

脱氧雪腐镰刀菌烯醇对人外周血单个核细胞 HLA-I 分子表达的影响

李月红*, 张祥宏, 邢凌霄, 严霞, 王俊灵, 王凤荣

(河北医科大学基础所实验病理室, 石家庄 050017)

摘要: 研究探讨了脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)对人外周血单个核细胞 HLA-I(human leucocyte antigen I)分子表达影响。采用流式细胞术(FCM)和免疫印迹方法研究了不同剂量 DON 对体外培养人外周血单个核细胞表面 HLA-I 分子表达的影响及其量效关系。FCM 定量检测结果表明, 不同浓度 DON 处理均可一定程度降低人外周血单个核细胞表面 HLA-I 分子的表达, DON 50ng/mL、100 ng/mL、1000 ng/mL 和 2000 ng/mL 组 HLA-I 类分子的平均表达量分别为 6.92 ± 0.68 、 6.64 ± 0.69 、 5.95 ± 0.48 和 5.48 ± 0.77 , 在 50~2000ng/mL 范围内随着 DON 浓度增加, 外周血单个核细胞 HLA-I 分子表达降低, 两者呈显著负相关($r=0.737$, $P<0.01$)。Western 印迹结果显示, 大剂量 DON(1000 ng/mL 和 2000 ng/mL)组人外周血单个核细胞 HLA-I 分子表达明显减弱。研究结果表明脱氧雪腐镰刀菌烯醇可剂量依赖地抑制体外培养的人外周血单个核细胞 HLA-I 分子的表达。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; HLA-I; 人外周血单个核细胞; 流式细胞光度术; Western 印迹
中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-297-04

HLA-I 类抗原分子广泛分布于有核细胞膜上, 其主要功能是在免疫应答中参与内源性抗原分子的加工处理和提呈, 从而控制免疫应答的发生和强弱。机体抗肿瘤免疫主要依赖细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)介导的免疫应答, HLA-I 分子-抗原肽复合体与 T 淋巴细胞的受体结合是 T 淋巴细胞活化、增殖进而对靶细胞产生杀伤力并分泌淋巴因子的第一激活信号, 在肿瘤免疫监视中发挥重要作用^[1,2]。最近研究发现, 某些外界环境因素可影响正常免疫细胞表面 HLA-I 分子的表达^[3]。因此, 外界环境因素对正常免疫细胞表面 HLA-I 分子的表达的影响及其在恶性肿瘤发生发展中的可能作用, 逐渐受到了学术界的关注。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)又称作呕吐毒素(vomitoxin, VT), 结构上属于单端孢菌烯族毒素, 是全世界饲料和粮食的主要污染霉菌毒素, 也是我国食管癌、胃癌高发区居民粮食的优势污染霉菌毒素之一^[4,5]。本研究室进行的研究表明, DON 对人和动物免疫功能主要产生负面影响^[6,7]。DON 的免疫毒性可能在肿瘤的发生中发挥一定作用, 但需进一步证实。目前, 有关 DON 对 HLA

表达影响的研究国内外均未见报道。本研究采用流式细胞术(FCM)和免疫印迹(Western blotting)方法研究了 DON 对人外周血单个核细胞表面 HLA-I 分子表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

流式细胞仪为美国 BD 公司生产的 FACS420 型; 新鲜健康成年人外周静脉血由河北省血液中心提供; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Sigma)由北京中山生物技术公司提供; 淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂; RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品。

1.2 人外周静脉血单个核细胞的分离与培养

聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心法(ficoll-hypaque density gradient centrifugation)分离人外周静脉血单个核细胞。主要步骤如下: 每批新鲜抗凝静脉血 200mL 加等体积的生理盐水稀释, 吸取淋巴细

收稿日期: 2003-08-06; 修回日期: 2004-01-08

国家科技部基础研究重大项目前期研究专项资助项目(批准号: 2001CCC00500)和河北省自然科学基金重点资助项目(批准号: 301350)

* 通讯作者, E-mail: blyjs@hebm.edu.cn

胞分离液(每10mL稀释血加5mL分离液)置于50mL离心管中,然后小心将2倍体积的稀释血加在淋巴细胞分离液上,2000 r/min离心25min,小心吸出分层液与血浆交界处的灰白色浑浊层(单个核细胞),PBS洗2次,按 1×10^6 个细胞/mL的浓度接种于含10%胎牛血清, 10^5 U/L青霉素,100mg/L链霉素的RPMI 1640培养基中,加入PHA至终浓度300 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂培养。

1.3 实验分组与处理

将单个核细胞按上述方法培养48h,然后更换不含PHA的新的RPMI 1640培养基,随机分为对照组和实验组,实验组根据DON处理浓度分为4个亚组。对照组加入生理盐水20 μ L,实验组加入DON至终浓度分别为50ng/mL,100ng/mL,1000ng/mL和2000ng/mL,继续孵育24h,生理盐水洗涤2次,更换新的RPMI 1640培养基,继续培养24h,然后离心收集细胞,用于FCM和蛋白印迹检测。

1.4 流式细胞术(flow cytometry, FCM)样品的制备及HLA-I检测

离心收集细胞,PBS洗2次,1%多聚甲醛固定,4 $^{\circ}$ C保存待测。HLA-I抗原检测采用间接免疫荧光法,主要步骤如下:离心收集细胞,以冷PBS洗涤,离心弃上清;加入200 μ L PBS稀释的鼠抗人HLA-I的单克隆抗体轻吹混匀,4 $^{\circ}$ C孵育30min;PBS洗涤1次,加入200 μ L PBS稀释的荧光素标记的二抗轻吹混匀,避光4 $^{\circ}$ C孵育30min;冷PBS离心洗涤2次,细胞重新悬浮于200 μ L PBS中混匀,置流式测试管中上机检测。以荧光强度(FI)表示HLA-I表达的强弱,以平均荧光强度计量各组HLA-I表达量。

1.5 单个核细胞膜蛋白的提取及总蛋白定量

淋巴细胞膜蛋白的提取简要步骤如下:收集培养的单个核细胞,以冰冷的PBS洗涤2次;将细胞重新悬浮于TritonX-100裂解缓冲液(300mmol/L NaCl、pH7.6 50mmol/L Tris-HCl、0.5% TritonX-100、1mmol/L PMSF异丙醇溶液)中,细胞浓度为 10^8 个/mL,4 $^{\circ}$ C放置30~40min,不时轻轻振摇;4 $^{\circ}$ C 1200 r/min离心15min,小心吸出上清(膜蛋白),-20 $^{\circ}$ C保存。采用改良福林-酚法测定各组蛋白样品的总蛋白浓度。

1.6 Western 印迹

SDS-PAGE电泳(20mA),分离样品蛋白质;进行印迹电泳(90V,1.5h),将PAGE中的蛋白质转移到硝酸纤维素膜(membrane nitrocellulose, NC)上;

取出NC膜放入塑料袋中,加入2mL牛血清白蛋白(BSA)封闭,4 $^{\circ}$ C过夜;加入1mL 1%BSA稀释的HLA-I单克隆抗体(1:100)室温反应3~4h;加入生物素标记的第二抗体室温反应2~3h;DAB显色试剂盒进行显色,反应5~10min,终止显色,拍照记录,应用图像分析对阳性条带进行定量分析。

1.7 统计学处理

实验数据以均数 $\pm$ 准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS10.0统计软件包进行单因素方差分析和相关回归分析。

2 结果

2.1 流式细胞术检测结果

FCM定量分析结果表明,不同浓度DON处理24h后,单个核细胞表面的HLA-I分子表达量与对照组比都降低(见图1)。各组单个核细胞表面HLA-I分子平均表达量见表1,高浓度DON(1000ng/mL和2000ng/mL)处理组HLA-I分子表达降低较明显,与对照组比有统计学意义($P < 0.05$)。在50ng/mL到2000ng/mL的浓度范围内,随着DON浓度的升高HLA-I表达量相应降低,两者呈明显的负相关,直

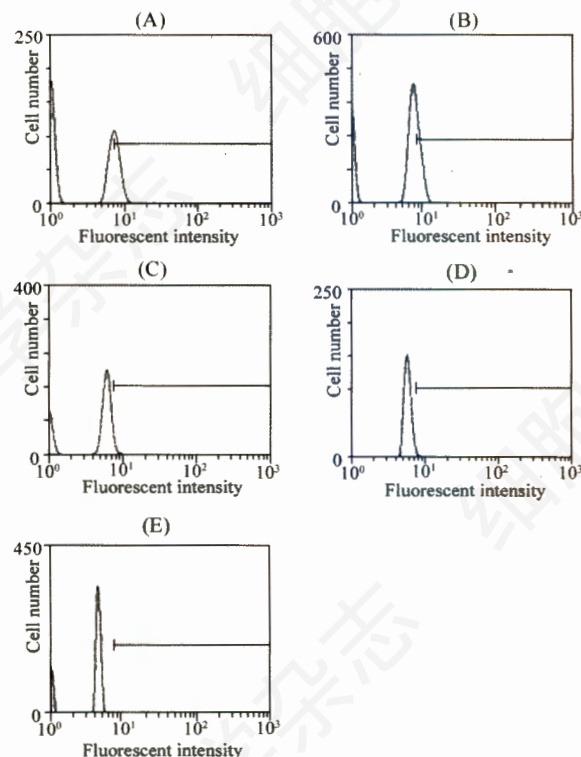


图1 DON处理的人外周血单个核细胞HLA-I表达的FCM组方图

A: 对照; B: DON 50ng/mL; C: DON 100ng/mL; D: DON 1000ng/mL; E: DON 2000ng/mL。

表1 不同浓度 DON 处理 24h 后，单个核细胞的 HLA-I 分子表达(FI, n=6)

DON concentration (ng/mL)	HLA-I expression (FI)
Control (0)	7.13±0.38
50	6.92±0.68
100	6.64±0.69
1000	5.95±0.48*
2000	5.48±0.77*

单因素方差分析，* $P<0.05$ ，与对照组比较。

线回归方程为 $Y=7.699-0.425X$ ($r=0.737$, $P<0.01$, $n=6$)。

2.2 HLA-I 蛋白免疫印迹结果

SDS-PAGE 电泳后，HLA-I 可分解为 α 、 β 两条链，分子量分别为 43kDa 和 12kDa。经 Western 杂交后发现分别在 43kDa 和 12kDa 位置出现了棕黄色阳性条带(见图 2)。采用图像分析对阳性条带进行灰度扫描定量分析，对照组的两条带的灰度值分别为 2.482/1.506，DON(50, 100, 1000 和 2000ng/mL)处理组的灰度值分别为 2.427/1.731、2.569/1.296、1.634/1.224 和 1.000/1.000。其中高浓度 DON(1000 和 2000ng/mL)处理组与对照组比降低最明显(见图 3)。

3 讨论

HLA-I 分子是参与免疫应答的重要细胞表面分子，在机体的排斥免疫、肿瘤免疫和自身免疫方面发挥重要作用。HLA-I 分子的正常表达是机体免疫监视和杀伤的重要环节，一方面，肿瘤的发生发展过程中肿瘤细胞 HLA-I 分子表达的丢失或降低，不能有效的将肿瘤抗原肽呈递给 CTL，激活 T 淋巴细胞的免疫应答，从而造成了肿瘤细胞逃避免疫系统的监视和杀伤^[1,2]。另一方面，机体的单核细胞、巨噬细胞等抗原提呈细胞的 HLA-I 分子表达降低抑制了抗原的提呈，同样不能有效激活 T 淋巴细胞的免疫应答。Salek 等^[3]研究发现 EB 病毒编码的 IL-10 可完全抑制单核细胞和巨噬细胞 HLA-I 分子表达，从而造成其抗原提呈功能的缺陷，进而避免了宿主 T 淋巴细胞对病毒感染细胞的监视和杀伤。Fine 等^[8]研究发现烟叶提取物抑制体外培养的原角质细胞表面 HLA-I 的表达，认为这可能有助于细胞逃避免疫监视，使癌变发生成为可能。

DON 是我国食管癌高发区居民粮食中最常见的一种污染霉菌毒素，其污染率和含量均很高，常与其他致癌性霉菌毒素如黄曲霉毒素、杂色曲霉素、

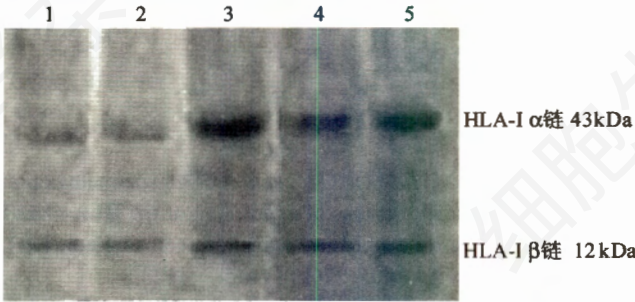


图2 蛋白质印迹检测 DON 处理人外周血单个核细胞 HLA-I 表达
1: DON 2000ng/mL; 2: DON 1000ng/mL; 3: DON 100ng/mL; 4: DON 50ng/mL; 5: 对照。

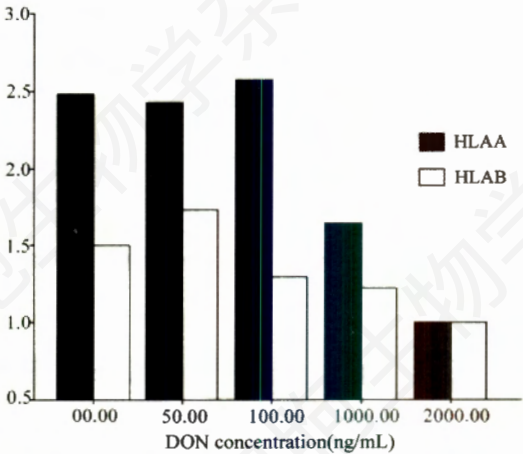


图3 HLA-I 表达的 Western 印迹检测定量结果

伏马菌素等形成混合污染^[5]。目前，DON 免疫毒理学的研究主要集中在免疫细胞凋亡与增殖、细胞因子分泌和抑制蛋白合成等方面^[6,7,9,10]，未见 DON 对激活肿瘤免疫应答的重要细胞膜分子 HLA-I 类抗原影响的研究报道。本研究从免疫应答的抗原呈递角度分析了 DON 对体外培养的人外周血单个核细胞 HLA-I 类分子表达的影响。本研究 FCM 结果表明，体外经 PHA 活化的单个核细胞在 DON 处理 24h 后，其表面的 HLA-I 分子表达明显受到抑制，而且随着 DON 浓度的升高，HLA-I 分子表达相应降低，两者呈明显的负相关。免疫印迹结果也证实，高浓度 DON 可明显抑制 HLA-I 分子的表达。

本研究从 HLA-I 分子表达的角度分析了 DON 对免疫细胞的影响，发现 DON 可浓度依赖性地抑制体外培养的人外周血淋巴细胞和单核细胞 HLA-I 的表达，从而可能对机体的免疫监视产生一定的负面影响。结合我国恶性肿瘤高发区居民饮食霉菌毒素污染情况综合分析可见，DON 通过抑制免疫细胞的 HLA-I 分子表达，进而抑制免疫应答造成恶变细胞逃避免疫监视和攻击，可能在致癌性霉菌毒素诱发

恶性肿瘤的发生发展中发挥一定的作用, 应该引起肿瘤工作者的重视。

参 考 文 献

- [1] NIE Y, YANG G, SONG Y, *et al.* DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Carcinogenesis*, 2001, **22**(10): 1615 — 1623.
- [2] PASCHEN A, MENDEZ R M, JIMENEZ P, *et al.* Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: A result of successive mutational events[J]. *Int J Cancer*, 2003, **103**(6): 759 — 767.
- [3] SALEK-ARDAKANI S, ARRAND J R, MACKETT M. Epstein-barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-Class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes: implications for immune evasion by EBV[J]. *Virology*, 2002, **304**(2): 342 — 351.
- [4] ROTTER BA, PRELUSKY DB, PESTKA JJ. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin) [J]. *J Toxicol Environ Health*, 1996, **48**(1): 1 — 34.
- [5] ZHANG X H, XIE T X, LI S S, *et al.* Contamination of fungi and mytoxins in foodstuffs in high risk area of esophageal cancer[J]. *Biomed Environ Sci*, 1998, **11**(2): 140 — 146.
- [6] 李月红, 张祥宏, 王俊灵等. 脱氧血腐镰刀菌烯醇对小鼠胸腺细胞凋亡和增殖的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2002; **18**(7): 778 — 781.
- [7] SUN X M, ZHANG X H, WANG H Y, *et al.* Effects of sterigmatocystin, deoxynivalenol and aflatoxin G1 on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro [J]. *Biomed Environ Sci*, 2002, **15**(2): 145 — 152.
- [8] FINE C I, HAN C D, SUN X, *et al.* Tobacco reduces membrane HLA class I that is restored by transfection with transporter associated with antigen processing 1 cDNA[J]. *J Immunol*, 2002, **169**(10): 6012 — 6019.
- [9] JOHANSSON A, BJOKHAG B, HANSSON W, *et al.* Effects of four trichothecene mycotoxins on activation marker expression and cell proliferation of human lymphocytes in culture[J]. *Cell Biol Toxicol*, 1999, **15**(4): 203 — 215.
- [10] MEKYFA, HARDIEL J, EVANS S W, *et al.* Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production[J]. *Food Chem Toxicol*, 2001, **39**(8): 827 — 836.

The Effects of DON on HLA-I Expression of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells *in vitro*

LI Yue Hong, ZHANG Xiang Hong, XING Ling Xiao, YAN Xia, WANG Jun Ling, WANG Feng Rong

(Laboratory of Experimental Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: To explore the effects of deoxynivalenol on HLA-I expression of human peripheral blood mononuclear cells. Effects of deoxynivalenol at different concentration on HLA-I expression of human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* were studied with flow cytometry(FCM) analysis and Western blotting. FCM analysis indicated that HLA-I expressions of human peripheral blood mononuclear cells were reduced in DON treatment groups (50ng/mL, 100ng/mL, 1000ng/mL and 2000ng/mL), especially in relatively higher concentration DON (1000ng/mL and 2000ng/mL) groups ($P < 0.01$), compared to that in control. In the concentration range from 50ng/mL to 2000ng/mL, a significant concentration-dependent negative correlation could be found between HLA-I expression and DON concentration. Western blotting also confirmed that DON at higher concentration (1000ng/mL and 2000ng/mL) could significantly inhibit HLA-I expression at protein level. The results suggest that DON could reduce HLA-I expression of human peripheral blood mononuclear cells in concentration-dependent manner *in vitro*.

Key words: deoxynivalenol; HLA-I; human peripheral blood mononuclear cell; flow cytometry; Western blotting

This work is supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (301350) and the Prophase Research of Major Basic Research Program of Ministry of Science and Technology of China (2001CCC00500)

*Corresponding author, E-mail: blyjs@hebm.u.edu.cn