

人主要组织相容性抗原 B/C 分子在口腔鳞癌中转录水平的研究

张少平 李龙江 佟 猛

【摘要】 目的 从基因转录水平探讨人主要组织相容性抗原 (HLA) I 类分子在口腔鳞癌发生、发展过程中的表达改变。方法 采用地高辛标记的 HLA-B/C 基因座特异性 DNA 探针通过原位杂交技术和图像分析方法分别检测了 23 例口腔鳞状细胞癌原发灶、10 例鳞状细胞癌颈淋巴结转移灶和 11 例正常的口腔粘膜上皮组织中 HLA-B/C mRNA 的表达,应用 Image Pro 软件检测杂交信号平均积分光密度 (IOD) 值。结果 阳性杂交信号出现于正常上皮和肿瘤细胞的胞浆内;IOD 值在原发灶组与正常粘膜组间存在显著性差异 ($P < 0.05$),而转移灶组的平均 IOD 值与原发灶组及正常粘膜组均未见统计学差异;相同患者原发灶与转移灶的平均 IOD 值也未见有显著性差异。结论 在口腔鳞癌的发展过程中肿瘤组织通过下调 HLA-I 分子的转录水平以最终逃脱宿主 CTL 的免疫监视功能,但肿瘤转移灶中 HLA-B/C 的转录水平却没有进一步的降低。

【关键词】 口腔鳞状细胞癌; 人类主要组织相容性抗原 I 类分子; 原位杂交

Human Leukocyte Antigen - B/C Transcription in Oral Squamous Cell Carcinomas

ZHANG Shaoping, LI Longjiang, TONG Meng. (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to investigate the mRNA expression levels of human leukocyte antigen Class at different progressive stages of human oral squamous cell carcinomas. **Methods** The expression of mRNA of human leukocyte antigen - B/C was detected in 23 primary tumors, 10 metastatic focuses and 11 histological normal oral epithelia using in situ hybridization method with a digoxigenin - labeled DNA probe. The probe was human leukocyte antigen - B/C locus specific. **Results** The hybridization signals were present in the cytoplasm of either normal epithelia or tumor cells. The integrated optical density values of the hybridization signals were detected with the aid of an image analysis system. The results showed that the average integrated optical density values of the primary tumors were statistically lower than the normal oral epithelia ($P < 0.05$), but there was no significant difference between metastatic tumors and the primary tumors or the normal epithelia. The integrated optical density values measured in the metastatic tumors also did not show statistically differences compared with the primary tumors of the same patients. **Conclusion** Impaired regulation of human leukocyte antigen - B/C transcription could occur but might not be directly associated with metastasis of oral squamous cell carcinomas.

【Key words】 oral squamous cell carcinoma; human leukocyte antigen class I; in situ hybridization

由 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 介导的免疫反应在机体抗肿瘤反应中发挥着重要的作用,而 CTL 的作用又受到由主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 编码的 I 类抗原分子的限制。肿瘤细胞通过降低其表面 MHC-I 分子的表达从而减弱肿瘤抗原向 CTL 的传递。这是肿瘤逃避机体 CTL 免疫监视作用的重要机制之一,并促进了肿瘤的发生、发展¹。本文拟通过

用地高辛标记的编码人类主要组织相容性抗原即人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) I 类分子重链的 B/C 基因座特异性 DNA 序列作探针,在组织原位与细胞内的 mRNA 进行杂交,结合形态学从转录水平观察 HLA-B/C mRNA 在口腔鳞状细胞癌 (简称鳞癌) 不同发展阶段的表达改变,并初步探讨了 MHC-I 类分子与人口腔鳞癌发展的关系,为进一步研究口腔鳞癌免疫学特性提供了实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

含人 HLA-B/C 基因座特异性序列 (356 bp) 的质粒 pHLA-1.1 (Dr. Orr 惠赠);感受态大肠杆菌 DH5 (四川大学感

本课题为国家自然科学基金 (编号 39700162) 及四川省跨世纪杰出青年基金 (编号 09949) 资助项目

作者单位: 610041 四川大学华西口腔医院口腔颌面外科

染免疫实验室);LB 抗性(Amp^r,含氨苄青霉素 100μg/ml)液体和固体培养基;柱式质粒(小量)抽提纯化试剂盒、DNA 胶回收纯化试剂盒(上海华舜生物工程有限公司);地高辛 DNA 标记和检测试剂盒(Boehringer Mannheim 公司,德国);二乙基焦碳酸(即 DEPC)(Sigma 公司,美国);图像分析系统(Media Cybernetics LP 公司,美国)。

1.2 标本收集

所有标本均取自四川大学华西口腔医院颌面外科手术患者,包括口腔鳞癌原发灶 23 例,口腔鳞癌颈淋巴结转移灶 10 例(其中 9 例标本取自上述鳞癌原发灶患者),并取原发灶切除边缘无癌变的上皮组织 11 例。所有标本均经病理学确诊。标本离体后立即用含体积分数为 0.05 %DEPC 的 PBS 冲洗,液氮冻存。

1.3 方法

1.3.1 探针制备和标记 pHLA-1.1 转化至感受态大肠杆菌 DH5 中,经含氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基筛选,转化阳性菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中扩增,碱裂解法小量抽提质粒。为得到大量的目的基因片段,以纯化质粒中 HLAB/C 基因座特异性序列为模板,通过 PCR 扩增其中 256 bp 的特异性序列(上游引物:5' GATGCAGGATTCTTCAG 3',下游引物:5' AGAAGITGCAGCTCAGTG 3'),产物经电泳分离鉴定、胶回收、纯化,-20 储存。探针标记采用随机引物法进行,标记产物用膜斑点杂交法检测标记效率²。

1.3.2 原位杂交 冰冻切片经 4 %多聚甲醛室温固定,乙醇梯度脱水后于-70 储存。杂交切片经 0.2 mol/L HCl 室温浸泡 20 min,37 蛋白酶 K(5 μg/ml)消化 15~20 min,4 %多聚甲醛室温固定 20 min,0.1 mol/L 三乙醇胺乙酰化切片 10 min 后用乙醇干燥。将切片置于盛有 2 ×SSC 的湿盒内 48 预杂交 2 h(预杂交液含体积分数为 50 %的去离子甲酰胺,3 ×SSC,体积分数为 5 %的硫酸葡聚糖,1 ×Denhardt s 氏液,800 μg/ml 变性断链的鲑鱼精 DNA)后弃去预杂交液,每片滴加 20 μl 杂交液(成分与预杂交液相同,仅增加浓度为 0.5 μg/μl 的经地高辛标记的煮沸变性 DNA 探针)于 48 孵育 16h。杂交后切片于 45 用含 50 %甲酰胺的 2 ×SSC 震荡冲洗 2 次,每次 20 min,再经 2 ×SSC、1 ×SSC、0.2 ×SSC 梯度震荡冲洗,每个梯度 2 次,每次 20 min。用阻断剂冲洗后,加入体积比为 1:500 的抗地高辛抗体 37 孵育 2h,NBT/BCIP 显色,待出现紫色信号后终止,甲基绿复染,二甲苯透明,封片。阴性对照采用不含探针的预杂交液代替杂交液进行杂交,其余步骤相同。

1.3.3 结果观察与图像分析 光镜下观察组织切片杂交信号强弱及定位。对切片上的杂交信号进行图像分析,系统定标。每张组织切片随机选取 6 个视野,运用图像分析软件 Image Pro 计算平均杂交光密度测量值(integrated optical density, IOD)作为整张切片的 IOD 值。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 10.0 进行统计学分析,各组平均 IOD 值的总体差异及组间两两比较用 ANOVA 方差分析,配对比较采用配对 t 检验。

2 结 果

2.1 PCR 扩增产物的电泳结果

质粒 pHLA-1.1 的 PCR 扩增产物电泳结果见图 1,从图 1 可见扩增产物片段长度为 256 bp,说明已成功扩增出特异性目的序列。

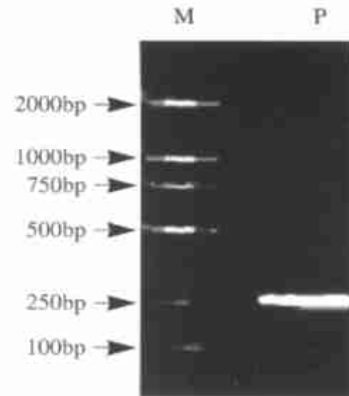


图 1 质粒 pHLA-1.1 PCR 扩增产物电泳结果

M:DNA 分子量 marker DL2000, P: 256 bp PCR 产物

Fig 1 Electrophoresis of the PCR product of the plasmid pHLA-1.1

M: DNA marker DL2000, P:256 bp PCR product of the pHLA-1.1

2.2 HLA-B/C mRNA 原位杂交信号的定位及分布

正常口腔粘膜上皮组织内,紫色杂交信号主要集中出现于基底细胞层和棘细胞层的细胞浆内(图 2),部分切片阳性信号延伸到颗粒层。肿瘤细胞中的杂交信号同样主要定位于鳞癌细胞的细胞浆,杂交信号强弱差异较大,分化较好的癌巢外层棘细胞样癌细胞内杂交信号较强(图 3),分化较差的肿瘤组织内,杂交信号普遍呈弱阳性或阴性。有 2 例患者的转移灶和原发灶中的杂交信号存在明显差异,其中 1 例原发灶内阳性信号明显而转移灶内信号微弱(图 4);另 1 例原发灶内几乎呈阴性表达而转移灶内阳性信号明确。阴性对照未出现特异的杂交信号。



图 2 组织学正常的口腔粘膜上皮 HLA-B/C mRNA 原位杂交 NBT/BCIP-甲基绿 ×180

Fig 2 ISH of the HLA-B/C mRNA detected in the histologically normal oral epithelium NBT/BCIP-methyl green ×180

2.3 HLA-B/C mRNA 原位杂交信号的图像分析

3组标本 HLA-B/C mRNA 表达的 IOD 值见表 1。统计学分析结果表明,原发灶组与正常粘膜组 IOD 值存在显著差异 ($P < 0.05$)。转移灶组的平均 IOD 值无论与原发灶组还是与正常粘膜组比较均无显著差异 (P 值分别为 0.817 和 0.17)。

对 9 例同时取到原发灶及颈淋巴结转移灶患者标本的 IOD 值也进行了配对 t 检验,结果表明无显著差异 ($P > 0.05$)。

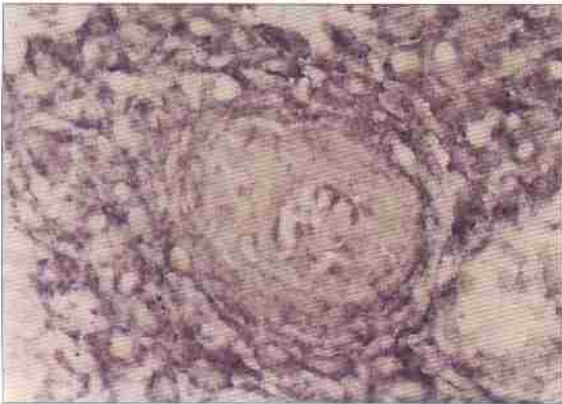


图 3 口腔鳞癌原发灶内 HLA-B/C mRNA 原位杂交,较强的阳性信号主要分布于癌巢外层棘细胞样肿瘤细胞胞浆内 NBT/BCIP-甲基绿 $\times 100$

Fig 3 ISH of the HLA-B/C mRNA detected in the primary OSCCs; strong hybridization signals were mainly distributed in cytoplasm of the tumor cells in the periphery of the carcinoma nest NBT/BCIP-methyl green $\times 100$



图 4 转移灶内肿瘤细胞 HLA-B/C mRNA 原位杂交信号减弱(与图 3 来自同一患者) NBT/BCIP-甲基绿 $\times 100$

Fig 4 ISH of the HLA-B/C mRNA detected in the metastasis focus derived from the primary lesion of Fig 3; hybridization signals were weak NBT/BCIP-methyl green $\times 100$

3 讨 论

许多恶性肿瘤都发现有 MHC-I 类分子表达降低或缺失的现象并与逃避机体的免疫监视有关³。本研究中采用了 HLA-B/C 基因座特异性的 DNA 探针⁴,在高严格度条件下进行杂交从 mRNA 转录的分子水平上探讨了人口腔鳞癌细胞 HLA-I 类分子的改

变。

表 1 各组 HLA-B/C mRNA 原位杂交平均 IOD 值结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Analysis of the average IOD values of the HLA-B/C mRNA ISH signals in the three groups($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	平均 IOD 值
正常粘膜	11	66508.74 \pm 93528.50
原发灶	23	28551.85 \pm 35959.29*
转移灶	10	35082.33 \pm 46166.17

* 与正常粘膜组比较 $P < 0.05$

笔者发现,正常上皮层细胞 HLA-B/C mRNA 的杂交信号主要出现在上皮的中下细胞层的胞浆内,其平均 IOD 值普遍较高并且阳性信号呈均质分布,提示正常上皮 HLA-B 基因及其转录机制尚未出现明显异常。

原发灶的肿瘤细胞杂交信号多呈异质性分布,分化较好的癌巢组织内,阳性信号集中出现于周边细胞内,而分化较差的部分阳性信号明显减弱或为阴性,推测这与肿瘤的不同分化潜能有关。杂交信号强弱不均,从阳性至阴性,而平均 IOD 值与正常组织相比存在显著差异 ($P < 0.05$)。Cruz 等⁵曾通过免疫组化的方法在对人口腔鳞癌标本研究中也发现 HLA-B/C 抗原的表达有明显减弱或缺失,其改变率高达 87%。HLA-I 类分子在肿瘤中的表达减弱或丢失主要有 4 种类型³: (1) HLA-I 类分子完全不表达,这主要由 MHC 结构基因的缺失、 β_2 微球蛋白的合成障碍、抗原加工相关转运体表达缺陷等因素引起; (2) HLA-I 单倍型的缺失,主要由染色体不分离或分裂期基因重排引起; (3) HLA-I 位点缺失,如 HLA-A 或 HLA-B 基因座位点表达缺失,主要由于转录机制异常引起,如位点特异性的启动子序列的改变以及转录因子的表达异常; (4) HLA-I 等位基因的缺失,常由基因的点突变、部分缺失或染色体断裂造成。以上各因素均有可能导致细胞内 HLA-I mRNA 转录水平的降低。本研究也观察到了肿瘤细胞内 HLA-B/C mRNA 总体水平有显著性降低。但是, Palmisano 等⁶用 RT-PCR 的方法检测了 25 例乳腺癌原发灶内肿瘤细胞的 HLA-A、HLA-B、HLA-C 3 个位点上的基因转录水平,却没有发现明显降低的情况,而在对 β_2 微球蛋白 mRNA 扩增时却发现 40% 的病例标本为阴性,因此认为其 HLA-I 类分子表达降低的原因是由于 β_2 微球蛋白的转录、合成障碍而导致了由 HLA 编码的重链分子和 β_2 微球蛋白基因编码的轻链分子不能稳固的结合于肿瘤的细胞膜上。笔者认为,不同组织来源的肿瘤细胞对 HLA 的调节存在一定的差异或者说不同的调

控方式所占比重不同。

在颈淋巴结转移灶内的肿瘤细胞杂交信号的分布也是强弱不均的,平均 IOD 值虽然有降低但与正常上皮及原发灶肿瘤组织相比均无显著性差异。研究还发现有 2 例病例标本的原发灶与转移灶 HLA-B/C mRNA 的转录水平存在明显差异,这可能反映了多克隆来源的口腔鳞癌细胞在生物学行为和组织相容性抗原的表达上存在某种关联⁷。为了进一步探讨同一肿瘤来源但转移潜能不同的肿瘤细胞是否存在 HLA-B/C mRNA 表达上的差异,本实验通过配对 *t* 检验统计了相同病例原发灶、转移灶 2 组阳性信号的平均 IOD 值,但是也没有发现存在显著性差异。虽然 Cromme 等⁸ 用免疫组化方法发现子宫颈癌淋巴结转移灶内的肿瘤细胞 HLA-B/C 表达与原发灶相比有显著降低,并因此认为 HLA-I 表达阴性的肿瘤细胞在机体免疫机制的选择下更容易发生转移,但在其他一些肿瘤中却发现转移灶内的肿瘤细胞有较高的 MHC-I 表达及较低的自然杀伤细胞活性⁹。笔者分析,肿瘤的发展不仅需要逃避 CTL 的监视,还要抵抗自然杀伤细胞的防御机制,而肿瘤靶细胞表面 MHC-I 特别是某些 HLA-I 等位基因的表达具有抑制自然杀伤细胞的溶解作用¹⁰,因此肿瘤特别是转移灶内的肿瘤细胞可能通过特异性降低能够呈递肿瘤抗原的 HLA-I 分子并同时表达能够抑制自然杀伤细胞溶解活性的某些表型而进一步逃脱宿主对肿瘤的免疫防御机制。肿瘤细胞如何通过改变 HLA-I 分子表达而促进转移尚需进一步探讨。

参考文献

- 1 Ruiz-Cabello F, Garrido F. HLA and cancer: From research to clinical impact. *Immunol Today*, 1998, 19(12):539-542
- 2 Boehringer Mannheim. Nonradioactive insitu hybridization application manual. 2nd ed, Germany: Doris Eisel, 1996:34-56
- 3 Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*, 1997, 18(2):89-95
- 4 Koller BH, Sidwell B, Demars R, et al. Isolation of HLA locus-specific DNA probes from the 3'-untranslated region. *Proc Natl Acad Sci*, 1984, 81(16):5175-5178
- 5 Cruz I, Meijer CJ, Walboomers JMM, et al. Lack of MHC class I surface expression on neoplastic cells and poor activation of the secretory pathway of cytotoxic cells in oral squamous cell carcinomas. *Br J Cancer*, 1999, 81(5):881-889
- 6 Palmisano CL, Pistillo MP, Capanni P, et al. Investigation of HLA class I downregulation in breast cancer by RT-PCR. *Hum Immunol*, 2001, 62(2):133-139
- 7 Zia A, Schildberg FW, Eunke I. MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in R0M0 breast cancer patients. *Int J Cancer*, 2001, 93(4):566-570
- 8 Cromme FV, van Bommel PFJ, Walboomers JMM, et al. Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br J Cancer*, 1994, 69(6):1176-1181
- 9 Marincola FM, Shamamian P, Alexander RB, et al. Loss of HLA haplotype and B locus down-regulation in melanoma cell lines. *J Immunol*, 1994, 153(3):1225-1237
- 10 Lanier LL, Phillips JH. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today*, 1996, 17(2):86-91

(2002-03-21 收稿)

(本文编辑 刘怡)

(上接第 35 页)

功能仍难以恢复正常。硬、软腭裂同期修复,在硬腭骨面上遗留的裸露骨面、凿断翼钩、鼻腔粘膜遗留的组织创面等均可严重抑制上颌骨的生长发育,使患儿出现面中份发育不足,下颌前突等⁸。有研究表明:完全性腭裂患者较不完全性腭裂更易出现术后软腭过短、语音不良、上颌骨生长发育障碍;但在唇裂修复同期采用犁骨瓣封闭硬腭裂隙则不会明显影响上颌骨的生长发育²,为尽早进行二期手术及二期手术中充分延长软腭、减轻对上颌骨生长发育的影响创造了条件。

参考文献

- 1 王光主编.唇腭裂的序列治疗.北京:人民卫生出版社,1995,1-6,185-193,307-352

- 2 石冰,王晴.外科修复腭裂的模式与方法.口腔颌面外科杂志,1999,9(4):326-328
- 3 邱蔚六主编.口腔颌面外科学.第3版.北京:人民卫生出版社,1995,348-359
- 4 周树夏主编.手术学全集:口腔颌面外科卷.北京:人民军医出版社,1994,548-558
- 5 徐慧芬,廖小宜,郑谦,等.完全性唇腭裂患者两阶段手术的初步研究.华西口腔医学杂志,2001,19(1):26-27
- 6 田薇综述.腭裂与听力障碍.国外医学口腔医学分册,1998,25(5):277-280
- 7 徐慧芬,徐丽蓉,王凯,等.腭裂患者中耳功能及听力障碍.中华口腔医学杂志,1998,33(3):167~168
- 8 McCarthy JG. Plastic Surgery. Vo 14: Cleft Lip and Palate and Craniofacial Anomalies. Philadelphia: WB Saunders Company,1990

(2001-08-31 收稿,2002-07-13 修回)

(本文编辑 邓本姿)