

人类主要组织相容抗原 DR 分子在口腔鳞癌中表达的研究

李龙江 张少平 佟 猛

【摘要】 目的 从基因转录水平和蛋白表达水平探讨了人主要组织相容抗原 DR(HLA-DR) 抗原分子在口腔鳞癌演变过程中的表达改变。方法 应用 HLA-DR 特异性单抗和 HLA-DR 基因特异性寡核苷酸探针分别通过免疫组织化学及原位杂交的方法分别从蛋白及转录水平检测了 32 例人口腔鳞癌原发灶、15 例颈淋巴结转移灶和 26 例正常口腔粘膜上皮标本内 HLA-DR 的表达。结果 口腔鳞癌原发灶内 HLA-DR 的表达显著性的高于正常口腔粘膜组 ($P < 0.05$) ;淋巴结转移灶的 HLA-DR 表达与原发灶和正常粘膜均未见统计学差异。原位杂交和免疫组化对于 HLA-DR 表达的检测具有一致性。结论 HLA-DR 在口腔鳞癌中存在有表达异常增高的现象,但与淋巴结转移并无明确关系。

【关键词】 人主要组织相容抗原 DR 分子; 口腔鳞状细胞癌; 原位杂交; 免疫组化

Human Leukocyte Antigen-DR Expression and Transcription in Oral Squamous Cell Carcinomas

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

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to investigate the transcription and expression levels of human leukocyte antigen-DR at different stages of oral squamous cell carcinomas. **Methods** The specific monoclonal antibody and -locus specific oligonucleotide probes of human leukocyte antigen-DR were employed in this study. A total of 32 primary oral squamous cell carcinomas, 15 metastatic foci and 26 histologically normal oral epithelia, were detected for the presence of the human leukocyte antigen-DR molecule by using immunohistochemistry and in situ hybridization. **Results** The human leukocyte antigen-DR expression of the primary foci was significantly higher than that of the normal epithelia ($P < 0.05$), but their expression did not show statistically difference between the metastatic foci and the normal epithelia. The immunohistochemistic results were identical with those of in situ hybridization. **Conclusion** The abnormal higher expression of the HLA-DR is a common character of primary oral squamous cell carcinomas, but it may be not relevant to the metastasis of tumors.

【Key words】 human leukocyte antigen-DR; oral squamous cell carcinoma; in situ hybridization; immunohistochemistry;

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) II 类基因区包括经典的 DR、DP、DQ 等基因座位,其产物主要表达于抗原呈递细胞 (antigen presenting cells, APCs)、B 淋巴细胞和被激活了的 T 淋巴细胞,起到识别和呈递外源性抗原肽的作用,并与共受体 CD4⁺ 结合从而约束辅助 T 淋巴细胞 (Th) 的识别功能¹。然而,在一些恶性肿瘤细胞内已观察到有 MHC 类分子的异常增高表达的现象^{2,3},其临床意义尚无统一认识。本研究拟通过原位杂交和免疫组化的方法探讨人类主要组织相容性抗原即人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 类分子的

DR 基因座在口腔鳞状细胞癌 (简称鳞癌) 演变过程中的表达改变,并为进一步研究口腔鳞癌的免疫学特性提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

含 37 个碱基的 HLA-DR 基因特异性正、反义寡核苷酸序列,其反义序列为 5'-CCGCTGCACTGTGAACTCTCCACCACC CCGTAGTTG-3 (GIBCO 公司合成,美国);地高辛寡核苷酸加尾标记试剂盒及地高辛检测试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司,德国);小鼠抗人 HLA-DR 单克隆抗体 LN3 (北京中山公司);寡核苷酸探针杂交稀释液 (武汉博士德公司);免疫组化染色试剂盒 HistostainTM-SP Kits (北京中山公司);二乙基焦碳酸,即 DEPC (Sigma 公司,美国)。

1.2 标本收集

所有研究标本均取自四川大学华西口腔医院颌面外科口

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 0949) 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

腔鳞癌手术患者,包括口腔鳞癌原发灶 32 例,口腔鳞癌颈淋巴结转移灶 15 例,并取原发灶切除边缘无癌变的上皮组织 26 例。所有标本均经病理组织学确诊。标本离体后立即用含体积分数为 0.05 %DEPC 的 PBS 缓冲液冲洗,液氮冻存。

1.3 实验方法

1.3.1 探针标记 根据试剂盒说明,采用加尾法标记寡核苷酸序列,并对标记效率进行检测。

1.3.2 原位杂交 (oligonucleotide-mRNA) 本实验只对其中 18 例原发灶和 10 例转移灶鳞癌标本进行了原位杂交。于 -20 对组织块行 8 μm 连续冰冻切片,经体积分数为 4 %的多聚甲醛溶液室温固定,乙醇梯度脱水后,于 -70 储存。杂交前复水,组织切片经 0.2 mol/L HCl 室温浸泡 20 min,37 蛋白酶 K(1 μg/ml) 消化 20 min,4 %多聚甲醛室温固定 20 min 及 0.1 mol/L 三乙醇胺乙酰化 10 min 后,乙醇干燥。预杂交时,切片与不含探针的杂交稀释液于 40 共同孵育 2 h。弃去预杂交液,每片滴加 15 μl 杂交液(内含经地高辛标记的寡核苷酸探针),于 40 孵育 16 h。杂交后,切片分别经 2 ×SSC、1 ×SSC、0.2 ×SSC 梯度震荡冲洗,每个梯度 2 ×20 min。切片与阻断剂在 37 孵育 30min 后,加入体积比为 1 500 的抗地高辛抗体再次 37 孵育 2 h。最后切片经 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及使用正义探针杂交,其余步骤相同。

1.3.3 免疫组化 采用 LsAB 法对组织切片进行染色。冰冻切片吹干后用冷丙酮固定 15 min,体积分数为 3 %的 H₂O₂ 室温闭光处理 15 min。切片经 5 %正常羊血清封闭 15 min 后滴加体积比为 1 200 的一抗并于 37 孵育 40 min 后再移入 4 冰箱过夜。切片分别与生物素化的羊抗鼠二抗及辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素孵育后,加入 DAB 底物溶液显色 3 min,及时终止显色后苏木素复染、脱水、透明、封片。阴性对照用正常羊血清稀释液代替一抗,其余步骤相同,阳性对照为同一切片内的固有层淋巴细胞。

1.3.4 结果观察 对于肿瘤组织,无论是原位杂交还是免疫组化染色,当平均阳性细胞个数占每个高倍视野(200 倍) 20 % 上者作为阳性病例,其余则记为阴性;对于正常口腔粘膜上皮,只要有确切阳性染色连续出现于基底细胞层时即可记为阳性。选取观察视野时注意避开坏死及大量角化组织。

1.4 统计学处理

统计软件采用 SPSS 10.0 软件包。各组 HLA-DR 免疫组化结果采用 ² 检验进行分析,原发灶 HLA-DR mRNA 转录与蛋白表达结果的比较采用 配对 ² 检验。

2 结 果

2.1 HLA-DR mRNA 原位杂交检测结果

寡核苷酸原位杂交的信号呈紫色定位于阳性细胞的胞浆内(图 1),探针阴性对照和正义链探针对照未出现特异性的杂交信号。原发灶阳性例数 15 例(阳性率 83.4 %),转移灶阳性例数 6 例(阳性率

60.0 %),两者无统计学差异(P = 0.207)。

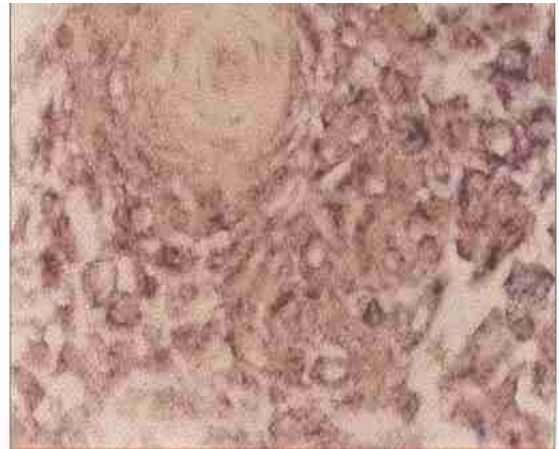


图1 口腔鳞癌原发灶内 HLA-DR mRNA 原位杂交信号分布 NBT/BCIP-甲基绿 ×80

Fig 1 Distribution of ISH signals of HLA-DR gene detected in the primary OSCCs NBT/PCI-methyl green ×80

2.2 HLA-DR 免疫组化表达

典型的棕黄色阳性信号出现于正常细胞及肿瘤细胞的胞膜上(图 2),部分细胞胞浆内也有着色。3 组标本 HLA-DR 表达情况见表 1。在正常口腔粘膜中,有 7 例出现 HLA-DR 阳性表达,且其中 5 例可见固有层内有大量单核细胞浸润。原发灶肿瘤组织中,有 21 例 HLA-DR 出现阳性表达,其中 11 例肿瘤细胞呈异质性着色,其余 10 例呈均质的弥漫性阳性着色。原发灶组与转移灶组的阳性率均高于正常口腔粘膜组,但只有原发灶组与正常粘膜组有显著差异(P < 0.05)。

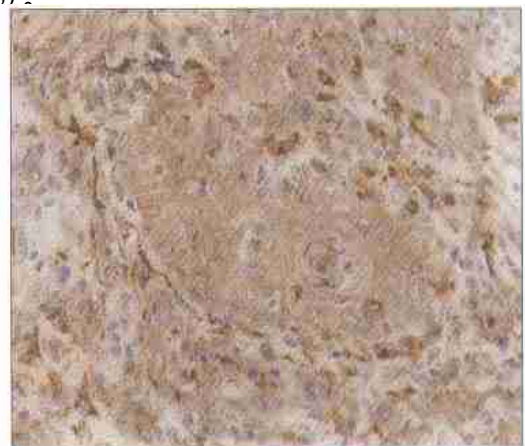


图2 HLA-DR 在口腔鳞癌原发灶内的表达 LsAB ×70

Fig 2 HLA-DR expression in the primary OSCCs LsAB ×70

2.3 HLA-DR 原位杂交及免疫组化结果的一致性检验

18 例鳞癌原发灶的免疫组化和原位杂交的一致性检验结果显示,两种方法检测具有一定程度的一致性(图 3,图 4,表 2),两者阳性检出率无统计学差

别。

表1 正常口腔粘膜、口腔鳞癌原发灶和颈淋巴结转移灶 HLA-DR免疫组化结果

Tab 1 HLA-DR expression in histologically normal oral mucosa, oral leukoplakia, primary OSCC and neck lymph node metastasis

分 组	例数	阳性例数(%)	阴性例数(%)
正常口腔粘膜	26	7(26.9)	19(73.1)
口腔鳞癌原发灶	32	21(65.6)	11(34.3)*
颈淋巴结转移灶	15	7(46.7)	8(53.3)

* 与正常粘膜组比较 P < 0.05



图3 HLA-DR在口腔鳞癌中的表达,癌巢内肿瘤细胞呈阳性反应() LsAB ×50

Fig 3 Expression of HLA-DR in the OSCCs; positive reaction in the carcinoma nest() LsAB ×50



图4 口腔鳞癌 HLA-DR mRNA原位杂交,与图3来自同一癌巢组织示阳性反应() NBT/BCIP-甲基绿 ×50

Fig 4 HLA-DR mRNA detected by ISH in the OSCCs; the same carcinoma nest as the Fig 3 also showed positive reactivity() NBT/PCIP-methyl green ×50

3 讨 论

在机体抗肿瘤免疫反应中,由 CD4⁺ Th 介导的免疫反应同样发挥着极其重要的作用。受 MHC-II 限制的 Th 再识别了由抗原呈递细胞 (APC) 提呈的肿瘤抗

原后可引发一系列免疫效应包括:激活 CTL、B 淋巴细胞及不受 MHC 限制的自然杀伤淋巴细胞共同发挥抗肿瘤作用¹。现已发现多种组织来源的肿瘤细胞均可异常地高表达 MHC 分子,但 MHC 在肿瘤中表达的临床意义尚有争议。

表2 18例原发灶 HLA-DR mRNA 转录与蛋白表达的结果比较

Tab 2 Comparison between transcription and expression of HLA-DR in 18 primary OSCCs

HLA-DR 原位杂交	HLA-DR 免疫组化		合计 (%)
	+(%)	-(%)	
+	10(55.6)	5(27.8)	15(83.4)
-	0(0)	3(16.6)	3(16.6)
合计	10(55.6)	8(44.4)	18(100)

注:一致性检验 Kappa = 0.4,配对 ² 检验 P = 0.063

本研究证实人口腔鳞癌组织可表达某些 MHC-基因座位点的产物如 HLA-DR。通过免疫组化实验发现原发灶组 HLA-DR 的表达率高达 65.6%,而组织学正常的口腔粘膜的阳性率为 26.9%。然而,HLA-DR 的异常高表达并非是肿瘤细胞特有的,一些良性病变如慢性炎症,也可导致受累细胞出现 MHC-DR 的高表达⁴。某些细胞因子如干扰素- (IFN-) 可以有效的诱导及增加口腔粘膜正常上皮和鳞癌细胞系 MHC 抗原的表达⁵。实验中笔者也发现,7 例 HLA-DR 抗原阳性表达的正常上皮组织中有 5 例都出现有固有层内大量单核细胞浸润。另外,在鳞癌组织切片上也可经常观察到有单核淋巴细胞的浸润,笔者认为由被激活了的 T 淋巴细胞产生的细胞因子如 IFN-,是导致 HLA-DR 在上皮细胞表达的重要因素。有学者^{6,7} 认为 HLA-DR 表达阳性的肿瘤细胞可作为 APC 向 CD4⁺ Th 细胞提呈肿瘤抗原并调节局部免疫反应以阻止肿瘤的局部浸润或转移。Cromme 等⁸ 在研究 20 例宫颈癌时发现,虽然有 9 例原发灶肿瘤细胞有 HLA-DR 的表达,但全部转移灶内的肿瘤细胞均未见有 HLA-DR 的表达。考虑到人类乳头状病毒与宫颈癌的关系,他们认为,HLA-DR 阴性的肿瘤细胞由于不能象表达阳性的肿瘤细胞那样可以向 CD4⁺ T 淋巴细胞呈递 HPV 抗原蛋白,因而更容易逃脱 CTL 的溶解作用而发生转移。然而,笔者的实验发现原发灶组与转移灶的肿瘤细胞 HLA-DR 的表达率相似,两者无显著性差异,提示 HLA-DR 阳性的肿瘤细胞同样可以逃避局部免疫监视作用。笔者的解释是,虽然 Th 的激活要受到 MHC 分子的限制,但由 MHC 提呈的抗原性质和抗原性大小对于调节

Th 的活性同样至关重要。应注意到,大多数的肿瘤细胞尚未证实存在抗原性强的特异性抗原如病毒抗原,那么由其 MHC 呈递的抗原所引发的免疫反应意义有限。另外,更有研究发现⁹,即使角化上皮细胞表达了 MHC 类分子并且在有特异性抗原存在的前提下同样不可能象经典的 APC 细胞那样激活 T 淋巴细胞,甚至还可以导致其免疫无反应性,以至于这样的淋巴细胞再次经过 APC 提呈抗原的刺激后失去了正常的增殖和其他免疫效应功能。因此,笔者推断口腔鳞癌淋巴结的转移并非是选择了 HLA-DR 表达阴性的克隆。肿瘤细胞由原发灶转移到了颈淋巴结,由于所处的微环境的改变,肿瘤细胞也有可能重新表达 HLA-DR 抗原。

为了进一步探讨 MHC 类抗原表达的调控机制,笔者通过寡核苷酸探针在组织原位与细胞内靶 mRNA 进行杂交,观察 HLA-DR 转录的情况。编码主要组织相容性抗原 类分子的 链在 DR 和 DQ 区呈现了高度同源性¹,因此选择恰当的寡核苷酸序列是关键问题之一。本实验选择的寡核苷酸序列位于编码 HLA-DR 基因座第 2 外显子 3 末端序列,相当于编码 HLA-DR 链第 82 ~ 95 氨基酸残基。Kajimura 等¹⁰通过 Southern 杂交证实该段序列最适合作为 HLA-DR 特异性的寡核苷酸探针。虽然本实验研究通过原位杂交的方法从转录水平上与免疫组化从蛋白表达水平上检测 HLA-DR 的表达具有一致性,但笔者发现运用原位杂交观察到的阳性率高于免疫组化的表达阳性率,有 5 例原发灶病例在原位杂交出现阳性信号而免疫组化却未见明确表达,而所有免疫组化表达阳性的在原位杂交中也为阳性,这提示笔者 HLA-DR 的表达可能存在某种转录后调节机制¹¹。

本实验研究结合免疫组化和原位杂交从蛋白表达及 mRNA 转录水平上研究了 HLA-DR 在口腔鳞癌发生、发展过程中的改变,认为 HLA-DR 在口腔鳞癌细胞中存在有表达异常增高的现象,但与肿瘤淋巴结转移并无明确的关系。这种异常增高的表达可能是受到了局部被激活了的淋巴细胞释放的某些因子如

IFN- 的调控。

参考文献

- 1 Bodmer WF. The HLA system: Structure and function. *J Clin Pathol*, 1987, 40(9):948-958
- 2 Ghosh AK, Moor M, Street AJ, et al. Expression of HLA-D sub-region on human colorectal carcinoma. *Int J Cancer*, 1986, 38(4):459-464
- 3 Cromme FV, Meijer CJLM, Snijders PJF, et al. Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. *Br J Cancer*, 1993, 67(6):1372-1380
- 4 Valnes K, Huitfeldt HS, Brandtzaeg P. Relation between T cell number and epithelial HLA class II expression quantified by image analysis in normal and inflamed gastric mucosa. *Gut*, 1990, 31(6):647-652
- 5 Mutlu S, Matthews JB, Midda M, et al. MHC antigen expression in human oral squamous carcinoma cell lines. *J Pathol*, 1991, 165(2):129-136
- 6 Sadanaga N, Kuwano H, Watanabe M, et al. Local immune response to tumor invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 1994, 74(2):586-591
- 7 Natali PC, De Martino C, Quaranta V, et al. Changes in Ia-like antigen expression on malignant human cells. *Immunogenetics*, 1981, 12(3-4):409-413
- 8 Cromme FV, van Bommel PJ, Walboomers JMM, et al. Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumors. *Br J Cancer*, 1994, 69(6):1176-1181
- 9 Bal V, McIndoe A, Denton G, et al. Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells. *Eur J Immunol*, 1990, 20(9):1893-1897
- 10 Kajimura Y, Krull J, Miyakoshi S, et al. Application of long synthetic oligonucleotides for gene analysis: Effect of probe length and stringency conditions on hybridization specificity. *Genet Anal Tech Appl*, 1990, 7(4):71-79
- 11 Jabrane-Ferrat N, Faille A, Loiseau P, et al. Effect of gamma interferon on HLA class I and -II transcription and protein expression in human breast adenocarcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 1990, 45(6):1169-1176

(2002-03-21 收稿)

(本文编辑 刘 怡)

《华西口腔医学杂志》2003 年征订启事

《华西口腔医学杂志》(双月刊)由四川大学和中华医学会四川分会主办,被列为中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊,是口腔医学期刊中唯一入选国家新闻出版总署重点建设的中国期刊方阵“双百”期刊的学术期刊。

本刊 2003 年扩版为 80 页,定价 10.00 元/期,全年 6 期。邮发代号 62-162,欢迎广大读者在当地邮局订阅,如在当地邮局漏订者,可直接与编辑部联系,每册加收邮费 1 元。联系方式:610041 四川省成都市人民南路三段 14 号《华西口腔医学杂志》编辑部,电话:028-85502414,传真:028-85503479, E-mail: hxkqbj@s@mail.wcums.edu.cn。