

大剂量强的松影响机体 MHC I 类基因表达的实验研究

李向东 邹雄

作者单位:250014 山东省,济南市千佛山医院检验科(李向东)
250012 山东省,山东大学齐鲁医院检验科(邹雄)

【摘要】 目的 研究大剂量糖皮质激素类药物强的松对机体 MHC I 类基因表达的影响。方法 将 12 只新西兰白兔随机分为两组,实验组 8 只,对照组 4 只,实验组每天给予强的松(20 mg/kg)灌喂,共给药 30 d。每 10 d 提取外周血单个核细胞总 RNA,实验结束后取肝脏、脾脏、肾脏和肺组织少许提取总 RNA,RT-PCR 法检测 MHC I 类基因 mRNA 的表达,Western blot 法检测 MHC I 类基因蛋白表达。结果 实验组外周血单个核细胞 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达在第 10 天、第 20 天和第 30 天均有逐渐降低的趋势。与对照组比较,实验组外周血单个核细胞 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达在第 20 天和第 30 天明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),且 mRNA 表达由用药前的 0.23 ± 0.06 降到用药后第 20 天的 0.13 ± 0.05 和第 30 天的 0.06 ± 0.02 ,蛋白表达由用药前的 2.55 ± 0.24 降到用药后第 20 天的 1.16 ± 0.15 和第 30 天的 0.76 ± 0.31 。在用药第 30 天实验结束后,机体各脏器(包括肝脏、脾脏、肾脏和肺脏)MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达均较对照组降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论 大剂量强的松能降低机体外周血单个核细胞、肝脏、脾脏、肾脏和肺组织的 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达,可能诱发机体肿瘤的发生。

【关键词】 糖皮质激素类;基因,MHC I 类;肿瘤

The study of organism MHC class I gene expression affected by high dose prednisone

LI Xiang-dong, ZOU Xiong. Department of Laboratory, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan 250014, China

【Abstract】 **Objective** To study how organism MHC class I gene expression is affected by high dose glucocorticoid prednisone. **Methods** 12 New Zealan white rabbits were randomly divided into two groups, 4 rabbits were in the control group, 8 rabbits were in the experimental group. Experimental group was given doses of prednisone (20 mg/kg) every day for 30 consecutive days by gavaging. Total RNA of peripheral blood mononuclear cell was extracted every 10 days. After 30 days experiment was finished, a small amount of total RNA was extracted from rabbits' liver, spleen, kidney and lung in two groups. RT-PCR and Western blot were utilized to examine mRNA and protein expression of MHC class I gene. **Results** MHC class I gene mRNA and protein expression level of peripheral blood mononuclear cell in the experimental group showed gradually descending tendency on the 10th, 20th and 30th day respectively. Compared with control group, peripheral blood mononuclear cell MHC class I gene mRNA and protein expression level in experimental group significantly declined on the 20th day and the 30th day ($P < 0.05, P < 0.01$), MHC class I gene mRNA expression level decreased from 0.23 ± 0.06 before gavaging to 0.13 ± 0.05 on the 20th day and 0.06 ± 0.02 on the 30th day after gavaging. The change trend of protein expression level was similar to mRNA expression level, which lowered from 2.55 ± 0.24 before gavaging to 1.16 ± 0.15 on the 20th day and 0.76 ± 0.31 on the 30th day after being carried out gavageing. When the 30 day experiments were completed, MHC class I gene mRNA and protein expression level of these rabbits' organs, including liver, spleen, kidney and lung were generally lower than counterparts in control group. **Conclusion** High dose prednisone can decrease organism peripheral blood mononuclear cell, liver, spleen, kidney and lung MHC class I gene mRNA and protein expression level, As a result, this may induce the occurrence of organism tumor.

【Key words】 Glucocorticoids; Gene, MHC class I; Neoplasms

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)传统上分为 MHC I 类、II 类和 III 类。

其中 I 类和 II 类基因为经典 MHC 基因,研究较多, MHC I 类基因和肿瘤的发生关系比较密切。糖皮质

激素是临床上应用最广泛的免疫抑制剂之一。长期应用免疫抑制剂糖皮质激素容易引发肿瘤,其诱发机制还不清楚。本文研究了最常应用的糖皮质激素药物强的松对新西兰白兔外周血单个核细胞和脏器 MHC I 类基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和药物 淋巴细胞分离液(中国医学科学院血液学研究所提供),Trizol 抽提试剂盒(美国 Invitrogen 公司提供),Money 鼠白血病病毒(MMLV)反转录酶(美国 Promega 公司提供),SYBR Green I 嵌合荧光 Real Time PCR 试剂盒(大连宝生物公司提供),鼠抗兔 MHC I 单抗和鼠抗兔肌动蛋白(英国 Serotec 公司提供),强的松片剂(山东济宁市第一制药厂提供,5 mg/片)。

1.2 动物分组和给药 自山东大学实验动物中心购 12 只新西兰白兔,雌雄不限,体重 2.5~3.0 kg。随机分成两组,实验组 8 只,对照组 4 只。实验组白兔每天用生理盐水溶解的强的松(20 mg/kg)灌喂,对照组白兔每天以相同体积的生理盐水灌喂。实验组和对照组的白兔连续灌喂 30 d。

1.3 外周血单个核细胞的分离及总 RNA 的提取 用药前 1 天、用药后第 10 天、第 20 天和第 30 天无菌抽取实验组和对照组白兔外周血 1 ml,EDTA-K₂ 抗凝,淋巴细胞分离液分离单个核细胞,Trizol 抽提试剂盒提取总 RNA,用紫外分光光度计测定提取的总 RNA 的吸光度(OD)值,OD 260/280 在 1.8~2.0 范围内,表明所提取的 RNA 浓度较纯,并根据 OD 值计算提取的总 RNA 浓度。

1.4 机体各脏器总 RNA 的提取 第 30 天实验结束当日空气栓塞处死实验白兔,实验组和对照组取兔肝脏、脾脏、肾脏和肺组织各少许,用 Trizol 抽提试剂盒提取各脏器总 RNA,用紫外分光光度计测定提取的总 RNA 的 OD 值。

1.5 反转录-定量 PCR (RT-QPCR) 使用常规方法进行 MMLV 逆转录酶合成 cDNA。扩增反应在 Lighter Cycler 2.0 型荧光 Real Time PCR 仪上进行。应用 SYBR Green I 嵌合荧光 Real Time PCR 试剂盒,且 20 μ l 反应体系包括 SYBR Premix Ex Taq(2 \times) 10 μ l,上下引物 10 μ M 各 0.4 μ l 和待检 cDNA 2 μ l。设计兔 MHC I 类基因上下游引物,引物跨 3、4 外显子,以保证在基因非多态区和用以排除 RNA 样本中可能存在的 DNA 污染,同时检测看家基因 β -actin 水平作为 RNA 定量标准^[1]。引物序列如下:MHC I 类基因上游引物:5'-ACCGCTCAGACCTCCG-3';

下游引物:5'-CAGACCTCGCAGCCAAAC-3'。看家基因 β -actin 上游引物:5'-TCATCACCATCG-GCAACG-3';下游引物:5'-AGGAAGGAGGGCTG-GAACA-3'。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s 后进入 PCR 循环,其循环参数为 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,55 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,扩增 40 个循环,在延伸阶段检测荧光信号。然后 95 $^{\circ}$ C 0 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 0 s 进行熔解曲线分析。根据 2^{- $\Delta\Delta$} 值(即代表某样品其初始 cDNA 的相对量)做 mRNA 表达的相对定量分析^[2]。

1.6 Western blot 法测定 MHC I 类基因蛋白表达 对淋巴细胞分离液分离的单个核细胞和实验结束时的机体脏器提取总蛋白,计算蛋白含量。取 50 μ g 总蛋白上样,10%聚丙烯酰胺凝胶电泳。一抗分别为鼠抗兔 MHC I 单抗,鼠抗兔肌动蛋白。用化学发光试剂显影,对胶片进行照相,根据条带密度进行计算机图像分析,用 MHC/肌动蛋白比值进行半定量分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组外周血单个核细胞 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达的变化情况 实验组 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达在第 10 天、第 20 天和第 30 天均有逐渐降低的趋势。与对照组比较,实验组外周血单个核细胞 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达在第 20 天和第 30 天均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$; 表 1、表 2)。

表 1 MHC I 类基因 mRNA 表达变化情况($\bar{x}\pm s$)

组别	用药前一天	第 10 天	第 20 天	第 30 天
对照组	0.25 \pm 0.10	0.21 \pm 0.08	0.24 \pm 0.12	0.29 \pm 0.11
实验组	0.23 \pm 0.06	0.18 \pm 0.06	0.13 \pm 0.05*	0.06 \pm 0.02**

注:*与对照组比较 $P < 0.05$, **与对照组比较 $P < 0.01$

表 2 MHC I 类基因蛋白表达变化情况($\bar{x}\pm s$)

组别	用药前一天	第 10 天	第 20 天	第 30 天
对照组	2.65 \pm 0.21	2.71 \pm 0.23	2.54 \pm 0.22	2.48 \pm 0.21
实验组	2.55 \pm 0.24	2.24 \pm 0.21	1.16 \pm 0.15*	0.76 \pm 0.31**

注:*与对照组比较 $P < 0.05$, **与对照组比较 $P < 0.01$

2.2 新西兰白兔各脏器 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达变化情况 用药第 30 天实验结束后,新西兰白兔各脏器(包括肝脏、脾脏、肾脏和肺脏)MHC I

类基因 mRNA 和蛋白表达均较对照组降低 ($P < 0.05, P < 0.01$; 表 3、表 4)。

表 3 MHC I 类基因 mRNA 表达变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	肝脏	脾脏	肾脏	肺脏
对照组	0.08±0.02	0.06±0.02	0.12±0.02	0.10±0.03
实验组	0.04±0.01*	0.03±0.01*	0.07±0.02*	0.03±0.01**

注: * 与对照组比较 $P < 0.05$, ** 与对照组比较 $P < 0.01$

表 4 MHC I 类基因蛋白表达变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	肝脏	脾脏	肾脏	肺脏
对照组	12.36±0.13	15.38±0.14	14.3±0.13	19.23±0.23
实验组	8.13±0.01*	10.35±0.13*	8.86±0.14*	8.36±0.12**

注: * 与对照组比较 $P < 0.05$, ** 与对照组比较 $P < 0.01$

3 讨论

糖皮质激素作为免疫抑制药物用于临床治疗的历史较长,糖皮质激素具有明显的抗炎、抗过敏和免疫抑制作用,故广泛地应用于免疫相关疾病的治疗中,并获得较好的效果。然而其副作用明显,尤其在剂量过大、治疗时间过长的情况下可出现不良反应。众所周知,使用免疫抑制剂或其他相关药物的患者出现恶性肿瘤的可能性大大增加,长期应用免疫抑制剂糖皮质激素容易引发肿瘤的诱导机制还不清楚。

机体内 MHC 以膜抗原形式存在于几乎所有组织细胞表面,而外周血单个核细胞检测最为方便。本研究以新西兰白兔进行动物实验,应用 RT-PCR 和 Western blot 方法研究新西兰白兔服用大剂量强的松(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹)后外周血单个核细胞和机体各脏器 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达变化情况。结果表明:实验组 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达在第 10 天、第 20 天和第 30 天均有逐渐降低的趋势。与对照组比较,实验组外周血单个核细胞 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达在第 20 天和第 30 天明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);且 mRNA 表达由用药前的 0.23±0.06 降到用药后第 20 天的 0.13±0.05 和第 30 天的 0.06±0.02,蛋白表达由用药前的 2.55±0.24 降到用药后第 20 天的 1.16±0.15 和第 30 天的 0.76±0.31。在用药第 30 天实验结束后,机体各脏器(包括肝脏、脾脏、肾脏和肺脏)MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达均较对照组降低($P < 0.05, P < 0.01$)。

在肿瘤免疫过程中,T 细胞的免疫功能起关键作用。可溶性肿瘤抗原经抗原提呈细胞摄入后加工成短肽,然后经 MHC II 类抗原提呈而激活 CD₄⁺T 细胞,通过分泌细胞因子促进 CD₈⁺T 细胞的特异杀伤作用。而肿瘤细胞表面的肿瘤抗原在肿瘤细胞内加工为短肽后提呈于表面的 MHC I 类分子直接激活 CD₈⁺T 细胞。肿瘤细胞可能通过多种机制逃逸 T 细胞的免疫监视。

在多数肿瘤中,MHC I 类分子表达明显减少或丢失,致使细胞毒 T 淋巴细胞对肿瘤细胞上的抗原不能识别,从而肿瘤细胞得以逃避宿主的免疫攻击。由于 MHC I 类分子在抗原呈递和自然杀伤细胞功能调节中的作用,迄今为止,认为其表达的变化与肿瘤免疫逃逸关系紧密,Algarra 等^[3]研究表明,MHC I 类分子表达下调普遍存在于人类肿瘤中,该变化为 T 细胞对肿瘤细胞的免疫选择的结果。Giuliani 等^[4]研究表明,糖皮质激素降低大鼠胸腺 MHC I 类基因表达。更早的研究表明^[5],强的松抑制小鼠巨噬细胞 MHC II 类基因表达。本文研究表明糖皮质激素药物强的松能广泛降低机体各脏器(包括肝脏、脾脏、肾脏和肺脏)的 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达,也降低了外周血单个核细胞 MHC I 类基因 mRNA 和蛋白表达。故长期大剂量应用免疫抑制剂糖皮质激素药物强的松,致使机体各脏器 MHC I 类分子表达下调,可能诱发机体肿瘤的发生。

4 参考文献

- 1 Wang kk, Liu N, Radulovich N, et al. Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. *Oncogene*, 2002, 21:7598-7604.
- 2 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25:402-408.
- 3 Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, et al. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53:904-910.
- 4 Giuliani C, Saji M, Napolitano G, et al. Hormonal modulation of major histocompatibility complex class I gene expression involves an enhancer A-binding complex consisting of Fra-2 and the p50 subunit of NF-kappa B. *J Biol Chem*, 1995, 270:11453-11462.
- 5 Snyder DS, Unanue ER. Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin 1 production. *J Immunol*, 1982, 129:1803-1805.

(收稿日期:2009-09-29)

(本文编辑:白雪)