

脱氧雪腐镰刀菌烯醇抑制体外培养人外周血 单个核细胞低分子量蛋白酶体-2表达

李月红 张祥宏* 邢凌霄 左连富¹ 严霞 王俊灵 王凤荣

(河北医科大学基础医学研究所实验病理室, 石家庄市 050017;

¹河北省肿瘤研究所细胞室, 石家庄市 050011)

摘要 探讨脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)对人外周血单个核细胞参与抗原呈递的低分子量蛋白酶体-2(LMP-2)表达的影响。采用流式细胞术(FCM)和半定量RT-PCR方法从蛋白质和mRNA水平分析了不同剂量DON对体外培养人外周血单个核细胞LMP-2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处理均可一定程度抑制人外周血单个核细胞LMP-2的表达,50 ng/ml DON组、100 ng/ml DON组、1000 ng/ml DON组和2000 ng/ml DON组LMP-2平均荧光强度分别为 6.99 ± 0.72 、 6.21 ± 0.55 、 5.34 ± 0.56 和 5.03 ± 0.43 ,在50~2000 ng/mL范围内随着DON浓度增加,外周血单个核细胞LMP-2表达降低,与DON浓度呈显著负相关($r=0.824$, $P<0.01$)。半定量RT-PCR结果显示,不同浓度DON处理均可抑制人外周血单个核细胞LMP-2 mRNA表达。DON在蛋白质和mRNA水平可剂量依赖地抑制体外培养的人外周血单个核细胞LMP-2的表达。

关键词 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 人外周血单个核细胞; 低分子量蛋白酶体-2; RT-PCR

低分子量蛋白酶体(low molecular weight polypeptide, LMP)包括LMP-2和LMP-7两个亚基是抗原加工呈递过程的重要辅助分子,负责加工抗原,将其酶解成能被抗原加工相关转运体(transporter associated with antigen processing, TAP)转运的小分子多肽,才能进一步呈递给人类白细胞抗原-I(human leucocyte antigen I, HLA-I)引起免疫应答。LMP在调节HLA-I分子限制性抗原的加工和呈递功能中发挥着重要作用,LMP的表达丢失或下降可造成蛋白酶解功能降低进而HLA-I分子表达下调,影响T淋巴细胞免疫应答和免疫监视功能^[1]。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)又称作呕吐毒素(vomitoxin, VT),是我国食管癌、胃癌高发区居民粮食的主要污染霉菌毒素之一^[2]。国内外研究表明,DON可通过诱导免疫细胞凋亡,影响细胞因子分泌等对人和动物免疫功能产生负面影响^[3-5],但有关DON对机体免疫细胞HLA-I、TAP和LMP等与细胞免疫监视功能密切相关因素表达影响的研究尚未见报道。为进一步探讨我国肿瘤高发区粮食常见污染霉菌毒素DON对人体免疫监视功能的可能影响,分析其在肿瘤发生中的可能意义,本

研究应用半定量RT-PCR和流式细胞定量检测的方法,在mRNA和蛋白质水平分析了DON对体外培养的人外周血单个核细胞与免疫监视有关的LMP-2表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

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;DON为Sigma公司产品;淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂;RPMI 1640培养基为Gibco BRL公司产品;小鼠抗人LMP-2单克隆抗体为Santa Cruz公司产品。

1.2 人外周静脉血单个核细胞的分离与培养

采用聚蔗糖-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

收稿日期:2004-04-19 接受日期:2005-01-07

河北省自然科学基金资助项目(No.301350),科技部重大基础研究项目前期研究专项(No.2001CCC00500)

*通讯作者。Tel: 0311-7222082, E-mail: blyjs@hebmu.edu.cn

脉血 100 ml 加等体积的生理盐水稀释, 吸取淋巴细胞分离液(每 10 ml 稀释血加 5 ml 分离液)置于 50 ml 离心管中, 然后小心地将 2 倍体积的稀释血加在淋巴细胞分离液上, 2000 r/min 离心 25 min, 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, 细胞按 1×10^6 个/ml 的浓度接种于含 10% 胎牛血清, 10^5 U/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 加入植物血凝素 (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

将单个核细胞浓度为 1×10^6 个/ml 的 4 ml 培养基置于 25 ml 的培养瓶中, 按上述方法培养 48 h, 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, 每组 5 瓶细胞。各 DON 处理组分别加入浓度为 100 μ g/ml 的 DON 溶液(生理盐水配制)0.5 μ l、1 μ l、10 μ l 和 20 μ l, 不足 20 μ l 的用生理盐水补足, 至终浓度分别为 50 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml 和 2000 ng/ml。对照组加入等量生理盐水 20 μ l, 继续温育 24 h, 生理盐水洗涤 2 次, 更换新的 RPMI 1640 培养基, 继续培养 24 h, 然后离心收集细胞, 用于流式细胞术(flow cytometry, FCM)和 RT-PCR 检测。

1.4 FCM 样品的制备及 LMP-2 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。LMP-2 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(含 0.1% Triton X-100)洗涤, 离心弃上清液; 加入 200 μ l PBS 稀释的鼠抗人 LMP-2 的单克隆抗体轻吹混匀, 4 $^{\circ}$ C 温育 30 min; 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 温育 30 min; 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。以荧光强度表示 LMP-2 表达的强弱, 以平均荧光强度计量各组 LMP-2 表达量。

1.5 细胞总 RNA 的提取及电泳鉴定

采用异硫氰酸胍一步法提取细胞总 RNA, 主要步骤如下: 细胞沉淀中加入 500 μ l 裂解液[4 mmol/L 异硫氰酸胍, 25 mmol/L 柠檬酸钠; 0.5% 十二烷基肌氨酸钠(sodium lauroyl sarcosine, SLS), 0.1 mol/L β -ME], 冰浴中裂解, 转移至 1.5 ml EP 管中, 依次加入 1/10 体积的 2 mol/L 醋酸钠, 等体积饱和酚和 1/5 体积氯仿/异戊醇(49:1), 剧烈振摇, 冰

表1 GADPH和LMP-2引物设计

	GADPH	LMP-2
有义	5'-ggaaggtgaaggtcggagt-3'	5'-gttgatgggttctga-3'
反义	5'-cctggaagatggtgatggg-3'	5'-gagcaatagcgtctgtg-3'
长度	231 bp	448 bp

浴 15 min, 4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液加入等体积异丙醇混匀, -20 $^{\circ}$ C 过夜, 4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 20 min, 加 1 ml 75% 乙醇洗涤沉淀, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 沉淀自然干燥, 加入 20 μ l Depc-H₂O 溶解沉淀, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳(1 \times TAE) 1 h, 鉴定其完整性, 紫外灯下观察并照相。

1.6 半定量 RT-PCR 检测 LMP-2 mRNA 的表达

1.6.1 反转录合成 cDNA 按顺序依次加入: 5 μ l 5 \times 缓冲液、2.5 μ l dNTP、0.5 μ l RNasin、1 μ l AMV、0.5 μ l Oligo(dT)₁₅、2 μ g 样品 RNA, 加水至终体积为 25 μ l, 42 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 冰浴 10 min, 放置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.6.2 引物设计 见表 1。引物由软件辅助设计, 由上海生工公司合成。

1.6.3 PCR 反应 PCR 反应体系如下: 5 μ l 反转录产物、5 μ l 10 \times 缓冲液、3 μ l MgCl₂、0.5 μ l dNTP、0.3 μ l Taq DNA 聚合酶、上、下游引物各 10 pmol, 加三蒸水至终体积为 50 μ l。置 PCR 仪中扩增, 扩增循环参数如下: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min、94 $^{\circ}$ C 50 s、54 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s、35 次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, PCR 产物于 10% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 紫外分析仪中观察并照相, 凝胶分析软件进行定量。

1.7 统计学处理

实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 将实验数据输入计算机, 采用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析和直线回归分析。

2 结果

2.1 FCM 检测 LMP-2 表达

FCM 定量分析表明, DON 处理 24 h 后, 各 DON 组单个核细胞 LMP-2 的平均表达量均低于对照组, 高浓度 DON(1000 ng/mL 和 2000 ng/mL)处理组 LMP-2 表达降低更明显(表 2, $P < 0.05$, 为 3 次实验的平均值)。在 50 ng/mL 到 2000 ng/mL 的浓度范围内, 随着 DON 处理浓度的升高, LMP-2 表达量相应降低, 两者呈明显的负相关, 直线回归方程为 $y = 7.382 - 0.608x$ ($r = 0.824$, $P < 0.01$, $n = 15$)。

表2 不同浓度 DON 处理 24 h, 人外周血单个核细胞 LMP-2 表达($\bar{x} \pm s, n=15$)

DON (ng/ml)	LMP-2 (FI)
0(对照)	7.25 ± 0.65
50	6.99 ± 0.72
100	6.21 ± 0.55
1000	5.34 ± 0.56*
2000	5.03 ± 0.43*

单因素方差分析, 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

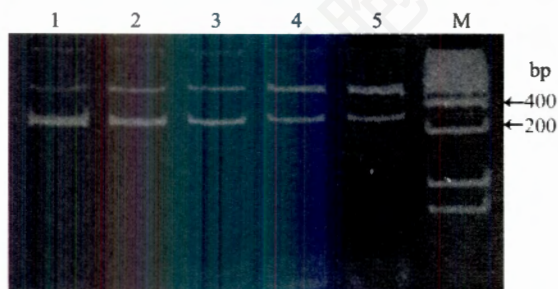


图1 RT-PCR 检测人外周血单个核细胞 LMP-2 mRNA 表达
1: 50 ng/ml DON; 2: 100 ng/ml DON; 3: 1000 ng/ml DON;
4: 2000 ng/ml DON; 5: 对照; M: DNA marker。

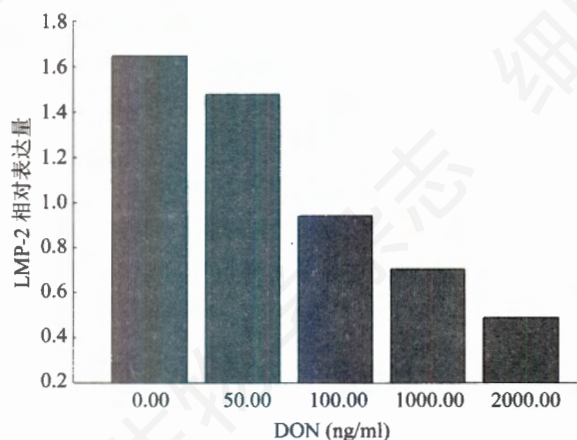


图2 LMP-2 RT-PCR 产物凝胶成像定量分析结果

2.2 半定量 RT-PCR 检测 LMP-2 mRNA 表达

RT-PCR 产物经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 每个泳道均出现了两条阳性条带, 与标准带比较可知分别为 231 bp 的内参照基因 GAPDH 和 448 bp 的 LMP-2 基因(图 1)。应用凝胶成像分析系统对其进行定量分析, 以 LMP-2/GAPDH 比值, 表示 LMP-2 的相对表达量, DON(50 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml 和 2000 ng/ml)处理组的 LMP-2 相对表达量分别为 1.48 ± 0.26 、 0.94 ± 0.11 、 0.71 ± 0.24 和 0.49 ± 0.15 , 都低于对照组的 1.64 ± 0.16 (3 次实验的平均值, 图 2)。

3 讨论

细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)在机体抗肿瘤和免疫监视中发挥重要作用, HLA-I 类分子限制性抗原的呈递是激活 CTL 的前奏。在 HLA-I 类分子限制性抗原加工、转运和呈递过程中, 完整的内源性抗原必须先在内质网内, 由 LMP-2 和 LMP-7 两个亚基组成的 LMP 降解形成 8~10 个氨基酸构成的多肽, 然后由内质网膜上由 TAP-1 和 TAP-2 两个亚基组成的 TAP 转运到内质网腔, 才能与新合成的 HLA-I 类分子结合形成 HLA-I-抗原肽复合物, 转运至细胞表面, 供 T 淋巴细胞识别引起免疫应答。抗原的加工、转运、呈递是紧密联系在一起的, 任何一个和 / 或多个环节发生障碍, 都会导致不能有效的激活 T 淋巴细胞, 抑制机体的免疫应答。研究表明, LMP 活性的降低或缺乏使蛋白酶体降解蛋白质的能力明显减弱, 可直接影响适宜转运的小多肽的产生; 干扰素- γ 可以通过上调 LMP 亚基的表达, 增强蛋白酶体切割肽键的能力, 继而促进抗原的加工提呈^[6]。

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、杂色曲霉毒素、伏马菌素等形成混合污染^[2]。目前, DON 免疫毒理学的研究越来越受到医学工作者的重视, 但未见 DON 对抗原呈递过程中抗原加工、转运影响的研究报道。本研究从免疫应答的抗原加工、转运环节分析了 DON 对体外培养的人外周血单个核细胞 LMP-2 分子表达的影响。FCM 定量分析结果发现, 体外培养经 PHA 活化的单个核细胞在 DON 处理 24 h 后, LMP-2 表达均受到明显抑制, 而且随着 DON 浓度的升高, LMP-2 表达相应降低, 与 DON 处理浓度呈明显的负相关。半定量 RT-PCR 结果表明, DON 可明显抑制体外培养经 PHA 活化的单个核细胞 LMP-2 mRNA 表达。提示 DON 在蛋白质和 mRNA 水平上可抑制 HLA-I 限制性抗原呈递途径中的抗原加工处理和转运环节, 影响了 HLA-I 限制性抗原呈递, 从而抑制细胞免疫应答, 可能是 DON 免疫抑制作用的另一重要机制。

结合河北省食管癌高发区多种霉菌毒素污染的实际综合分析提示, 食管癌高发区居民长期饮食 DON 污染, 可抑制 LMP 分子的表达, 进而抑制细胞毒性 T 淋巴细胞介导的免疫应答, 有助于恶变细胞逃避免疫监视和攻击, 可能在其他致癌性霉菌毒素致癌过程中发挥一定作用。因此, 在食管癌高发

区针对霉菌病因的预防工作中, 具有免疫抑制作用的非致癌性霉菌的污染应当引起肿瘤工作者的高度重视。

参考文献 (References)

- [1] Dovhey SE *et al. Cancer Res*, 2000, **60**: 5789
- [2] Zhang XH *et al. Biomed Environ Sci*, 1998, **11**: 140
- [3] Rotter BA *et al. J Toxicol Environ Health*, 1996, **48**: 1
- [4] 李月红等. *中国病理生理杂志*, 2002, **18**: 778
- [5] Sun XM *et al. Biomed Environ Sci*, 2002, **15**: 145
- [6] Griffin TA *et al. J Exp Med*, 1998, **187**: 97

The Effects of Deoxynivalenol on LMP-2 Expression of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells *in Vitro*

Yue-Hong Li, Xiang-Hong Zhang*, Ling-Xiao Xing, Lian-Fu Zuo¹, Xia Yan, Jun-Ling Wang, Feng-Rong Wang
(Laboratory of Experimental Pathology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;
¹Laboratory of Cytology, Institute of Hebei Province Oncology, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract To explore the effects of deoxynivalenol (DON) on low molecular weight polypeptide-2 (LMP-2) expression of human peripheral blood mononuclear cells. Effects of deoxynivalenol at different concentration on LMP-2 expression of human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* were studied with flow cytometry (FCM) analysis and RT-PCR. FCM analysis indicated that LMP-2 expression of human peripheral blood mononuclear cells were reduced at protein level in DON treatment groups (50 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml and 2000 ng/ml), the mean fluorescence intensity of LMP-2 expression in DON groups were 6.99 ± 0.72 , 6.21 ± 0.55 , 5.34 ± 0.56 and 5.03 ± 0.43 , respectively. As the DON concentration increase from 50 ng/mL to 2000 ng/mL, the expression of LMP-2 was decreased correspondingly and a significant dose-depended response negative correlation could be found between expressions of LMP-2 and DON concentration. RT-PCR also confirmed that DON at higher concentration (1000 ng/ml and 2000 ng/ml) could distinct inhibit LMP-2 mRNA expressions. The results suggest that DON could reduce LMP-2 expressions of human peripheral blood mononuclear cells at protein and mRNA level in a concentration-depended manner *in vitro*.

Key words deoxynivalenol; human peripheral blood mononuclear cell; low molecular weight polypeptide-2; RT-PCR

Received: April 19, 2004 Accepted: January 7, 2005

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.301350) and the Prophase Research of Major Base Research of Ministry of Science and Technology of China (No.2001CCC00500)

*Corresponding author. Tel: 86-311-7222082, E-mail: blyjs@hebm.edu.cn