

· 基础研究 ·

莪术油影响宫颈癌细胞 MHC- I 类抗原呈递
相关基因表达水平的实验研究

贾 静 李云波 王 群

摘要 目的 通过观察莪术油对体外培养宫颈癌细胞 HeLa 的增殖抑制及人类主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) I 类分子抗原呈递通路相关基因表达水平的影响,为莪术油应用于临床宫颈高危型人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 感染的治疗提供实验依据。**方法** 以宫颈癌 HeLa 细胞为研究对象,体外培养 HeLa 细胞,绘制细胞生长曲线,CKK8 法检测莪术油对细胞增殖抑制的作用,计算半数有效量 (median effective dose, ED_{50});以不同剂量莪术油和干扰素干预细胞,收集不同作用时间的细胞样本,实时荧光定量 PCR 法检测样本中 MHC- I 类抗原呈递通路相关基因人类白细胞抗原- I (human leukocyte antigen, HLA- I)、抗原处理相关转运蛋白 1 (transporter associated with antigen processing 1, TAP1)、抗原处理相关转运蛋白 2 (transporter associated with antigen processing 2, TAP2) 的表达水平。**结果** 各浓度莪术油混悬液对 HeLa 细胞有不同程度的抑制作用,高剂量莪术油 ($213.8 \mu\text{g/mL}$) 可上调 HeLa 细胞 HLA- I、TAP1、TAP2 的基因表达,且上调作用优于干扰素 ($P < 0.05$);干预 12 h 开始显效,其中 HLA- I 基因表达在干预 12 h 达到最佳上调作用,之后上调作用减弱, TAP1、TAP2 基因表达在干预 48 h 达到最佳上调作用 ($P < 0.05$)。**结论** 莪术油可以上调宫颈癌 HeLa 细胞 HLA- I、TAP1、TAP2 的基因表达,从而加强宫颈癌细胞表面的抗原呈递,避免病变细胞免疫逃逸,帮助机体清除 HPV 感染及癌变细胞,这可能是莪术油治疗宫颈 HPV 感染及宫颈癌的作用机制之一。另外,提示临床应用莪术油时,应使用高剂量并每日给药 2 次持续给药方能达到最佳治疗效果。

关键词 莪术油;宫颈癌细胞;基因表达;实验研究

Effect of Zedoary Turmeric Oil on the Expressions of MHC- I Antigen Presentation Pathway Associated Genes in Cervical Cancer Cells JIA Jing, LI Yun-bo, and WANG Qun Department of Gynaecology, Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)

ABSTRACT Objective To observe the effect of zedoary turmeric oil on the proliferation of cervical cancer cells Hela and the expression of major histocompatibility complex class I (MHC- I) presentation pathway related genes *in vitro*, so as to provide experimental evidence for its application in the treatment of cervical high-risk human papilloma virus (HPV) infection. **Methods** Human cervical cancer cell line HeLa was cultured *in vitro* and treated by zedoary turmeric oil. The effect of zedoary turmeric oil on cell proliferation was detected by CCK8 method. The cell growth curve was plotted, and median effective dose (ED_{50}) was calculated. The cells were treated by high, medium and low doses of zedoary turmeric oil, and collected at different time points. Gene expressions of human leukocyte antigen (HLA- I), transporter associated with antigen processing 1 (TAP1), and transporter associated with antigen processing 2 (TAP2) were detected by using Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) in all groups. **Results** Different concentrations of zedoary turmeric oil suspension inhibited Hela cells to various degrees. High dose zedoary turmeric oil could up-regulate the gene expressions of

基金项目:北京中医药大学中央高校基本科研项目 (No. 2016-JYB-JSMS-060)

作者单位:北京中医药大学第三附属医院妇科 (北京 100029)

通讯作者:李云波, Tel: 010-52075455, E-mail: cindylee100001@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20180822. 279

HLA- I , TAP1 , and TAP2 in HeLa cells , and the up-regulation effect was better than that of IFN α -2a ($P < 0.05$) . After intervened for 12 h , significant effect occurred . The expression of HLA- I gene reached the optimal up-regulation after 12 h of intervention , and then the up-regulation effect was weakened . The gene expressions of TAP1 and TAP2 reached the optimal up-regulation effect at 48 h after intervention ($P < 0.05$) . Conclusions Zedoary turmeric oil could up-regulate the gene expressions of HLA- I , TAP1 , and TAP2 to promote the antigen presentation on the surface of human cervical cancer cell , and avoid immune escape of diseased cells . It might be one of mechanisms for zedoary turmeric oil to treat HPV infection and cervical cancer . In addition , clinical application of zedoary turmeric oil , used at high dose with twice daily could achieve the optimal therapeutic effect .

KEYWORDS zedoary turmeric oil ; cervical cancer cell ; gene expression ; experimental study

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤之一,它在导致妇女死亡的恶性肿瘤中占第 2 位,同时也是人类中免疫抗原关系较强的肿瘤。高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)逃逸宿主的免疫清除并发展为持续感染是宫颈癌发生的最危险因素,免疫逃逸导致的病毒清除障碍是 HPV 持续感染的关键环节^[1]。人类主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)是编码主要组织相容性抗原系统的一组紧密连锁的基因群,位于 6 号染色体的短臂上,存在于所有有核细胞的表面,因其首先在人类白细胞表面被发现且含量最高,故又称为白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA),而 MHC- I 类分子是介导 T 细胞免疫的关键分子,病毒感染和感染转归都受到 MHC- I 类分子的控制。HPV DNA 整合入宿主细胞 DNA,可以使宿主细胞中抗原呈递通路相关分子表达异常,从而减弱 HPV 病毒的抗原呈递,造成 HPV 的免疫逃逸。抗原呈递过程的完成需要多种相关分子的参与,如抗原处理相关转运蛋白(transporter associated with antigen processing, TAP)等。在宫颈癌中发现 MHC- I 类抗原低表达并伴随抗原加工递呈系统分子低表达或缺陷^[2]。

莪术油是传统活血化瘀中药莪术的挥发油,具有行气破血、消积止痛的作用,研究证实莪术油药理活性强、高效、安全,其中含有多多种抗癌有效成分,如 β -榄香烯、莪术醇、莪术酮、吉玛酮等,对于 HPV16 具有抑制作用^[3],并对肝癌细胞、胃癌细胞均具有明显的抑制作用^[4,5]。国内已有临床研究使用纯中药制剂保妇康栓治疗宫颈 HPV 感染,证实疗效确切,而保妇康栓即由莪术油和冰片佐以基质成分而成,其主要抗癌作用成分即为莪术油^[6,7]。干扰素做为临床最常用的治疗宫颈 HPV 感染的西药,已有研究证实具有上调 MHC-I 类分子表达的作用^[8],此研究中将干扰素做为阳性对照组药物。本实验将主要观察莪术油对宫颈癌 HeLa 细胞

HLA-I 类抗原及其抗原呈递通路相关分子 TAP1、TAP2 基因表达的影响,从细胞生物学及分子生物学水平探讨莪术油抗病毒、抗肿瘤的作用机制。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞株 HeLa 细胞(HPV18 阳性的人宫颈鳞癌细胞株),由武汉大学生命科学院张祺老师馈赠。

1.2 药物 莪术油主要成分为 β -榄香烯、莪术醇、莪术酮、吉玛酮等,购自中国药品生物制品检定所,批号:111544-200703。注射用重组人干扰素 α 2a,成分为重组人干扰素 α 2a,100 万 IU/支,沈阳三生制药有限责任公司生产,批号:201603015-1。

1.3 试剂与仪器 二甲基亚砜 DMSO(美国 Sigma 公司),DMEM 培养基、胎牛血清 FBS、0.25% 胰酶均购自美国 GIBCO 公司,青霉素-链霉素双抗溶液(中国杭州吉诺生物医药技术有限公司),CCK-8 增殖试剂盒(中国 Biosharp 公司),Trizol 试剂(美国 BioFlux 公司),反转录试剂盒(cDNA Synthesis Kit,北京安赞诺生物有限公司),荧光定量用预混液 FastStart Essential DNA Green Master(瑞士罗氏公司);二氧化碳培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),Thermo 酶标仪(Multiskan FC 型,美国热电公司),普通倒置显微镜(CK2 型,日本 Olympus),荧光倒置显微镜及照相系统(Axio Observer Z1 型,德国蔡司公司),实时荧光定量 PCR 仪(CFX96 型,美国伯乐公司),梯度 PCR 仪(DNA Engine 型,美国 Bio-Rad 公司),低温离心机(Microfuge20R 型,美国贝克曼)。

2 方法

2.1 细胞培养 用常规方法培养 HeLa 细胞,以 DMEM 完全培养液(含 10% 胎牛血清,青霉素

100 U/mL,链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$)维持培养,待细胞生长至 70%~80%满度时,吸弃培养瓶中原培养液,无菌 PBS 洗涤 1 次,加入 0.25% 胰蛋白酶溶液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静置 2~3 min,显微镜下见细胞间隙增大、细胞变圆时,吸弃尽培养皿中胰蛋白酶溶液,加入 DMEM 完全培养液终止消化,反复吹打培养瓶底,充分吹打均匀脱落细胞,以 1:4 或 1:5 比例传代,接种于培养瓶或培养孔板中,待细胞生长至对数生长期时,进行相关实验研究。

2.2 细胞增殖与 ED_{50} 测定 将处于对数生长期细胞消化,接种于 96 孔细胞培养板中,接种密度为 1×10^4 个/孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中,待细胞贴壁生长后,吸弃孔中原培养液,PBS 洗涤 1 次,按空白对照组(简称 HC 组)、莪术油高(简称 HOH 组)/中(简称 HOM 组)/低(简称 HOL 组)剂量组进行相应药物干预处理,每组 3 个复孔,每孔 0.1 mL,其中 HC 组各孔加入 DMEM 完全培养基,HOH 组、HOM 组、HOL 组各孔加入相应浓度莪术油混悬液,各浓度($\mu\text{g/mL}$)分别为:5.53、22.13、44.25、88.50、177.00、295.00、354.00、590.00,用 DMEM 完全培养基将莪术油配制成浓度 2.95 mg/mL 的母液,加入 100 μL DMSO 使其形成均匀的混悬液,按需要稀释成上述各个浓度的莪术油溶液。待加完各受试药物溶液,培养孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中,培养 24、48、72 h 后,吸弃各孔内上清液,无菌 PBS 液洗涤 3 次,加入 10% CCK-8 的无血清 DMEM 培养基混合液,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中静置 1 h 后,于 Multiskan FC 型酶标仪上以双波长法($\lambda_1 = 450 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 620 \text{ nm}$)检测各孔吸光度(OD 值),并记录结果,绘制细胞生长曲线,利用软件 Graphpad Prism 7.0 计算莪术油的 ED_{50} 。

2.3 细胞 MHC-I 类抗原呈递相关基因表达水平的测定 以干扰素为阳性对照,不同浓度莪术油作用 5、12、24、48 h 细胞。应用实时荧光定量 PCR 法,检测细胞内 HLA-I、TAP1、TAP2 基因表达水平,分析探讨这些基因对莪术油干预处理的量效与时效关系。

具体操作:将处于对数生长期细胞消化,接种于 6 孔细胞培养板中,接种密度为 1×10^5 个/孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中,待细胞贴壁生长后时,吸弃孔中原培养液,PBS 洗涤 1 次,按 HC 组、阳性对照组干扰素 $\alpha 2a$ 组(简称 HIF 组)、HOH 组、HOM 组、HOL 组进行相应药物干预处理,每组 3 个复孔,每孔 1 mL,其中 HC 组各孔加入 DMEM 完全培养基,HIF 组各孔

加入干扰素溶液(浓度:10 万 IU/mL),HOH、HOM、HOL 组各孔对应加入的莪术油混悬液浓度依次为:213.8、106.9、53.45(单位: $\mu\text{g/mL}$)。待加完各受试药物溶液,培养孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中,培养 5、12、24、48 h 后,吸弃各孔内上清液,各孔加入 1 mL Trizol 裂解剂,吹打均匀,细胞裂解液收集于 1.5 mL RAase-free 的 EP 管中。

2.4 RNA 提取与 cDNA 合成 采用 Trizol 法^[9]提取各样本 RNA,以 DEPC 处理的无菌水溶解,制备 RNA 溶液。按照反转录试剂盒(cDNA Synthesis Kit)说明书操作要求,将各 RNA 溶液进行反转录反应,合成相应的 cDNA,反转录反应程序为:42 $^{\circ}\text{C}$,40 min;99 $^{\circ}\text{C}$,5 min;4 $^{\circ}\text{C}$,5 min。

2.5 实时荧光定量 PCR 检测 以 β -actin 为内参,上步合成的 cDNA 为模板,采用罗氏公司 Fast-Start Essential DNA Green Master 染料,在美国伯乐 CFX96 型荧光定量 PCR 仪上进行定量检测分析,每个目的基因、内参均设 3 个复孔。目的基因、内参基因荧光定量检测用引物见表 1。荧光定量检测用程序参数具体为:95 $^{\circ}\text{C}$,3 min;95 $^{\circ}\text{C}$,15 s;56 $^{\circ}\text{C}$,10 s;72 $^{\circ}\text{C}$,10 s,荧光检测,重复 2~4 步骤 40 个循环;融解曲线。

表 1 目的、内参基因荧光定量 PCR 检测用引物表

基因名称	引物序列 (5'→3')	扩增产物 大小(bp)
β -actin	F:AAAGACCTGTACGCCAACACA R:CGATCCACACGGAGTACTTGC	154
HLA-I	F:AGGATTACATCGCCCTGAAC R:AGGTAGACTCTCCGCTGCT	118
TAP1	F:TCAACCAGAAGGAGGCTGTG R:AGCTGCCACCAATGTAGAG	100
TAP2	F:GGAGGTGATTTTGACCCCCA R:ATGGTGTAGGTGAAGCAGCC R:TTCTCTGCGTCTGGATCAGG	113

2.6 统计学方法 运用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 HeLa 细胞生长曲线(图 1) 统计 24、36、48、72 h 时间点空白对照孔的 OD 值,利用软件 Graphpad Prism 7.0 绘制 HeLa 细胞的生长曲线。由图可见,细胞接种密度合适,生长速度正常。

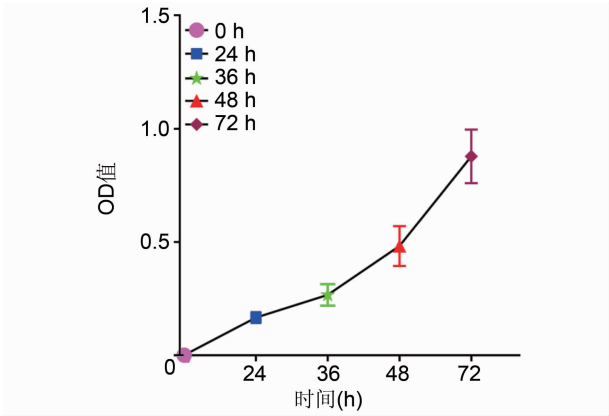


图1 HeLa 细胞生长曲线图

2 不同浓度莪术油混悬液对细胞增殖抑制的影响 各浓度莪术油混悬液对 HeLa 细胞有不同程度的抑制作用,利用软件 Graphpad Prism 7.0 计算莪术油作用 HeLa 细胞 24 h 时的 ED_{50} ,得到莪术油 $ED_{50}=106.9\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

3 不同浓度莪术油对 HeLa 细胞 MHC- I 类抗原呈递相关基因表达的影响

3.1 各组 HeLa 细胞 HLA- I 基因表达比较 (表 2) 与 HC 组比较,HOH 组干预 12、24、48 h 及 HIF 组干预 48 h 均可上调 HLA-I 基因表达($P<0.05$),且 HOH 组 12、24 h 上调作用较 HIF 组更明显($P<0.05$);干预 48 h 时,HOH 组与 HIF 组比较,差异无

统计学意义($P>0.05$);HOL 组及 HOM 组 HLA- I 基因表达较 HIF 组下调($P<0.05$)。

3.2 各组 HeLa 细胞 TAP1 基因表达比较 (表 3) 与 HC 组比较,干预 12、24、48 h,HOH 组及 HIF 组 TAP1 的基因表达均上调($P<0.05$),且 HOH 组上调作用较 HIF 组更明显($P<0.05$)。

3.3 各组 HeLa 细胞 TAP2 基因表达比较 (表 4) 干预 12、24、48 h 时,HOH 组 TAP2 的基因表达上调,较 HC 组、HIF 组差异均有统计学意义($P<0.05$);而 HIF 组 TAP2 的基因表达较 HC 组差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.4 HOH 组各时间点 HeLa 细胞 HLA- I、TAP1、TAP2 基因表达比较(表 5) HOH 组 HLA- I 在干预 12 h 时上调最显著,与 5、24、48 h 比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 48 h 与 24 h 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。TAP1、TAP2 在干预 48 h 时上调最显著,与 5、12、24 h 比较,TAP1 基因差异均有统计学意义($P<0.05$),且 12 h 优于 24、48 h ($P<0.05$),而 TAP2 基因上调在干预 12、24 h 差异无统计学意义($P>0.05$)。

讨 论

MHC- I 类分子参与内源性抗原(包括病毒相关抗原、肿瘤抗原、突变的癌基因产物和突变的抑癌基因

表 2 各组 HeLa 细胞 HLA- I 基因表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HLA- I mRNA			
		5 h	12 h	24 h	48 h
HC	3	0.002 28 ± 0.000 66	0.002 28 ± 0.000 66	0.002 28 ± 0.000 66	0.002 28 ± 0.000 66
HIF	3	0.012 09 ± 0.006 51	0.007 83 ± 0.000 79	0.002 81 ± 0.000 52	0.017 74 ± 0.004 87 *
HOL	3	0.002 60 ± 0.000 33	0.002 52 ± 0.000 31	0.002 16 ± 0.000 88	0.000 81 ± 0.000 31 Δ
HOM	3	0.003 06 ± 0.001 91	0.004 17 ± 0.000 45	0.003 41 ± 0.000 94	0.004 73 ± 0.000 72 Δ
HOH	3	0.007 39 ± 0.002 26	0.036 32 ± 0.009 62 * Δ	0.011 80 ± 0.001 04 * Δ	0.017 09 ± 0.002 16 *
F		1.739	11.262	24.714	11.535
P		0.218	0.001	0.000	0.001

注:与 HC 组比较,* $P<0.05$;与 HIF 组同期比较, $\Delta P<0.05$

表 3 各组 HeLa 细胞 TAP1 的基因表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TAP1 mRNA			
		5 h	12 h	24 h	48 h
HC	3	0.002 29 ± 0.000 41	0.002 29 ± 0.000 41	0.002 29 ± 0.000 41	0.002 29 ± 0.000 41
HIF	3	0.004 26 ± 0.022 07	0.015 92 ± 0.000 42 *	0.012 59 ± 0.002 52 *	0.028 57 ± 0.007 73 *
HOL	3	0.001 66 ± 0.000 23	0.002 25 ± 0.000 77 Δ	0.003 89 ± 0.000 12 Δ	0.002 14 ± 0.000 37
HOM	3	0.001 51 ± 0.000 66	0.002 85 ± 0.000 14 Δ	0.007 01 ± 0.000 39	0.018 34 ± 0.000 74
HOH	3	0.004 04 ± 0.000 40	0.360 24 ± 0.008 79 * Δ	0.091 02 ± 0.005 05 * Δ	1.315 53 ± 0.057 50 * Δ
F		2.954	1609.793	224.895	504.166
P		0.075	0.000	0.000	0.000

注:与 HC 组比较,* $P<0.05$;与 HIF 组同期比较, $\Delta P<0.05$

表 4 各组 HeLa 细胞 TAP2 基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TAP2 mRNA			
		5 h	12 h	24 h	48 h
HC	3	0.000 29 ± 0.000 02	0.000 29 ± 0.000 02	0.000 29 ± 0.000 02	0.000 29 ± 0.000 02
HIF	3	0.001 41 ± 0.000 69	0.000 61 ± 0.000 11	0.001 38 ± 0.000 05	0.002 94 ± 0.000 47
HOL	3	0.000 21 ± 0.000 04	0.000 21 ± 0.000 01	0.002 50 ± 0.000 15	0.000 99 ± 0.000 07
HOM	3	0.000 25 ± 0.000 11	0.000 35 ± 0.000 07	0.005 03 ± 0.000 27	0.010 31 ± 0.000 45
HOH	3	0.001 03 ± 0.000 22	0.156 45 ± 0.004 79 * Δ	0.089 05 ± 0.005 16 * Δ	0.803 84 ± 0.057 99 * Δ
F		2.783	1062.128	282.784	190.397
P		0.086	0.000	0.000	0.000

注:与 HC 组比较,* $P < 0.05$;与 HIF 组同期比较, $\Delta P < 0.05$

表 5 HOH 组 12、24、48 h HLA- I、TAP1、TAP2 基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	HLA- I mRNA	TAP1 mRNA	TAP2 mRNA
5 h	0.007 39 ± 0.002 26	0.004 04 ± 0.000 40	0.001 03 ± 0.000 22
12 h	0.036 32 ± 0.009 62 *	0.360 24 ± 0.008 79 *	0.156 45 ± 0.004 79 *
24 h	0.011 80 ± 0.001 04 Δ	0.091 02 ± 0.005 05 Δ	0.089 05 ± 0.005 16
48 h	0.017 09 ± 0.002 16 Δ	1.315 53 ± 0.057 50 * Δ $\blacktriangle$	0.803 84 ± 0.057 99 * Δ $\blacktriangle$
F	6.289	424.207	157.354
P	0.017	0.000	0.000

注:与 5 h 比较,* $P < 0.05$;与 12 h 比较, $\Delta P < 0.05$;与 24 h 比较, $\blacktriangle P < 0.05$;n 为 3

产物等)加工、处理,其作用是将蛋白抗原处理成抗原肽,呈递给抗原特异性 T 淋巴细胞,进行抗原抗体反应,保护机体免受外界感染^[10]。一旦机体 MHC- I 类分子及抗原呈递相关分子表达异常,就会导致对病毒及癌抗原呈递、识别和杀伤等作用障碍,从而使肿瘤病毒感染受损伤的细胞逃脱免疫监视,随即发展为原位癌、浸润癌或转移等。

在癌症的发展过程中,细胞表面 MHC- I 类分子蛋白表达下调或缺失,无法与 MHC- I 抗原结合形成免疫复合物,从而失去 CTL 的杀伤作用,导致肿瘤的形成^[11-13]。宫颈癌在其发生过程中,E5 基因可下调 MHC- I 类分子蛋白表达,这在 HPV-16、HPV-2、HPV-6 和 HPV83 中得到实验证实^[14-19]。Ritz U 等^[20]研究结果显示 CIN I 级细胞表面 MHC- I 类分子表达下调,提示在癌前病变中,E5 蛋白可以下调 MHC- I 类分子蛋白的表达,影响其抗原提呈过程。

TAP 属 ABC 转运体家族的 B 族,位于内质网和顺式高尔基体膜上,其功能是将胞浆内经过蛋白酶体降解后产生的肽段转运到内质网腔中,并在此与 MHC-I 类分子结合,进一步被提呈到细胞表面引起特异性的 CTL 应答。一些肿瘤细胞通过抑制 TAP 的表达来下调 MHC-I 类分子在细胞表面的表达,从而逃避了 CTLs 的识别和杀伤。TAP 蛋白的表达减少也会抑制 MHC-I 类分子/病毒肽复合物的形成或使其不稳定,妨碍抗原肽的呈递以及病毒蛋白降解蛋白酶的改

变,从而影响病毒肽的免疫原性^[21]。免疫组化结果表明肿瘤细胞的分化程度越低其 TAP 的表达量也越低,Cresswell AC 等^[22]研究表明在宫颈癌病例中 72% (21/29) 的组织中 TAP1 和 TAP2 的表达下降。

综上所述,HPV 病毒可以下调 HLA- I 在宫颈细胞表面的表达,并可同时下调抗原呈递相关通路相关转运分子 TAP1、TAP2 的表达,从而减弱受病毒感染细胞的抗原呈递作用,逃脱人体的免疫监视,造成宫颈 HPV 病毒的持续感染。

由于宫颈癌存在较长的、可逆转的癌前病变期,是一种可以预防并治愈的癌症,故及时阻断 HPV 感染在宫颈癌的早诊早治中至关重要。近年来从中药中筛选抗病毒和抗肿瘤药物是宫颈 HPV 感染药物治疗的研究热点。近代中医学者认为,宫颈 HPV 感染和宫颈癌的发病机制主要为邪毒外袭胞宫,郁而不解,久而成瘀,损伤冲任带脉所致^[23]。然而所谓“邪之所凑,其气必虚”,“虚”是疾病发生的前提和基础。“正虚”在西医学中相当于免疫系统功能下降,抗原呈递作用减弱使人体的免疫监视功能发生故障。宫颈 HPV 感染和宫颈癌的发病就是一个正虚邪实的过程。莪术油即针对瘀毒虚的病机达到治疗目的。

本研究结果表明,高剂量莪术油(213.8 $\mu\text{g/mL}$)及干扰素 $\alpha 2\text{a}$ 均可上调宫颈癌 HeLa 细胞 HLA- I、TAP1、TAP2 的基因表达,且较高剂量莪术油的作用更为显著($P < 0.05$),并找到了其最佳作用时效点,即 HLA- I 基因表达在用药 12 h 时上调作用最为显著,TAP1、TAP2 基因表达在用药 48 h 时上调作用最为显著。因此,提示临床应用莪术油时应使用高剂量并每日给药 2 次持续给药方能达到最佳治疗效果。目前临床应用保妇康栓治疗宫颈 HPV 感染均为每日给药 1 次,但根据本研究结果提示每 12 h 给药 1 次可能会达到更好的治疗效果。本研究初步证实了莪术油可以促进宫颈 HPV 感染细胞 HLA- I、TAP1、TAP2 的基因表达,加强了宫颈细胞表面的抗原呈递作用,从而可能有利于人体免疫系统发现并清除感染细胞及癌变细

胞,为临床使用莪术油治疗宫颈 HPV 感染及防治宫颈癌提供最佳量效、时效点理论基础。但其具体作用机制及莪术油对以上各分子的蛋白表达调节作用,仍有待下一步深入研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Insinga RP, Perez G, Wheeler CM, et al. Incident cervical HPV infections in young women: transition probabilities for CIN and infection clearance [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20(2): 287–296.
- [2] Tsai TC, Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein[J]. *Arch Virol*, 2003, 8(148): 1445–1453.
- [3] 张小燕, 丁晓萍, 叶梅, 等. 莪术油对人乳头瘤病毒的抑制作用[J]. *中医药信息*, 2004, 21(2): 19–23.
- [4] 张维彬, 谭敏, 肖刚, 等. 莪术油诱导小鼠 Hepa 肝癌细胞凋亡及其对 bcl-2 蛋白表达的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2009, 18(4): 370–371.
- [5] 徐立春, 边可君, 刘志敏, 等. 天然药物莪术醇抑制肿瘤细胞生长及 RNA 合成影响的初步研究[J]. *肿瘤*, 2005, 25(6): 570.
- [6] 杨毅, 王友芳, 郎景和, 等. 保妇康栓治疗宫颈糜烂 HPV 感染临床疗效观察[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(10): 1695–1696.
- [7] 赵健, 廖秦平, 谢红, 等. 保妇康栓治疗人乳头瘤病毒感染的临床观察[J]. *实用妇产科杂志*, 2015, 31(1): 45–48.
- [8] Mora-Garcia Mde L, Duenas-Gonzalez A, Hernandez-Montes J, et al. Up-regulation of HLA class-I antigen expression and antigen-specific CTL response in cervical cancer cells by the demethylating agent hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid [J]. *J Transl Med*, 2006, 12(4): 55.
- [9] 秦娟娟, 路志勇, 焦章平, 等. 改良 TRIzol 法同步提取血液 RNA 和 DNA [J]. *法医学杂志*, 2013, 29(3): 209–211.
- [10] Ojcus DM, Delarbre C, Kourilsky P, et al. MHC and MHC-related protein as pleiotropic signal molecules[J]. *FASEB J*, 2002, 16(2): 202–206.
- [11] Huang J, Cai MY, Wei DP, et al. HLA class I expression in primary hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(4): 654–657.
- [12] Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Lopez-Nevot MA, et al. Impaired surface antigen presentation in tumors: implications for T cell-based immunotherapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(1): 15–24.
- [13] Dovhey SE, Ghosh NS, Wright KL, et al. Loss of interferon-g inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(20): 5789–5796.
- [14] Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, et al. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins [J]. *Virus Res*, 2006, 120(2): 208–211.
- [15] Ashrafi GH, Tsirimonaki E, Marchetti B, et al. Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins [J]. *Oncogene*, 2002, 21(2): 248–259.
- [16] Marchetti B, Ashrafi GH, Tsirimonaki E, et al. The bovine papilloma virus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface [J]. *Oncogene*, 2002, 21(51): 7808–7816.
- [17] Ashrafi GH, Haghsheenas MR, Marchetti B, et al. The E5 protein of human papillomavirus type16 selectively down-regulates surface HLA class [J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(2): 276–283.
- [18] Cartin W, Alonso A. The human papillomavirus HPV 2a E5 protein localizes to the Golgi apparatus and modulates signal transduction [J]. *Virology*, 2003, 314(2): 572–579.
- [19] Campo MS, Graham SV, Cortese MS, et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells [J]. *Virology*, 2010, 407(1): 137–142.
- [20] Ritz U, Momburg F, Pilch H, et al. Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2001, 19(6): 1211–1220.
- [21] Sheu BC, Chiou SH, Chang WC, et al. Integration of high risk human papillomavirus DNA correlates with HLA genotype aberration and reduced HLA class I molecule expression in human cervical carcinoma [J]. *Clin Immun*, 2005, 115(3): 295–301.
- [22] Cresswell AC, Sisley K, Laws D, et al. Reduced expression of TAP-1 and TAP-2 in posterior uveal melanoma is associated with progression to metastatic disease [J]. *Melanoma Res*, 2001, 11(3): 275–281.
- [23] 刘伟, 梁晓春. 中医药治疗宫颈癌研究进展 [J]. *环球中医药*, 2013, 7(6): 554–558.

(收稿: 2017-12-14 在线: 2018-11-04)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶