表明,HLA-G ASODN-Lf 4.0 μg/ml, 6.0 μg/ml, 8.0 μg/ml 作用于 JEG-3 细胞 48 h 后, HLA-G 蛋白表达率为 8.39%, 7.21%, 5.90%, 较对照组的 14.17%、NODN-Lf 对照组的 11.39% (4.0 μg/ml), 12.53% (6.0 μg/ml), 12.7% (8.0 μg/ml) 显著下降 ($P < 0.01$), 并呈剂量依赖效应。

2.2 RT-PCR 检测 HLA-G AS/NODN-Lf 处理后 JEG-3 中 HLA-G mRNA 表达水平的变化

如(图1)所示,各组中可见3条清晰的带:506 bp 的 β-actin, 980 bp 的 HLA-G₁ 和 700 bp 的 HLA-G₂, HLA-G₄。HLA-G ASODN-Lf 作用组(3)与未处理对照组(4)和 NODN-Lf 对照组(2)相比,HLA-G 基因表达下降。扩增片段扫描定量表明,(4)组和(2)组相对定量值为 1.24 和 1.05,(3)组作用组降至 0.81;HLA-G₂, G₄ 分别从 0.20, 0.25 降至 0.11。表明 HLA-G mRNA 基因表达被 HLA-G ASODN-Lf 明显抑制。

图1 HLA-G 基因的 RT-PCR 扩增片段电泳结果

Fig.1 DNA electrophoresis analysis of HLA-G mRNA expression of control and treated JEG-3 cells

1: Marker; 2: NODN-Lf; 3: ASODN-Lf; 4: Control

2.3 HLA-G AS/NODN-Lf 各处理组上清对 NK 杀伤活性的影响

用各处理组 24, 48, 72 h 上清作用 NK 细胞后,其杀伤活性在效靶比为 50:1, 25:1, 12.5:1 时,未处理组分别为 19.29%, 7.6%, 6.7%; 23.13%, 18.97%, 12.94%; 25.41%, 14.52%, 6.34%, 均显著低于培养液对照组的 72.96%, 53.19%, 37.28%; 75.71%, 67.82%, 56.21%; 74.78%, 61.93%, 55.15%。用 ASODN 处理后,NK 细胞的杀伤活性恢复为 58.12%, 44.38%, 23.51%; 70.78%, 61.94%, 51.15%; 68.97%, 57.36%, 50.12%。

2.4 HLA-G AS/NODN-Lf 作用后 JEG-3 细胞对 CD3AK 杀伤敏感性的变化

如(图2)所示,ASODN-Lf 处理组在效靶比为 25.0

:1, 12.5:1, 6.25:1 时, CD3AK 的杀伤率分别为 74.92%, 43.97%, 30.56%, 明显高于对照组的 41.92%, 21.86%, 13.51% 和 NODN-Lf 对照组的 47.65%, 28.05%, 20.79% ($P < 0.01$)。

图2 ASODN-Lf 处理后对 CD3AK 杀伤活性的影响
Fig.2 Effects of HLA-G ASODN on the sensitivity of JEG-3 cells to CD3AK lysis

* $P < 0.01$

2.5 HLA-G AS/NODN-Lf 作用后肿瘤-CD3AK 细胞混合培养上清中 IFN-γ 的变化

图3 各处理组和对照组肿瘤-CD3AK 混合培养上清中 IFN-γ 的含量

Fig.3 The IFN-γ production in the supernatant of CD3AK cocultured with JEG-3 cells treated by HLA-G ASODN

A: CD3AK; B: ASODN + MMC; C: NODN + MMC; D: MMC; E: Untreated (control) $P < 0.01$

如(图3)所示,CD3AK 对照组 A 由于处于静止状态下,IFN-γ 的含量较低为 149.049 pg/ml,与未用 MMC 灭活的未处理组 E 的 195.663 pg/ml 基本持平。E 组 IFN-γ 的含量显著低于 ASODN + MMC (B) 的 498.757 pg/ml, NODN + MMC (C) 的 483.36 pg/ml, 未处理 + MMC 组 (D) 的 461.213 pg/ml, 表明 JEG-3 细胞

持续产生的 HLA-G 抑制 CD3AK 产生 IFN- γ 。B, C, D 组 IFN- γ 含量的升高;可能由于用 MMC 灭活的各处理组 JEG-3 细胞不能继续产生 HLA-G;对 CD3AK 产生 IFN- γ 的抑制作用降低而致使增高。而在各处理组 IFN- γ 含量中, B 组高于 D 组,表明 ASODN-Lf 可部分逆转 HLA-G 分子对 IFN- γ 产生的抑制作用。

2.6 HLA-G AS/NODN-Lf 作用后肿瘤细胞-CD3AK 混合反应中 CD3AK 的增殖活性

如(图4)所示,当 CD3AK 与不同处理组 JEG-3 细胞共同培养时,将 CD3AK 对照组的 A 值作为 1, ASODN 处理组 CD3AK 的增殖比值为 1.832,显著高于 NODN 组的 0.9919 和未处理对照组的 0.9338 ($P < 0.01$)。

图4 肿瘤细胞-CD3AK 混合反应中 CD3AK 的增殖活性

Fig. 4 Proliferation of CD3AK in the coculture of tumour cells and CD3AK

A: Untreated group; B: NODN + MMC; C: ASODN + MMC

* $P < 0.01$

3 讨论

HLA-G 分子是一种免疫耐受分子,是非经典 HLA-Ib 类基因,该类基因还包括 HLA-E 和 HLA-F,位于人类 6 号染色体(6p21.3)^[9]。HLA-G 基因在转录水平的选择性剪切共产生 7 种异构体,其相应的蛋白产物可分为膜结合型和可溶型。膜结合型有 HLA-G₁, G₂, G₃, G₄。可溶型有 HLA-G₅(G1S), G₆(G2S), G7(新剪切异构体)^[10]。HLA-G 在生理条件下主要在人类胎盘绒毛外细胞滋养层表达,形成妊娠期母胎耐受。但是近年研究发现,HLA-G 分子在某些肿瘤或肿瘤细胞系异位表达,形成了类似妊娠期母胎耐受状态的肿瘤免疫逃逸的新机制。本研究发现,绒毛膜癌来源的细胞系 JEG-3 高表达 HLA-G 分子,抑制 NK 细胞杀伤、CD3AK 细胞杀伤、增殖及其产生 IFN- γ 的活性,在体

外表现出明显的免疫抑制作用。为了逆转这种肿瘤免疫逃逸作用,本研究将硫代化修饰后的 HLA-G 反义寡核苷酸-脂质体复合物转入 JEG-3 细胞,发现 HLA-G ASODN-Lf 6.0 $\mu\text{g/ml}$ 时,HLA-G₁, G₂, G₄ 的 mRNA 的相对定量值显著降低;同时在蛋白水平,HLA-G-ASODN-Lf 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 就可以明显降低 HLA-G 分子的表达,随着 ASODN-Lf 浓度的升高,HLA-G 的表达降低更明显,呈剂量依赖效应趋势。由此表明,HLA-G 反义基因可封闭和阻断 JEG-3 细胞 HLA-G mRNA 和蛋白表达水平。

研究表明,HLA-G 可结合 NK 和 T 细胞表面的 KIR,强烈抑制 T 细胞和 NK 细胞对肿瘤靶细胞的识别、杀伤活性。本研究发现 JEG-3 细胞的 24, 48, 72 h 上清中可溶型 HLA-G 分子抑制 PBMC 中 NK 细胞的杀伤活性;用 ASODN-Lf 处理后,在效靶比为 50:1, 25:1, 12.5:1 时, NK 细胞的杀伤活性均有明显恢复和提高。表明 ASODN 作用后,可逆转可溶型 HLA-G 对 NK 杀伤活性的抑制作用。

CD3AK 细胞是由 CD₃单抗、IL-2 诱导的杀伤细胞,是以 T 淋巴细胞为主的异质性细胞群,以类似 CTL 的杀伤方式发挥抗肿瘤作用。本研究表明,CD3AK 的杀伤活性可被 HLA-G 分子显著抑制,用 ASODN-Lf 处理后,其杀伤活性明显提高,同时进一步表明,CD3AK 杀伤活性的提高可能与以下机制有关:1) ASODN-Lf 促进 CD3AK 产生 IFN- γ , JEG-3 细胞持续产生的 HLA-G 可抑制 CD3AK 产生 IFN- γ , 当 ASODN-Lf 作用后, ASODN + MMC 组 IFN- γ 的含量稍高于未处理 + MMC 组,表明 ASODN-Lf 可部分逆转 HLA-G 分子对 CD3AK 产生 IFN- γ 的抑制作用。2) 增强 CD3AK 的增殖活性, ASODN-Lf 作用后,可使 CD3AK 的增殖比值显著提高,因此可逆转 HLA-G 对 CD3AK 的增殖抑制作用。本研究虽然初步揭示增高的 IFN- γ 水平能增强对 CD3AK 的激活、增殖作用,但其详细机制有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Paul P, Cabestre FA, Le Gal FA, *et al.* Heterogeneity of HLA-G transcription and protein expression in malignant melanoma biopsies [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(8): 1954-1960.
- [2] 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 157-159.
- [3] Lozano JM, Gonzalez R, Kindelan JM, *et al.* Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule [J]. *AIDS*, 2002, 16(3): 347-351.
- [4] 左连富. 流式细胞术样品制备技术[M]. 北京: 华夏出版社, 1991, 81-89.
- [5] Frumento G, Franchello S, Palmisano GL, *et al.* Melanomas and melanoma cell lines do not express HLA-G, and the expression can-

not be induced by γ IFN treatment [J]. *Tissue Antigen*, 2000, 56 (1): 30-37.

[6] Real LM, Cabrera T, Collado A, *et al.* Expression of HLA-G in human tumors is not a frequent event[J]. *Int J Cancer*, 1999, 81 (4): 512-518.

[7] 张志强, 田志刚, 崔正言, 等. MTT 法检测人胎脾巨噬细胞毒效应的建立[J]. *上海免疫学杂志*, 1994, 14(1): 48.

[8] 李晓燕, 张 玲, 王 芸, 等. 淫羊藿甙逆转转化生长因子 β 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.

[9] Schmidt CM, Orr HT. A physical linkage map of HLA-A,-G,-7.5P,and-F[J]. *Hum Immunol*, 1991, 31(3): 180-185.

[10] Paul P, Cabestre FA, Ibrahim EC, *et al.* Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5 ,HLA-G6, and G7 transcripts in human transfected cells[J]. *Hum Immunol*, 2000, 61(11): 1138-1149.

[收稿日期] 2003 -08 -27

[修回日期] 2003 -11 -15

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0128-01

p73 基因蛋白表达与肺癌临床病理学特征及预后关系的探讨

田 辉, 王善政, 彭书华 (山东大学齐鲁医院胸外科, 济南 250012)

癌基因的激活和抑癌基因的失活导致了肿瘤的发生和发展,其中 p53 基因是迄今为止发现的与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因,作为第一个被发现的 p53 基因家族的成员—p73 基因,与 p53 基因共同组成了一个抑癌基因的家庭。自 1997 年被发现以来,倍受研究者的关注。本研究采用免疫组织化学染色方法检测了 65 例肺癌组织、癌旁组织和正常肺组织中 p73 基因蛋白的表达,以探讨 p73 基因与肺癌发生、发展的关系。

65 例肺癌病例均来源于山东大学齐鲁医院胸外科 1997 年 1 月~1998 年 12 月间经手术后临床病理确诊的患者,术前均未行放、化疗。男性 51 例,女性 14 例,男女比率约为 3.6:1。年龄 41~76 岁,中位年龄 61 岁。65 例患者无住院期间死亡,术后随访至 2002 年 12 月;实访 61 例,失访 4 例,随访率 93.8%。标本均在手术中收集,取材后速冻于液氮中,-80℃超低温贮存备用。肿瘤组织在原发灶取材,避开坏死、炎症区域;癌旁组织取自相应肿瘤旁 2 cm;正常肺组织取自距肿瘤边缘 5 cm 以上的肺组织,并经病理学检查未见癌细胞。免疫组化

染色采用即用型 SABC 法,应用行 \times 列表资料的 X^2 检验、四格表资料 X^2 检验和确切概率法进行统计学处理。

本研究结果发现, P73 蛋白在肺癌组织中存在高水平的阳性表达率,提示它的正常存在并没有能够阻止肺癌的发生及恶化,所以在肺癌发生中 p73 基因可能不起主要抑癌基因的作用,似乎预示了一个论点,即 p73 作为抑癌基因,发挥抑癌作用,有一个组织特异性范畴。研究结果还发现 P73 蛋白表达与肺癌的临床分期呈负相关,提示 p73 基因的过度表达可能是肺癌发展过程中的分子事件,参与了调控肺癌的发展过程。研究同时发现, P73 蛋白表达与肺癌患者的生存期呈明显正相关,提示 P73 蛋白表达可作为临床上判断患者预后的一个参考指标。

[关键词] 肺癌; p73 基因; 免疫组化

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] D

[收稿日期] 2003 -11 -03

[修回日期] 2003 -12 -20