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

但汉雷袁赵 燕袁张 健袁张积仁渊第一军医大学珠江医院全军肿瘤医学中心袁广东 广州 510282冤

摘要院目的 研究乳腺癌多药耐药细胞人类白细胞抗原渊HLA冤和免疫共刺激分子 B7 的表达袁探讨乳腺癌多药耐药与免疫逃避的关系遥方法 应用免疫荧光 - 单克隆抗体直接标记的流式细胞技术袁检测并分析比较阿霉素和长春新碱耐药的乳腺癌细胞渊MCF-7/ADR冤及其化疗敏感的亲本细胞渊MCF-7冤HLA 和 B7 分子渊B7-1/CD80尧B7-2/CD86冤的表达遥结果 MCF-7/ADR 细胞多药耐药糖蛋白 P-170 表达的阳性细胞百分率渊PECR冤和平均相对荧光强度渊RLFI冤分别为 85.3%和 40.65依5.54袁明显高于 MCF-7 细胞 (分别为 3.38%尧3.13依1.27, 孕0.001尧孕0.0030)遥MCF-7/ADR 细胞 HLA-Ⅰ表达的 PECR 和平均 RLFI分别为 76.26% 和 51.77依5.55袁明显低于敏感细胞 MCF-7 渊分别为 98.22% 和 129.08依9.97, 孕0.001冤曰MCF-7/ADR 细胞 HLA-DR 的 PECR 和平均 RLFI 分别为 13.92%尧19.20依1.23袁MCF-7 细胞分别为 10.06%尧16.70依1.37曰两种细胞 B7-1 表达的 PECR 和平均 RLFI 没有显著差异 (孕0.348, 孕0.105)遥敏感细胞 B7-2 表达的 PECR 为 14.4%袁平均 RLFI 为 11.72依4.15袁MCF-7/ADR 细胞分别为 1.28%渊孕0.011冤尧30.06依1.20 渊孕0.026冤遥结论 乳腺癌多药耐药细胞 HLA 和 B7 分子表达与敏感细胞有显著区别袁主要表现为 HLA-Ⅰ类分子表达下调袁表明乳腺癌多药耐药细胞存在 HLA-I 相关的免疫逃避机制遥

关键词院乳腺肿瘤曰药物耐受性曰HLA 抗原曰免疫共刺激分子曰抗药性袁多药
中图分类号院R394;R737.902 文献标识码院A 文章编号院1000-2588(2001)10-0731-04

耘晕贵贼蕴蕴壮燥与蕴粤 蕴惭月苑蚤壮皂怎贼贼贼

果的主要障碍[1~6]。有关乳腺癌多药耐药细胞 HLA 和 B7 表达及其与乳腺癌多药耐药有何关系，乳腺癌耐药细胞是否存在 HLA 和 B7 相关的免疫逃避机制未见报道，我们对此进行研究。

1 材料与方法

1.1 细胞株

以人乳腺癌细胞株 MCF-7 及其阿霉素耐药株 MCF-7/ADR 细胞（购自北京肿瘤研究所）为研究对象，由 DMEM 细胞培养基（含10%（体积分数）胎牛血清和 L-谷氨酰胺（GibracoCo.）配制成培养液）培养的细胞株置 37 ℃、5%（体积分数）CO_2 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 2ng/L。观察细胞生长状况并确保细胞生长良好。

1.2 试剂和仪器

荧光素（FITC）标记的鼠抗人 HLA-Ⅰ单克隆抗体（IgG-2a）、HLA-DR 单克隆抗体（IgG-2b）、CD80（B7-1）单克隆抗体（IgM）、CD86（B7-2）单克隆抗体（IgG1）以及 FITC 标记的同型阴性对照单克隆抗体（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 单克隆抗体（IgG1）和 FITC 标记鼠 IgG1 阴性对照抗体购自法国 ImmuneTechCo.。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[7]进行耐药性检测，观察耐药细胞对 ADR 和硫酸长春新碱（VCR）广州明星制药厂）的半数抑制浓度（IC_{50}）。直接采用 FITC 直接标记的鼠抗人多药耐药糖蛋白 P-170 单克隆抗体检测耐药细胞 P-170 表达，并与敏感细胞进行比较。

1.4 FCM 分析

取对数生长期的敏感细胞和耐药细胞，分别收集，制备单个细胞悬液，用 0.01mmol/L、pH7.4 的不含钙镁离子的 PBS 洗 2 次，0 μm 尼龙网过滤，加入 PBS，制成单个细胞悬液，细胞计数为（1~3）×10^6 /ml。然后按每管 0.5ml 分别加入作有不同标号的测试管和对照管。测试管分别加入 FITC 标记的 HLA-Ⅰ、HLA-Ⅱ、B7-1、B7-2 单克隆抗体 10 μl；同型对照管加入相应的同型对照抗体。37 ℃避光孵育 30min 后，上机检测。重复实验 3 次。

1.5 数据资料分析

采用 FCM 点密度双参数图和三维数据曲线分析图，比较 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞 HLA-Ⅰ、HLA-Ⅱ、B7-1、B7-2 表达情况。应用 SPSS10.0 对数据进行统计分析，比较 IC_{50} 值、HLA 和 B7 表达的阳性细胞百分率和平均相对荧光强度，分别采用 χ^2 检验与 t' 检验。

2 结果

2.1 耐药性比较

体外药敏试验（MTT 法）结果表明，ADR、VCR 对敏感细胞 MCF-7 的 IC_{50} 分别为(0.52±0.18)、(0.75±0.41) μg/ml；对耐药细胞 MCF-7/ADR 的 IC_{50} 分别为(25.75±5.84)、(10.44±1.57) μg/ml，是敏感细胞的 49.5 倍和 13.9 倍（t'=7.25, 8.47; P=0.018, 0.014）。FCM 检测结果（图 1）表明，MCF-7 细胞多药耐药糖蛋白 P-170 阳性细胞百分率和平均相对荧光强度分别为 3.38% 和 (5.13±1.27)，MCF-7/ADR 细胞则分别为 85.3% 和 40.65±1.54。耐药细胞 P-170 表达明显高于敏感细胞（χ^2=6797.99，P<0.001; t'=19.38, P=0.003）。

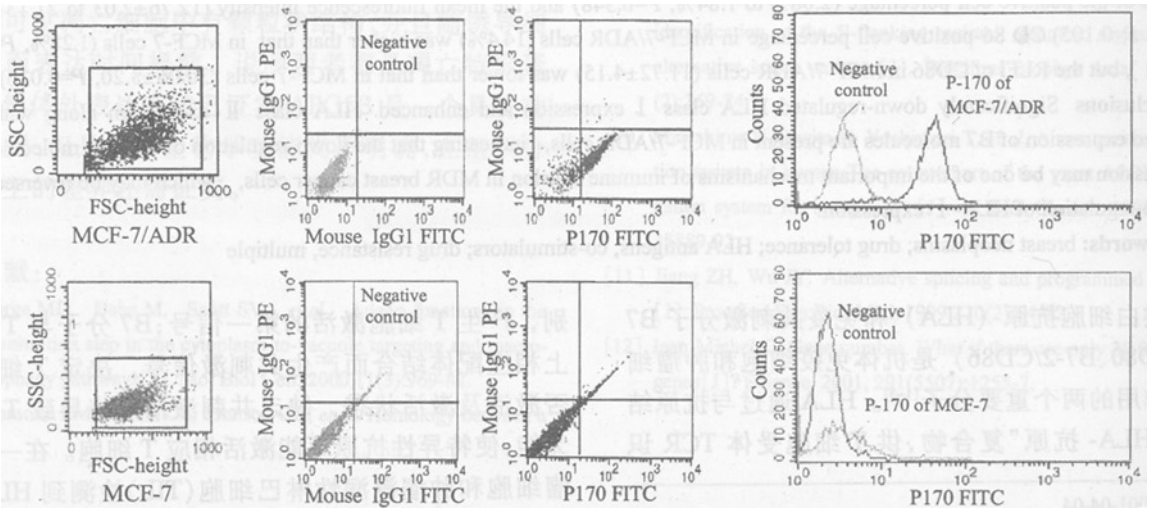

图 1 流式细胞仪检测乳腺癌细胞 MCF-7 和多药耐药细胞 MCF-7/ADR 多药耐药糖蛋白 P-170 的表达

2.2 HLA 和 B7 的表达

FCM 检测敏感细胞 MCF-7 和耐药细胞 MCF-7/ADR HLA 和 B7 表达结果见图 2。MCF-7/ADR 细胞 HLA-Ⅰ表达的阳性百分率和相对荧光强度分别为 76.26%±1.77%,±.55。MCF-7 细胞则分别为 98.22%±129.08%,±.97。两者比较有显著差异,χ^2=1 083.03, P<0.001; χ^2=6.49, P<0.023。耐药细胞 HLA-DR 表达阳性百分率为 13.92%,较敏感细胞的 0.06%,高,χ^2=3.788, P=0.052。两种细胞 HLA-DR 相对荧光强度分别为 19.20±.23,±6.70±.37,没有显著差异,χ^2=2.082, P=0.173。敏感细胞和耐药细胞 B7-1 表达的阳性细胞百分率分别为 2.08%±.84%,平均相对荧光强度分别为 12.76±.03,±1.13±.77,两种细胞 B7-1 表达没有显著差异,χ^2=0.876, P=0.348; χ^2=2.83, P=0.105。敏感细胞 B7-2 表达阳性细胞百分率为 14.4%,高于耐药细胞的 1.28%,χ^2=12.18, P=0.001。其平均相对荧光强度为 11.72±.15,低于耐药细胞的 30.06±.20,χ^2=6.097, P=0.026。

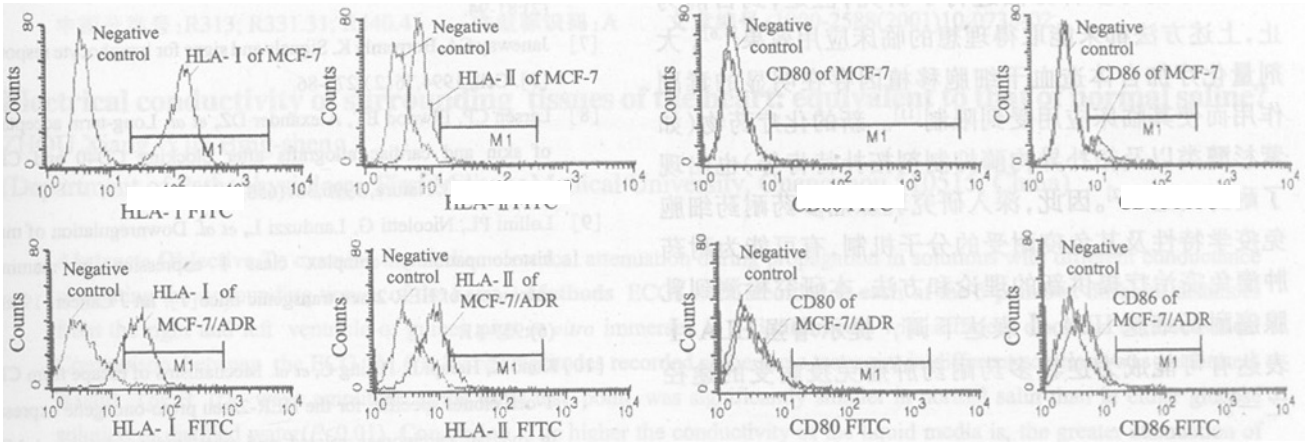

图 2　乳腺癌细胞 MCF-7 和多药耐药细胞 MCF-7/ADRHLA 和 B7 表达的流式细胞仪检测

[illegible]

3　讨论

HLA 和 B7 是机体免疫识别、抗原递呈以及免疫细胞激活和杀伤靶细胞的重要分子。正常人体内 HLA-Ⅰ类分子几乎分布于全部有核细胞表面,作为人体主要组织相容性抗原,并参与内源性抗原,如肿瘤抗原和病毒抗原,的加工和提呈,激活特异性 $CD8^+$ 细胞毒性杀伤淋巴细胞,CTL,,在移植免疫和抗肿瘤免疫中发挥关键性作用。HLA-Ⅱ类分子主要分布于抗原提呈细胞和激活的 T 细胞、、B 细胞、、单核巨噬细胞等免疫效应细胞表面,参与外源性抗原,如细菌蛋白,的加工、、提呈和免疫效应过程。B7 分子主要表达在活化的 B 细胞、、树突状细胞及单核细胞,非免疫细胞 B7 分子几乎不表达。在树突状细胞、、郎罕氏细胞等多种抗原提呈细胞,B7-1、、B7-2 可同时表达,并受干扰素,IFN,、、白细胞介素,IL,、、4、、2 和粒细胞-单核细胞集落刺激因子,GM-CSF,等多种细胞因子调节。

已有研究表明,一些免疫性疾病的发生与 HLA 和 B7 异常表达有关。在恶性淋巴瘤、、结肠癌、、恶性黑色素瘤等细胞也检测到 HLA 和 B7 分子异常表达,并证实与肿瘤免疫耐受有关。本研究发现,多药耐药细胞 MCF-7/ADR HLA-I 类分子表达明显低于其化疗敏感的亲本细胞 MCF-7,HLA-II 类分子则略有升高。B7-1 分子表达变化不大,而 B7-2 表达则较亲本细胞减少,表明乳腺癌多药耐药细胞也存在 HLA 和 B7 相关的免疫耐受机制。有关乳腺癌多药耐药细胞是否存在 HLA 和 B7 分子结构和功能改变需要进一步研究。

肿瘤细胞 HLA 和 B7 分子异常表达的原因和机制目前还不清楚。根据临床观察,肿瘤细胞 HLA 和 B7 异常表达与肿瘤组织类型、、恶性程度及临床分期有一定关系。Lollini 等将大鼠原癌基因 *ras* 与乳腺癌病毒长末端重复序列连接,转导诱发鼠乳腺癌,发现 *ras*/LTR 转基因可导致主要组织相容性复合体,MHC,,I 类分子低表达并使特异性 CTL 对其杀伤作用明显减弱,说明癌基因的表达可能抑制了 MHC 的正常表达。Kono 等在体外将 HLA-A2 及 Her-2 阳性表达的卵巢癌细胞与 HLA-A2 限制性抗 Her-2 的 CTL 共育,结果导致了部分肿瘤细胞 HLA-A2 表达降低,并且逃避了特异性 CTL 的攻击。可见,肿瘤细胞在与免疫细胞的相互作用过程中,其 MHC 表达可发生改变。本研究首次发现,乳腺癌耐药细胞 MDR 表型也伴有 HLA 和 B7 分子表达的变化,提示乳腺癌 MDR 的出现可能引起了 HLA 和 B7 分子表达的

改变遥有关肿瘤多药耐药与 HLA 和 B7 表达的相互关系和机制我们正在进行深入研究遥

乳腺癌多药耐药涉及多药耐药基因 皂蝴和糟蛋白糟皂蝴等癌基因的异常表达袁以及拓扑异构酶Ⅱ尧谷胱甘肽 S 转移酶仔活性和功能改变等多种机制遥为了逆转乳腺癌多药耐药袁提高耐药细胞对化疗药物的敏感性袁有人应用反义核酸技术和核酶切割皂蝴基因的方法来抑制皂蝴的表达尧应用维拉帕米和环胞素 A 抑制多药耐药糖蛋白 P-170 的活性以及应用中医中药等多种方法进行了研究袁但是袁到目前为止袁上述方法都未能取得理想的临床应用效果[咱2尧3暂]遥大剂量化疗加自体造血干细胞移植因存在明显的毒副作用而使其临床应用受到限制[咱1暂]遥新的化疗药物渊如紫杉醇类以及拓扑异构酶抑制剂拓扑特肯等冤也出现了耐药问题[咱2尧3暂]遥因此袁深入研究乳腺癌多药耐药细胞免疫学特性及其免疫耐受的分子机制袁有可能为耐药肿瘤免疫治疗提供新的理论和方法遥本研究检测到乳腺癌耐药细胞 HLA-Ⅰ表达下调袁提示增强 HLA-Ⅰ表达有可能成为逆转多药耐药肿瘤免疫耐受的途径之一遥

致谢院本课题 FCM 检测得到广东省人民医院检验科张建军副主任医师和王随昭博士的协助袁特此致谢遥

参考文献院

咱1暂 KleinJ,SatoA.TheHLAsystem咱暂NEnglJMed,2000,343(11):782-6.

咱2暂 HarrisNL,RoncheseF.TheroleofB7costimulationinT-cellimmunity咱暂ImmunolCellBiol,2000,77(4):304-11.

咱3暂 GaoGF,TormoJ,GerthUC,渊等冤Crystalstructureofthecomplex betweenhumanCD8alpha(alpha) andHLA-A2咱暂Nature, 1997, 387(6633):630-4.

咱4暂 HicklinDJ,MarincolaFM,FerroneS.HLAclassIantigen down-regulationinhumancancers: T-cellimmunotherapyrevivesanold story咱暂MolMedToday,1999,5(4):178-86.

咱5暂 PersidisA. Cancermultidrugresistance咱暂Nat Biotechnol,1999, 17(1):94-5.

咱6暂 RamachandranC,MelnickSJ.Multidrugresistanceinhumantumors-moleculardiagnosisandclinicalsignificance咱暂MolDiagn,1999,4(2):81-94.

咱7暂 JanewayCA,BorromlyK.Signalsandsignsforlymphocyteresponses咱暂Cell,1994,76渊冤:275-86.

咱8暂 LarsenCP,ElwoodET,AlexanderDZ,渊等冤Long-termacceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways咱暂Nature,1996,381(6581):434-8.

咱9暂 LolliniPL,NicolettiG,LanduzziL,渊等冤Downregulationofmajor histocompatibility complex class Ⅰ expression in mammary carcinomaofHER-2/neutransgenicmice咱暂IntJCancer,1998,77(6):937-41.

咱10暂 KonoK,HalapiE,HisingC,渊等冤MechanismsofescapefromCD8+ T-cellclonesspecific fortheHER-2/neuproto-oncogeneexpressed in ovarian carcinomas院elated and unrelated to decreased MHC classIexpression咱暂IntJCancer,1997,70(1):112-21.

咱11暂 SobecksRM,VogelzangNJ.High-dosechemotherapywithautologousstemcellsupportforgermcelltumors院 critical review 咱暂SeminOncol,1999,26(1):106-18.

咱12暂 ValeroV,JonesSE,Von-HoffDD,渊等冤A phaseIIstudyofdocetaxelinpatientswith paclitaxel-resistant metastatic breast cancer 咱暂ClinOncol,1998,16(10):3362-8.

新书叶循证医学院临床证据的产生尧评价与利用曳征订启示

由叶实用医学杂志曳编辑部主任尧常务副主编李强主编尧中国科学院科学出版社出版的叶循证医学院临床证据的产生尧评价与利用曳一书已于 2001 年 7 月出版袁全书 52 万字袁50 页袁6 开袁共分以下 14 章院第一章 循证医学曰第二章 如何正确开展临床诊断性研究曰第三章 如何正确开展临床疗效研究曰第四章 如何正确开展临床病因学研究曰第五章 如何正确开展疾病的预后研究曰第六章 临床经济分析曰第七章 临床科研数据的统计分析曰第八章 临床医学科研选取题曰第九章 临床科研成果的申报曰第十章 医学文献查找方法曰第十一章 如何利用网络获得最新医学文献曰第十二章 如何撰写医学论文曰第十三章 如何选择医学期刊投稿曰第十四章 临床医生投稿指南遥本书以临床各科医生尧科研管理人员尧医学期刊编辑及审稿人为读者对象遥本书邮购价 45 元遥

地址院广州市惠福西路进步里 2 号之 4叶实用医学杂志曳编辑部李强收

邮政编码院10180

电话院20-81872080袁3503076159

E-mail:lqth@163.net;lqthabc@sina.com.cn