

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.02.03

• 研究生专栏 •

利用 PCR-SSP 法研究肺腺癌细胞系 A549、Calu-6 的 HLA-A BDR 等位基因

邓波 林一丹 王如文 蒋耀光

【摘要】 背景和目的 已有的研究表明人类白细胞抗原(HLA)在抗原呈递及 T 细胞识别抗原的过程中起关键作用,此外还与肿瘤细胞的免疫杀伤及免疫逃避有着密切的关系。本研究探讨了人肺腺癌细胞系 A549、Calu-6 中 HLA-A、HLA-B、HLA-DR 等位基因的存在状况。方法 分离 A549、Calu-6 细胞 DNA, 分别行 PCR-SSP 法扩增、电泳后紫外透射扫描, 根据反应格局表对 HLA-A、HLA-B、HLA-DR 进行判定。结果 A549 与 Calu-6 细胞中 HLA-A、HLA-B 基因较杂合子均有缺失, 而 HLA-DR 基因无缺失。A549 细胞 HLA-ABDR 的基因分型为 HLA-A30、HLA-B44、HLA-DR7/HLA-DR53。Calu-6 细胞 HLA-ABDR 的基因分型为 HLA-A01、HLA-B08、HLA-DR17/HLA-DR52。结论 肺腺癌中存在 HLA-I 和 HLA-II 基因。HLA-I 基因可能在肿瘤细胞传代过程中发生选择性丢失, 而 HLA-DR 基因完整保留。检测肿瘤 HLA 对了解其免疫学行为及建立肿瘤特异性杀伤淋巴细胞(CTL)模型具有重要意义。

【关键词】 肺腺癌细胞 人类白细胞抗原 PCR-SSP 法

【中图分类号】 R734.2

Study on HLA-ABDR alleles in A549 and Calu-6 lung cancer cell lines with PCR-SSP DENG Bo, LIN Yidan, WANG Ruwen, JIANG Yaoguang. Chest Surgery Center of PLA, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, P. R. China

Corresponding author: WANG Ruwen, E-mail: superdb@163.com

【Abstract】 **Background and objective** It has been confirmed that human leucocyte antigen (HLA) may play very important roles in the process of antigen presenting and antigen distinguishing. HLA has a close relationship with the immunity killing and immunity escape in cancer. HLA-ABDR alleles were detected in A549 and Calu-6 lung cancer cell lines by PCR sequence specific primers (PCR-SSP) in this research. **Methods** DNA of A549 and Calu-6 was purified and PCR-SSP was practiced. Then the gel was scanned in ultra violet. HLA-A, HLA-B and HLA-DR were determined with special response list. **Results** HLA-A and HLA-B in A549 and Calu-6 were not integral, but HLA-DR was integral. The genotype of HLA-ABDR for A549 was: HLA-A30, HLA-B44, HLA-DR7/HLA-DR53. The genotype of HLA-ABDR for Calu-6 was: HLA-A01, HLA-B08, HLA-DR17/HLA-DR52. **Conclusion** Human adenocarcinoma cell line exists both HLA-I and HLA-II genotypes. Selective loss of HLA-I gene might be occurred during tumor generation, but all the HLA-II genes remain. Detection of tumor HLA is necessary to the acknowledgment of tumor immunology behavior and foundation of tumor specific cytotoxic T lymphocyte.

【Key words】 Lung adenocarcinoma Human leucocyte antigen PCR-SSP

This work was partly supported by grants from National Natural Science Foundation of China (to LIN Yidan) (No. 30400440) and Doctoral Innovation Fund of the Third Military Medical University (to LIN Yidan).

人类白细胞抗原 (human leucocyte antigen, HLA) 在抗原呈递及 T 细胞识别抗原的过程中起关键作用。研究肿瘤细胞 HLA 基因表型有助于了解其免疫杀伤及免疫逃避等生物学行为。目前国内外均未见

肺腺癌细胞 Calu-6 HLA 基因的相关报道, 而关于肺腺癌细胞 A549 HLA 基因的研究结果则并不一致^[1,2]。本研究拟通过序列特异性引物聚合酶链反应 (PCR sequence specific primers, PCR-SSP) 这一高效、灵敏、简便的方法, 对肺腺癌细胞 A549 与 Calu-6 的 HLA-A、HLA-B、HLA-DR 等位基因进行研究, 为建立肿瘤特异性杀伤淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 模型及研究肿瘤细胞免疫机制寻找理论依据和实验证据

本研究受国家自然科学基金 (No. 30400440) 及第三军医大学博士创新基金资助

作者单位: 400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心 (通讯作者: 王如文, E-mail: superdb@163.com)

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 A549 肺腺癌细胞系(ATCC 序列号 CCL-185, 本室保存), 人 Calu6 肺腺癌细胞系(ATCC 序列号 HTB-56, 本室保存)。DNA 抽提试剂盒、Tag DNA 聚合酶(Promega, USA), Biotest HLA-ABDR SSP 试剂盒(Biotest, USA), 其它试剂为国产分析纯试剂。PCR 仪(Lwaki Glass INC, Japan), 凝胶电泳仪(Mupid2, Cosmo Bio Co, Japan), 紫外透射仪(GS-710, BIO-RAD, USA)。

1.2 A549 及 Calu6 肺癌细胞株 DNA 的提取和鉴定
根据 DNA 抽提试剂盒说明书进行。将 2×10^6 / mL 的细胞约 10 mL 离心后沉淀中加入 4 mL 核裂解液, 反复震荡直至细胞团块溶解, 加入 RNA 酶 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 冷却至室温。加入蛋白酶 K 2 mL, 充分震荡后离心, 吸取上清加入等体积的异丙醇中, 可见

DNA 呈白色丝状沉淀。离心后加入 75% 乙醇洗涤 5 min, 弃上清, 将 DNA 风干后加入 120 μ L 去离子水, 4 $^{\circ}$ C 溶解过夜。测定 DNA 浓度为 500 mg/L, A260/A280 光密度比值为 1.8。

1.3 PCR-SSP 法检测 HLA-ABDR 按下列配方配制混合液: 440 μ L PCR cocktail 缓冲液, 7 μ L Tag 酶, 550 μ L 双蒸水, 混匀后取 10 μ L 加入 96 孔 HLA-ABDR 检测板的阴性对照孔 A1 中。然后在混合液中加入 100 mg/l 的 DNA 110 μ L, 以每孔 10 μ L 反应体积将混合液加入 96 孔 HLA-ABDR 检测板的其它 95 孔中。PCR 扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 10 s, 65 $^{\circ}$ C 60 s 循环 10 次, 94 $^{\circ}$ C 10 s, 61 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 循环 20 次。将 PCR 扩增产物加在 2% 琼脂糖凝胶中以 90 V 电压电泳 15 min, 在紫外透射仪下观察并拍照。根据反应格局表(表 1)读出 HLA 结果, 每个 PCR 反应均包括 1069 bp 的内对照条带。

表 1 PCR-SSP 反应格局表

Tab 1 PCR-SSP response list

	1	2	3	4	5	6
A	Control	A25	A69	A80	B63	B8, 35, 51, 53, 78
B	A01	A26	A29, 32, 32, 33	B07	B70, 71, 72, 15	B18, 35, 78
C	A02	A34	A29	B08	B62, 63, 75, 77	B37
D	A03	A66	A30	B13	B75, 15	B38
E	A11	A10. 2	A31	B64, B65	B76	B38, 39, 67
F	A23	A36	A32	B65	B18	B60, 48, 81
G	A24	A43	A33	B15 no B75	B27. 2708	B 61, 47
H	A10. 1	A68	A74	B15 no B63	B7, 8, 14, 35. 39	B8, 41, 42
I	B44	B51, 52	B56	Bw06	DR07	DR13. 4
J	B45	B52	B57	DR01	DR08	DR14. 1
K	B46	B52. 1	B58	DR103	DR09	DR14. 2
L	B47	B8, 38, 51, 52, 53	B13, 59	DR15	DR10	DR14. 3
M	B49	B7, 27, 42, 46, 54,	B73	DR16	DR11	DR14. 4
N	B49, 50, 51	B54	B62, 70, 78	DR17	DR12	DR52
O	B72, 50, 40, 41, 45	B7, 42, 55, 56, 67	B82	DR18	DR13. 1	DR53
P	B51, 52	B54, 55, 39, 41	Bw04	DR04	DR13. 3	DR51

2 结果

2.1 A549 肺癌细胞株 HLA-ABDR 基因型 在 D3、I1、I5、O6、P3 等处出现基因特异性扩增产物, 其大小在 90~ 690 bp 之间(图 1)。从表 1 可知, D3 为 HLA-A30, I1 为 HLA-B44, P3 为 Bw4 超型(与 B44 交叉反应), I5 为 HLA-DR7, O6 为 HLA-DR53, 因此 A549 肺癌细胞株 HLA-ABDR 基因分型的结果为 HLA-A30/-, HLA-B44/-, HLA-DR7/HLA-DR53。

2.2 Calu6 肺癌细胞株的 HLA-ABDR 基因型 在 B1、C4、H5、H6、A6、I4、N4、I6、N6 等处出现基因特异性扩增产物, 其大小在 90~ 690 bp 之间(图 2)。

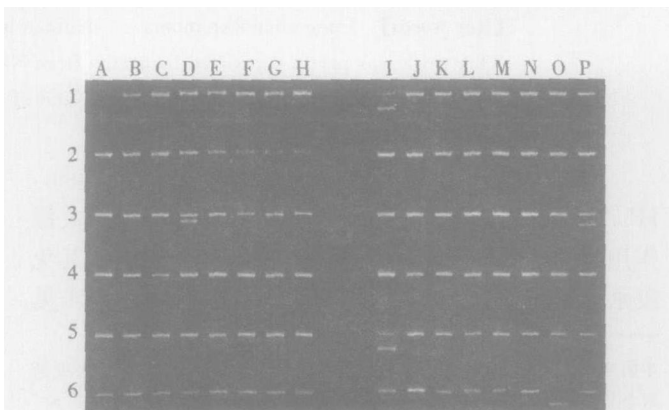


图 1 A549 肺癌细胞株 HLA-ABDR 基因型检测结果

Fig 1 Genotype of HLA-ABDR in A549 cell line by PCR-SSP

从表 1 可知, B1 为 HLA-A01, C4 为 HLA-B08, H5 为 HLA-B07、08、14、35、39, A6 为 HLA-B8、35、51、53、78, I4 为 Bw06(与 B08 交叉反应), N4 为 DR17, I6 为 DR17(与 DR13.4 交叉反应), N6 为 DR52, 因此 Calu6 肺癌细胞株 HLA-ABDR 基因分型的结果为 HLA-A01/-, HLA-B08/--, HLA-DR17/HLA-DR52。

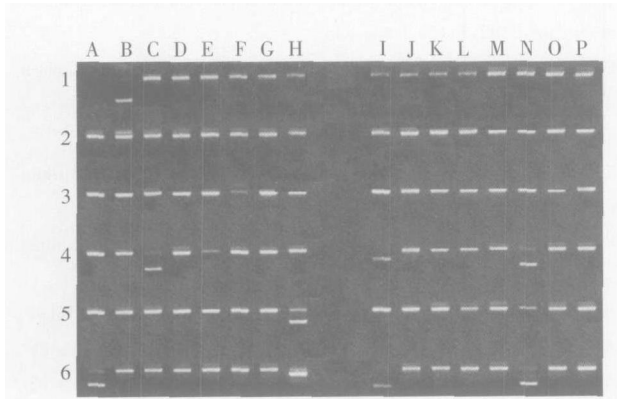


图 2 Calu6 肺癌细胞株 HLA-ABDR 基因型检测结果

Fig 2 Genotype of HLA-ABDR in Calu6 cell line by PCR-SSP

3 讨论

HLA 即人类主要组织相容性复合体, 定位于第 6 号染色体短臂 6p21、31, 包括 224 个基因座位, 按顺序划分为 3 个区域, 即 I 类(HLA-A、HLA-B、HLA-C), II类(HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ)和 III类。利用 PCR-SSP 能简单快速检测 HLA, 其基本原理是编码各种 HLA 抗原表型的等位基因均可用相应的序列特异性引物进行扩增。通过控制 PCR 反应条件, 特异性引物只扩增与其相应的等位基因, 而不扩增其它等位基因。因此 PCR 扩增产物的有无是鉴定特异性等位基因的基础, 这种特异的 PCR 扩增产物可通过琼脂糖凝胶电泳检出。该方法操作简单快速, 实验结果易判断, 杂合子也很易于检出。因此本研究中采用了 PCR-SSP 方法探讨 A549 肺癌细胞的 HLA-ABDR 基因型。

CTL 细胞活化需双信号, 即 T 细胞表面受体结合肿瘤细胞膜上 HLA-I 类分子与抗原肽分子复合物, 通过 CD3 复合分子传递第一信号, 由抗原呈递细胞 (antigen presenting cell, APC) 上的某些分子与 T 细胞上相应受体结合提供第二信号。因此, CTL 发挥细胞免疫抗肿瘤的前提条件是识别肿瘤细胞膜上的 HLA-I 类分子, 即 HLA 限制细胞杀伤。近来人们发现许多肿瘤中 HLA-I 类抗原表达降低或缺失, 致使 CTL 对肿瘤细胞不能识别, 肿瘤细胞得以逃避宿主的免疫攻击 从而不利于肿瘤的免疫治疗^[3] 肿瘤细胞

HLA-I 类基因缺失有多种类型, 如 HLA-I 类基因全部缺失、HLA-I 类基因单倍型选择性缺失、HLA-A 或 HLA-B 基因位点的选择性降低、单个 HLA-I 类等位基因的选择性缺失或降低等^[4]。Rimmelzwaan 等^[1]报道 A549 细胞 HLA-AB 基因型为 HLA-A30/HLA-A25, HLA-B44/HLA-B18; 而 Hanagiri 等^[2]报道 HLA-A 基因型为 HLA-A30/HLA-A26。两项研究所获得的 HLA-A 基因型有差异, 可能因为 HLA-A25 (gene bank 序号 L15373) 与 HLA-A26 (gene bank 序号 L15374) 有 97.6% 的同源性 (gene bank blast), 且 Hanagiri 等所采用的方法为微量细胞毒试验法, 而该方法误差较大易导致结果不准确。但上述研究结果均显示 A549 细胞 HLA 基因为杂合子, 本研究发现 A549 细胞 HLA-A、HLA-B 存在等位基因缺失, 而非标准杂合子, 并且 Calu6 细胞也存在 HLA-A、HLA-B 等位基因丢失。可能是肿瘤细胞在传代过程中姐妹染色体不分离或染色体重组错误如染色体缺失等造成 HLA-I 基因单倍型选择性丢失, 并且这种畸变亦可能是肿瘤为更好地逃避免疫细胞攻击而采取的一种自我保护行为。其具体的基因调控机制如何, 为何 A549、Calu6 细胞分别保留 HLA-A30、HLA-B44 和 HLA-A01、HLA-B08 而缺失其他等位基因, 是否保留此类基因将更有利于肿瘤细胞的生存等诸多问题还有待于进一步解决。近来不少研究发现核骨架在染色体空间组织、DNA 复制、RNA 转录过程中都起着极为重要的作用, 例如核骨架中原癌基因 *c-myc* 产物可抑制 HLA-B 的启动子^[5]。因此笔者推测, 在肿瘤细胞中某些调控蛋白如 *c-myc* 基因产物可能影响了 HLA 染色体分离, 造成部分 HLA 基因选择性丢失, 另一部分 HLA 基因则适应这些细胞调控蛋白因而被保留下来。由于 HLA-I 基因具有高度多态性, 笔者认为有必要进一步研究人类各型肿瘤中是否存在特异性 HLA-I 类等位基因的优先缺失, 进而明确肿瘤与 HLA 基因是否具有相关性。

HLA-II 基因主要在 B 细胞、树突状细胞、Langerhans 细胞、单核细胞、巨噬细胞和激活的 T 细胞等具有抗原递呈功能的免疫细胞中存在。目前人类在许多肿瘤细胞上(肝、胃、肺、膀胱、大肠、宫颈、黑色素瘤等)发现了 HLA-II 基因的异常存在^[6]。本研究发现在肺癌细胞中亦有 HLA-II 基因存在。目前有观点认为 HLA-II 分子在肿瘤细胞中的表达是肿瘤发生、发展过程中出现的标志物, 笔者在肿瘤细胞系中发现了 HLA-II 基因亦证实了这一点。表达 HLA-II 类分子的肿瘤细胞虽可作为兼职 APC 但通常不表达

CD80、CD86 等共刺激分子, 因此诱导产生肿瘤特异性免疫耐受^[7]。本研究发现 A 549 肺癌细胞株和 Calu 6 肺癌细胞株尽管 HLA- I 类基因选择性缺失, 但 HLA- II 基因均无缺失, 推测这可能是 HLA- II 基因能更好地适应细胞调控蛋白, 亦可能是肿瘤细胞为更好地适应免疫耐受而将 HLA- II 基因完整保留下来。

建立肿瘤特异性杀伤淋巴细胞模型对研究肿瘤的免疫杀伤与免疫逃避十分必要。近年来, 随着培养条件的不断改进, 从健康人外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL) 中成功诱导肿瘤特异性 CTL 的实验已取得成功^[8], 这类实验前提条件是肿瘤与 PBL 存在一个或一个以上 HLA- A 分子匹配^[9,10]。因此了解肿瘤细胞的 HLA 对建立肿瘤特异性 CTL 细胞模型十分必要, 而国内此试验大多根据文献结果进行。鉴于肿瘤细胞系有可能丢失 HLA 基因, 所以笔者认为不能完全根据文献报道而应预先检查肿瘤 HLA 基因以保证试验的严谨。目前笔者正积极构建能够稳定表达 HLA- A2 的肺癌细胞系, 为肺癌的临床免疫治疗提供特异性 CTL 模型。

参 考 文 献

1 Rim melzwaan GF, Boon AC, Geelhoed Mieras MM, et al. Human airway epithelial cells present antigen to influenza virus specific CD8⁺ CTL inefficiently after incubation with viral protein together with ISCO- MATRIX. *Vaccine*, 2004, 22(21-22): 2769-75.

2 Hanagiri T, Yoshino I, Takenoyama M, et al. Effects of interleukin 12 on the induction of cytotoxic T lymphocytes from the regional lymph node lymphocytes of patients with lung adenocarcinoma. *Jpn J*

Cancer Res, 1998, 89(2): 192-198.

3 Trojan A, Schultze JL, Witzens M, et al. Immunoglobulin framework-derived peptides function as cytotoxic T cell epitopes commonly expressed in B-cell malignancies. *Nat Med*, 2000, 6(6): 667-672.

4 Maleno I, Lopez Nevot MA, Cabrera T, et al. Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51(7): 389-396.

5 Peltenburg LT, Dee R, Schrier PI. Downregulation of HLA class I expression by c myc in human melanoma is independent of enhancer A. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(5): 1179-1185.

6 Xu M, Qiu G, Jiang Z, et al. Genetic modulation of tumor antigen presentation. *Trends Biotechnol*, 2000, 18(4): 167-172.

7 Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 2001, 411(6835): 380-384.

8 Nukaya I, Yasumoto M, Iwasaki T, et al. Identification of HLA-A24 epitope peptides of carcinoembryonic antigen which induce tumor reactive cytotoxic T lymphocyte. *Int J Cancer*, 1999, 80(1): 92-97.

9 Crowley NJ, Slingluff CL Jr, Darrow TL, et al. Generation of human autologous melanoma specific cytotoxic T-cells using HLA-A2 mismatched allogeneic melanomas. *Cancer Res*, 1990, 50(3): 492-498.

10 Stevens EJ, Jacknin L, Robbins PF, et al. Generation of tumor specific CTLs from melanoma patients by using peripheral blood stimulated with allogeneic melanoma tumor cell lines. Fine specificity and MART-1 melanoma antigen recognition. *J Immunol*, 1995, 154(2): 762-771.

(收稿: 2005-09-07 修回: 2005-10-27)
(本文编辑 张世雯)

• 会议消息 •

肺癌的多领域研究新进展学习班
第一轮会议通知

由中国抗癌协会肺癌专业委员会、湖北省抗癌协会肺癌专业委员会主办, 湖北省肿瘤医院、《肿瘤防治研究》杂志协办的肺癌的多领域研究新进展学习班, 将于 2006 年 8 月 18~ 20 日在江城武汉召开。本学习班为国家级教育项目, 编号: 2006-09-03-003(国), 参加者授予 1 类学分 10 分。项目总负责人: 中国抗癌协会肺癌专业委员会常委, 湖北省抗癌协会肺癌专业委员会主任委员, 湖北省立体定向放射治疗中心主任宋启斌教授。学习班将邀请国内外肺癌领域各学科的著名专家进行授课, 如殷蔚伯教授、吴一龙教授、蒋国 教授、秦叔逵教授、于丁教授、邹蒙教授、张力教授、Joseph Y. Ting, Ph. D 等。

请欲参加学习班的代表于 2006 年 8 月 4 日前将注册费邮寄到组委会秘书处。

地址: 430079 湖北省武汉市湖北省肿瘤医院肿瘤内科; 联系人: 胡胜; 电话: 027-87670057 13971324718;

E-mail: ehsmn@163.com; 网上注册和其他信息见: www.hbch.com.cn.

湖北省抗癌协会肺癌专业委员会