文章编号:1000-5404(2007)21-2019-04

论著

MHC Ⅱ类反式激活因子在上调 HepG2 细胞 HLA Ⅱ类分子表达中的作用

柏秀娟,张绪清 (第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex,MHC)Ⅱ类反式激活因子(class Ⅱ transactivator,CⅡTA)在调控 HepG2 细胞 HLA Ⅱ类分子表达中的作用。**方法** 将含 CⅡTA cDNA 的真核表达载体 EBS-NPL-CⅡTA 和不含 CⅡTA cDNA 的空载体 EBS-NPL 分别转染至 HepG2 细胞。用 RT-PCR 技术检测未经转染的 HepG2 细胞、转染 EBS-NPL-CⅡTA 及空载体 EBS-NPL 的 HepG2 细胞 CⅡTA mRNA 的表达,并用间接细胞免疫荧光技术及流式细胞技术检测其3种 HLA Ⅱ类分子(HLA-DR、DP、DQ)的表达。**结果** 未经转染的 HepG2 细胞和转染空载体 EBS-NPL 的 HepG2 细胞均无 CⅡTA mRNA 和 HLA Ⅱ类分子的表达。转染 EBS-NPL-CⅡTA 后的 HepG2 细胞出现 CⅡTA mRNA 表达,并表达3种 HLA Ⅱ类分子。**结论** CⅡTA 是调控 HepG2 细胞是否表达 HLA Ⅱ类分子的关键因子,HepG2 细胞不表达 HLA-Ⅱ类分子与其缺乏 CⅡTA 表达有关,为进一步研究 CⅡTA 在肝癌治疗中的作用奠定基础。

关键词:MHC Ⅱ类反式激活因子;HepG2 细胞;HLA Ⅱ类分子
中图法分类号:R394.3;R73-362;R735.7 **文献标识码**:A

Role of MHC class Ⅱ transactivator in upregulating the expression of HLA class Ⅱ antigen in HepG2 cells

BAI Xiu-juan, ZHANG Xu-qing (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of MHC class Ⅱ transactivator (CⅡTA) in upregulating the expression of HLA class Ⅱ antigen in HepG2 cells. **Methods** Eukaryotic expression vector EBS-NPL-CⅡTA containing CⅡTA cDNA or the empty vector EBS-NPL was transfected into HepG2 cells respectively. CⅡTA mRNA and HLA class Ⅱ antigen (HLA-DR, DP, DQ) were respectively detected by RT-PCR, indirect cell immunofluorescence technique and flow cytometry in original HepG2 cells, HepG2 cells transfected with EBS-NPL-CⅡTA or the empty vector EBS-NPL. **Results** The expression of CⅡTA mRNA and HLA class Ⅱ antigen (HLA-DR, DP, DQ) were not observed in original HepG2 cells and HepG2 cells transfected with empty vector, but in the HepG2 cells transfected with EBS-NPL-CⅡTA. **Conclusion** CⅡTA is a switching factor of mastering the expression of HLA class Ⅱ antigen in HepG2 cells. The lack of CⅡTA expression in HepG2 cells contributes to no expression of HLA Ⅱ antigen.

Key words: class Ⅱ transactivator; HepG2 cells; HLA class Ⅱ antigen

主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex,MHC)Ⅱ类分子是由α链和β链以非共价键结合而成的高度多态性的跨膜糖蛋白,主要表达在专业性递呈细胞(antigen presenting cells, APCs)的表面。MHC Ⅱ类分子具有向 $CD4^+$ 的辅助性 T 细胞(helper T limphocyte, Th)受体递呈抗原肽的能力,而且其正常表达对于 T 细胞的活化与增殖是必需的,因此在启动抗原特异性免疫应答中起重要作用,有助于宿主免疫系统清除外来抗原和异常增殖的肿瘤细胞。MHC Ⅱ类分子的表达有着严格的调控机制,其主要在转录水平。MHC Ⅱ类分子主要包括顺式作用元件和反式作用因子,前者主要有 W 盒、X 盒和 Y 盒等,后者主要包括 W/S 因子、调节因子(RFX)、X2 结合蛋白(X2BP)、

基金项目:国家自然科学基金(30371283)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371283)
作者简介:柏秀娟(1976-),女,山西省运城市人,硕士研究生,医师,主要从事 CⅡTA 基因编码区 SNP 的功能方面的研究。电话:13269330993,E-mail: baixiujuan1225@126.com
通讯作者:张绪清, E-mail:xuqing651005@tom.com
收稿日期:2006-12-28;修回日期:2007-09-03

核因子 Y(NY-F)、MHC Ⅱ类反式激活因子(class Ⅱ transactivator, CⅡTA)等[1,2]。而CⅡTA作为近年新发现的MHCⅡ类分子的主要调控因子,越来越受到人们的关注。

很多组织的肿瘤细胞缺乏 HLA-Ⅱ类分子的表达,降低了其免疫原性,从而逃逸了机体免疫系统的识别与攻击[3]。已有的研究显示将 CⅡTA 基因转入本身不表达 HLA-Ⅱ类分子的肿瘤细胞,可以使其恢复 HLA-Ⅱ类分子的表达,增强肿瘤细胞的免疫原性[4]。HepG2 细胞是来源于肝癌的细胞株,本身不表达 HLA-Ⅱ类分子。本研究拟探讨 CⅡTA 对 HepG2 细胞 HLA-Ⅱ类分子表达的影响,为进一步研究 CⅡTA 在肝癌治疗中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

CⅡTA cDNA 真核表达载体 EBS-NPL-CⅡTA 和空载体 EBS-NPL 加拿大 Steimle 教授惠赠;DMEM 培养液及小牛血清购自 HyClone 公司;鼠抗人 HLA-DR、DP、DQ 单克隆抗体购自 NeoMarker 公司;FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Lipofectamine 2000、Trizol 均由 Invitrogen 公司购得; RNA LA PCR™ Kit、1KB DNA marker 均由 TaKaRa 公司购得;引物由北京奥科公司合成。

1.2 细胞株培养

HepG2 细胞株为我所保存。细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养。

1.3 脂质体 2000 介导的转染

将 CⅡTA cDNA 真核表达载体 EBS-NPL-CⅡTA 和空载体 EBS-NPL 转染 HepG2 肿瘤细胞。转染前 1 d 24 孔板中每孔接种 10^5 个细胞,待细胞贴壁达到 80% ~90% 融合时转染。取 50 μl无血清的 DMEM 培养基稀释质粒 DNA (0.8 μg),再取 50 μl无血清的 DMEM 培养基稀释脂质体 2000(2 μl)室温放置 5 min,然后将两者混合室温放置 20 min,最后将 100 μl 的混合物加入每孔细胞中(含有完全培养液 500 μl),72 h 后检测 CⅡTA mRNA 和 HLAⅡ类分子的表达。

1.4 RT-PCR 检测 CⅡTA mRNA

用 Trizol 抽提每孔细胞总 RNA,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳观察 RNA 是否降解。参考二步法 RT-PCR 试剂盒的说明进行扩增,第一步即逆转录的反应体系为 20 μl:$MgCl_2$ 4 μl,10 × RNA PCR Buffer 2 μl,RNase Free dH_2O 6.5 μl,dNTP Mixture (各 10 mmol/L)2 μl,RNase inhibitor 0.5 μl,AMV Reverse Transcriptase 1 μl,Oligo DT-Adaptor Primer 1 μl,模板 RNA3 μl;反应条件:43 ℃ 40 min,99 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min。第二步即 PCR 的上游引物序列 5′-TCGCTAGCGGCCGCGTCGACT-3',下游引物序列 5′-TCCGCCTCAGAAGGTACGTATCT-3';反应体系 50 μl,模板即第一步逆转录的反应产物 3 μl,2 μmol/L 的引物混合物 5 μl,10 × LA PCR Buffer 5 μl,$MgCl_2$(25 mmol/L)5 μl,dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)8 μl,LA *Taq* 酶(5 U/μl)0.5 μl;反应条件:95 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s、62 ℃ 40 s、72 ℃ 3 min 30 s,30 个循环;72 ℃继续延伸 5 min。取 2 μl 的扩增产物进行凝胶电泳分析。

1.5 间接细胞免疫荧光技术检测 HepG2 细胞 3 种 HLA-Ⅱ类分子的表达

每孔细胞用 4% 的多聚甲醛固定 30 min,PBS 液洗 3 次;分别加入鼠抗人的 HLA-DR、DP、DQ 单克隆抗体(均为 1∶50 稀释),4 ℃过夜,PBS 液洗 3 次;再加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(为 1∶50 稀释),37 ℃ 1 h,PBS 液洗 3 次。同时作只加二抗不加一抗的阴性对照,然后在荧光显微镜下观察。

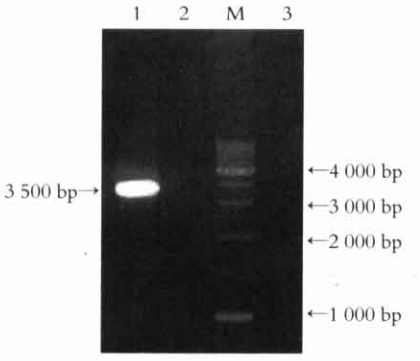
1.6 流式细胞技术检测 HepG2 细胞 3 种 HLA-Ⅱ类分子的表达

取 10^5 细胞,分别加鼠抗人 HLA-Ⅱ类分子的 3 种单克隆抗体(均为 1∶50 稀释),室温 30 min,PBS 液洗 3 次;再加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(为 1∶50 稀释),4 ℃,30 min,PBS 液洗 3 次。同时作只加二抗不加一抗的对照,然后进行流式细胞检测。

2 结果

2.1 转染前后 HepG2 细胞 CⅡTA mRNA 的表达

转染真核表达载体 EBS-NPL-CⅡTA 的 HepG2 细胞所提的 RNA 能反转录扩增出长约 3 550 bp 的特异性条带即 CⅡTA cDNA,说明其有 CⅡTA mRNA 的表达。而 HepG2 细胞本身及转染空载体 EBS-NPL 的 HepG2 细胞所提的 RNA 不能反转录扩增出 CⅡTA cDNA,因此没有 CⅡTA mRNA 的表达(图 1)。

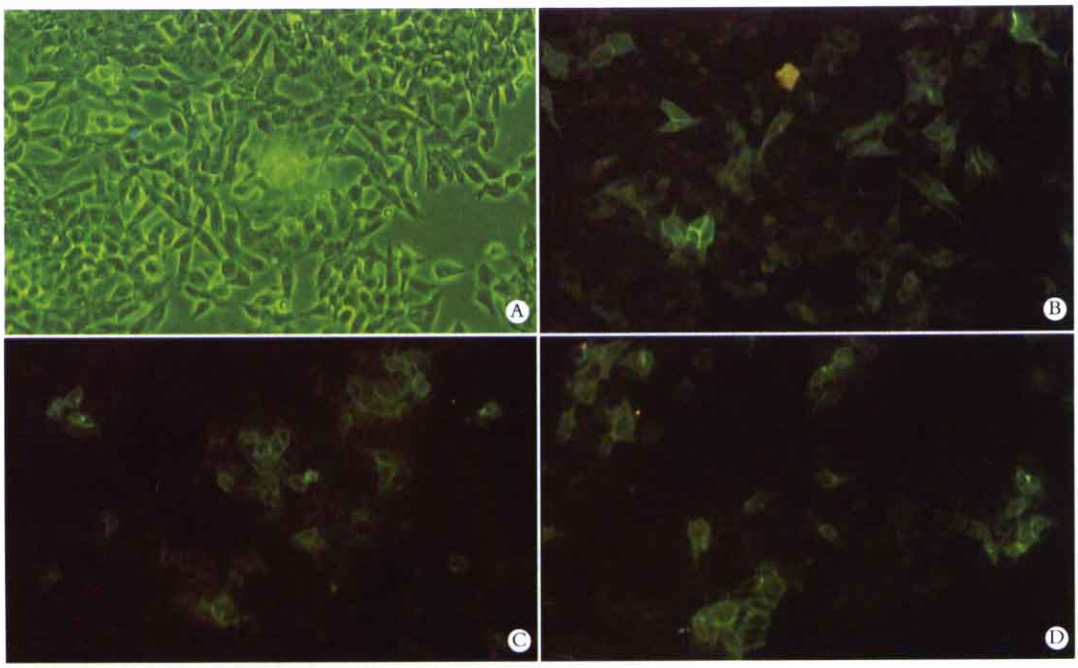


1:转染 EBS-NPL-CⅡTA 的 HepG2 细胞;2:转染 EBS-NPL 的 HepG2 细胞;3:HepG2 细胞本身;M:标准

图 1 转染前后 HepG2 细胞 CⅡTA mRNA 表达的 RT-PCR 电泳图

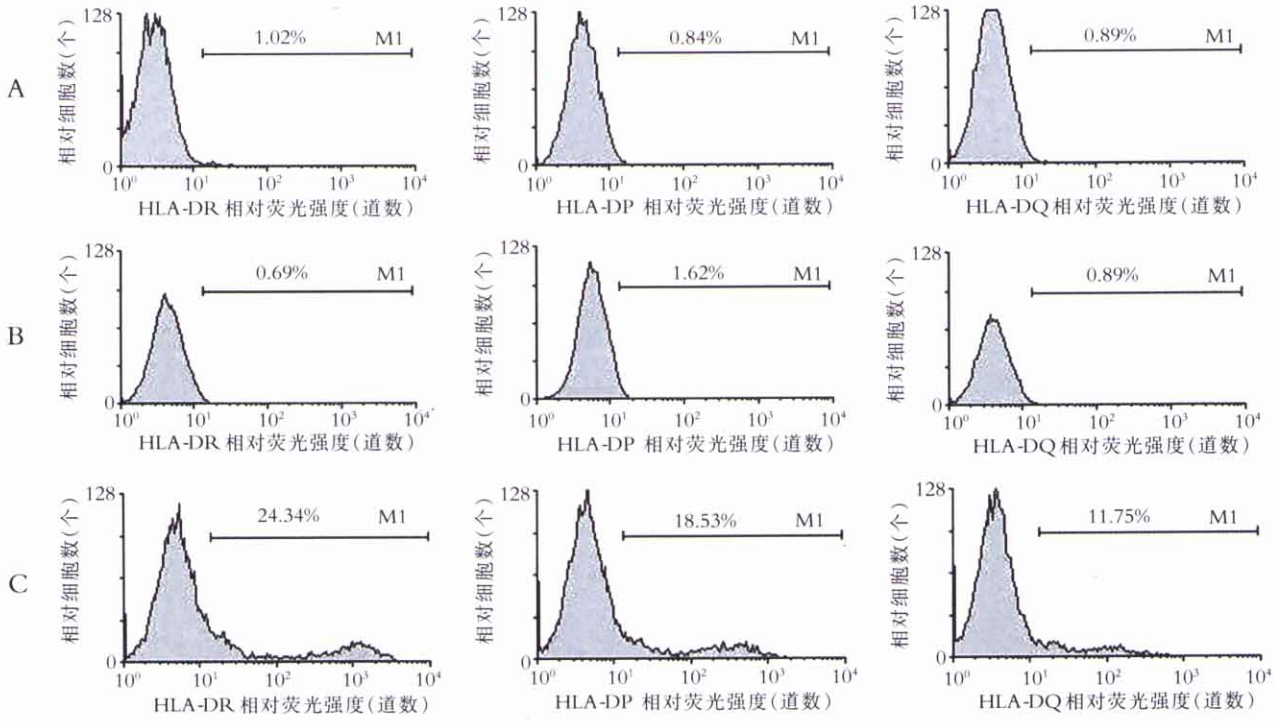
2.2 HepG2 细胞 3 种 HLA-Ⅱ类分子的表达

转染 CⅡTA cDNA 真核表达载体 EBS-NPL-CⅡTA 后的 HepG2 细胞表面有 3 种 HLA-Ⅱ类分子 HLA-DR、DP、DQ 的表达,而 HepG2 细胞本身及转染空载体 EBS-NPL 的 HepG2 细胞无 3 种 HLA-Ⅱ类分子的表达。细胞免疫荧光结果如图 2。流式细胞检测结果如图 3。



A：倒置显微镜下的 HepG2 细胞；B、C、D 均为荧光显微镜下的 HepG2 细胞，胞膜发绿色荧光的细胞为转染后分别表达 HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ 分子的细胞

图 2　转染真核表达载体 EBS-NPL-C Ⅱ TA 且标记 3 种 HLA-Ⅱ类分子的 HepG2 细胞　（倒置荧光显微镜 ×100）



A：HepG2 细胞；B：转染空载体 HepG2 细胞；C：转染真核表达载体 EBS-NPL-C Ⅱ TA 的 HepG2 细胞

图 3　HepG2 细胞本身、转染空载体及转染真核表达载体 EBS-NPL-C Ⅱ TA 的 HepG2 细胞 3 种 HLA-Ⅱ类分子的表达

3　讨论

一些免疫细胞如 B 淋巴细胞、树突状细胞可以组成性表达 HLA-Ⅱ类分子，但有些细胞只有在炎症因子的诱导下才可以表达此类分子[5]。Holling 等[6]认为肿瘤细胞缺乏 HLA Ⅱ类分子的表达与其 C Ⅱ TA 基因转录沉默有关。本研究证实了 HepG2 细胞本身不表达C Ⅱ TA mRNA 和 HLA Ⅱ类分子，但转染 EBS-NPL-C Ⅱ TA后就出现了 C Ⅱ TA mRNA 和 3 种 HLA Ⅱ类分子的表达，与 Sartoris 等[7]的研究结果一致，提示 HepG2 细胞不表达 HLA Ⅱ类分子与其缺乏 C Ⅱ TA 的表达有关，C Ⅱ TA 是调控 HepG2 细胞 HLA Ⅱ类分子表

达与否的关键因子。

很多肿瘤细胞都缺乏HLA-Ⅱ类分子的表达，降低了其免疫原性，如乳腺癌细胞不表达HLA-Ⅱ类分子，致使肿瘤细胞逃避机体的免疫监视[8]。Warabi等[9]报道结肠癌细胞也缺HLA-Ⅱ类分子的表达，而且与其肿瘤浸润性T淋巴细胞减少及肿瘤转移增加密切相关。Amstrong等[10]将CⅡTA基因转入肿瘤细胞，能有效增强肿瘤细胞HLA-Ⅱ类分子的表达，提高肿瘤细胞的免疫原性。本实验也显示CⅡTA基因的转入能使缺乏HLA-Ⅱ类分子的肝癌细胞株HepG2细胞恢复HLA-Ⅱ类分子的表达，可增强其免疫原性。因此本研究的结果具有一定的免疫学意义和临床应用前景，如可以利用CⅡTA生产肿瘤疫苗，激发机体产生抗肿瘤专一性的免疫应答来发挥抗肿瘤的作用，为肝癌的治疗提供新的方案。

参考文献：

[1] 张绪清. MHCII类反式激活因子与病毒感染的关系[J]. 免疫学杂志，2006，22(2)：230－232.

[2] Wright K L, Ting J P. Epigenetic regulation of MHC-II and CIITA genes[J]. Trends Immunol, 2006, 27(9): 405－412.

[3] Seliger B, Maeurer M J, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth[J]. Immunol Today, 2000, 21(9): 455－464.

[4] Meazza R, Comes A, Orengo A M, *et al*. Tumor rejection by gene transfer of the MHC class II transactivator in murine mammary adenocarcinoma cells[J]. Eur J Immunol, 2003, 33(5): 1183－1192.

[5] Harton J A, Ting J P. Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(17): 6185－6194.

[6] Holling T M, van-Eggermond M C, Jager M J, *et al*. Epigenetic silencing of MHC2TA transcription in cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(11): 1570－1576.

[7] Sartoris S, Valle M T, Barbaro A L, *et al*. HLA class II expression in uninducible hepatocarcinoma cells after transfection of AIR-1 gene product CIITA: acquisition of antigen processing and presentation capacity[J]. J Immunol, 1998, 161(2): 814－820.

[8] Shi B, Vinyals A, Alia P, *et al*. Differential expression of MHC class II molecules in highly metastatic breast cancer cells is mediated by the regulation of the CIITA transcription Implication of CIITA in tumor and metastasis development[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(4): 544－562.

[9] Warabi M, Kitagawa M, Hirokawa K. Loss of MHC class II expression is associated with a decrease of tumor-infiltrating T cells and an increase of metastatic potential of colorectal cancer: immunohistological and histopathological analyses as compared with normal colonic mucosa and adenomas[J]. Pathol Res Pract, 2000, 196(12): 807－815.

[10] Amstrong T D, Clements V K, Martin B K, *et al*. Major histocompatibility complex class II-transfected tumor cells present endogenous antigen and are potent inducers of tumor-specific immunity[J]. Proc Natl Acid Sci U S A, 1997, 94(13): 6886－6891.

（编辑　邓强庭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2007)21-2022-01

腹腔镜保守治疗后继发持续性异位妊娠1例

雷　玲　（第三军医大学野战外科研究所大坪医院妇产科，重庆 400042）

异位妊娠是最常见的妇科急症，以输卵管妊娠发病率最高，治疗以手术为主。输卵管妊娠的手术方式包括输卵管切除和输卵管保守手术。由于保守手术在保留患者生育功能方面较根治术更为有利，因此成为很多有生育要求的患者首选治疗方式，然而保守手术，不论采用开腹或是腹腔镜方式，都可能发生一种并发症，即持续性异位妊娠(persistent ectopic pregnancy, PEP)。据报道，剖腹术保守治疗后PEP的发生率约5%，而腹腔镜线性输卵管造口术后发生率为3%～20%[1]。多数学者认为PEP是输卵管妊娠保守手术或药物治疗后，患侧输卵管内残存的滋养细胞持续生长，或者输卵管妊娠根治术后，少数滋养细胞异位种植生长所致的滋养细胞持续活动，而使血清β-hCG水平下降缓慢或上升。PEP中，约有24%的患者可能导致急性内出血和输卵管破裂，比初始未破异位妊娠更危及生命，是导致再次治疗的重要原因，应该引起足够重视。下面报告1例PEP病例，是在腹腔镜下剖管取胚术后发生的。

1　临床资料

患者，31岁，孕4产0流3，因异位妊娠术后阴道出血53 d，检查发现盆腔包块1个月，于2006年3月12日入院。患者于2006年1月19日因"停经42 d，阴道不规则流血8 d，腹痛2 d，加重3 h"急诊入我院，盆腔B超见左侧附件区6.7 cm×4.7 cm大小混合占位，诊断为异位妊娠，遂急诊行腹腔镜手术，术中见左侧输卵管壶腹部膨大，直径约5 cm，行输卵管开窗取胚及输卵管通水术，手术顺利，术后予抗感染、止血、对症治疗。1月22日，患者恢复较好，遂出院，并嘱其1周后院外复查血β-hCG。出院后阴道每日少量出血，2月2日复查血β-hCG为205.2 mIU/ml，遂以来非司酮片150 mg/d，连用2 d后阴道出血量稍增多，伴间歇性左下腹隐痛，2月3日B超显示左附件区混

（下转2037页）

作者简介：雷　玲（1976－），女，重庆市璧山人，硕士，主治医师，讲师，主要从事高危妊娠方面的研究。电话：(023)68757649

收稿日期：2007-05-16；修回日期：2007-07-04