

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.18.004

35-37 kDa 形式可溶性 MHC I 释放机制研究 *

赵锦荣¹ 白海燕² 郭晏海¹ 刘永兰¹ 颜真^{1△}

(1 第四军医大学中国人民解放军基因诊断技术应用研究所 陕西 西安 710032;

2 河南省上蔡县人民医院 河南 上蔡 463800)

摘要 目的:探讨 35-37 kDa 形式的可溶性 MHC I 释放机制,为开展造血系统恶性肿瘤免疫干预治疗研究奠定理论基础。**方法:**以细胞表面标记、免疫沉淀、免疫印迹和增强化学发光法探讨 EGTA 和蔗糖对 THP1 细胞释放 43 和 35-37 kDa 可溶性 MHC I 的影响;以超速离心法纯化外排小体,并用免疫沉淀、免疫印迹和增强化学发光法检测 43 和 35-37 kDa 可溶性 MHC I;用 Quantity One 软件对 43 和 35-37 kDa 可溶性 MHC I 进行相对定量分析。**结果:**EGTA 同时显著抑制 43 和 35-37 kDa 可溶性 MHC I 产生;蔗糖同时显著促进 43 和 35-37 kDa 可溶性 MHC I 产生;43 kDa 可溶性 MHC I 存在于外排小体上,而 35-37 kDa 可溶性 MHC I 在外排小体上检测不到。**结论:**35-37 kDa 可溶性 MHC I 与外排小体都来源于细胞内多泡小体同质膜的溶合后释放,但 35-37 kDa 可溶性 MHC I 并不包含在外排小体的泡囊中,而是独立于外排小体释放。

关键词:主要组织相容性复合体 I;金属蛋白酶;外排小体;多泡小体

中图分类号:R733;Q26 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)18-3415-03

Release Mechanism of 35-37 kDa of Soluble MHC I*

ZHAO Jin-rong¹, BAI Hai-yan², GUO Yan-hai¹, LIU Yong-lan¹, YAN Zhen^{1△}

(1 Institute of Genetic Diagnosis of PLA, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Renmin Hospital of Shangcai, Shangcai, Henan, 463800, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the release mechanism of 35-37 kDa of soluble MHC I and to lay a foundation for the immune intervention of hematopoietic malignancies. **Methods:** Cell surface labeling, immunoprecipitation, Western blot and enhanced chemiluminescence methods were used to investigate the effect of EGTA and sucrose on the release of 43 and 35-37 kDa of soluble MHC I in THP1 cells respectively. Exosomes were separated from the supernatant of cell culture by ultracentrifugation, and then soluble MHC I was detected with immunoprecipitation, Western blot and enhanced chemiluminescence methods. The quantity of soluble MHC I release was analyzed with Quantity One software after chemiluminescence. **Results:** EGTA could inhibit the release of 43 and 35-37 kDa of soluble MHC I simultaneously, and sucrose could increase the release of 43 and 35-37 kDa of soluble MHC I simultaneously. No 35-37 kDa of soluble MHC I was found in exosomes, contrary to 43 kDa of soluble MHC I. **Conclusions:** Both 35-37 kDa of soluble MHC I and exosomes were released by fusing of multivesicular bodies with plasma membrane, but while being released, 35-37 kDa of soluble MHC I was independent of exosomes, while 43 kDa of soluble MHC I was located in exosomes and released with exosomes.

Key words: Major histocompatibility complex class I; Metalloproteinase; Exosome; Multivesicular bodies

Chinese Library Classification (CLC): R733; Q26 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)18-3415-03

前言

可溶性 MHC I (soluble major histocompatibility complex class I),简称 sMHC I,近年来逐渐成为研究热点^[1-8],在何杰金病和非何杰金淋巴瘤、急性髓性白血病、慢性粒细胞白血病、多发性骨髓瘤和原发性巨球蛋白血症等造血系统恶性肿瘤患者的血清中,sMHC I 水平显著升高,升高的 sMHC I 同疾病程度及预后相关^[9-11]。

在功能上,sMHC I 可诱导 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞发生凋亡^[11-15],sMHC I 还可通过诱导 TGF-β1 表达的方式间接介导免

疫耐受^[16]。已知输血或输入血液制品可引起机体的免疫功能抑制,血液中的 sMHC I 被认为是引起这一效应的主要原因^[17,18]。

血液中的 sMHC I 有 43, 39 和 35-37 kDa 三种形式^[11]。已知 43 kDa 为全长形式,存在于外排小体上,随外排小体释放至胞外;39 kDa 分子无跨膜区,为 mRNA 改变拼接的产物;35-37 kDa 分子来源于金属蛋白酶对 43 kDa 分子的切割。我们前期的研究结果显示,切割产生 35-37 kDa 分子的反应发生在细胞晚期体内^[19],但它的具体释放机制还不清楚。

鉴于 35-37 kDa sMHC I 分子的切割产生发生在晚期体内^[19],因此推测 35-37 kDa sMHC I 分子也可能是通过晚期体内分

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31100547)

作者简介:赵锦荣(1972-),女,博士,主要研究方向:分子生物学,电话:15353628471, E-mail: zhaojrr@fimmu.edu.cn

△通讯作者:颜真(1962-),女,博士生导师,教授,主要研究方向:分子生物学,电话:029-84774772, E-mail: yanzhen@fimmu.edu.cn

(收稿日期:2015-02-20 接受日期:2015-03-15)

泌的外排小体被释放到细胞外。已知 43 kDa sMHC I 是外排小体的标志分子之一,因此本研究以 43 kDa sMHC I 分子为研究参照,探讨 35-37 kDa sMHC I 的释放机制,为开展造血系统恶性肿瘤免疫干预治疗研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

生物素购自 Sigma 公司;蛋白酶抑制剂混合物和辣根过氧化物酶偶联链亲合素购自博士德公司;W6/32 抗体购自 Santa Cruz 公司;硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司;预染蛋白分子量标准购自 Fermentas 公司;THP1 细胞为本室保存;蛋白 A 琼脂糖购自 GE 公司;外排小体裂解液(50 mmol/L Tris/HCl, pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1 % NP-40, 1 mmol/L EDTA, 1 mg/L 胃蛋白酶抑制剂 A, 1 mg/L 抑肽酶, 1 mg/L 亮抑酶肽)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在含 5 % CO₂ 的细胞培养箱对 THP1 细胞进行培养,培养液为含 10 %胎牛血清的 RPMI 1640。

1.2.2 细胞表面生物素标记 用 0.5 mg/mL 生物素于 4 °C 标记细胞表面 15 min, 加入 8 mL PBS, 于 8 °C 1000 rpm 离心 8 min, 去上清, 重复洗涤细胞 2 次, 将细胞重悬于培养液, 加入终浓度为 1.5 mol/L 的 EGTA 或 0.45 mol/L 的蔗糖, 37 °C 继续培养 4 h。收集培养液, 2000 rpm 离心 5 min, 保留上清, 用于免疫沉淀。

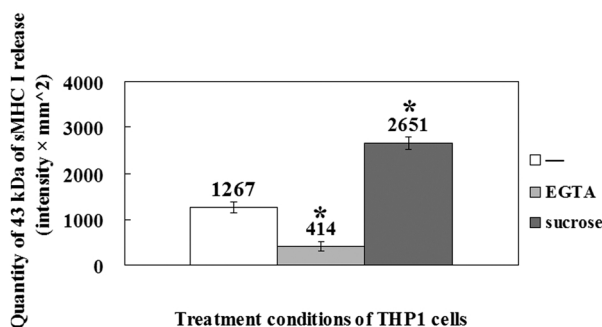


图 1 EGTA 和蔗糖对 43 kDa sMHC I 产生的影响

Fig.1 Effect of EGTA and sucrose on the release of 43 kDa of soluble MHC I

2.2 检测外排小体上 sMHC I 分子的种类

从表面生物素标记后的 THP1 细胞培养上清纯化外排小体,并将外排小体溶解后,进行免疫沉淀、免疫印迹和增强化学发光分析,实验结果显示在纯化的外排小体上检测到其标志物之一 43 kDa sMHC I,而检测不到 35-37 kDa sMHC I(图 3 泳道 1)。图 3 泳道 2 为用于纯化外排小体的 THP1 细胞培养上清,在该上清中,既存在 43 kDa sMHC I 分子,也存在切割形式的 35-37 kDa sMHC I。

3 讨论

MHC I 既以跨膜蛋白的形式存在于几乎所有有核细胞膜表面,也以可溶性形式存在于血液、尿液、淋巴液、乳汁等体液

1.2.3 外排小体制备 2000× g 离心细胞培养上清 30 min,去除细胞碎片,加入 5 mL 外排小体分离试剂并混匀,过夜,于 4 °C 10000× g 离心 1 h,弃上清,留沉淀,用外排小体裂解液重悬沉淀,4 °C 保存,用于免疫沉淀。

1.2.4 免疫沉淀和免疫印迹 将 100 μL 包被有蛋白 A 的琼脂糖同 100 μg W6/32 抗体 4 °C 过夜孵育,加入 800 L PBS, 5000 rpm 离心 3 min,弃上清,重复洗涤琼脂糖 2 次,然后加入细胞培养上清或外排小体混合物,于 4 °C 旋转过夜,进行免疫沉淀。免疫沉淀物经免疫印迹后,用辣根过氧化物酶偶联链亲合素进行化学发光检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS10.0 软件进行独立样本的 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGTA 和蔗糖对 43 和 35-37 kDa sMHC I 产生的影响

在 EGTA 或蔗糖存在条件下,对生物素表面标记的 THP1 细胞进行培养,收集培养上清,并进行免疫沉淀、免疫印迹和增强化学发光分析,结果显示,细胞内多泡小体与质膜融合抑制剂 EGTA,在抑制 43 kDa sMHC I 产生的同时(图 1),同样可显著抑制 35-37 kDa sMHC I 产生(P<0.05)(图 2)。蔗糖在促进 43 kDa sMHC I 产生的同时(图 1),同样可显著促进 35-37 kDa sMHC I 的产生(P<0.05)(图 2)。上述实验结果重复 3 次。

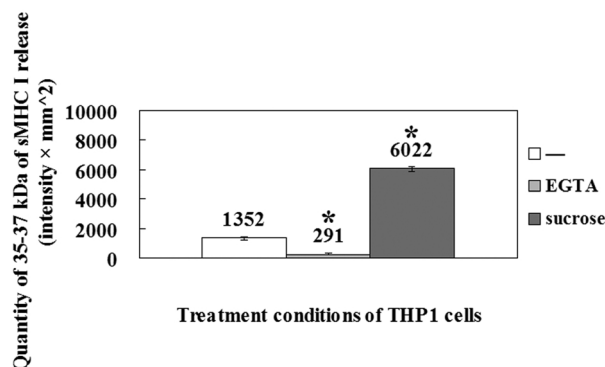


图 2 EGTA 和蔗糖对 35-37 kDa sMHC I 产生的影响

Fig.2 Effect of EGTA and sucrose on the release of 35-37 kDa of soluble MHC I

中^[1]。MHC I 的主要功能是向杀伤性 T 细胞提呈抗原,引发免疫系统对携带有抗原肽细胞的攻击,同时 MHC I 也作为 NK 细胞的抑制性配体起作用,而 sMHC I 则可诱导 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞发生凋亡,介导肿瘤免疫耐受,具有免疫抑制功能。血液中 sMHC I 水平升高同淋巴瘤和急性髓性白血病等疾病差的预后相关,因此开展 sMHC I 产生机制研究,可为开展针对造血系统恶性肿瘤的免疫干预研究提供药物设计靶标,具有重要的理论价值和社会意义。

外排小体是由细胞晚期内体分泌的 40-100 nm 的小囊泡体,而我们前期的研究结果显示 35-37 kDa sMHC I 分子的产生依赖于金属蛋白酶切割活性,切割反应发生在晚期内体,由此推测 35-37 kDa sMHC I 分子也可能是通过晚期内体分泌的外

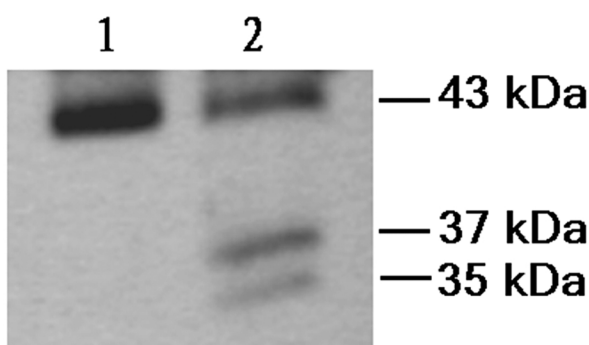


图3 检测外排小体中的 sMHC I, 1: 外排小体; 2: 阳性对照(用于外排小体纯化的细胞培养上清)

Fig.3 To detect sMHC I from exosomes: Lane 1 is exosome; lane 2 is positive control (cell culture supernatant for exosome purification)

排小体被释放到细胞外。已知 43 kDa sMHC I 分子为全长型 MHC I 分子, 是外排小体的标志分子之一, 因此在本研究中, 我们以细胞表面生物素标记、免疫沉淀、免疫印迹和增强化学发光法对比研究了 43 和 35-37 kDa sMHC I 的产生机制。已知 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA, 可通过抑制细胞内多泡小体与质膜的融合, 抑制外排小体释放^[20]。在本研究中, 我们发现 EGTA 可同时抑制 43 和 35-37 kDa sMHC I 产生, 这一结果提示这两种分子释放通路具有一致之处; 蔗糖分子在促进 43 kDa sMHC I 产生的同时, 可同样促进 35-37 kDa sMHC I 产生, 进一步支持 43 和 35-37 kDa sMHC I 释放通路具有一致性之处。但进一步检测外排小体, 只检测到 43 kDa sMHC I, 而检测不到 35-37 kDa sMHC I, 这说明 43 和 35-37 kDa sMHC I 释放通路大体一致, 但细节稍有差异, 既它们都来源于细胞内多泡小体同质膜的溶合后释放, 但前者随外排小体释放到细胞外, 而后者独立于外排小体被释放到细胞外。

在本研究中, 多泡小体与质膜融合的抑制剂 EGTA 抑制 35-37 kDa sMHC I 释放的事实也进一步验证了我们前期的研究结果, 既 35-37 kDa sMHC I 的切割产生发生在细胞内, 而不是简单的发生在细胞表面^[19]。

本研究结果显示, 43 和 35-37 kDa sMHC I 的产生都来源于内化的细胞表面 MHC I, 内化的 MHC I 分子中有的保持了分子的完整性, 随外排小体释放, 而有的则被切割为 35-37 kDa sMHC I 后释放, 是什么因素导致了上述差异是下一步值得探究的问题。

该研究结果也提示我们, 可通过调控 Ca^{2+} 浓度, 影响细胞内多泡小体与质膜的溶合, 同时干预 43 和 35-37 kDa sMHC I 产生, 进行后续的造血系统恶性肿瘤免疫干预治疗研究。

参考文献(References)

- [1] Allard M, Oger R, Benlalam H, et al. Soluble HLA-I/peptide monomers mediate antigen-specific CD8 T cell activation through passive peptide exchange with cell-bound HLA-I molecules [J]. J Immunol, 2014, 192(11): 5090-5097
- [2] Kotze D, Kruger TF, Lombard C, et al. The effect of the biochemical marker soluble human leukocyte antigen G on pregnancy outcome in assisted reproductive technology--a multicenter study[J]. Fertil Steril,

2013, 100(5): 1303-1309

- [3] Shwetank, Date OS, Carbone E, et al. Inhibition of ERK and proliferation in NK cell lines by soluble HLA-E released from Japanese encephalitis virus infected cells[J]. Immunol Lett, 2014, 162 (1 Pt A): 94-100
- [4] Kubysheva N, Soodaeva S, Postnikova L, et al. Associations between indicators of nitrosative stress and levels of soluble HLA-I, CD95 molecules in patients with COPD[J]. COPD, 2014, 11(6): 639-644
- [5] Darmochwal-Kolarz D, Kolarz B, Rolinski J, et al. The concentrations of soluble HLA-G protein are elevated during mid-gestation and decreased in pre-eclampsia [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2012, 50 (2): 286-291
- [6] Allard M, Oger R, Vignard V, et al. Serum soluble HLA-E in melanoma: a new potential immune-related marker in cancer[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21118
- [7] Huang, Burke P, Yang Y, et al. Soluble HLA-G inhibits myeloid dendritic cell function in HIV-1 infection by interacting with leukocyte immunoglobulin-like receptor B2[J]. J Virol, 2010, 84(20): 10784-10791
- [8] Rebmann V, Switala M, Eue I, et al. Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study[J]. Hum Reprod, 2010, 25(7): 1691-1698
- [9] Tabayoyong WB, Zavazava N. Soluble HLA revisited [J]. Leuk Res, 2007, 31(2): 121-125
- [10] 徐伟, 赵春亭, 苏湛, 等. 恶性血液病患者血 sHLA-I 水平的变化及临床意义[J]. 山东医药, 2010, 50(13): 16-18
Xu Wei, Zhao Chun-ting, Su Zhan, et al. Change of serum HLA-I level in patients with hematologic malignancies and its significance [J]. Shan dong Med J, 2010, 50(13): 16-18
- [11] Zhao JR, Guo Y, Yan Z, et al. Soluble MHC I and soluble MIC molecules: potential therapeutic targets for cancer [J]. Int Rev Immunol, 2011, 30(1): 35-43
- [12] Spaggiari GM, Contini P, Dondero A, et al. Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class I receptors through FasL-Fas interaction [J]. Blood, 2002, 100(12): 4098-4107
- [13] Contini P, Ghio M, Poggi A, et al. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation [J]. Eur J Immunol, 2003, 33(1): 125-134
- [14] Contini P, Zocchi MR, Pierri I, et al. In vivo apoptosis of CD8(+) lymphocytes in acute myeloid leukemia patients: involvement of soluble HLA-I and Fas ligand[J]. Leukemia, 2007, 21(2): 253-260
- [15] 郭礼和. 肿瘤免疫耐受 - 肿瘤细胞的免疫学特性 [J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(7): 732-734
Guo Li-he. Tumor immune tolerance- the immunological characteristics of tumor cells [J]. Chin J Cell Bio, 2012, 34 (7): 732-734
- [16] Ghio M, Contini P, Negrini S, et al. Soluble HLA-I-mediated secretion of TGF-beta1 by human NK cells and consequent down-regulation of anti-tumor cytolytic activity [J]. Eur J Immunol, 2009, 39(12): 3459-3468

- implications for healthy human aging [J]. *Am J Hum Biol*, 2012, 24 (2): 101-106
- [32] Hill DR, Rho HK, Kessler SP, et al. Human milk hyaluronan enhances innate defense of the intestinal epithelium[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(40): 29090-29104
- [33] Hui MZ, Wei C, Guo Q. Clinical applications of ozonated water in human wounds, skin and mucosas [J]. *Health Research*, 2013, 33(6): 412-414
- [34] Hayakumo S, Arakawa S, Mano Y, et al. Clinical and microbiological effects of ozone nano-bubble water irrigation as an adjunct to mechanical subgingival debridement in periodontitis patients in a randomized controlled trial [J]. *Clinical Oral Investigations*, 2013, 17 (2): 379-388
- [35] Dhingra K, Vandana KL. Management of gingival inflammation in orthodontic patients with ozonated water irrigation - a pilot study[J]. *International Journal of Dental Hygiene*, 2011, 9(4): 296-302
- [36] Kapoor P, Sachdeva S, Sachdeva S. Topical Hyaluronic Acid In The Management of Oral Ulcers[J]. *Indian Journal of Dermatology*, 2011, 56(3): 300-302
- [37] Rodrigues SV, Acharya AB, Bhadbhade S, et al. Hyaluronan-containing mouthwash as an adjunctive plaque-control agent [J]. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 2010, 8(4): 389-394
- [38] Tashiro T, Seino S, Sato T, et al. Oral administration of polymer hyaluronic acid alleviates symptoms of knee osteoarthritis: A double-blind, placebo-controlled study over a 12-month period [J]. *Scientific World Journal*, 2012, 2012: 167928
- [39] Gariboldi S, Palazzo M, Zanolbio L, et al. Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of defensin 2 via TLR2 and TLR4 [J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 181: 2103-2110
- [40] Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair [J]. *Wound Repair and Regeneration*, 1999, 7: 79-89
- [41] Weind G, Schaller M, Schaefer-Korting M, et al. Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular, biological, pharmaceutical and clinical aspects [J]. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2004, 17: 207-213
- [42] Schlesinger TE, Powell CR. Efficacy and safety of low-molecular weight hyaluronic acid topical gel in the treatment of facial seborrheic dermatitis[J]. *Journal of Clinical Aesthetic Dermatology*, 2012, 5(10): 20-23
- [43] Schlesinger TE, Powell CR. Efficacy and tolerability of low molecular weight hyaluronic acid sodium salt 0.2% cream in rosacea [J]. *Journal of drugs in dermatology*, 2013, 12(6): 664-667
- [44] Neuman MG, Nanau RM, Oruñá L, et al. In vitro Anti-Inflammatory Effects of Hyaluronic Acid in Ethanol-Induced Damage in Skin Cells [J]. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2011, 14(3): 425-437
- [45] Wang Y, Zhang ZY, Chen LL, et al. a Snake Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptide, Could Be an Excellent Therapeutic Agent for Acne Vulgaris[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22120
- [46] Finch CE, Crimmins EM. Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans[J]. *Science*, 2004, 305: 1736-1739
- [47] Fei, N, Zhao LP. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice[J]. *ISME J*, 2012, 7 (4): 880-884
- [48] Cao ZJ, Yu JC, et al. Research Advances in the gut microbiota and inflammation in obesity [J]. *Acta Acedinae Medicine Sinicae*, 2013, 35(4): 462-465
- [49] He GZ. The Gut barrier and Bacterial Translocation [J]. *Journal of Peking Union Medical College Hospital*, 2012, 3(3): 260-264
- [50] Huang ZD, Zhao CM, Chen YL, et al. Recombinant Human Hyaluronidase PH20 Does Not Stimulate an Acute Inflammatory Response and Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Neutrophil Recruitment in the Air Pouch Model of Inflammation [J]. *Journal of Immunology*, 2014, 192(11): 5285-5295
- [51] Jun M, Kenshi Y, Kristen RT, et al. Engagement of CD44 by hyaluronan suppresses TLR4 signaling and the septic response to LPS [J]. *Mol Immunol*, 2009, 47(2-3): 449-456

(上接第 3417 页)

- [17] Ghio M, Contini P, Negrini S, et al. sHLA-I contaminating molecules as novel mechanism of ex vivo/in vitro transcriptional and posttranscriptional modulation of transforming growth factor-beta in CD8⁺ T lymphocytes and neutrophils after intravenous immunoglobulin treatment[J]. *Transfusion*, 2010, 50(3): 547-555
- [18] 朱鑫方, 夏荣. 输血相关免疫调节机制研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(1): 268-272
- Zhu Xin-fang, Xia Rong. Research advance on transfusion-related immunomodulation-review[J]. *J Exp Hematol*, 2010, 18(1): 268-272
- [19] 赵锦荣, 刘永兰, 颜真. HeLa 细胞中可溶性 MHC I 产生于晚期内体[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(6): 773-774
- Zhao Jin-rong, Liu Yong-lan, Yan Zhen. Soluble MHC I was cleaved in late endosome in HeLa cells[J]. *Bas Med Sci Clin*, 2013, 33(6): 773-774
- [20] Savina A, Furlá n M, Vidal M, et al. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(22): 20083-20090