

# 伏马菌素 B1 对人外周血单个核细胞抗原加工相关转运子表达的影响

邢凌霄 张祥宏\* 李月红 左连富<sup>1</sup> 严霞 王俊灵 王凤荣

(河北医科大学病理研究室, 石家庄市 050017; <sup>1</sup>河北省肿瘤研究所细胞室, 石家庄市 050511)

**摘要** 探讨伏马菌素 B1(FB1)对体外培养的人外周血单个核细胞(hPBMC)抗原加工相关转运子(TAP-1)表达的影响。采用流式细胞定量检测(FCM)、免疫印迹(Western 印迹)及半定量 RT-PCR 方法, 研究不同浓度 FB1(0, 10 和 50  $\mu\text{mol/L}$ )处理后人外周血单个核细胞 TAP-1 在 mRNA 和蛋白质水平表达的影响。RT-PCR 检测结果表明, 10 和 50  $\mu\text{mol/L}$  FB1 处理 24 h 后, 处理组细胞 TAP-1 mRNA 明显低于对照组。在蛋白质水平, FCM 定量分析表明, 两个处理组细胞表面 TAP1 的平均荧光强度均较对照组降低, 以 50  $\mu\text{mol/L}$  FB1 处理组降低显著( $P < 0.05$ )。免疫印迹结果亦表明, FB1 处理组 TAP-1 的表达均较对照组降低。10 和 50  $\mu\text{mol/L}$  FB1 可抑制体外培养的 hPBMC TAP-1 mRNA 和蛋白质表达。

**关键词** 伏马菌素 B1; 人外周血单个核细胞; 抗原加工相关转运子

抗原加工相关转运子(transporter associated with antigen processing, TAP)与人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)-I 类分子限制性抗原的处理和递呈密切相关, 在调节 HLA-I 限制性抗原的加工和提呈功能中发挥着重要作用, 是近年来肿瘤免疫研究方面的热点之一。TAP 表达丢失或下降可造成 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<sup>[1]</sup>。最近的研究发现, 在体外环境下, 某些具有致癌性的物质(如烟叶等)的干预可影响正常细胞 HLA-I 及 TAP-1 的表达<sup>[2]</sup>。因此, 环境因素对正常细胞 HLA-I 及其加工和提呈分子表达的变化及其在恶性肿瘤发生中的可能意义, 逐渐引起学术界的关注。

伏马菌素 B1(fumonisin, FB1)是致癌性的真菌毒素, 在粮食和饲料中的污染非常普遍, 是我国恶性肿瘤高发区居民粮食中的重要优势污染霉菌毒素之一。本研究组进行的初步研究表明, FB1 可抑制体外培养的人外周血单个核细胞(human peripheral blood mononuclear cell, hPBMC)表面 HLA-I 分子的表达。在上述工作的基础上, 本研究采用流式细胞定量检测(FCM)、免疫印迹(Western 印迹)和半定量 RT-PCR 方法, 观察了 FB1 对体外培养的 hPBMC TAP-1 表达的影响, 探讨 FB1 对机体免疫功能的可能影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

FB1 为 Sigma 公司产品, 异硫氰酸胍、AMV 反转酶、RNasin、Oligo(dT)<sub>15</sub>、Taq DNA 聚合酶等 RT-PCR 试剂均为 Promega 公司产品, 新鲜健康成年人外周静脉血由河北省血液中心提供, RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品, TAP-1 抗体购自 Santa 公司, 淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂。

### 1.2 hPBMC 的分离与培养

采用聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心法分离单个核细胞, 按  $1 \times 10^6$  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  $\mu\text{g/ml}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养。

### 1.3 实验分组与处理

将单个核细胞按上述方法培养 48 h 后, 更换不含 PHA 的新的 RPMI-1640 培养基, 随机分为阴性对照组和实验组, 实验组加入溶于 PBS 的 FB1, 使终浓度分别为 10  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{mol/L}$ , 对照组加入等体积的 PBS。温育 24 h 后, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 1 000 r/min 离心收集细胞待测。

### 1.4 FCM 样品的制备及 TAP-1 检测

TAP-1 检测采用间接免疫荧光方法, 按试剂说明进行, 主要步骤如下: 离心收集细胞, 以冷 PBA(PBS

收稿日期: 2007-01-12 接受日期: 2007-04-18

河北省自然科学基金资助项目(No.C2004000613)

\* 通讯作者。Tel: 0311-86266229, E-mail: zhangxh@hebm.edu.cn

加 2%BSA、0.1% 叠氮钠)洗涤,离心弃上清液,加入 200  $\mu$ l PBA 稀释的小鼠抗人 TAP-1 单克隆抗体轻吹混匀,4  $^{\circ}$ C 温育 30 min, PBA 洗涤 1 次,加入 200  $\mu$ l PBA 稀释的荧光素标记的第二抗体,轻吹混匀,避光 4  $^{\circ}$ C 温育 30 min,冷 PBA 离心洗涤 2 次,细胞重新悬浮于 200  $\mu$ l PBS,混匀,置流式测试管中上机检测。以荧光强度表示细胞 TAP-1 的相对含量,以平均荧光强度计量各组细胞 TAP-1 的表达量。

### 1.5 免疫印迹分析

提取胞浆总蛋白,根据定量结果,取各组蛋白质样品 80  $\mu$ g,经 10% SDS 变性不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,电转移膜至 PVDF 膜上,将膜用 5%BSA 封闭过夜,加入 1:100 稀释的小鼠抗人的 TAP-1 抗体反应 4 h,TTBS 洗膜 3 次后,加入生物素标记的二抗反应 2 h,TTBS 洗膜 3 次,加入过氧化物酶标记链酶卵白素,室温反应 1 h,DAB 显色。实验中用  $\beta$  肌动蛋白作为内参照蛋白。显色条带扫描后用 BIO-LD 软件测定产物条带的密度值,以目的蛋白 TAP-1 与  $\beta$  肌动蛋白的比值表示 TAP-1 的相对表达量。

### 1.6 半定量 RT-PCR 检测

采用异硫氰酸胍一步法提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA;以 cDNA 为模板,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参照,在 PCR 指数曲线的线性期进行 PCR 扩增。TAP-1 上游引物: 5'-GCTCAGCCGATACCTTCA-3', TAP-1 下游引物: 5'-CCACTTTCAGCAGCATAACC-3', 产物长度为 618 bp; GAPDH 的上游引物: 5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGT-3', GAPDH 的下游引物: 5'-CCTGGAAGATGGTGTATGGG-3', 产物长度为 231 bp。引物设计时,首先从 GenBank 中找出目的基因的 mRNA 序列,然后由软件辅助设计,由上海生工公司合成。PCR 反应体系为 50  $\mu$ l。扩增参数为: 94  $^{\circ}$ C 变性 5 min,循环周期依次为: 94  $^{\circ}$ C 50 s,

54  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 次循环后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。采用凝胶分析软件(BIO-LD)对凝胶进行定量,以 TAP-1 与 GAPDH 量的比值表示目的基因相对表达量。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS 软件进行方差分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 FCM 检测 TAP-1 的表达

FCM 定量分析表明,FB1 处理 24 h 后, hPBMC 经不同浓度(10  $\mu$ mol/L 和 50  $\mu$ mol/L) FB1 处理 24 h 后,两个处理组细胞表面 TAP-1 的平均荧光强度(FI)均较对照组降低,以 50  $\mu$ mol/L 处理组降低显著( $P < 0.05$ , 表 1 和图 1)。

### 2.2 免疫印迹检测 TAP-1 的表达

免疫印迹检测结果显示,以蛋白质标准为参照确定 TAP-1(80 kDa)的位置,各组在 80 kDa 位置均出现了棕色的阳性条带。随处理浓度的增加阳性条带棕色逐渐变浅。结合扫描条带密度定量结果显示(TAP-1/ $\beta$  肌动蛋白), 10  $\mu$ mol/L 和 50  $\mu$ mol/L FB1 处理组 TAP-1 的表达均较对照组降低(图 2)。

### 2.3 半定量 RT-PCR 检测 TAP-1 mRNA 的表达

应用 RT-PCR 技术检测了 FB1 处理对 hPBMC TAP-1 mRNA 的表达情况。结合凝胶定量分析结果显示, 10  $\mu$ mol/L 和 50  $\mu$ mol/L FB1 处理后, TAP-1 mRNA 相对表达量较对照组降低,但在两个处理组之间没有明显不同(图 3)。

表 1 FCM 检测不同浓度 FB1 对外周血单个核细胞表面 TAP-1 的表达( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| FB1 浓度( $\mu$ mol/L) | TAP-1 表达(FI)     |
|----------------------|------------------|
| 0(对照)                | 1.00 $\pm$ 0.04  |
| 10                   | 0.97 $\pm$ 0.03  |
| 50                   | 0.93 $\pm$ 0.03* |

单因素方差分析,与对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

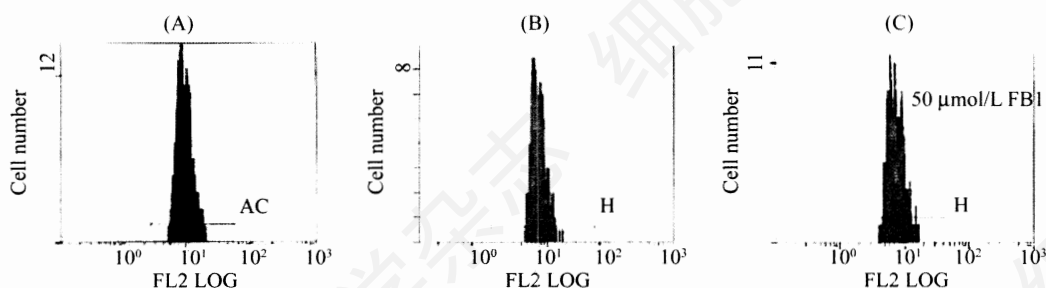


图 1 流式细胞术定量检测 FB1 对外周血单个核细胞表面 TAP-1 直方图

A: FI=1.04; B: FI=0.93; C: FI=0.89。

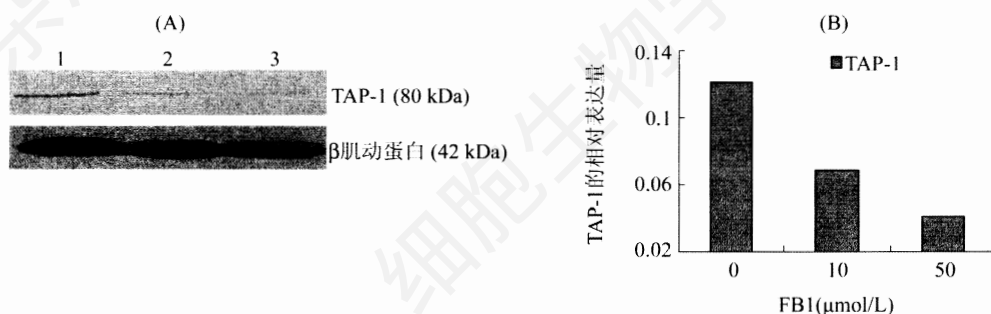


图2 免疫印迹分析不同浓度 FB1 处理后 hPBMC TAP-1 表达

A: 蛋白质印迹条带图; B: 定量直方图。1: 阴性对照; 2: 10 μmol/L FB1; 3: 50 μmol/L FB1。

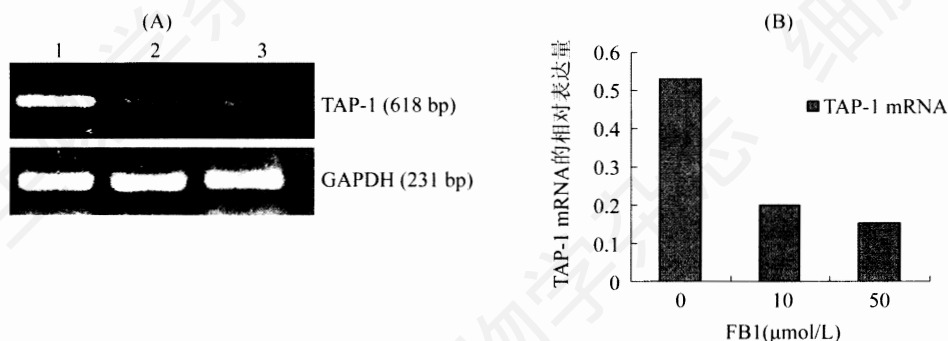


图3 RT-PCR 检测不同浓度 FB1 处理对 hPBMC TAP-1 mRNA 表达的电泳及定量结果

A: 凝胶条带图; B: 定量直方图。1: 阴性对照; 2: 10 μmol/L FB1; 3: 50 μmol/L FB1。

### 3 讨论

TAP 是 HLA-I 类分子限制性抗原的处理和递呈有关的新基因, 在 HLA-I 类分子限制性抗原转运与递呈过程中, 抗原多肽需要经过 TAP 转运至内质网腔, 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 淋巴细胞识别及引起免疫应答。在人类许多肿瘤细胞中, 如神经母细胞瘤细胞、结肠癌细胞株、卵巢癌细胞中均可见 HLA-I 类分子的失表达和低表达现象, 且认为 HLA-I 类分子的降低主要是 TAP-1 表达的异常所致<sup>[3-5]</sup>。另外, 人乳头瘤病毒表达的 E7 蛋白, 与 TAP-1 结合, 导致 HPV 感染细胞的病毒抗原的提呈明显降低, 因此, 机体不能产生有效的免疫反应来阻止疾病的发展<sup>[6]</sup>。近年来国外学者研究表明, 某些环境因素, 如烟叶可引起许多类型肿瘤的形成, 用含烟叶提取物的培养基进行培养, 可导致原角质细胞表面 HLA-I 表达的降低以及 TAP-1 的相应降低, 从而有助于细胞逃避免疫监视, 使癌变发生成为可能<sup>[2]</sup>。以上研究表明, TAP-1 表达异常是导致 HLA-I 分子表达降低的主要机制之一。抗原的转运呈递过程发生障碍, 会导致 T 淋巴细胞不能被有效激活, 抑制机体的免疫应答。

FB1 是一种串珠镰刀菌毒素, 在世界范围内粮食中的污染均非常普遍。FB1 具有致癌作用, 其致癌性已经在啮齿类动物中得到证实<sup>[7,8]</sup>, 但是在人类主要是流行病学研究, 发现许多食管癌高发区玉米中 FB1 含量与食管癌发病率之间有明显相关性<sup>[9,10]</sup>, 因此, 有关 FB1 与人类肿瘤发生的研究备受重视。众所周知, 机体免疫状态与肿瘤发生密切相关。近年来 FB1 对机体免疫机能的影响也逐渐引起学术界的关注, 但有关 FB1 对人免疫功能影响的研究国内外报道很少。

本研究从抗原转运递呈角度, 研究了 FB1 对体外培养的 hPBMC TAP-1 表达的影响。RT-PCR 检测结果表明, 10 和 50 μmol/L FB1 处理 24 h 后, 处理组细胞 TAP-1 mRNA 明显低于对照组。在蛋白质水平, FCM 定量分析表明, 两个处理组细胞表面 TAP-1 的平均荧光强度均较对照组降低, 以 50 μmol/L FB1 处理组降低显著 ( $P < 0.05$ )。免疫印迹结果亦表明, FB1 处理组 TAP-1 的表达均较对照组降低。本研究室既往有关其他霉菌毒素的研究表明, 脱氧小麦镰刀菌烯醇 (DON) 和杂色曲霉素 (ST) 均可降低体外培养的人外周血淋巴细胞表面 TAP-1 及 HLA-I 的表达<sup>[11-14]</sup>。综合研究结果提示, FB1 作用后使 hPBMC TAP-1 表达

降低可能影响HLA-I限制性抗原呈递过程,导致T淋巴细胞不能被有效激活,对机体的免疫应答和免疫监视功能产生负面影响。

FB1是我国胃癌、食管癌等恶性肿瘤高发区居民粮食中的重要优势污染霉菌毒素,高发区居民FB1暴露水平和频率均较高。因此,在胃癌、食管癌的防治研究和实践中对FB1对机体免疫功能,特别是细胞免疫功能的可能影响应予以充分地重视。

#### 参考文献(References)

- [1] Dovhey SE *et al. Cancer Res*, 2000, **60**: 5789
- [2] Fine CI *et al. J Immunol*, 2002, **169**: 6012
- [3] Corrias MV *et al. Tissue Antigens*, 2001, **57**: 110
- [4] Miyagi T *et al. J Gastroenterol Hepatol*, 2003, **18**: 32
- [5] 葛海良等. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, **19**: 41
- [6] Vambutas A *et al. Clin Immunol*, 2001, **101**: 94
- [7] Carratu MR *et al. Toxicol Lett*, 2003, **140-141**: 459
- [8] Hard GC *et al. Toxicol Pathol*, 2001, **29**: 379
- [9] Rheeder JP *et al. Phytopathology*, 1992, **82**: 353
- [10] Yoshizawa T *et al. Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 1626
- [11] 李月红等. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 297
- [12] 邢凌霄等. *卫生研究*, 2006, **34**: 454
- [13] 李月红等. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, **21**: 246
- [14] 邢凌霄等. *中国肿瘤临床*, 2004, **31**: 189

## Effects of Fumonisin on TAP-1 Expression of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells *in Vitro*

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

**Abstract** To explore the effects of fumonisin (FB1) on TAP-1 (transporter associated with antigen processing) expression of human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC) *in vitro*. The expression of TAP-1 of hPBMC by FB1 pretreatment at three different dosages (0, 10 and 50  $\mu\text{mol/L}$ ) were detected with flow cytometry (FCM), Western blot and semi-RT-PCR respectively. TAP-1 mRNA was decreased in 10 and 50  $\mu\text{mol/L}$  FB1 treated groups than that in control group. FCM quantitative analysis showed that at protein level, TAP-1 expression (as expressed by FI) of hPBMC at FB1 treated groups were lower than that of control, especially in 50  $\mu\text{mol/L}$  FB1 treated groups ( $P < 0.05$ ). Western blot results further confirmed the above results. 10 and 50  $\mu\text{mol/L}$  FB1 treatment could inhibit the expression of TAP-1 at mRNA and protein level.

**Key words** fumonisin; human peripheral blood mononuclear cell; transporter associated with antigen processing

Received: January 12, 2007 Accepted: April 18, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2004000613)

\*Corresponding author. Tel: 86-311-86266229, E-mail: zhangxh@hebmh.edu.cn