

• 临床检验研究论著 •

B 细胞淋巴瘤主要组织相容性复合物 II 类分子表达水平研究*

李向东^{1△}, 邹 雄²

(1. 山东大学附属千佛山医院检验科, 山东济南 250014; 2. 山东大学齐鲁医院检验科, 山东济南 250012)

摘要:目的 了解 B 细胞淋巴瘤淋巴组织和外周血淋巴细胞主要组织相容性复合物(MHC) II 类分子表达情况。方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应和 Western 印迹法检测 B 细胞淋巴瘤组织 MHC II mRNA 和蛋白表达, 流式细胞仪检测外周血淋巴细胞 MHC II 类分子荧光强度。结果 B 细胞淋巴瘤组织 MHC II mRNA 和蛋白相对表达量分别为 1.21 ± 0.16 和 2.38 ± 0.24 , 低于正常淋巴组织的 7.68 ± 0.48 和 17.31 ± 1.08 ($P < 0.05$), 外周血淋巴细胞 MHC II 类分子平均荧光强度也由对照组的 438.00 ± 46.00 下降为 235.00 ± 23.00 ($P < 0.05$)。结论 B 细胞淋巴瘤组织及外周血淋巴细胞 MHC II 类分子表达下降, 外周血淋巴细胞 MHC II 类分子检测可辅助早期诊断 B 细胞淋巴瘤。

关键词: B 细胞淋巴瘤; 主要组织相容性复合物; 淋巴细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)19-2317-02

Study of major histocompatibility complex class II expression in B-cell lymphoma*

Li Xiangdong^{1△}, Zou Xiong²

(1. Department of Clinical Laboratory, Shandong University Affiliated Qianfoshan Hospital, Jinan, Shandong 250014, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China)

Abstract: Objective To explore the expression level of major histocompatibility complex class II (MHC II molecule) in B-cell lymphoma tissue and blood lymphocytes. **Methods** B-cell lymphoma tissue MHC II molecule mRNA and protein levels were detected by real time fluorescent quantitation polymerase chain reaction and Western blot respectively. Blood lymphocyte MHC II molecular fluorescence intensity was detected by flow cytometry. **Results** B-cell lymphoma tissue MHC II mRNA and protein relative expression levels were 1.21 ± 0.16 and 2.38 ± 0.24 , lower than 7.68 ± 0.48 and 17.31 ± 1.08 of normal tissues respectively. Blood lymphocyte MHC II molecular median fluorescence intensity decrease to 235.00 ± 23.00 from 438.00 ± 46.00 of normal control group ($P < 0.05$). **Conclusion** MHC II molecular mRNA and protein expression could decrease in B-cell lymphoma tissue and blood lymphocytes, detection of blood lymphocyte MHC II molecular could assist early diagnosis of B-cell lymphoma.

Key words: B-cell lymphoma; major histocompatibility complex; lymphocyte

主要组织相容性复合物(MHC) II 类分子仅表达于专职抗原递呈细胞(APCs), 如 B 淋巴细胞、单核细胞和树突状细胞, 其功能是递呈抗原肽至辅助 T 淋巴细胞。研究显示表达于肿瘤细胞表面的 MHC II 可能是 CD4⁺ 细胞毒性 T 细胞(CTL)的直接靶标^[1-3]。弥漫性大 B 淋巴细胞瘤(DLCLs) MHC II 表达也有报道^[4-5]。为了解 B 细胞淋巴瘤组织和血液淋巴细胞 MHC II 类分子的表达情况, 本研究建立了 B 细胞淋巴瘤动物模型以研究上述问题。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 淋巴细胞分离液(中国医学科学院血液学研究所), Trizol 抽提试剂盒(美国 Invitrogen), Money 鼠白血病病毒(MMLV)逆转录酶(美国 Promega), SYBR Green I 嵌合实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒(大连宝生物), 小鼠 MHC II 单抗和小鼠 β -Actin 单抗(美国 Santa Cruz)。

1.2 动物试验分组 用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液将人 B 淋巴瘤细胞系 Raji 细胞(中国科学院上海细胞研究所)在 37 °C、5% CO₂、95% 湿度培养箱中培养, 2~3 d 传代 1 次, 将对数生长期 Raji 细胞用不含血清 RPMI 1640 培养液调整细胞密度为 1×10^7 /mL, 每只 BALB/c 裸鼠(4~6 周龄, 中国科学院上海实验

动物中心)皮下接种 0.2 mL, 建立 B 细胞淋巴瘤动物模型, 30 d 后裸鼠成瘤, 共 50 只, 为试验组。对照组为未进行任何瘤细胞接种的 BALB/c 裸鼠, 共 20 只。

1.3 方法

1.3.1 组织标本 MHC II 类分子 mRNA 检测 短颈处死小鼠, 取血 2 mL, EDTA-K₂ 抗凝备用。同时取试验组小鼠淋巴瘤和对照组淋巴结组织, 按 Trizol 抽提试剂盒说明书提取组织标本总 RNA; 紫外分光光度法检测总 RNA 吸光度值, OD_{260/280} 为 1.8~2.0, 表明 RNA 纯度较高, 再根据 OD 值计算 RNA 浓度。小鼠 MHC II 类分子基因 PCR 扩增上游引物为 5'-ACG GTA CCG TCT TAA TGT GT-3', 下游引物为 5'-TTG TGT ACT TCT ACT GTT CC-3'; 小鼠 β -actin 基因 PCR 扩增上游引物为 5'-GAC GGA CTG CCG GTC CAG TA-3', 下游引物为 5'-TGA CAG GTG GAA GGT CGT CT-3'。逆转录反应体系: 5×逆转录缓冲液 4 μ L, dNTP 1 μ L, MMLV 逆转录酶 1 μ L, Oligo-dT 引物 1 μ L, RNA 1 μ g, 补足双蒸水至 20 μ L; 反应条件: 37 °C 60 min, 95 °C 5 min。以合成的 cDNA 为模板, 应用荧光实时定量 PCR 试剂盒在 Light Cycler Real Time PCR 扩增仪上扩增 MHC II 类分子和 β -actin 基因。PCR 反应体系: SYBR Premix Ex Taq 酶(2×) 10 μ L, 上、下游引物

* 基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(ZR2010HL003)。△ 通讯作者, E-mail: lixd05@yahoo.com.cn。

各 0.4 μ L,cDNA 2 μ L,补足双蒸水至 20 mL;反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,55 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 15 s 循环 40 次,在延伸阶段检测荧光信号,95 $^{\circ}$ C 1 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 1 s 进行融解曲线分析。根据 $2^{-\Delta Ct}$ 值计算 mRNA 相对定量值。

1.3.2 组织标本 MHC II 类分子蛋白检测 提取淋巴瘤和淋巴结组织标本总蛋白,计算蛋白含量;取 50 μ g 总蛋白进行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳;用化学发光试剂和相应抗体显影,胶片成像后采用计算机进行条带光密度值分析,以 MHC II / β -actin 比值进行半定量分析。

1.3.3 外周血淋巴细胞 MHC II 类分子蛋白检测 取 1 mL 抗凝外周血,3 000 r/min 离心 10 min,取白细胞层与生理盐水按体积比 1 : 1 混匀后加于 2 mL 小鼠淋巴细胞分离液表面,3 000 r/min 离心 25 min 后吸取云雾层至新的离心管中,7 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清;用磷酸盐缓冲液(PBS) 1 mL 洗涤细胞沉淀 2 次后弃去上清,用 PBS 0.5 mL 悬浮细胞;收集 10^4 个细胞,用流式细胞仪和相应抗体检测 MHC II 类分子荧光强度,并计算平均荧光强度(MFI)。

1.4 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS13.0 软件包进行组间 t 检验,显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

试验组淋巴瘤组织 MHC II mRNA 及蛋白表达水平均低于对照组淋巴结组织(t 值分别为 5.83 和 6.98, $P<0.05$),试验组外周血淋巴细胞 MHC II 类分子 MFI 低于对照组($t=4.65$, $P<0.05$),见表 1。

表 1 组织及外周血淋巴细胞 MHC II 类分子相对表达量				
组别	n	组织标本		外周血淋巴细胞 (MFI)
		mRNA	蛋白	
对照组	20	7.68 $\pm$ 0.48	17.31 $\pm$ 1.08	438.00 $\pm$ 46.00
试验组	50	1.21 $\pm$ 0.16	2.38 $\pm$ 0.24	235.00 $\pm$ 23.00

3 讨 论

淋巴瘤是一组起源于淋巴结或结外淋巴组织的恶性肿瘤,属于免疫系统实体恶性肿瘤。发生淋巴瘤时,外周血淋巴细胞 MHC II 类分子表达目前尚未见相关报道,故本研究建立了 B 细胞淋巴瘤动物模型以对其进行相关研究。结果表明,B 细胞淋巴瘤组织及外周血淋巴细胞 MHC II 类分子 mRNA 和蛋白表达均下降。淋巴细胞恶变为淋巴瘤细胞,可能与浆细胞异常分化有关^[6]。淋巴瘤细胞 MHC II 类分子表达降低,且纯合子缺失是 MHC II 类分子表达下调的重要机制,大部分 DLCLs 患者为此类纯合子缺失^[7]。

CD8⁺ CTL 对肿瘤细胞的杀伤依赖于肿瘤细胞表达 MHC I 类分子。但有研究显示,MHC II 类分子缺失可导致淋巴瘤患者预后较差^[8]。CD8⁺ CTL 的激活依赖于 CD4⁺ 辅助 T 淋巴细胞^[9-10]。肿瘤 B 细胞也可表达 MHC I 和 MHC II 类分子,具有 APCs 功能^[11]。MHC I 和 MHC II 类分子表达降低会导致 CD8⁺ CTL 无法激活,而有利于肿瘤细胞生长。本研究表明 B 细胞淋巴瘤组织 MHC II 类分子表达下降,且外周血淋巴细胞 MHC II 类分子表达也下降,考虑可能与淋巴细胞的体内再

循环有关。
综上所述,B 细胞淋巴瘤组织淋巴细胞恶变为淋巴瘤细胞后,MHC II 类分子表达下降,且受淋巴细胞再循环影响,淋巴瘤组织淋巴细胞进入外周血,使外周血淋巴细胞 MHC II 类分子表达也下降。因此,外周血淋巴细胞 MHC II 类分子水平可反映淋巴瘤组织 MHC II 类分子水平,可通过检测外周血淋巴细胞 MHC II 类分子以辅助早期诊断 B 细胞淋巴瘤。

参考文献

[1] Ohminami H,Yasukawa M,Kaneko S,et al. Fas dependent and nonapoptotic cytotoxicity mediated by a human CD4⁺ T-cell clone directed against an acute myelogenous leukemia-associated DEK-CAN fusion peptide[J]. Blood,1999,93(8):925-935.

[2] Yasukawa M,Ohminami H,Arai J,et al. Granule exocytosis, and not the Fas/Fas ligand system,is the main pathway of cytotoxicity mediated by alloantigen-specific CD4⁺ as well as CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in humans[J]. Blood,2000,95(12):2352-2355.

[3] Falkenburg JH,Wafelman AR,Joosten P,et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia reactive cytotoxic T lymphocytes[J]. Blood,1999,94(10):1201-1208.

[4] Slymen DJ,Miller TP,Lippman SM,et al. Immunobiologic factors predictive of clinical outcome in diffuse large-cell lymphoma[J]. J Clin Oncol,1990,8(7):986-993.

[5] O'Keane JC,Mack C,Lynch E,et al. Prognostic correlation of HLA-DR expression in large cell lymphoma as determined by LN3 antibody staining[J]. Cancer,1990,66(10):1147-1153.

[6] Plander M,Seegers S,Ugocsai P,et al. Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles[J]. Leukemia,2009,23(11):2118-2128.

[7] Riemersma SA,Jordanova ES,Schop RFJ,et al. Extensive genetic alterations of the HLA region,including homozygous deletions of HLA class II genes in B-cell lymphomas arising in immune-privileged sites[J]. Blood,2000,96(17):3569-3577.

[8] Wilkinson ST,Fernandez DR,Murphy SP,et al. Loss of CIITA and MHC Class II expression in diffuse large B-cell lymphoma is not explained by methylation of CIITA promoters III and IV[J]. Blood,2008,112(12):1786.

[9] Ossendorp F,Mengede E,Camps M,et al. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors [J]. J Exp Med,1998,187(8):693-702.

[10] Bennett SR,Carbone FR,Karamalis F,et al. Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T-cell help[J]. J Exp Med,1997,186(1):65-70.

[11] Dorfman DM,Schultze JL,Shahsafaei A,et al. In vivo expression of B7-1 and B7-2 by follicular lymphoma cells can prevent induction of T-cell anergy but is insufficient to induce significant T cell proliferation[J]. Blood,1997,90(23):4297-4306.

(收稿日期:2012-06-18)