

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

但汉雷¹, 赵燕², 张健², 张积仁¹ (第一军医大学南方医院全军消化病研究所, 广东广州 510515; ²第一军医大学珠江医院全军肿瘤医学中心, 广东广州 510282)

摘要:目的 研究乳腺癌多药耐药细胞人类白细胞抗原(HLA)和免疫共刺激分子 B7-1(CD80)、B7-2(CD86)表达的可调控性。方法 应用免疫荧光 FITC-抗体直接标记的流式细胞检测技术(FCM)检测乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 经重组人干扰素- α 2b(rhIFN- α 2b)不同浓度(0、100、400、800 IU/ml)和不同作用时间(0、12、24 和 48 h)处理后 HLA 和 B7 表达及其变化。结果 rhIFN- α 2b 在浓度小于 1×10^3 IU/ml 时对 MCF-7/ADR 细胞生长和增值无明显影响。经 rhIFN- α 2b (400 IU/ml)处理, MCF-7/ADR 细胞 HLA 和 B7 表达的阳性细胞百分率(PECR)有不同程度升高,以 24 h 时比较明显。当不同浓度 rhIFN- α 2b (100、400、800 IU/ml)处理 24 h 后, MCF-7/ADR 细胞 HLA-I 表达的 PECR 由未处理时的 (76.26 \pm 7.55)% 升至 (78.12 \pm 8.34)%、(87.84 \pm 12.45)%、(83.98 \pm 10.37)% ($P < 0.05$)。HLA-DR 由未处理时的 (13.92 \pm 5.23)% 升至 (24.26 \pm 9.02)%、(31.48 \pm 6.33)%、(30.00 \pm 4.68)% ($P < 0.005$)。B7-1 变化不明显,分别为 (2.42 \pm 1.28)%、(1.91 \pm 2.71)%、(3.33 \pm 3.92)% 和 (2.62 \pm 1.27)% ($P > 0.05$)。B7-2 由未处理时的 (1.28 \pm 0.81)% 升至 (3.01 \pm 2.44)%、(4.62 \pm 2.81)% 和 (8.68 \pm 4.45)% ($P < 0.05$)。平均相对荧光强度(RLFI)以 HLA-I 变化最为明显,由未处理时的 57.77 \pm 7.55 升至 79.29 \pm 8.34、79.85 \pm 10.23 和 89.85 \pm 12.45 ($P < 0.001$)。HLA-DR 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。结论 rhIFN- α 2b 能够增强乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 的 HLA 和 B7 表达,其作用呈明显的剂量和时间依赖关系。应用细胞因子有可能逆转乳腺癌多药耐药细胞 HLA 和 B7 的免疫耐受。

关键词: 乳腺肿瘤; HLA 抗原; 免疫共刺激分子; 干扰素; 抗药性; 多药

中图分类号: R394; R737.902 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2002)02-0107-04

In vitro regulation of HLA and B7 expression in multidrug-resistant breast cancer cells

DAN Han-lei¹, ZHAO Yan², ZHANG Jian², ZHANG Ji-ren²

¹Institute of Digestive Disease of PLA, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Oncology Center of PLA, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To study the modulation of the expressions of human leucocyte antigen (HLA) and co-stimulatory molecules B7 (CD80, CD86) in multidrug-resistant (MDR) breast cancer cells. **Methods** The MDR phenotype MCF-7/ADR cells were treated with recombinant human interferon (IFN)- α 2b (rhIFN- α 2b) at different doses for varied length of time, and the expressions of HLA and B7 were determined by flow cytometry (FCM) and compared with those of non-treated cells. Statistical analysis was performed using SPSS10.0 software. **Results** At the doses smaller than 1×10^3 IU/ml, rhIFN- α 2b did not exhibit significant inhibition on MCF-7/ADR cell growth, but HLA and B7 expressions were enhanced in a dose- and time-dependent fashion and significant up-regulation occurred 24 h after 400 IU/ml rhIFN- α 2b treatment. Treatment with rhIFN- α 2b at the doses of 100, 400, 800 IU/ml respectively for 24 h produced significant increases in the positive cell ratios for HLA class I expression ($P < 0.05$), HLA-DR expression ($P < 0.005$) and B7-2 expression ($P < 0.05$), while changes in B7-1 expression was not obvious ($P > 0.05$). The mean relative linear fluorescence intensity (RLFI) of HLA class I was also significantly increased ($P < 0.001$) but alterations in the mean RLFI of HLA-DR and B7 were not significant. **Conclusions** rhIFN- α 2b within the dose range from 400 to 800 IU/ml can effectively enhance the expression of HLA and B7 molecules, suggesting that it may have the potential to reverse immune tolerance of breast cancer cells. Cytokine treatment may be effective in reversing immune tolerance caused by down-expression of HLA and B7.

Key words: breast neoplasms; drug tolerance; HLA antigen; co-stimulator; interferon; drug resistance, multiple

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^[1-4]。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。

收稿日期: 2001-05-10

基金项目: 国家自然科学基金(39870813); 广东省自然科学基金(001041)

作者简介: 但汉雷(1966-),男,重庆人,2000年毕业于第一军医大学,肿瘤学硕士,在读博士研究生,主治医师, E-mail: dan@fimmu.edu.cn

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-α2b(rhIFN-α2b)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 1×10⁴ 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-α2b(美国 Schering-Plough 公司生产)使培养液中 IFN 浓度分别为 0、10、100、1000、10000 和 100000 (IU/ml),观察细胞生长状态。应用 MTT 法检测并比较不同浓度 rhIFN-α2b 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-α2b 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-α2b 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, PECR)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-α2b 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 PECR、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-α2b 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 1×10³ IU/ml 时,rhIFN-α2b 对 MCF-7/ADR 细胞生长无明显影响(P>0.05),当浓度达 1×10⁴ IU/ml 时,MCF-7/ADR 细胞生长受到明显抑制。

2.3 rhIFN-α2b 调节 HLA 和 B7 表达的时效关系

FCM 检测 rhIFN-α2b 调节 MCF-7/ADR 细胞 HLA 和 B7 表达的时间-效应关系见图 2。rhIFN-α2b 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-α2b 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-α2b(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)。

2.4 rhIFN-α2b 调节 HLA 和 B7 表达的量效关系

经适当浓度 rhIFN-α2b (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-α2b 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-α2b 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)。

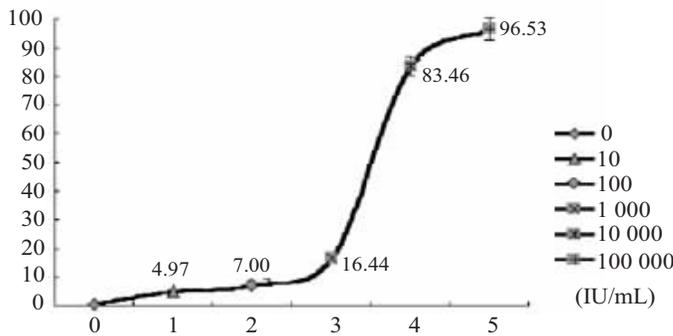


Fig.1

图 1 rhIFN-α2b 抑制 MCF-7/ADR 细胞生长的对数浓度曲线

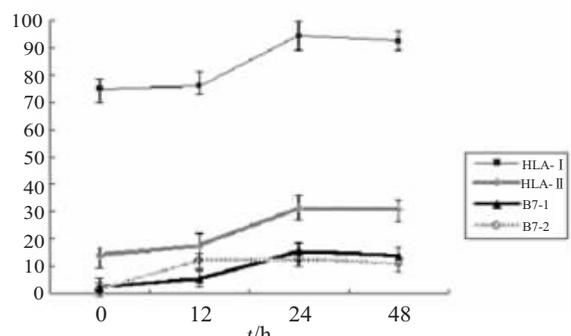


Fig.2

Fig.1 Growth inhibition-logarithmic concentration curve of MCF-7/ADR cell line treated with rhIFN-α2b

图 2 rhIFN-α2b(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-α2b (400 IU/ml) in MCF-7/ADR cell line

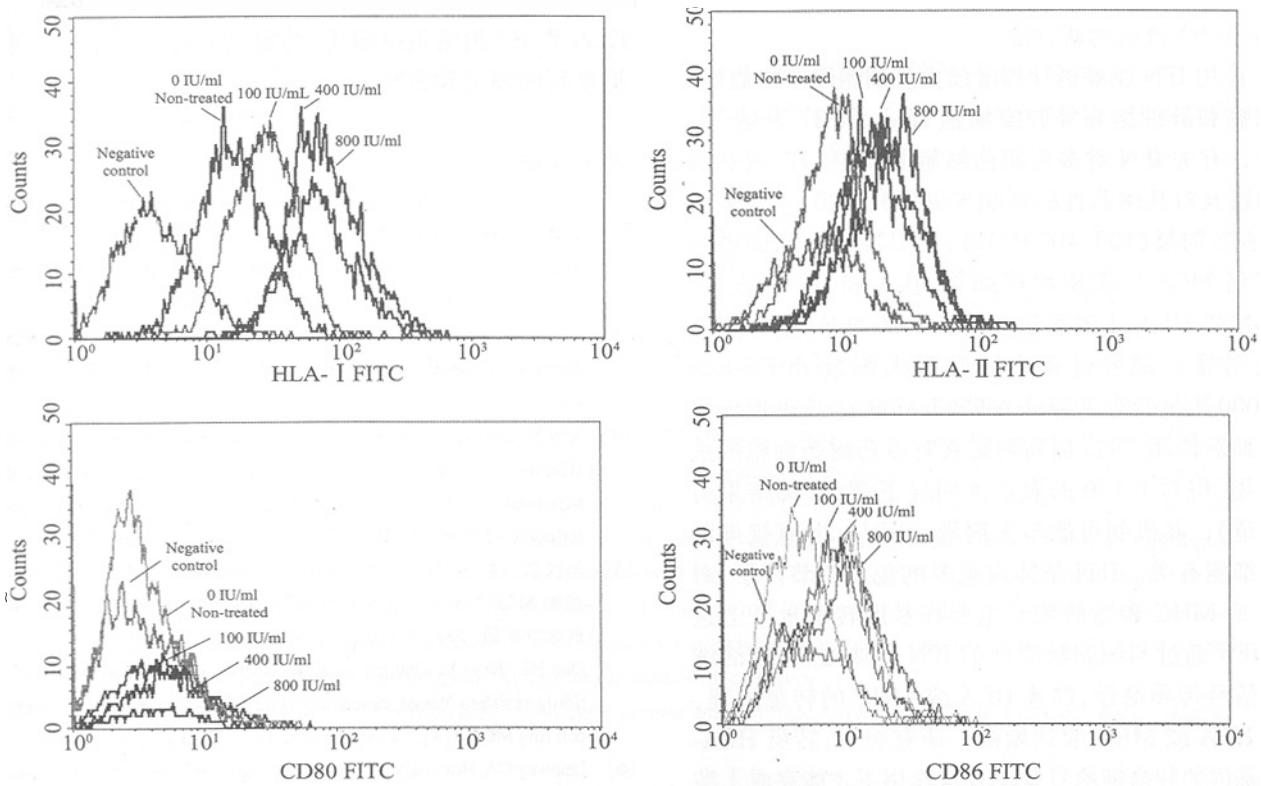


图 3 rhIFN-α2b 对 MCF-7/ADR 细胞 HLA 和 B7 表达调节的量效关系(FCM 检测结果)

Fig.3 Dose-effect relationship of HLA and B7 expression in MCF-7/ADR cell line detected by flow cytometry after administration with rhIFN-α2b

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^[1-3]。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

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 \pm 7.55	78.12 \pm 8.34	87.48 \pm 12.45*	83.98 \pm 10.37*
HLA-II	13.92 \pm 5.23	24.26 \pm 9.02 [#]	31.48 \pm 6.33 [#]	30.00 \pm 4.68 [#]
B7-1 (CD80)	2.42 \pm 1.28	1.91 \pm 2.71	3.33 \pm 3.92	2.62 \pm 1.27
B7-2 (CD86)	1.28 \pm 0.81	3.01 \pm 2.44	4.62 \pm 2.81	8.68 \pm 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.

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,也不能同时纠正肿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^[7-9]。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^[12,10]。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.
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.
- [6] Janeway CA, Borromy 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.