

乳腺癌多药耐药细胞人类白细胞抗原和B7分子表达的体外调节

近年研究表明,肿瘤细胞逃避机体免疫系统识别和攻击的重要分子机制之一是肿瘤细胞和肿瘤浸润性淋巴细胞人类白细胞抗原(HLA)和/或免疫共刺激分子B7-1(CD80)、B7-2(CD86)表达水平降低[1][2][3][4]。我们研究发现,乳腺癌多药耐药细胞HLA-I类分子表达明显低于敏感细胞,HLA-DR呈低水平表达并与敏感细胞存在差异,提示多药耐药细胞比敏感细胞更容易逃避机体的免疫识别和攻击[5]。国内外有关调控乳腺癌多药耐药细胞HLA和B7表达的研究未见报道,我们对此进行了研究,为探索逆转多药耐药乳腺癌HLA和B7相关免疫逃避问题提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞株

以人乳腺癌阿霉素耐药株MCF-7/ADR及其亲本细胞MCF-7(购自北京肿瘤研究所)为研究对象,DMEM(Hyclone Co., USA)细胞培养基、10%(体积分数)胎牛血清(Hyclone Co., USA)和L-谷氨酰胺(Fraco Co.)配制成培养液,将上述细胞株置于37℃、5%(体积分数)CO₂饱和湿度下常规培养传代。耐药细胞培养液中加入盐酸阿霉素(ADR,日本美露香株式会社,批号9804E2),浓度为2 ng/L。观察细胞生长状况并保持细胞生长良好。

1.2 检测试剂和仪器

荧光素(FITC)标记的鼠抗人HLA-I mAb(IgG-2a)、HLA-DR mAb(IgG-2b)、CD80(B7-1) mAb(IgM)、CD86(B7-2) mAb(IgG1)以及FITC标记的同型阴性对照mAb鼠IgG-2a、IgG-2b、IgM、IgG1购自加拿大Caltag Laboratories。FITC直接标记的鼠抗人多药耐药糖蛋白(P-170) mAb(IgG1)和FITC标记鼠IgG1阴性对照mAb购自法国Immune Tech Co.。所用流式细胞仪(FCM)为美国BD公司生产的ELITE临床应用研究型流式细胞仪。

1.3 耐药性鉴定

应用改良的四甲基偶氮唑盐(MTT)法[5][6]进行耐药性检测,观察MCF-7/ADR及MCF-7细胞对ADR和硫酸长春新碱(VCR,广州明星制药厂,批号990521-1)的半数抑制浓度值(IC₅₀)并进行比较。采用FITC直接标记鼠抗人P-170 mAb(IgG1, UIC-2;对照mAb为FITC标记鼠IgG1, Immune Tech Co.)检测两种细胞P-170表达并进行比较。

1.4 重组干扰素- α 2b(rhIFN- α 2b)适宜浓度实验

取对数生长期的MCF-7/ADR细胞,制成单细胞悬液,细胞计数 1×10^4 个/ml;按每瓶10 ml常规分瓶,37℃、5%(体积分数)CO₂饱和湿度下培养24 h,再加入新配制的rhIFN- α 2b(美国Schering-Plough公司生产),使培养液中IFN浓度分别为0、10、100、1 000、10 000和100 000(IU/ml),观察细胞生长状态。应用MTT法检测并比较不同浓度rhIFN- α 2b对MCF-7/ADR细胞生长的抑制率[IR=(1-检测组D₅₇₀平均值/空白对照组D₅₇₀平均值)×100%],以IR值为纵坐标,以药物浓度对数(lgX)为横坐标作图,确定对MCF-7/ADR细胞生长无明显影响的适宜浓度。

1.5 rhIFN- α 2b作用后HLA和B7表达的检测

应用FITC-mAb直接标记的FCM检测技术检测MCF-7/ADR细胞经rhIFN- α 2b不同浓度(0、100、400、800 IU/ml)处理0、12、24和48 h后HLA和B7表达。检测样品单细胞悬液的制备和免疫荧光标记按试剂说明书进行。为了减少和消除误差,实验设计者和FCM检测人员采取双盲法,重复实验3次。

1.6 数据分析与处理

应用SPSS10.0对数据进行统计分析,检验方法为单向方差分析,比较MCF-7/ADR及MCF-7细胞IC₅₀值和P-170表达阳性细胞百分率(positive expression cell rate, PECC)和平均相对荧光强度(relative linear fluorescence intensity, RLFI)的变化;比较MCF-7/ADR细胞经rhIFN- α 2b不同浓度和作用时间处理前后细胞增值抑制率、HLA和B7表达PECC、平均RLFI的变化。

2 结果

2.1 MCF-7/ADR细胞的耐药性

体外药敏试验(MTT法)结果表明,ADR、VCR对MCF-7的半数抑制浓度IC₅₀分别为(0.52±0.18)、(0.75±0.41) μg/ml;对MCF-7/ADR细胞IC₅₀分别为(25.75±5.84)、(10.44±1.57) μg/ml,是MCF-7细胞的49.5、13.9倍。FCM检测结果表明,MCF-7细胞P-170

的PECR和平均RLFI分别为3.38%和5.13±3.27, MCF-7/ADR细胞分别为85.3%和40.65±5.54。MCF-7/ADR细胞P-170的PECR和平均RLFI明显高于敏感细胞。

2.2 rhIFN- α 2b对MCF-7/ADR细胞生长的影响

MTT检测结果(图1)显示,当浓度小于 1×10^3 IU/ml时, rhIFN- α 2b对MCF-7/ADR细胞生长无明显影响($P > 0.05$),当浓度达 1×10^4 IU/ml时, MCF-7/ADR细胞生长受到明显抑制。

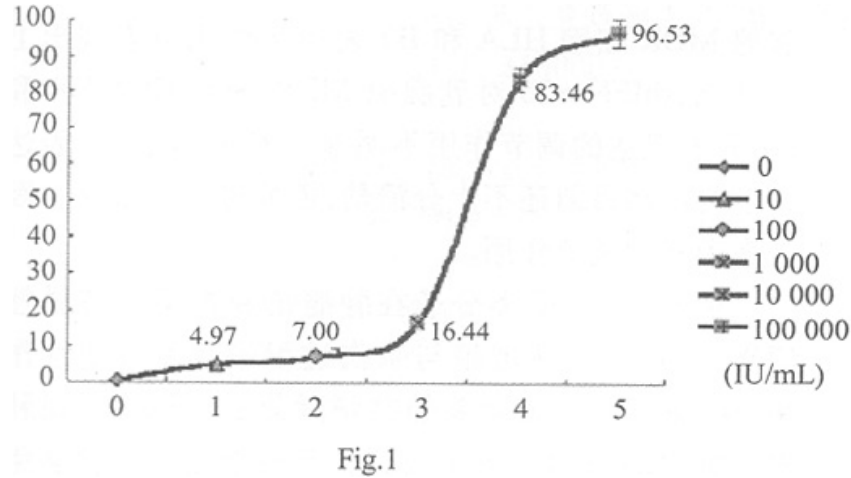


图1 rhIFN- α 2b抑制MCF-7/ADR细胞生长的对数浓度曲线

Fig.1 Growth inhibition-logarithmic concentration curve of MCF-7/ADR cell line treated with rhIFN- α 2b

2.3 rhIFN- α 2b调节HLA和B7表达的时效关系

FCM检测rhIFN- α 2b调节MCF-7/ADR细胞HLA和B7表达的时间-效应关系见图2。rhIFN- α 2b调节MCF-7/ADR细胞HLA和B7表达的高峰时间为用药后24 h左右。经rhIFN- α 2b处理后, MCF-7/ ADR细胞HLA- I 和DR表达的PECR和平均RLFI以24 h最高(分别为94.4%, 89.85±12.45; 31.48%, 24.51±6.33, $P < 0.001$)。rhIFN- α 2b(400 IU/ml)对HLA- I、HLA-DR表达调节作用较为明显(与加药前比较, $P < 0.001$),而对B7表达调节作用较弱(与加药前比较, $P < 0.05$)。

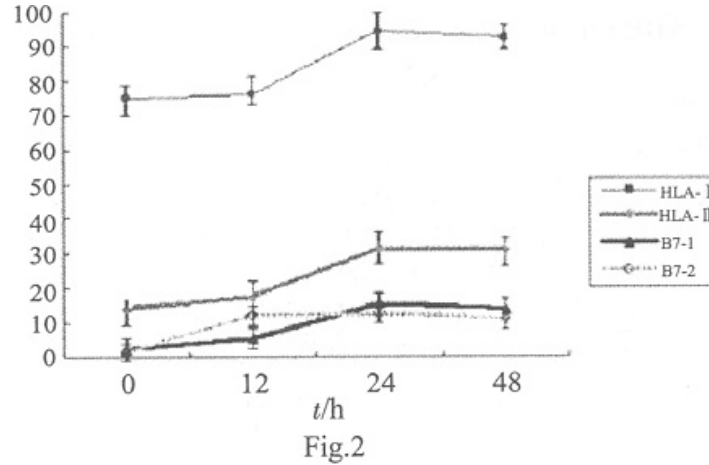


图2 rhIFN- α 2b(400 IU/ml)调节MCF-7/ADR细胞HLA和B7表达的时效关系

Fig.2 Time-effect curves of HLA and B7 expression after administration with rhIFN- α 2b (400IU/ml) in MCF-7/ADR cell line

2.4 rhIFN- α 2b调节HLA和B7表达的量效关系

经适当浓度rhIFN- α 2b(100、400和800 IU/ml)处理24 h后, MCF-7/ADR细胞HLA和B7表达变化见图3和表1。其中HLA- I类和II类分子表达的PECR升高比较明显($P < 0.05$, $P < 0.005$); B7-1变化不明显; B7-2有升高($P < 0.005$)。当rhIFN- α 2b浓度为400和800 IU/ml时作用较明显。

经不同浓度(100、400和800 IU/ml)rhIFN- α 2b处理后, MCF-7/ADR细胞HLA- I类平均RLFI变化较明显,由处理前的 57.77 ± 7.55 升至 79.29 ± 8.34 、 79.85 ± 10.23 和 89.85 ± 12.45 ($P < 0.005$); HLA- II类和B7-2分子平均RLFI亦有不同程度升高,但B7-1平均RLFI变化不明显(图3)。

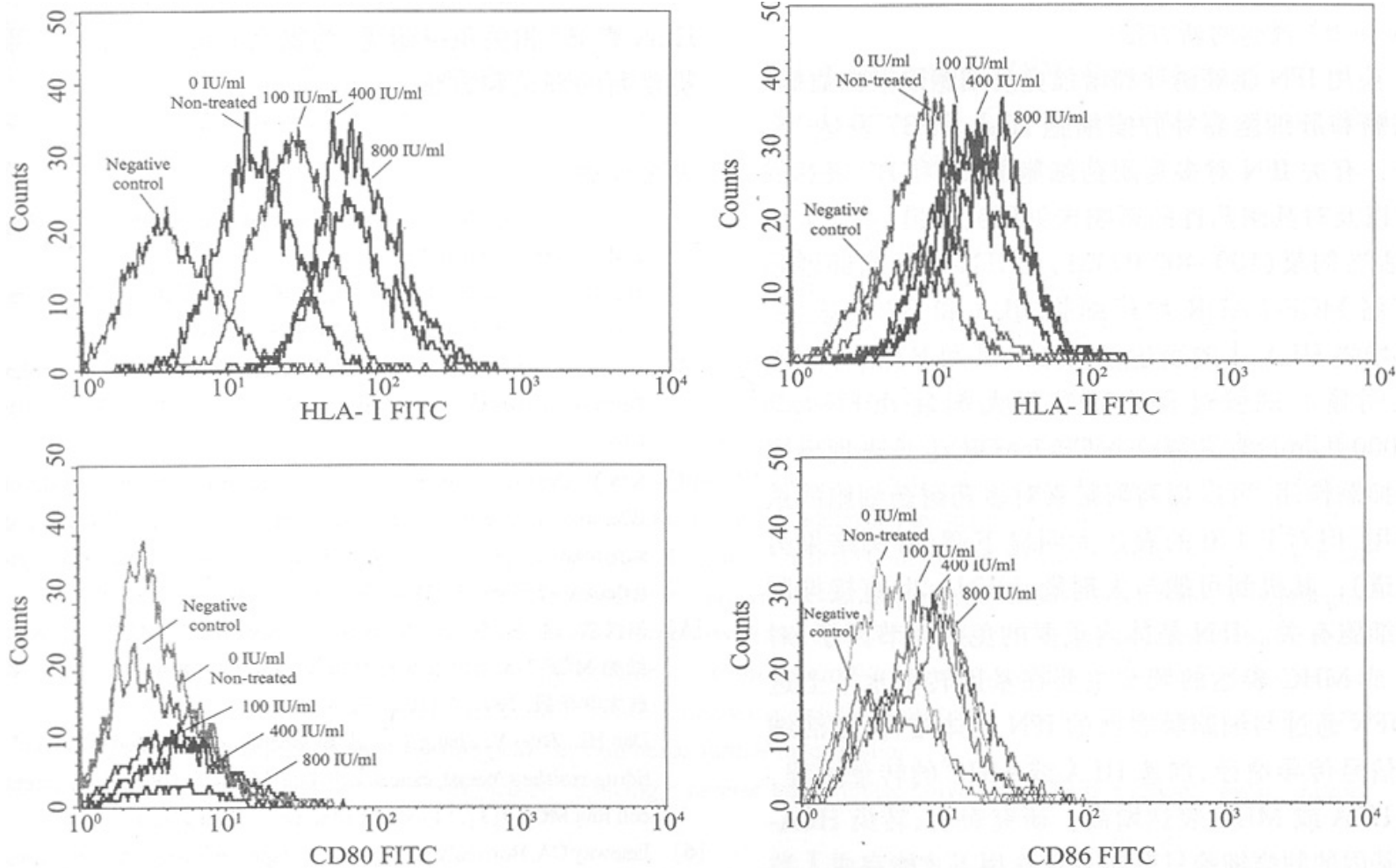


图3 rhIFN- α 2b对MCF-7/ADR细胞HLA和B7表达调节的量效关系(FCM检测结果)

Fig.3 Dose-effect relationship of HLA and B7 expression in MCF-7/ADR cell line detected by flow cytometry after administration with rhIFN- α 2b

表1 不同浓度 rhIFN- α 2b 对 MCF-7/ADR 细胞 HLA 和 B7 表达的阳性细胞百分率($n=3$, %, $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Positive cell ratios of HLA and B7 in MCF-7/ADR cell line after administration with rhIFN- α 2b ($n=3$, %, $Mean \pm SD$)

Cell groups	Concentrations of rhIFN- α 2b (IU/ml)			
	0	100	400	800
HLA-I	76.26+7.55	78.12+8.34	87.48+12.45*	83.98+10.37*
HLA-II	13.92+5.23	24.26+9.02*	31.48+6.33*	30.00+4.68*
B7-1 (CD80)	2.42+1.28	1.91+2.71	3.33+3.92	2.62+1.27
B7-2 (CD86)	1.28+0.81	3.01+2.44	4.62+2.81	8.68+4.45*

* $P < 0.05$, * $P < 0.005$ vs A total of count 5 000 cells was counted for each test by FCM; n: Times of test.

3 讨论

肿瘤免疫耐受的机制主要包括：(1) 肿瘤细胞和免疫细胞低表达免疫识别与效应分子(如HLA和B7)；(2) 基于Fas-FasL和杀伤细胞抑制性受体的肿瘤细胞凋亡和杀伤机制异常；(3) 肿瘤侵袭破坏免疫系统或产生免疫抑制因子等。HLA和B7是免疫识别和免疫效应的重要分子，特别是在启动特异性T细胞抗肿瘤免疫过程中，HLA和B7分子不可缺少[1][2][3]。增强HLA和B7表达、纠正机体免疫细胞和肿瘤细胞HLA和B7异常表达，成为逆转肿瘤免疫耐受、提高肿瘤免疫治疗效果的研究热点。一些实验研究显示，应用细胞因子或转基因方法可不同程度增强肿瘤细胞HLA和B7表达，并具有一定的抗肿瘤作用[1][2]。然而，由于人体HLA和B7分子的复杂性和个体差异性、现有转基因技

术的缺陷等问题, 人体内HLA和B7基因靶向转染比较困难, 特别是多基因和长序列基因转染效率低、表达时间短, 也不能同时纠正荷瘤机体免疫细胞存在的HLA和B7表达异常等问题, 必须进一步研究增强肿瘤细胞和机体免疫细胞HLA和B7表达的新方法。

应用IFN能够诱导和增强免疫细胞以及白血病、肺腺癌和肝细胞癌等肿瘤细胞HLA和B7表达[7][8][9]。但是, 有关IFN对多药耐药细胞HLA和B7表达的作用以及对其耐药性的影响未见研究报道。本研究发现, 适当剂量(100~400 IU/ml)的IFN- α 2b能够增强乳腺癌MCF-7/ADR耐药细胞HLA和B7表达, 主要是增强HLA-I的表达, 对HLA-II和B7的作用不是很明显。试验过程中还发现大剂量rhIFN- α 2b(10 000 IU/ml)对乳腺癌MCF-7/ADR生长表现出明显的抑制作用, 可以提高阿霉素对多药耐药细胞的杀伤作用, 但对P-170的表达无明显下调(有关结果另文报道), 其机制可能与大剂量rhIFN- α 2b直接抑制肿瘤细胞有关。IFN是体内重要的免疫调节因子, 对HLA或MHC表达的调节主要在基因转录水平上进行。IFN通过与细胞膜表面的IFN受体结合, 激活细胞内信号传导途径, 加速HLA或MHC的转录过程, 引起HLA或MHC表达增高。研究表明, 转染HLA-I类基因的肿瘤细胞只有在IFN作用下才能完成I类抗原重链和轻链分子组装[10]。这说明肿瘤细胞HLA-I类抗原表达的下调不仅与基因的转录有关, 而且I类抗原分子组装及输送至细胞表面表达所必需的基因(如多肽输送基因)也可能被抑制。IFN能够同时调节HLA-I以及多肽输送基因的表达, 显示应用IFN等细胞因子调节HLA或MHC的表达比单纯转基因在调节范围和效能等方面具有一定的优越性。

在免疫调节研究中发现, I型IFN(IFN- α 、 β)主要促进免疫细胞HLA-I类抗原的表达, II型IFN(IFN- γ)能广泛促使各种类型细胞表达MHC-II类抗原, 从而很大程度上放大了免疫应答的识别阶段[1][2][10]。乳腺癌MDR细胞主要表现为HLA-I表达的下调。我们研究rhIFN- α 2b不同剂量和不同作用时间对乳腺癌MDR细胞HLA和B7表达的作用也表现出上述特点, rhIFN- α 2b对乳腺癌MDR细胞HLA-DR和B7分子表达的调节作用不明显, 有关B7基因表达调节的机制目前还不十分清楚, 需要进一步研究多因子多因素的调节作用。

由于HLA-I类分子在肿瘤抗原提呈、特异性CD8⁺CTL的激活增殖与杀伤过程中具有决定性作用, B7分子亦是最重要的共刺激分子, 因此, 增强肿瘤细胞HLA和B7分子表达, 有可能是增强肿瘤免疫原性、逆转肿瘤免疫耐受、促进抗肿瘤免疫的重要措施之一。尽管HLA和B7表达调节的机制仍不十分清楚, 目前仍然未找到理想的方法调节HLA和B7表达, 但是, 对HLA和B7表达调节的深入研究, 将有助于人为控制肿瘤细胞HLA和B7表达, 逆转HLA和B7相关免疫耐受, 为提高肿瘤免疫治疗效果提供新的理论和方法。

参考文献:

- [1] Klein J, Sato A. The HLA system (Second of two parts) [J]. N Engl J Med, 2000, 343(11): 782-6.
- [2] Harris NL, Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity[J]. Immunol Cell Biol, 1999, 77(4): 304-11.
- [3] Gao GF, Tormo J, Gerth UC, et al. Crystal structure of the complex between human CD8 α and HLA-A2[J]. Nature, 1997, 387(6633): 630-4.
- [4] Sun Y, Qian C, Peng D, et al. Gene transfer to liver cancer cells of B7-1 plus interleukin 12 changes immunoeffector mechanisms and suppresses helper T cell type 1 cytokine production induced by interleukin 12 alone[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(1): 127-38.
- [5] 但汉雷, 赵燕, 张健, 等. 多药耐药细胞MCF-7/ADR及其亲本细胞MCF-7人类白细胞抗原和B7表达的对比研究[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(10): 731-4.
- [6] Dan HL, Zhao Y, Zhang J, et al. Expression of HLA and B7 in multidrug-resistant breast cancer cell line MCF-7/ADR and its parent cell line MCF-7[J]. J First Mil Med Univ, 2001, 21(10): 731-4.
- [7] Janeway CA, Borromly K. Signals and signs for lymphocyte responses[J]. Cell, 1994, 76(2): 275-86.
- [8] Yano T, Fukuyama Y, Yokoyama H, et al. HLA class I and Class II expression of pulmonary adenocarcinoma cells and the influence of interferon gamma[J]. Lung Cancer, 1998, 20(3): 185-90.
- [9] Costello RT, Mallet F, Sainty D, et al. Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(1): 90-103.
- [10] Tatsumi T, Takehara T, Katayama K, et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1997, 25(5): 1108-14.
- [11] Boehm U, Klamp T, Groot M, et al. Cellular responses to interferon- gamma[J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15(1): 749-95.

参考文献:

- [1] Klein J, Sato A. The HLA system (Second of two parts) [J]. N Engl J Med, 2000, 343(11): 782-6.
- [2] Harris NL, Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity[J]. Immunol Cell Biol, 1999, 77(4): 304-11.
- [3] Gao GF, Tormo J, Gerth UC, et al. Crystal structure of the complex between human CD8 α and HLA-A2[J]. Nature, 1997, 387(6633): 630-4.
- [4] Sun Y, Qian C, Peng D, et al. Gene transfer to liver cancer cells of B7-1 plus interleukin 12 changes immunoeffector mechanisms and suppresses helper T cell type 1 cytokine production induced by interleukin 12 alone[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(1): 127-38.
- [5] 但汉雷, 赵燕, 张健, 等. 多药耐药细胞MCF-7/ADR及其亲本细胞MCF-7人类白细胞抗原和B7表达的对比研究[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(10): 731-4.
- [6] Dan HL, Zhao Y, Zhang J, et al. Expression of HLA and B7 in multidrug-resistant breast cancer cell line MCF-

7/ADR and its parent cellline MCF-7[J]. J First Mil Med Univ, 2001,21(10): 731-4.

[6] Janeway CA, Borromly K. Signals and signs for lymphocyte responses[J]. Cell, 1994, 76(2): 275-86.

[7] Yano T, Fukuyama Y, Yokoyama H, et al. HLA class I and Class II expression of pulmonary adenocarcinoma cells and the influence of interferon gamma[J]. Lung Cancer, 1998, 20(3): 185-90.

[8] Costello RT, Mallet F, Sainty D, et al. Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(1): 90-103.

[9] Tatsumi T, Takehara T, Katayama K, et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1997, 25(5): 1108-14.

[10] Boehm U, Klamp T, Groot M, et al. Cellular responses to interferon- gamma[J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15(1): 749-95.

[回结果列表](#)