DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.015

文章编号:1000-5404(2000)03-0239-03

论著

核酶抑制表皮细胞HLA-Ⅰ类抗原表达的实验研究

杜太超,赵雄飞,赵阳兵,路淑珍,王 旭,黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要 目的:表皮细胞可表达HLA-Ⅰ类抗原,抑制其表达可望延迟其排斥反应。方法:我们将pLXRZ(Ribozyme-H的表达载体)用脂质体结合甘油休克法转染培养的表皮细胞,观察其对排斥反应的影响。结果:通过转染细胞的PCR产物证实pLXRZ已整合入细胞基因组DNA中,免疫组化染色显示转染细胞HLA-Ⅰ类抗原表达较弱,流式细胞术检测显示细胞表达HLA-Ⅰ类抗原总数减少。结论:Ribozyme-H的表达载体能够稳定存在于转染细胞中,Ribozyme-H能抑制表皮细胞HLA-Ⅰ类抗原的表达。

关键词 烧伤;表皮细胞;HLA-Ⅰ类抗原;Ribozyme-H
中图法分类号 R392.11 文献标识码 A

Inhibitory effects of ribozyme on expression of HLA class Ⅰ antigen in cultured keratinocytes

DU Tai-chao, ZHAO Xiong-fei, ZHAO Yang-bin, LU Shu-zhen, WANG Xu, LI Ao (Research Institute of Burn Injury, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effects of ribozyme on the expression of HLA class Ⅰ antigen in cultured keratinocytes. Methods: We transfected pLXRZ into cultured keratinocytes with Lipofect AMINE in combination with 10% glycerol shocking. Results: The PCR production of DNA obtained form transfected cells proved that pLXRZ was inserted into chromosome DNA of trasnsfected cells. Immunohistochemical staining displayed that transfected cells expressed weaker HLA class Ⅰ antigen and flow cytometry showed that transfected cells had less HLA class Ⅰ antigen than normal cells. Conclusion: Ribozyme-H expression vector can be inserted into chromosome DNA of epidermis and steadily exist. Ribozyme-H can inhibit expression of HLA class Ⅰ antigen in cultured epidermis.

Key words burns; epidermis; HLA class Ⅰ antigen; ribozyme-H

培养的人表皮细胞表达HLA-Ⅰ类抗原,在异体移植后仍能成为启动移植排斥反应的主要抗原,去除或削弱HLA-Ⅰ类抗原的表达有可能延长存活,本实验应用脂质体结合甘油休克的转染方法(另文报道)转染能切割HLA-HBC mRNA保守序列的核酶-H(Ribozyme-H)表达载体pLXRZ,观察其对HLA-Ⅰ类抗原表达的影响。

1 材料与方法

1.1 Ribozyme表达载体pLXRZ

由逆转录病毒载体pLXSN与Ribozyme-H cDNA构建而成。

1.2 细胞培养

取材于门诊手术新鲜包皮,采用组织块法培养细胞,取生长旺盛,形态良好的细胞作为靶细胞。

1.3 表皮细胞的基因转染

详细步骤见文献[1],大致如下:用报告基因pSV-β作为表达载体,采用Lipofect AMINE结合甘油休克法转染生长旺盛的细胞,取不同转染时间,不同的甘油休克浓度对表皮细胞进行转染,继续培养24 h后进行原位染色,转染阳性的细胞呈蓝

基金项目:国家自然科学基金资助项目(394707078)

作者简介:杜太超(1968.3),男,四川省南充市人,硕士,主治医师,主要从事皮肤移植方面的研究,发表论文6篇。现在北京黄寺美容外科医院,北京 100011。电话:(010)66367975

收稿日期:1999-06-14;修回日期:1999-12-22

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

色,用图像分析仪测定转染效率,其中 Lipofect AMINE 结合10%甘油休克法转染率最高达到4%。然后用此稳定有效的方法转染 pLXRZ 进入表皮细胞。

1.4 转染细胞的检测

1.4.1 PCR 检测转染细胞内 pLXRZ 整合情况 根据设计的特异引物,其序列为:正向引物(5′端)5′-AATTCTCTCAGGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGGGGCTG-3′,反身引物(3′端)5′-AGTCAGCCATGGGGCGGAGAATG-3′理论上可扩增出293 bp的 DNA 片段。

1.4.2 HLA-ABC 免疫组化染色检测(FACS)细胞膜 HLA-ABC 抗原表达情况 抗 HLA-ABC 单克隆抗体(购自邦定生物医学公司)链霉素亲生物蛋白过氧化酶免疫组化染色(S-P 染色),参照试剂盒说明书。

1.4.3 流式细胞仪检测细胞 HLA-ABC 抗原总量 各取正常细胞及转染细胞 10^4 个,乙醇固定后用荧光标记的 HLA-ABC 单克隆抗体进行 FACS 检测,结果见表1、2。

表1 正常表皮细胞与转染表皮细胞 FACS 检测结果

Tab 1 Results of normal cultured and transfected epidermic cells by FACS

Epidermocyte	n	Mean fluorescent intensity($\bar{x} \pm s$)
Normal cultured	10	72 ± 0.34
Transfected	10	63.6 ± 0.51*

*: $P < 0.05$ *vs* control

表2 正常表皮细胞 FACS 动态测定

Tab 2 Dynamic results of normal cultured epidermocytes by FACS

Cultured time(d)	n	Mean fluorescent intensity($\bar{x} \pm s$)
3	10	73 ± 0.23
7	10	72 ± 0.17
10	10	70 ± 0.05

2 结果

2.1 pLXRZ 基因转染表皮细胞的 PCR 鉴定

针对 pLXRZ 中 Ribozyme-H 的 cDNA 序列,通过计算机软件辅助设计了两条引物,理论上在这两条上下游引物互补位点之间应扩增出长度为293 bp 的 DNA 片段,实验中我们对转染表皮细胞和正常细胞的基因组 DNA 进行特异性扩增,结果发现转染组表皮细胞能扩增出长度为293 bp 的目的 DNA 片段,与理论推算值相符合,而正常细胞的 DNA 未扩增出特异片段,这说明 pLXRZ 基因确实已通过转染进入了表皮细胞内并整合到表皮细胞基因组 DNA 中稳定存在,为进一步的基因表达提供了有力的佐证,结果见图1。

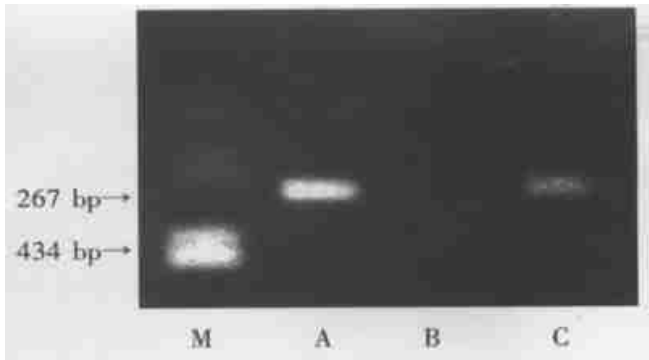


图1 PCR 检测转染细胞及正常细胞 DNA

Fig 1 DNA analysis of the transfected and normal cultured keratinocytes by PCR

M: PBR 322Hae 3 marker 434 bp, 267 bp; A, C: Transfected keratinocytes; B: Normal keratinocytes

2.2 免疫组织化学染色测定转染表皮细胞 HLA-Ⅰ类抗原表达情况

收获于同一时相点(转染后7 d)的表皮细胞在正常对照组中其 HLA-Ⅰ类抗原分布表现出较强、均匀的染色,提示未经转染的表皮细胞表达 HLA-Ⅰ类抗原不受影响,而转染组的表皮细胞中呈现染色强弱交替存在,且强染色区与弱染色区均呈簇状分布。染色强弱的差异提示它们表达 HLA-Ⅰ抗原水平的差异。结果见图2。

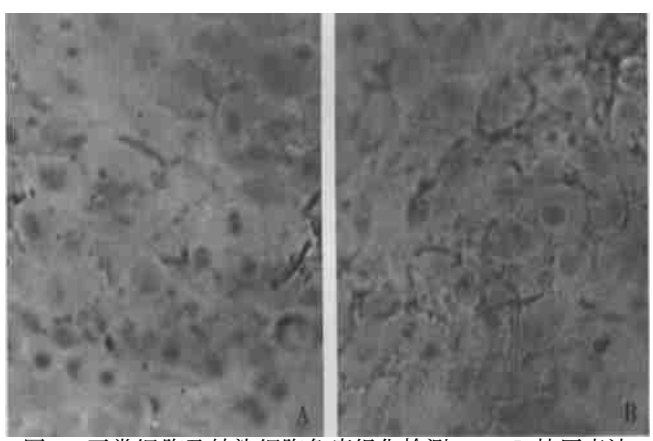


图2 正常细胞及转染细胞免疫组化检测 HLA-Ⅰ抗原表达

Fig 2 Comparison of HLA-Ⅰ Ag expression in normal cultured and transfected keratinocytes cells with immunohistochemical method

A: Transfected cultured keratinocytes of epidermal cells

B: Normal cultured keratinocytes of epidermal cells

2.3 FACS 测定表皮细胞 HLA-Ⅰ类抗原表达情况

流式细胞术检测了正常表皮细胞,转染表皮细胞同一时相点(转染后7 d)表皮细胞及正常表皮细胞 HLA-Ⅰ类抗原表达情况,以及正常细胞在不同培养时相其 HLA-Ⅰ类抗原表达变化情况。结果表明,正常表皮细胞的平均荧光强度高于转染表皮细胞,见表1。而正常培养表皮细胞在培养3、7、10 d 后的平

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

均荧光强度变化差异不明显, 见表 2。这就排除了短期培养的表皮细胞本身在 HLA-Ⅰ类抗原表达变化对实验结果的影响。由此可以说明转染表皮细胞 HLA-Ⅰ类抗原的表达变化是由处理因素引起的。

3　讨论

Ribozyme是一类具有生物催化活性的 DNA 分子, 在没有蛋白质的参与下能与互补 RNA 序列结合并能催化切割该段序列中磷酸二脂键的 RNA 分子[2]。因此, Ribozyme 只能切割特异性的靶 RNA 分子, 在切割时还需要二价阳离子等的存在, 切割靶 RNA 后, 又可将被切割的产物从 Ribozyme 解脱下来而又去结合另外相同的序列进而继续切割靶序列[3]。Ribozyme可以被人为设计, 使其与靶基因的 RNA 分子互补, 将其转入细胞后, 就可以特异性地切割目标 RNA 分子, 达到治疗目的。赵雄飞等[4] 通过计算机基因库筛选, 在目前发现的所有编码 HLA-A、HLA-B、HLA-C 的基因序列中选择了一段非常保守的序列作为 Ribozyme-H 的切割靶序列, 其间含有 Ribozyme-H 识别的切割三联体 CUC, 其侧翼序列与所设计的 Ribozyme-H 结合区互补。在他们的实验中, 经 Ribozyme-H 体外转录载体与 HLA-B 7 体外转录载体转录的 HLA-B 7 mRNA 进行的体外切割实验表明, 所设计的 Ribozyme-H 能将HLA-B 7 mRNA 特异性地切割成两段, 并观察到通过逆转录病毒载体将其导入 HeLa 细胞后可使细胞内完整的 HLA-Ⅰ类 mRNA 减少, HLA-ABC 抗原的表达明显减弱[4]。

在器官移植的排斥反应中, 供体的抗原要作用于受体的免疫效应细胞, 在培养表皮细胞异体移植中, 虽由于表达 HLA-Ⅱ类抗原的 Langerhan′s 细胞的消失存活期有所延长, 但 HLA-Ⅰ类抗原仍广泛表达在几乎所有表皮细胞膜上, 成为在皮片异体移植的过程中引导排斥反应的主要抗原。国外文献报道有人用经单克隆抗体阻断 rIFN 受体的方法制备 HLA-Ⅰ类抗原表达减弱的肝癌细胞移植异体小鼠后无排斥现象的发生[5]。Wu 等[6] 用抗小鼠 HLA-Ⅰ类抗原的β2-m 的单抗处理皮肤, 阻止 T 细胞攻击移植物而存活期明显延长。同样, 无 HLA-Ⅰ类抗原的肾脏异体移植后的功能较HLA-Ⅰ类抗原不合者有明显改善[7]。因此, 减弱或消除移植物内HLA-Ⅰ抗原可有效地减弱CTL 细胞对移植物的攻击。

分子生物学技术的发展使我们可在分子水平干预细胞 HLA 抗原的表达, 如果通过基因工程技术在体外预先对移植物细胞内 HLA 抗原的表达进行调节, 尽可能抑制其表达, 减弱或消除细胞表面的 HLA 分子, 减轻受体免疫系统对异体移植细胞的攻击, 有可能延长移植物的存活时间[8]。

外源基因在细胞内的转录和表达, 它必须稳定存在于细胞内并整合入细胞基因组 DNA 中。本实验通过将 Ribozyme-H 的表达载体 pLXRZ 采用脂质体结合甘油休克法转染培养人原代表皮细胞, 通过对转染细胞基因组 DNA 的 PCR 鉴定, 得到了与理论计算大小符合的 DNA 片段, 从而证实了细胞内外源基因的稳定存在, 对转染阳性的表皮细胞和正常表皮细胞共同存在的细胞群体进行免疫组化染色, 结果提示抗原表达强弱的表皮细胞相间存在, 多呈克隆分布, 证明经转染处理的细胞部分实现转染而引起该细胞的 HLA-Ⅰ类抗原表达减少, 流式细胞术检测正常表皮细胞, 转染表皮细胞的结果进一步说明了转染表皮细胞 HLA-Ⅰ类抗原低于正常表皮细胞。通过上述实验初步观察到 Ribozyme-H 对表皮细胞 HLA-Ⅰ类抗原表达有一定的下调趋势, 证明用 Ribozyme-H 干预表皮细胞 HLA-Ⅰ类抗原表达合成的思路是可行的。

参考文献

[1] 杜太超, 赵雄飞, 路淑珍, 等. 一种稳定有效的表皮细胞基因导入方法的确立[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(9): 674—676.

[2] Bratty J, Ferbeyre G, Chartrard P, *et al*. The hammerhead RNA domain a model ribozyme[J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1 216(3): 345—349.

[3] Ruffner R, Duane E, Gary D T, *et al*. Sequence reqirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction[J]. Biochemistry, 1990, 29(47): 10 695-10 702.

[4] 赵雄飞, 赵阳兵, 徐小珂, 等. 下调人类细胞 HLA-Ⅰ类抗原的表达的初步试探[J]. 生物技术通报, 1997, 8(3~4): 136—137.

[5] Dighe A S, Richards E, Old L J, *et al*. Enhance in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative γIFN receptor[J]. Immunity, 1994, 1(6): 447—456.

[6] Wu J, Dino B, Liu M, *et al*. A novel approach to extend the survival of skin xenografts without entailling general immunosuppression or systemic toxicity[J]. Burns, 1993, 19(4): 289—296.

[7] Rpbert W O, Nancy L A, Peter G S, *et al*. Prolongation of *in vivo* mouse isl*et al*lograft survival by modulation of HLA class I antigen[J]. Transplantation, 1994, 57(6): 783—788.

[8] Coffman J, Geier S, Ibrahim S, *et al*. Improved renal function in mouse kidney allografts backing HLA class I antigens[J]. J Immunol, 1993, 151(1): 425—435.

(编辑　冯崇英)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net