

米非司酮对绒癌细胞体外增殖及对非经典人类白细胞类抗原表达的影响

王建英¹, 李勇², 程建新¹, 范立侨¹, 吴小华¹, 赵群², 王世杰²

Effect of Mifepristone on Proliferation and Expression of Non-classical Human Leucocyte Antigen Class Molecules in Choriocarcinoma Cell Line

WANG Jian-ying¹, LI Yong², CHENG Jian-xin¹, FAN Li-qiao², WU Xiao-hua¹, ZHAO Qun², WANG Shi-jie²

1. Department of Gynecology and Obstetric, The Forth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China, 2. Department of Surgery

Abstract :Objective To explore the effect of mifepristone on the proliferation and the expression of non-classical HLA I molecules (HLA-G and HLA-E) in choriocarcinoma cell line JEG3. **Methods** The HLA-G highly positive cell line of choriocarcinoma (JEG3) was cultured in vitro, and MTT assay was used to examine antiproliferative effect of mifepristone on the JEG3 cells, the mRNA expression of HLA-G and HLA-E were detected by RT-PCR, and protein level by flow cytometry. **Results** Mifepristone produced concentration-dependent and time-dependent antiproliferative effect on JEG3 cell at all experimental concentrations. High-concentration mifepristone could significantly down-regulate both mRNA and protein expression of HLA-G and HLA-E. **Conclusion** One of mifepristone's antineoplastic mechanisms is surmounting immune tolerance to the neoplasm and inhibit its growth. **Key words** Mifepristone Human Leucocyte Antigen immune tolerance.

Key words : Mifepristone; Human Leucocyte antigen; Immune tolerance

摘要 :目的 探讨米非司酮对绒癌细胞 JEG3 体外增殖及对非经典人类白细胞 I 类抗原 HLA-G、HLA-E 表达的影响。方法 体外培养高表达 HLA-G、HLA-E 的绒癌细胞株 JEG3, 采用 MTT 法检测米非司酮对细胞增殖的影响, 分别通过 RT-PCR 技术和流式细胞分析技术观察其对细胞中 HLA-G、HLA-E mRNA 和蛋白水平表达的影响。结果 米非司酮对 JEG3 细胞的增殖表现出浓度依赖性的抑制作用, 高浓度米非司酮能明显下调 JEG3 细胞中 HLA-G、HLA-E mRNA 和蛋白水平。结论 米非司酮抗肿瘤机制之一可能是其可以打破机体对肿瘤的免疫耐受, 从而遏制肿瘤的生长。

关键词 : 米非司酮; 人类白细胞抗原; 免疫耐受

中图分类号: R737.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)07-0487-04

0 引言

研究表明人类白细胞抗原-G (human leukocyte antigen G, HLA-G) 和人类白细胞抗原-E (human leukocyte antigen E, HLA-E) 可通过免疫抑制途径, 在肿瘤发生过程中起到免疫逃逸作用^[1]。

许多体内外实验证明, 米非司酮对于性激素依赖性的妇科肿瘤有明显的抗肿瘤作用, 但作用机制不太清楚, 其作用是否与下调 HLA-G、HLA-E 有关, 目前尚未见报道。本研究将米非司酮直接作用于高表达 HLA-G 和 HLA-E 的绒癌细胞株 JEG3,

观察米非司酮对 JEG3 细胞的杀伤活性及对该细胞中 HLA-G、HLA-E 水平的影响, 探索米非司酮的抗肿瘤机制, 为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 绒毛膜癌细胞 JEG3, 购于中国科学院动物研究所计划生育及生殖生物学国家重点实验室。

1.1.2 试剂 米非司酮纯品 (RU486) 由北京紫竹药业有限公司提供; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购于 Sigma 公司; 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒购于 Fermentas 公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; HLA-G、HLA-E 单克隆抗体购于英国 Abcam 公司。

1.2 方法

收稿日期: 2007-07-04; 修回日期: 2008-01-30

基金项目: 河北省普通高校强势特色学科基金资助项目
作者单位: 050011 石家庄, 河北医科大学第四医院妇产科, 2. 外科

作者简介: 王建英 (1973-), 女, 博士, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤研究

1.2.1 JEG3 细胞培养 用含 10%胎牛血清、100 u/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素、2 mmol/L 的 DMEM/F12 培养液,在 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养,以 0.25%胰蛋白酶消化,2~3 天传代一次。

1.2.2 MTT 法检测米非司酮对 JEG3 细胞增殖的影响 米非司酮以无水乙醇溶解,配成 10 mg/ml,再以 RPMI1640 培养液稀释至所需浓度,试验组米非司酮终浓度分别为 1.25 μg/ml、2.5 μg/ml、5 μg/ml、10 μg/ml、20 μg/ml、40 μg/ml、80 μg/ml。为避免乙醇对试验的影响,设 7 个乙醇对照组,使乙醇终浓度与各实验组乙醇含量一致。采用 MTT 比色法检测细胞的增殖情况,取对数生长期的细胞,调整浓度为 2 × 10⁵/ml,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μl,贴壁培养 24 h 后分别加入不同浓度的药物,每个浓度设 6 个复孔,每板设 3 个空白对照孔。细胞培养设定时间后,每孔加入 10 μl MTT(浓度为 5 mg/ml),继续培养 4 h 后,弃培养液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO) 150 μl,振荡 10 min,酶标仪在 600 nm 处测定吸光度(A)值,并按如下公式计算各组细胞的生长抑制率。实验重复 5 次。

细胞生长抑制率 = (对照孔 A 值 - 实验孔 A 值) / 对照孔 A 值 × 100%。

1.2.3 RT-PCR 技术检测米非司酮对 JEG3 细胞 HLA-G、HLA-E mRNA 水平的影响 试验组米非司酮终浓度为 40 μg/ml、80 μg/ml,同时设无药对照组。药物作用于 JEG3 细胞 72 h,用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,用紫外分光光度法定量 RNA。将等量的 RNA 反转录为 cDNA 第 1 链,以获得的逆转录产物为模板进行 PCR,扩增 HLA-G 基因、HLA-E 基因和 β -actin 基因。使用凝胶分析系统对扩增条带进行密度分析,以平均灰度值代表相应基因的表达量,并除以 β -actin 的平均灰度值,所得数值做为各扩增产物 mRNA 的相对表达量。扩增条件为: HLA-G 为 94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 45 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环,72℃ 延伸 7 min; HLA-E 为 94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 55 s,72℃ 延伸 2 min,40 个循环,72℃ 延伸 7 min。1%琼脂糖凝胶电泳 80V 30 min,观察基因表达变化。引物序列^[2]: HLA-G 上游引物为 5'-AGA CGC CAA GGA TGG TGG TCA-3',下游引物为 5'-AGG AAA GGT GAT TGG GGA AGG-3'; HLA-E 上游引物为 5'-TCC GAG CAA AAG TCA AAT-3',下游引物为 5'-AGA TCC AAG GAG AAC CAG-3'; β -actin 上游引物 5'-AAG AGA GGC ATC CTC ACC CT-3',下游引物为 5'-GGA AGG AAG GCT GGA AG-3'。扩增产物:

HLA-G 为 770 bp,HLA-E 为 447 bp, β -actin 为 619 bp。实验重复 5 次。

1.2.4 流式细胞技术测定米非司酮对 JEG3 细胞 HLA-G、HLA-E 蛋白表达的影响 试验组米非司酮终浓度为 40 μg/ml 和 80 μg/ml,药物作用于 JEG3 细胞 72 h,取单细胞悬液 1 × 10⁶/ml,分别加入 100 鼠抗人单克隆抗体 HLA-G、HLA-E 100 μl,孵育 30 min,PBS 洗涤去上清,加入 10 羊抗鼠 FITC-IgG100 μl,孵育 30 min,PBS 冲洗未结合抗体,再加入 PBS,经 500 目铜网过滤后上机检测,设本底对照和阴性对照。以荧光指数(FI)表示蛋白的相对含量。实验重复 5 次。

1.2.5 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 统计软件进行数据分析,进行 F 检验。

2 结果

2.1 米非司酮对 JEG3 细胞增殖的影响

由图 1 可看出,随着作用时间的延长,同一浓度的米非司酮对细胞的抑制率有逐渐升高的趋势,其中 40 μg/ml 和 80 μg/ml 两个浓度作用细胞 72 h 后抑制率达到 50%以上,故选用 72 h 为米非司酮的最佳实验作用时间。

与空白对照组相比,药物作用 72 h 后,各浓度米非司酮对 JEG3 细胞均有不同程度的杀伤作用,呈浓度依赖性(P < 0.05)。当米非司酮浓度低于 10 μg/ml 时,抑制作用较弱,但浓度达 20 μg/ml 以上时,抑制作用呈明显上升趋势,当浓度为 80 μg/ml 时,抑制率几乎达到 100%。用于溶解米非司酮的乙醇对细胞生长并无明显影响,见图 1。

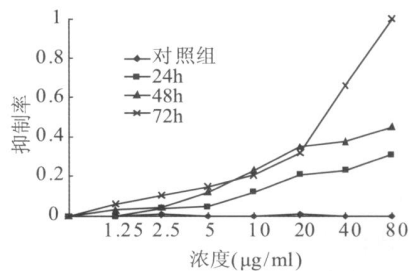


图 1 米非司酮抑制 JEG3 细胞的浓度效应曲线

Fig 1 Concentration-response curve for JEG3 cells treated by mifepristone

2.2 米非司酮对 JEG3 细胞中 HLA-G mRNA 和蛋白水平的影响

米非司酮作用于 JEG3 细胞 72 h 后,对照组、40 μg/ml 组和 80 μg/ml 组之间两两比较,HLA-G mRNA 和蛋白表达变化均有统计学意义。其中对照组和 80 μg/ml 组相比,P < 0.01;对照组和 40 μg/ml 组、40 μg/ml 组和 80 μg/ml 组相比,均为 P

< 0.05。见表 1、图 2、4。

表 1 米非司酮对 JEG3 细胞 HLA-G、HLA-E mRNA 和蛋白表达的影响

Tab 1 Effect of Mifepristone on the mRNA and protein expression of HLA-G, HLA-E in JEG3 cells

浓度 (μg/ml)	光密度比值	荧光指数
HLA-G		
0	0.966 ± 0.049	0.995 ± 0.072
40	0.892 ± 0.015 *	0.895 ± 0.034 *
80	0.816 ± 0.060 **	0.802 ± 0.069 **
HLA-E		
0	0.533 ± 0.028	0.983 ± 0.015
40	0.516 ± 0.010	0.972 ± 0.010
80	0.495 ± 0.010 **	0.949 ± 0.014 **

*:与对照组比较 P<0.05; **:与对照组比较 P<0.01

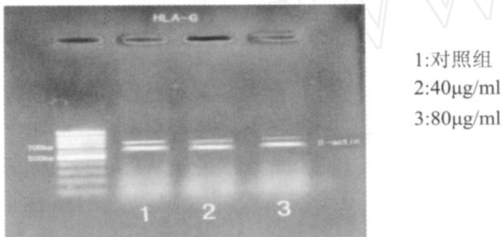


图 2 米非司酮对 JEG3 细胞中 HLA-G mRNA 表达的影响
Fig 2 Effect of Mifepristone on the mRNA expression of HLA-G in JEG3 cells

2.3 米非司酮对 JEG3 细胞中 HLA-E mRNA 水平和蛋白水平的影响

80 μg/ml 米非司酮作用于 JEG3 细胞 72 h 后,与对照组相比,HLA-E mRNA 和蛋白表达均明显降低;40 μg/ml 组与对照组相比,HLA-E mRNA 和蛋白水平变化无统计学意义(分别为 P = 0.164, P = 0.2);40 μg/ml 组与 80 μg/ml 组相比,mRNA 表达降低不明显(P = 0.098),蛋白表达降低有统计学意义(P = 0.018),见表 1、图 3、5。

3 讨论

机体免疫监视作用的主要效应细胞是 CTL (cytotoxic T cell, CTL) 和 NK 细胞,CTL 对肿瘤细胞的识别要依赖对肿瘤细胞表面的主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 类分子的识别。对于不表达 MHC 类分子的肿瘤细胞,NK 细胞发挥其细胞毒作用以攻击肿瘤细胞。

与此同时,肿瘤细胞通过多种途径逃避机体的免疫监视作用,包括经典的 MHC 类分子丢失或

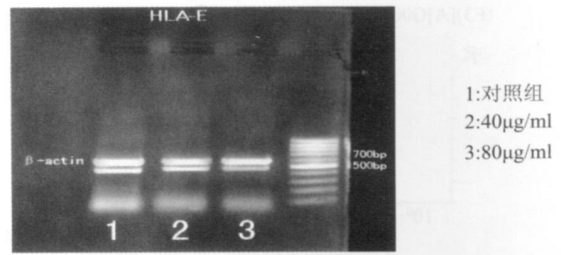


图 3 米非司酮对 JEG3 细胞中 HLA-E mRNA 表达的影响
Fig 3 Effect of Mifepristone on the mRNA expression of HLA-E in JEG3 cells

变构,导致 CTL 杀伤功能的丧失;另外肿瘤细胞在丢失 MHC 类分子的同时可高表达非经典的 MHC 类分子(如 HLA-G、HLA-E),传递强烈的杀伤抑制信号,致使肿瘤细胞在逃逸 CTL 的杀伤作用后又逃逸 NK 细胞的杀伤作用。

NK 细胞受体包括两类,即免疫球蛋白超家族和 C 型凝集素超家族,每一类又包括抑制性受体和活化性受体。免疫球蛋白超家族中抑制性受体 KIRs(killer cell inhibitory receptor)有 IL T-2 (Ig-like transcript 2)和 IL T-4,识别 HLA-G。C 型凝集素超家族抑制性受体 CD94/NKG2A,识别 HLA-E^[3]。HLA-G 和 HLA-E 具有相似的 NK 抑制功能,其多态性有限,组织分布广泛。HLA-G 与 KIR 结合后,激活 KIR 胞浆部分含有的免疫受体酪氨酸抑制基序,该基序与自身 MHC 类分子的结合后,可转导负调控信号,抑制 NK 细胞活化。HLA-E 需要与源于其他 HLA-I 类分子等位基因前导序列的特异性肽段结合,这一肽段必须能稳定 HLA-E 的表达,与 HLA-E 结合成为 CD94/NKG2A 的识别受体,抑制 NK 细胞及部分 T 淋巴细胞的细胞毒作用^[4]。HLA-G 和 HLA-E 具有互补或协同作用,前者能促进和稳定后者的表达。

HLA-G 的高表达依赖于肿瘤微环境中的活化刺激剂,如 IFN-、GM-CSF、IL-2、IL-10 等,均可增强 HLA-G 蛋白的表达,对 HLA-E 表达也有一定促进作用^[5,6]。因其在胎盘母体面绒毛膜外细胞滋养层大量表达,陈春玲等^[7]研究发现,HCG 在 HLA-G 的表达调节上具有重要作用,高表达的 HCG 可能在绒毛中通过上调 HLA-G 参与免疫逃逸方面具有重要意义。2006 年 Yie 等^[8]研究报道了黄体酮、绒毛膜促性腺激素、孕激素可通过上调 HLA-G 的水平以达到保胎的目的,由此推测临床的引产药物如米非司酮等引起流产的机制可能与它们能下调 HLA-G、HLA-E 的水平有关,进而推测其在免疫逃逸方面的抗肿瘤机制。

抑制孕激素受体阳性肿瘤细胞的生长,并促使

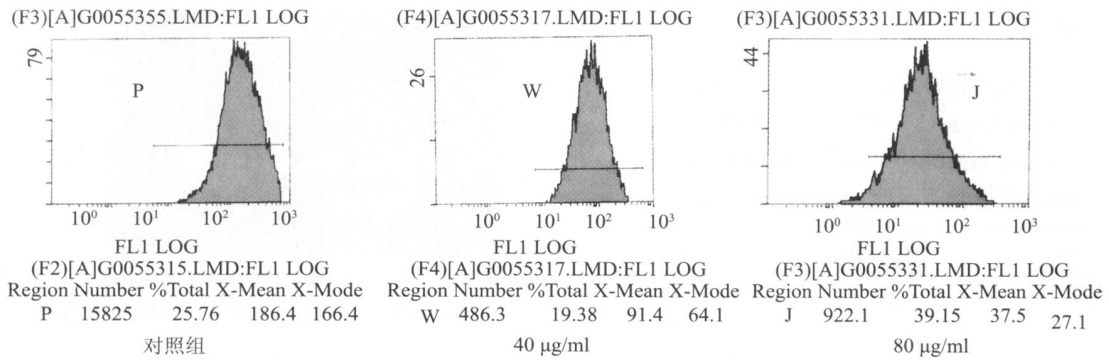


图 4 米非司酮对 JEG3 细胞中 HLA-G 蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of Mifepristone on the protein expression of HLA-G in JEG3 cells

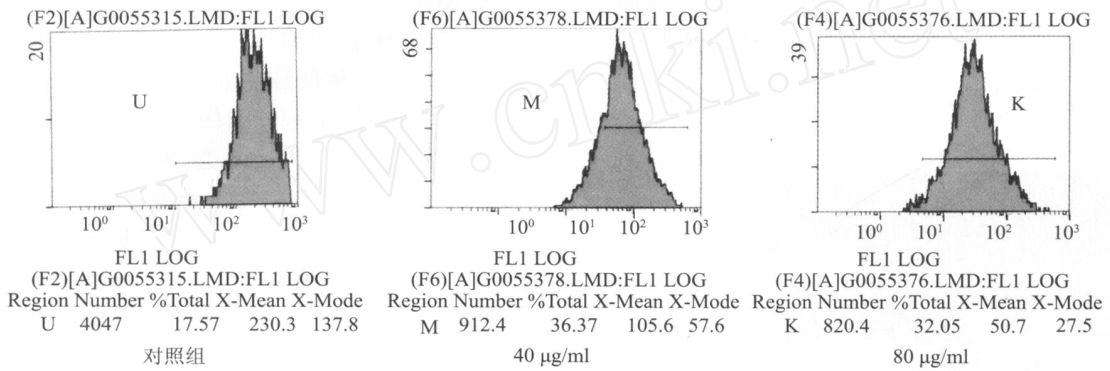


图 5 米非司酮对 JEG3 细胞中 HLA-E 蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of Mifepristone on the protein expression of HLA-E in JEG3 cells

他们向终末分化,是米非司酮抗肿瘤活性的主要机制;另外米非司酮也可通过下调 bcl-2、诱导 TGF-1 表达从而诱导细胞凋亡^[9];研究还发现米非司酮是一种特异性细胞周期抑制性药物,通过抑制细胞 DNA 的合成,使肿瘤细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,不能进入 S 及 G₂/M 期,从而抑制肿瘤细胞的增殖^[10]。本研究表明,米非司酮对 JEG3 细胞具有很强的抑制作用,呈时间和剂量依赖性。高浓度的米非司酮作用于 JEG3 细胞 72 h,可以下调 HLA-G、HLA-E 基因 mRNA 和蛋白水平,而且 80 µg/ml 组下调 HLA-G、HLA-E 程度高于 40 µg/ml 组,尤其 HLA-G 表现更明显,提示米非司酮抗肿瘤的另一机制可能是其可以打破机体对肿瘤的免疫耐受,恢复效应细胞的杀瘤作用,从而遏制肿瘤的生长,这也为肿瘤的治疗提供了新的发展方向。尤其对于癌组织高表达 HLA-G、HLA-E 的患者或常规药物耐药的患者,在进行肿瘤免疫治疗研究过程中,应该充分考虑肿瘤细胞表达 HLA-G、HLA-E 抗原的影响。

参考文献:

[1] Favier B, LeMaout J, Rouas-Freiss N, et al. Research on HLA-G: an update[J]. Tissue Antigens, 2007, 69(3): 207-211.
 [2] Monique H Hurks, Markus M, Valter, et al. Uveal Melanoma:

No Expression of HLA-G[J]. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2001, 42(13): 3081-3084.
 [3] Masilamani M, Nguyen C, Kabat J, et al. CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network at the immunological synapse [J]. J Immunol, 2006, 177(6): 3590-3596.
 [4] Felicity A, Bland, Marius K. et al. Requirement of the Proteasome for the Trimming of Signal Peptide-derived Epitopes Presented by the Nonclassical Major Histocompatibility Complex Class I Molecule HLA-E[J]. Biol Chem, 2003, 278: 33747-33752.
 [5] Urosevic M, Dummer R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message[J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(5): 337-342.
 [6] Gobin SJ, van den Elsen PJ. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G[J]. Hum Immunol, 2000, 61(11): 1102-1107.
 [7] 陈春玲, 廖秦平. HCG 促进绒毛癌细胞系中 HLA-G 的表达[J]. 中国妇产科临床杂志, 2004, 5(2): 113-114.
 [8] Yie SM, Xiao R, Librach CL. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element [J]. Hum Reprod, 2006, 21(10): 2538-2544.
 [9] Fauvet R, Dufournet Etienne C, Poncelet C. et al. Effects of progesterone and anti-progestin (mifepristone) treatment on proliferation and apoptosis of the human ovarian cancer cell line, OVCAR-3[J]. Oncol Rep, 2006, 15(4): 743-748.
 [10] 王刚, 郑闻亭, 肖平, 等. 米非司酮对耐药卵巢癌细胞增殖、凋亡及其对顺铂敏感性的影响[J]. 癌症, 2004, 23(4): 406-411.

[编辑:安凤;校对:杨卉]