

健康成年人外周血单个核细胞 HLA-G mRNA 的表达水平分析

夏悦昕¹ 周世航¹ 张力¹ 于卫建¹ 邵林楠¹ 刘铭²

[摘要] 目的:探讨健康成年人外周血单个核细胞(PBMCs)HLA-G mRNA 的表达水平与性别和年龄的相关性,以期为研究 PBMCs HLA-G 的功能提供相关信息。方法:分离健康成年人 PBMCs 并提取总 RNA,应用实时定量 PCR 方法,比较不同性别和不同年龄段健康成年人 PBMCs HLA-G mRNA 的表达情况。结果:健康女性 PBMCs HLA-G mRNA 的表达水平高于男性(男:0.049 2,女:0.083 7, $P=0.018 0$),并且 41~50 岁年龄段女性 HLA-G mRNA 的表达水平高于 31~40 岁年龄段(31~40 岁:0.039 3,41~50 岁:0.152 2, $P=0.001 0$)。结论:健康成年人 PBMCs HLA-G mRNA 的表达水平与性别有关,且健康女性 HLA-G mRNA 的表达水平与年龄有关。

[关键词] 人类白细胞抗原;HLA-G;外周血单个核细胞;实时定量 PCR;表达水平

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.08.015

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Expression patterns of HLA-G mRNA in peripheral blood mononuclear cells from healthy adult

XIA Yuexin¹ ZHOU Shihang¹ ZHANG Li¹ YU Weijian¹ SHAO Linan¹ LIU Ming²
(¹Dalian Blood Center,Dalian,116001,Chian;²Department of Cell Biology,Dalian Medical University)

Corresponding author:LIU Ming,E-mail:liuminglinxi@163.com

Abstract Objective: To provide the information for future research into the function of HLA-G, and explore the relationship between expression patterns of HLA-G mRNA in PBMCs from healthy adult and gender and age. **Method:** PBMCs were separated from peripheral blood of healthy adults, and the total RNA was extracted. Expression patterns of HLA-G mRNA between different genders and different ages were determined by quantitative real-time-PCR. **Result:** The expression levels of HLA-G mRNA in PBMCs of healthy women were higher than that of men(men:0.049 2, women:0.083 7, $P=0.018 0$). And the expression levels of HLA-G mRNA of women ages of 41-50 were higher than that of 31-40(31-40:0.039 3, 41-50:0.152 2, $P=0.001 0$). **Conclusion:** The expression level of HLA-G mRNA in PBMCs of healthy adults was related to gender, and the expression level of HLA-G mRNA in healthy women was related to age.

Key words human leukocyte antigen; HLA-G; peripheral blood mononuclear cells; quantitative real-time PCR; expression patterns

人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)是一组位于染色体上的紧密连锁且具有高度多态性的基因群,其编码的蛋白质在免疫应答和免疫调节中发挥极其重要的作用。HLA-I 基因编码的 I 类分子主要参与排斥反应、抗体产生和细胞裂解等免疫过程。经典的 HLA-I 类分子包括:HLA-A、HLA-B、HLA-C。HLA-G 属于非经典 HLA-I 类分子,是机体重要的免疫耐受分子之一。除了母胎界面的绒毛外滋养层细胞和肿瘤细胞,HLA-G 还表达于单个核细胞且以淋巴细胞表面表达最为丰富,但其功能至今尚不清楚。之前研究发现,健康成年人外周血淋巴细胞表面 HLA-A 和 HLA-B 的表达随年龄增长显著降低^[1]。但是关于 HLA-G 在健康成年人外周血单个核细胞(periph-

eral blood mononuclear cells, PBMCs)表面的表达情况尚不清楚。本文利用实时定量比较 Ct 法初步探讨健康成年人 PBMCs 表面 HLA-G mRNA 的表达水平与性别和年龄的相关性,以期为研究 PBMCs HLA-G 的功能提供相关信息。

1 资料与方法

1.1 标本来源

随机选取我中心符合献血标准的健康献血者 88 例,其中男 60 例,女 28 例;年龄 31~50 岁。按年龄分为 31~40 年龄段组和 41~50 年龄段组。

1.2 试剂与仪器

7300 实时定量 PCR(Quantitative real-time PCR)扩增仪(美国 ABI 公司);RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit(TIANGEN);淋巴细胞分离液(北京索莱宝);Megafuge1.0 高速离心机(德国 Heraeus 公司);Biofuge pico 高速离心机(德国 Heraeus 公司);PrimeScript™ RT reagent Kit with

¹大连市血液中心(辽宁大连,116001)

²大连医科大学细胞生物学教研室

通信作者:刘铭,E-mail:liuminglinxi@163.com

gDNA Eraser(Takara 公司);SYBR® Select Master Mix(Applied Biosystems)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 分别抽取献血者的静脉血 5 ml (EDTA 抗凝血),在采血 4 h 内分离单个核细胞用于 HLA-G mRNA 的表达水平分析。

1.3.2 分离单个核细胞 抗凝血 5ml,离心 (3 000 r/min,5 min)。吸取约 2 ml 白膜层细胞,再加入 2 ml 生理盐水,用吸管混匀。将细胞悬液加入到 2 ml 淋巴细胞分离液中(沿管壁缓缓叠加于分层液上,形成清晰界面),离心 (2 000 r/min,25 min)。离心后管内分为 3 层,下层为红细胞和粒细胞层、中层为分离液层、下层为血浆层(含血小板和破碎细胞)。用滴管吸取位于上层和中层界面处的单个核细胞。用等量 PBS 稀释,1 500 r/min 离心 10 min。见白色沉淀,弃上清,再次加入 PBS 稀释,离心。经本法分离得到的单个核细胞纯度可达 95%,淋巴细胞占 90%~95%,细胞获得率可达 80%以上^[2]。

1.3.3 PBMCs 总 RNA 提取 使用 RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit (TIANGEN) 试剂盒提取

PBMCs 总 RNA。电泳条带及 A_{260}/A_{280} 的值判断提取 RNA 的质量。-80℃保存备用。

1.3.4 cDNA 的合成 使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Takara)试剂盒合成 cDNA。

1.3.5 实时定量 PCR ①引物序列:参考之前的研究^[3-4],设计目的基因 HLA-G 和内参基因 $\beta 2M$ ($\beta 2$ -微球蛋白)的引物,保证靶位点基因的特异性,以避免非特异性扩增。引物序列见表 1,引物由 Takara-宝生物工程(大连)有限公司合成。②利用 SYBR 染料检测不同性别健康成年人外周血单个核细胞 HLA-G 表达情况,并以 $\beta 2M$ 基因作为内参照。利用 SYBR® Select Master Mix 试剂盒,反应体系为 20 μ L,包括:2 $\times$ TaqMan® Universal PCR Master Mix II 10 μ L,cDNA 1 μ L (10 ng/ μ L);正向引物和反向引物各 0.2 μ L (20 μ mol/L),每一标本设 3 个复孔。反应条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 15 s;60℃ 退火延伸 1 min,共 40 个循环。所有样品检测均设置阴性对照(无模板)以排除假阳性结果。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因	正向引物	反向引物
HLA-G	TTGCTGGCCTGGTTGTCTT	TTGCCACTCAGTCCCACACAG
$\beta 2M$	GACTTGTCTTTCAGCAAGGA	ACAAAGTCACATGGTTCACA

1.3.6 实时定量 PCR 反应的建立 随机选取任一样本的 cDNA,将其进行 5 倍浓度梯度稀释,稀释后进行实时定量 PCR 反应,反应后根据模板量与 Ct 值作图,得到用于目的基因定量标准曲线。设标准曲线中浓度最低的模板量为 1,则稀释后的模板量分别为:1、5、25、125、625、3 125。通过标准曲线可以得到引物的扩增效率,融解曲线分析以确定引物是否形成二聚体。

1.3.7 HLA-G mRNA 相对表达水平的计算 采用相对定量法分别分析健康成年人外周血单个核细胞 HLA-G mRNA 表达情况,以 $\beta 2M$ 为内参照。计算公式为:相对 mRNA 表达量 = $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$,其中 $\Delta Ct = Ct(\text{HLA-G}) - Ct(\beta 2M)$ ^[5]。

1.4 统计学处理

使用 SPSS 13.0 软件进行 t-test 分析, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时定量 PCR 反应的建立

实验建立了 HLA-G 和 $\beta 2M$ 的标准曲线,实时定量 PCR 反应采用的引物扩增效率均为 1.0~1.1,线性关系良好。融解曲线分析确定引物不产

生二聚体。以未反转录的 RNA 和水作为模板进行实时定量 PCR 检测,在 35 圈之前没有出现扩增产物,满足要求。

2.2 利用公式 $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$ 计算健康成年人外周血单个核细胞 HLA-G mRNA 的表达情况

结果显示:41~50 年龄段健康成年人外周血单个核细胞 HLA-G mRNA 的表达水平高于 31~40 年龄段 (31~40 岁组:0.042 4,41~50 岁组:0.074 9, $P=0.021$)。健康女性外周血单个核细胞 HLA-G mRNA 的表达水平高于男性 (男:0.049 2,女:0.083 7, $P=0.018 0$),且 41~50 年龄段女性 HLA-G mRNA 的表达水平高于 31~40 年龄段 (31~40 岁组:0.039 3,41~50 岁组:0.152 2, $P=0.001$)。而不同年龄段男性 HLA-G mRNA 表达水平的差异无统计学意义 (31~40 岁组:0.044 7,41~50 岁组:0.051 9, $P=0.465$)。

3 讨论

早期研究发现 HLA-G 可在母胎界面的绒毛外滋养层细胞上表达,产生免疫抑制,维持母体对胎儿的免疫耐受^[6]。另有研究表明,表达于肿瘤细胞上的 HLA-G 可以与免疫细胞上的抑制性受体

结合直接发挥免疫抑制功能,同时可以通过诱导产生调节性 T 细胞参与机体的免疫耐受,使肿瘤细胞逃避宿主的免疫监视并在体内进一步生长^[7]。越来越多的研究发现,HLA-G 的异常表达与乳腺癌^[8]、卵巢癌^[9]、食管癌^[10]、非小细胞肺癌^[11]、肝癌^[12]、结直肠癌^[13]等多种恶性肿瘤有关。除此之外,HLA-G 还表达于 PBMCs 且以淋巴细胞表面表达最为丰富,但其具体功能至今尚不清楚。关于健康成年人 PBMCs HLA-G mRNA 表达的研究,一方面可以为以后深入研究 HLA-G 的功能及其与肿瘤的相关性提供理论基础;另一方面,不同性别与年龄的健康人 PBMCs HLA-G mRNA 的表达情况与机体的免疫状态有关,进一步提示发生感染和肿瘤的可能性大小。

HLA-G 分子免疫学功能主要为:①直接作用:HLA-G 可以直接与 T 细胞、APC 和 NK 细胞上的抑制性受体结合,从而发挥免疫抑制作用^[14-15];②间接作用:HLA-G 可以使 T 细胞分化成为抑制性 T 细胞,发挥免疫抑制功能^[16]。HLA-G 的免疫抑制作用在不同的情况下所扮演的角色相反,例如:在妊娠障碍和器官移植的治疗中,应使 HLA-G 的表达上调,从而保护胎儿的正常发育和移植物的存活;在肿瘤的免疫治疗中,则应使 HLA-G 分子的表达下调,从而抑制肿瘤的免疫逃逸。

与 HLA-G 不同,HLA-A 和 HLA-B 属于经典的 HLA-I 类分子,HLA-A 和 HLA-B 可以将肿瘤抗原提呈给 T 细胞,在 T 细胞识别肿瘤细胞的过程中扮演着重要角色,因此 HLA-A 和 HLA-B 的表达下调被认为是肿瘤细胞免疫逃逸的机制。有研究发现,外周血淋巴细胞表面 HLA-A 和 HLA-B 的表达随年龄增长显著降低。HLA-G 的表达水平与机体免疫状态有关,其表达量上调,发挥免疫抑制功能,机体免疫功能受损,杀伤效能下降。

本研究发现,健康女性外周血单个核细胞 HLA-G mRNA 的表达水平高于男性,并且高年龄段(41~50 岁)健康女性 HLA-G mRNA 表达水平较低年龄段(31~40 岁)显著性上调,提示高年龄段女性可能会导致更多的感染和相关肿瘤的发生。

参考文献

- [1] Le Morvan C, Cogné M, Drouet M. An elevation in the concentration of HLA class I molecules in human blood due to ageing[J]. Mech Ageing Dev, 2001, 122: 335-340.
- [2] 尹玲玲,阮素红,田宇,等.不同方法转染人外周血淋巴细胞效率比较[J].白血病·淋巴瘤, 2015, 24(3): 165-168.
- [3] Jasinski-Bergner S, Reches A, Stoeckl C, et al. Identification of novel microRNAs regulating HLA-G expression and investigating their clinical relevance in renal cell carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7: 26866-26878.
- [4] Kulkarni S, Qi Y, OhUigin C, et al. Genetic interplay between HLA-C and MIR148A in HIV control and Crohn disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110: 20705-20710.
- [5] 陈少华,李扬秋,杨力建,等.实时定量 RT-PCR 检测 TCR V γ 亚家族基因表达水平[J].细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(2): 166-168.
- [6] 李婷,朱爱珍,王雪松,等.血清 ACA、sHLA-G 等在预测习惯性流产中的应用价值[J].中华保健医学杂志, 2017, 9(1): 40-42.
- [7] Yan WH. Human leukocyte antigen-G in cancer: Are they clinically relevant? [J]. Cancer Lett, 2011, 311: 123-130.
- [8] da Silva IL, Montero-Montero L, Martín-Villar E, et al. Reduced expression of the murine HLA-G homolog Qa-2 is associated with malignancy, epithelial-mesenchymal transition and stemness in breast cancer cells [J]. Sci Rep, 2017, 7: 6276.
- [9] Jung YW, Kim YT, Kim SW, et al. Correlation of human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression and disease progression in epithelial ovarian cancer [J]. Reprod Sci, 2009, 16: 1103-1111.
- [10] Yie SM, Yang H, Ye SR, et al. Expression of HLA-G is associated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Am J Clin Pathol, 2007, 128: 1002-1009.
- [11] Zhang Y, Zhao J, Qiu L, et al. Co-expression of ILT4/HLA-G in human non-small cell lung cancer correlates with poor prognosis and ILT4-HLA-G interaction activates ERK signaling [J]. Tumour Biol, 2016, 37: 11187-11198.
- [12] Wang Y, Ye Z, Meng XQ, et al. Expression of HLA-G in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2011, 10: 158-163.
- [13] Zhang RL, Zhang X, Dong SS, et al. Predictive value of different proportion of lesion HLA-G expression in colorectal cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8: 107441-107451.
- [14] Yan WH. HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2011, 11: 76-89.
- [15] 阮嫣赞,颜卫华,林爱芬. HLA-G 与肿瘤研究进展 [J]. 生命科学, 2012, 24(3): 242-249.
- [16] Naji A, Le Rond S, Durrbach A, et al. CD3+CD4low and CD3+CD8low are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance [J]. Blood, 2007, 110: 3936-3948.

(收稿日期:2018-04-23)