

组、模型对照组灌胃同体积生理盐水,其他各组灌胃相应药液,给药体积均为 10ml/kg。(4)供试大鼠血糖检测:分组后开始灌胃治疗性给药,连续 14 天。于给药后第 7 天、第 14 天断尾尖采血,用血糖仪与血糖试纸测定大鼠血糖值,观察大鼠血糖变化情况。

3. 统计学方法:测定数据用 SPSS 10.0 软件进行数据分析,结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用单因素方差分析数据,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

实验大鼠经腹腔给药 STZ 后,各鼠均表现出多饮、多食、多尿及体重减轻的典型糖尿病症状,且 72h 后血糖值较正常血糖值范围均明显升高 ($> 18\text{mmol/L}$),表明 2 型糖尿病大鼠造模成功。给药 7 天后,测定各组大鼠血糖值,生五味子组大鼠血糖值显著降低,与模型组比较差异有统计学意义,接近阿卡波糖阳性对照组,而醋五味子组未表现出降血糖作用。给药 14 天后,生五味子组、醋五味子组大鼠血糖值与给药 7 天时相比,出现了相反的结果:醋五味子组大鼠血糖值明显降低,接近正常血糖值水平,但生五味子组大鼠血糖值却出现了升高的现象,且升高显著。结果见表 1。

表 1 生、醋五味子对 STZ 致 2 型糖尿病大鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	n	造模后	给药 7 天	给药 14 天
空白对照组	10	4.29 $\pm$ 0.70 *	3.26 $\pm$ 0.53 * Δ	3.14 $\pm$ 0.46 *
模型对照组	10	20.60 $\pm$ 1.07	20.38 $\pm$ 2.62 Δ	20.00 $\pm$ 2.11 Δ
阿卡波糖组	10	20.64 $\pm$ 0.95	8.14 $\pm$ 2.40 *	3.04 $\pm$ 0.34 * Δ
生五味子组	10	19.69 $\pm$ 2.44	6.83 $\pm$ 1.53 *	17.61 $\pm$ 0.83 * Δ
醋五味子组	10	21.45 $\pm$ 1.88	21.85 $\pm$ 2.70 Δ	7.98 $\pm$ 3.41 * Δ

与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与阿卡波糖组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

传统理论认为五味子“入补药熟用,入嗽药生

用”,即五味子“生熟异用”^[5]。本研究选择五味子功效中治疗“津伤口渴、内热消渴”为研究内容,进行五味子及其药典收载炮制品种——醋五味子的对比研究,意在为五味子临床合理应用提供实验依据。

实验研究表明,生五味子、醋五味子对 STZ 致 2 型糖尿病大鼠均表现出降血糖作用,与传统功效“内热消渴”相吻合。生品、炮制品间降血糖作用表现出明显差异,即生五味子降血糖作用起效快且显著,表现在给药 7 天时大鼠血糖值降低显著,但在给药 14 天后,大鼠血糖值反而上升;醋五味子,降血糖作用起效慢,表现在给药 14 天时大鼠血糖值降低显著。

关于五味子炮制前后降血糖作用的研究未见报道,本研究对此进行初探并对实验结果进行了客观如实的报道,虽就目前研究结果而言,还不能对临床应用有明显的帮助,但可为进一步的研究奠定很好的基础。由于本实验按照参考文献[6]方法,仅考察了给药 7 天、14 天时大鼠的血糖值变化情况,但鉴于五味子及其炮制品较明显的降血糖作用,在今后的研究中,将继续对五味子及其炮制品降血糖作用进行深入研究,拟将其纳入复方中,更好地探明五味子的炮制原理。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 61-62
- 2 葛会奇. 五味子炮制工艺规范化及原理研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2007
- 3 陆兔林, 毛春芹, 吕高虹, 等. 五味子不同炮制品补益作用的实验研究[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(15): 1147-1149
- 4 姚庆, 陆兔林, 胡芳, 等. 五味子不同炮制品对小鼠 CYP450 的诱导作用[J]. 华西药理学杂志, 2011, 26(3): 249-251
- 5 张浩. 仁术便览[M]. 海口: 海南国际新闻出版社, 1995: 320
- 6 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002

(收稿日期: 2013-09-24)

(修回日期: 2013-10-25)

肝内胆管细胞型肝癌中 HLA-F 的表达及临床意义

徐永富 方哲平 陈 霞 潘君芬 陈思思 蒋琼英

摘 要 目的 探讨 HLA-F 在肝内胆管细胞型肝癌 (ICC) 中的表达及其临床意义。**方法** 应用免疫组织化学染色方法检测 HLA-F 在 75 例 ICC 癌灶组织及 51 例相应邻近正常组织中的表达水平, 应用 Pearson χ^2 检验分析癌灶区 HLA-F 表达量和各

基金项目: 浙江省科学技术厅基金资助项目 (2009C33096)

作者单位: 317000 温州医科大学附属浙江省台州医院肝胆外科

通讯作者: 方哲平, 教授、主任医师, 电子信箱: fangzheping@yeah.net

临床病理因素的关系。**结果** HLA-F 在 ICC 癌灶组织中表达阳性率为 38.7% (29/75), 而邻近正常肝脏组织不表达 HLA-F ($P < 0.05$)。HLA-F 表达量与肿瘤数目 ($P = 0.030$)、血管/淋巴管浸润情况 ($P = 0.019$) 等相关。**结论** HLA-F 在肝内胆管细胞型肝癌的发生和发展中可能发挥着重要的作用, 并可能成为 ICC 潜在诊断指标之一。

关键词 肝内胆管细胞型肝癌 HLA-F 临床意义

[中图分类号] R735 [文献标识码] A

Expression and Its Clinical Significance of HLA-F in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. Xu Yongfu, Fang Zheping, Chen Xia, Pan Junfen, Chen Sisi, Jiang Qiongying. Department of Hepatobiliary Surgery, Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Wenzhou Medical University, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of HLA-F in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) tissues. **Methods** The HLA-F expressions of 75 cases ICC lesions and 51 case-matched adjacent normal tissues were detected with immunohistochemical staining. The correlations of HLA-F expression and clinicopathological characteristics were analyzed with *Pearson* χ^2 test. **Results** HLA-F expression was observed in 38.7% (29/75) of the ICC lesion, while was negative in adjacent normal tissues ($P < 0.05$). HLA-F expression was closely related to tumor nodular number ($P = 0.030$) and venous/lymphatic invasions ($P = 0.019$). **Conclusion** HLA-F plays a mutually promoting role in the carcinogenesis and development of ICC, and may be a diagnostic indicator for ICC patients.

Key words Intrahepatic cholangiocarcinoma; HLA-F; Clinical significance

肝内胆管细胞型肝癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是一种源于肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤, 约占原发性肝癌的 5% ~ 15%, 其恶性程度高, 预后差, 手术切除率远比肝细胞癌要低^[1,2]。随着对肿瘤研究的深入, 发现人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 与肿瘤的发生、发展密切相关, HLA-I 类分子表达下调可使肿瘤细胞逃避细胞毒性 T 细胞的免疫识别, 而非经典 HLA-I 类分子 (HLA-E、G、F) 作为免疫耐受分子, 亦可帮助肿瘤细胞逃避机体免疫细胞 (NK 细胞、T 细胞等) 的识别与杀伤^[3,4]。HLA-F 是新近发现的第 3 种非经典 HLA-I 类分子, 其基因多态性 (HLA-F * 01:04) 与肝癌的易感性有关, HLA-F 抗体存在于各种肿瘤患者 (包括肝癌) 的血清中, 而且证实在肺、食管、胃等多部位肿瘤组织中存在 HLA-F 异常表达^[5-9]。

目前, 国内外尚未见到 HLA-F 与 ICC 的相关性报道, 本研究中笔者利用免疫组化法检测 ICC 组织中 HLA-F 的表达情况, 并分析其与临床病理因素的相关性, 探讨 HLA-F 与 ICC 发生、发展的内在关系。

材料与方法

1. 标本来源: 收集 2003 年 1 月 ~ 2012 年 5 月在温州医科大学附属浙江省台州医院接受手术治疗的 75 位 ICC 患者的组织标本 (75 例 ICC 癌灶组织及 51 例邻近正常组织), 术后均确诊为肝内胆管细胞型肝癌。肿瘤病理诊断参照世界卫生组织标准、临床分期标准参照美国癌症联合委员会 (AJCC) 制定的第七版 TNM 分期标准^[10]。术前患者均未接受放化疗或其他任何药物干预。并有完整临床病理资料 (年龄、性别、病

理诊断、被膜累及情况、血管/淋巴管浸润情况、肿瘤直径、肿块数目、TNM 分期等)。所有人体标本的研究均事先获得伦理委员会的批准。

2. 免疫组织化学染色: 石蜡包埋组织按照 4 μm 厚度进行连续切片, 所得石蜡切片常规脱蜡、梯度乙醇水化; 3% H_2O_2 孵育 15min, 消除内源性过氧化物酶活性; 高压锅热处理 5 ~ 8min 进行抗原修复; 山羊血清孵育 15min, 消除非特异性抗体; 滴加按照 1:300 稀释后的兔抗人 HLA-F 抗体 14670-1-AP (proteintec group, Chicago, IL, USA), 湿盒内 4℃ 孵育过夜; 滴加山羊抗兔抗体 (二抗, Dako, Glostrup, Denmark), 室温孵育 1h, PBS 冲洗; 浓缩型 DAB 显微镜下控制显色; 苏木精复染, 脱水, 中性树脂封片。皮肤癌组织用于阳性对照, 以 PBS 替代 HLA-F 抗体作为阴性对照。

3. HLA-F 表达结果判定: 阳性细胞表现为细胞膜或细胞质出现棕色或棕褐色颗粒, 由 2 名病理医师进行独立双盲半定量评估, 取其平均值作为最终结果。切片内染色阳性细胞数占全部细胞 5% 以上标记为 HLA-F 表达阳性, 反之记为阴性。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 13.0 统计软件, HLA-F 在癌灶组织和正常组织差异表达, 以及其与各临床病理因素的关系分析均采用 *Pearson* χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HLA-F 在 ICC 癌灶组织中异常高表达: 细胞膜或细胞质出现棕色或棕褐色染色产物定位为 HLA-F 阳性细胞, 皮肤癌组织作为阳性对照, 以 PBS 代替 HLA-F 抗体作为阴性对照 (图 1)。在肝癌癌灶组织中表达阳性率为 38.7% (29/75), 而邻近正常组织不表达 HLA-F (0/51), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 25.616, P < 0.05$), 癌灶组织 HLA-F 表达升高。

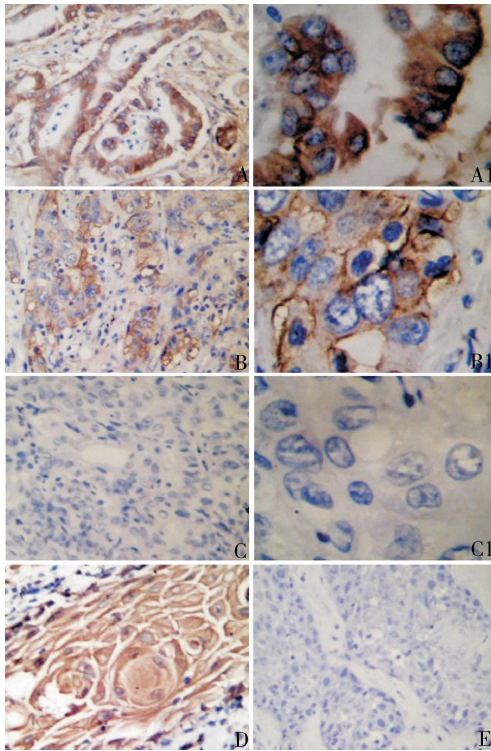


图1 免疫组织化学染色检测 HLA - F 表达

A、B. ICC 癌灶组织中 HLA - F 阳性表达,染色产物可位于胞质(A)或细胞膜(B);C. ICC 癌灶组织中 HLA - F 阴性表达;D、E. 分别为 HLA - F 在皮肤癌组织阳性和阴性对照。A ~ E 图放大倍数为 100 倍,A1、B1、C1 图分别对应 A、B、C 图,放大倍数为 400 倍

2. 肝癌中 HLA - F 的表达量与临床病理参数的关系:为研究 HLA - F 的临床相关性,笔者分析了肝癌癌灶区 HLA - F 表达量与各临床病理因素的关系。数据显示 HLA - F 表达与肿瘤数目($\chi^2 = 4.723, P = 0.030$)、血管/淋巴管浸润情况($\chi^2 = 5.476, P = 0.019$)相关,而与患者性别、年龄、被膜累及情况、肿瘤直径、TNM 分期等无明显相关。HLA - F 表达更多见于肿瘤多发或伴有血管/淋巴管浸润的 ICC 患者(表 1)。

讨 论

本次实验发现,38.7% ICC 癌灶组织表达 HLA - F,而邻近正常组织均无 HLA - F 表达,差异有统计学意义,HLA - F 在癌灶组织中表达升高。进一步统计分析发现,癌灶区 HLA - F 表达量和肿瘤数目、血管/淋巴管浸润等相关;笔者由此推测,HLA - F 在 ICC 的发生和发展过程中可能发挥着重要的作用,并且有望成为 ICC 的潜在诊断指标之一。

1990 年,Geraghty 等^[11]首次从 B - LCL721.221 细胞系中抽提出第 3 个非经典 HLA - I 类分子(又称为 HLA - I b),并命名为 HLA - F,其基因位于人类 6 号染色体短臂上,靠近着丝粒末端,全长 5.4kb。

表 1 ICC 癌灶区 HLA - F 的表达量与临床病理因素的关系[$n(\%)$]

临床病理因素	n	HLA - F 表达			P
		阴性	阳性	χ^2	
性别					
男性	55	31(56.4)	24(43.6)	2.148	0.143
女性	20	15(75.0)	5(25.0)		
年龄(岁)					
≤ 58	40	25(62.5)	15(37.5)	0.049	0.824
> 58	35	21(60.0)	14(40.0)		
肿块直径(cm)					
≤ 3	24	13(54.2)	11(45.8)	0.456	0.764
> 3	51	33(64.7)	18(35.3)		
血管/淋巴管浸润					
有	53	37(69.8)	19(30.2)	5.476	0.019
无	22	9(40.9)	13(59.1)		
被膜累及					
有	59	38(64.4)	21(35.6)	1.102	0.294
无	16	8(50.0)	8(50.0)		
肿瘤数目					
单发	63	42(66.7)	21(33.3)	4.723	0.030
多发	12	4(33.3)	8(66.7)		
TNM 分期					
I / II	57	35(61.4)	22(38.6)	0.000	0.982
IV / IV	18	11(61.3)	7(38.7)		

HLA - F 分子是一个 β_2 - 微球蛋白相关的(40 ~ 41) kDa 大小的、具有相对较低多态性的蛋白。HLA - F 基因亦由 8 个外显子和 7 个内含子组成,但成熟的 mRNA 缺乏外显子 7,导致其编码的 HLA - F 蛋白尾部较其他 HLA - I 类分子短^[11,12]。HLA - F 即可存在于胞内,亦可表达于细胞膜表面。早期研究在细胞内检测到了 HLA - F 蛋白表达,Wainwright 等^[13]利用一种针对 HLA - F a1 结构域的单克隆抗体,在外周血 B 细胞、B 细胞株及含有 B 细胞的组织(如成人扁桃体、婴儿肝脏)中发现了其胞内表达;Lepin 等^[14]利用 HLA - F 蛋白和 β_2 - m 重组蛋白作为免疫原产生抗体,用该抗体检测发现扁桃体、脾脏及胸腺组织,和许多种组织及细胞株如膀胱、皮肤、肝脏细胞株等均有 HLA - F 胞内表达。后期研究发现,在侵入母体蜕膜的绒毛膜滋养层细胞、EB 病毒转染的淋巴细胞株、以及活化后的 B 细胞、T 细胞、NK 细胞、单核细胞等细胞表面均有 HLA - F 表达^[15-17]。

目前认为 HLA - F 主要功能是参与免疫调节,维持免疫耐受。Lepin 等^[14]研究认为,HLA - F 可能是通过结合抑制性受体(ILT2 和 ILT4)发挥免疫抑制作用。而 Lee 等^[17]研究发现 HLA - F 表面表达与淋巴细胞活化同步,可以作为免疫系统激活的标志物,同时推测 HLA - F 可作为信号分子,作用于调节性 T 细胞,引起机体的免疫耐受。Goodridge 等^[18]发现 HLA

-F 可以介导外源蛋白的 MHC - I 类分子交叉递呈途径,并且不依赖 TAP 及 tapasin,对溶酶体酶抑制敏感,揭示了该途径对机体免疫调节和免疫防御的重要性,并且还分析了 HLA - F 与 MHC 分子的受体 - 配体关系,证实 HLA - F 可以与 NK 细胞和 T 细胞上的杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR3DL2、KIR2DS4)结合,作为配体,调节其免疫活性^[18,19]。HLA - F 对维持正常妊娠具有特殊意义,从免疫学观点出发,胚胎是一个半异己的同种自然移植物,母体免疫系统中的免疫细胞能否识别并耐受胚胎抗原,直接影响妊娠的建立与维持,Shobu 等^[20]发现 HLA - F 参与了母胎耐受的建立,为胎儿生长准备适宜环境。当 HLA - F 表达改变时,会引起 T 细胞、NK 细胞自体免疫反应,还导致各种免疫相关疾病,如呼吸道炎症、皮肤溃疡等^[21]。而在肿瘤方面,我们早期已有实验研究了 HLA - F 与非小细胞肺癌、食管鳞癌和胃癌的关系^[7-9]:在肺癌组织中,24.1% (20/83) 的癌灶组织表达 HLA - F,但邻近正常组织不表达 HLA - F,而食管鳞癌癌灶组织和邻近正常组织均有 HLA - F 表达(阳性率分别为 58.1%、54.8%),HLA - F 在胃癌组织中的阳性率更是高达 71.1%。进一步分析发现 HLA - F 表达量和肿瘤分化程度、淋巴结转移、TNM 分期等无明显相关性,但 HLA - F 表达改变与肺癌、食管癌患者的预后相关。可见肿瘤细胞亦可能通过高表达 HLA - F,躲避机体免疫系统的监视,为其自身生长创造良好环境,HLA - F 维持免疫耐受的功能也更好解释并论证了我们的结论。同时,HLA - F 在上述 3 种肿瘤组织中表现出不同的分布特点和临床相关性,推测 HLA - F 因肿瘤类型差异可表现出不同的生物学行为特点。

总之,HLA - F 在 ICC 癌灶中表达升高,且与肿瘤数目及血管/淋巴管浸润等有关,提示 HLA - F 在 ICC 的发生和发展中可能发挥了重要的作用,并可能成为 ICC 潜在诊断指标之一。HLA - F 的发现为肿瘤研究开启了新的领域,HLA - F 与 ICC 的关系仍需进一步研究探索。

参考文献

- McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, *et al.* International trends and patterns of primary liver cancer[J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(2): 290 - 296
- Goodman ZD. Neoplasms of the liver[J]. *Mod Pathol*, 2007, 20 Suppl 1N: S49 - 60
- Garrido F, Algarra I, Garel'a - Lora AM. The escape of cancer from T lymphocytes immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural - irreversible "hard" lesions[J]. *Cancer Immunol Immun* - other, 2010, 59: 1601 - 1606
- Wischhusen J, Waschbisch A, Wiendl H. Immune - refractory can-

- ers and their little helpers—an extended role for immunetolerogenic MHC molecules HLA - G and HLA - E? [J]. *Semin Cancer Biol*, 2007, 17: 459 - 468
- Zhang J, Pan L, Chen L, *et al.* Non - classical MHC - I genes in chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma[J]. *Immunogenetics*, 2012, 64(3): 251 - 258
- Noguchi K, Isogai M, Kuwada E, *et al.* Detection of anti - HLA - F antibodies in sera from cancer patients[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(5C): 3387 - 3392
- Lin A, Zhang X, Ruan YY, *et al.* HLA - F expression is a prognostic factor in patients with non - small - cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2011, 74(3): 504 - 509
- Zhang X, Lin A, Zhang JG, *et al.* Alteration of HLA - F and HLA I antigen expression in the tumor is associated with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132: 82 - 89
- Zhang JG, Zhang X, Lin A, *et al.* Lesion HLA - F expression is irrelevant to prognosis for patients with gastric cancer[J]. *Hum Immunol*, 2013, 74(7): 828 - 832
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, *et al.* *AJCC cancer staging manual* [J]. New York: Springer - Verlag, 2009: 117 - 126
- Geraghty DE, Wei XH, Orr HT, *et al.* Human leukocyte antigen F (HLA - F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element[J]. *J Exp Med*, 1990, 171: 1 - 18
- Lury D, Epstein H, Holmes N. The human class I MHC gene HLA - F is expressed in lymphocytes. *Int J Immunol*, 1990, 2: 532
- Wainwright SD, Biro PA, Holmes CH. HLA - F is a predominantly empty, intracellular, TAP - associated MHC class Ib protein with a restricted expression pattern[J]. *J Immunol*, 2000, 164: 319 - 328
- Lepin EJ, Bastin JM, Allan DS, *et al.* Functional characterization of HLA - F and binding of HLA - F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors [J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30: 3552 - 3561
- Lee N, Geraghty DE. HLA - F surface expression on B cell and monocyte cell lines is partially independent from tapasin and completely independent from TAP[J]. *J Immunol*, 2003, 171: 5264 - 5271
- Ishitani A, Sageshima N, Lee N, *et al.* Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA - E, F, and G in maternal - placental immune recognition[J]. *J Immunol*, 2003, 171: 1376 - 1384
- Lee N, Ishitani A, Geraghty DE. HLA - F is a surface marker on activated lymphocytes[J]. *Eur J Immunol* 2010, 40: 2308 - 2318
- Goodridge JP, Lee N, Burian A, *et al.* HLA - F and MHC - I open conformers cooperate in a MHC - I antigen cross - presentation pathway[J]. *J Immunol*, 2013, 191: 1567 - 1577
- Goodridge JP, Burian A, Lee N, *et al.* HLA - F and MHC class I open conformers are ligands for NK cell Ig - like receptors[J]. *J Immunol*, 2013, 191(7): 3553 - 3562
- Shobu T, Sageshima N, Tokui H, *et al.* The surface expression of HLA - F on decidual trophoblasts increases from mid to term gestation[J]. *J Reprod Immunol*, 2006, 72(1 - 2): 18 - 32
- Furukawa H, Yabe T, Akaza T, *et al.* Cell surface expression of HLA - E molecules on PBMC from a TAP1 - deficient patient[J]. *Tissue Antigens*, 1999, 53: 292 - 295

(收稿日期: 2013 - 10 - 10)

(修回日期: 2013 - 10 - 28)