

人白细胞抗原-G1 对 NK92 效靶识别过程的影响*

田兴辉¹⁾ 周建军²⁾ 方贞付³⁾ 娄黎明¹⁾ 汪 蕴¹⁾ 丰美福^{1)**}

¹⁾ 中国科学院动物研究所, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080;

²⁾ 北京大学生命科学学院, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100871;

³⁾ 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875)

摘要 人白细胞抗原 G (human leukocyte antigen-G, HLA-G) 属非经典的主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 类分子, 为自然杀伤细胞 (natural killer, NK) 抑制性受体的识别配体, 可以向 NK 细胞传递抑制性信号, 从而抑制 NK 细胞的细胞毒作用. 为了研究 HLA-G 对 NK 与靶细胞识别过程的影响机制, 采用激光扫描共聚焦显微镜和流式细胞术对全长 HLA-G1 的表达和功能进行了探讨, 并对效靶识别过程中靶细胞 $[Ca^{2+}]_i$ (胞内自由钙离子浓度) 进行了实时检测. 结果发现, 全长的 HLA-G1 表达于 K562、JAR 和 CHO 细胞的胞浆和胞膜上, 它能够部分地抑制 NK92 的细胞毒作用. NK92 与 CHO 和 GFP-CHO 细胞作用后, 靶细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 出现了明显的升高, HLA-G1 的表达则抑制了靶细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高. 结果提示: 靶细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高是有效的细胞杀伤作用的必要条件, HLA-G 的免疫抑制功能可能与靶细胞胞内钙离子浓度升高的抑制作用有密切关系.

关键词 HLA-G1, NK92, 靶细胞, 胞内钙离子, 免疫抑制

学科分类号 R392

人白细胞抗原 G (HLA-G) 为一种非经典的主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 类分子, 它选择性地高表达于绒毛膜外的细胞滋养层细胞上, 在妊娠早期的胎盘绒毛膜血管内皮细胞、羊膜上皮细胞、胸腺上皮细胞以及活化的巨噬细胞、病毒感染的树突状细胞及某些肿瘤细胞与组织内也有表达^[1]. 与经典的 HLA-I 类分子相比, HLA-G 呈现组织限定性的分布. 并具有较高的多态性. 原始的 HLA-G 转录产物经选择性剪接可编码 7 种异型体, 其中包括 4 种膜结合形式 (G1~ G4) 和 3 种可溶性形式 (G5~ G7)^[1~ 3]. 研究发现, 通过与 NK 细胞上的抑制性受体 (其中包括 ILT-2 (immunoglobulin-like transcript, ILT), ILT-4 和 KIR2DL4 (killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR) 等) 的识别作用, HLA-G 能够抑制 NK 细胞的细胞毒作用^[2, 3]. 但是靶细胞本身的信号传递分子是否也积极参与了这种免疫抑制作用的诱导, 目前国内外还未见报道.

钙离子是细胞内最重要的信使之一, 它几乎参与从受精、增殖、分泌、收缩-松弛、运动、代谢、蛋白质合成、细胞周期到细胞凋亡等生命的全过程. 胞内钙稳态的改变不仅是细胞活化的标志, 通常也会伴随着细胞的死亡, 已有报道发现细胞毒性细胞的攻击可以导致靶细胞胞内钙离子浓度的升

高. 在 NK 细胞介导的细胞毒作用中, 效应细胞和靶细胞的紧密结合 (conjugate formation) 是杀伤作用中关键的一步. Radosevic 等^[4]发现 NK 与其敏感靶细胞 K562 紧密结合的形成 (Ir-conjugation) 是钙依赖性的. 受此启发, 本文着重探讨了 HLA-G 在效靶识别过程中, 对靶细胞胞内游离钙离子的影响, 为揭示 HLA-G 的免疫耐受机理提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 细胞系

人绒毛膜癌细胞系 JAR, 由中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室朴允尚研究员惠赠. 中国仓鼠卵巢细胞 CHO、人红白血病淋巴瘤细胞 K562、NK92 细胞系由生物膜与膜生物工程重点实验室保存, JAR 和 CHO 细胞培养于 DMEM (GIBCO) 培养基中, K562 和 NK92 细胞培养于 RPMI1640 (GIBCO) 培养基中. 以上细胞除 NK92 需 15% 的胎牛血清 (Hyclone) 和 200 U/ml 的 IL-2 外, 其他细胞加 10% 的胎牛血清.

* 生物膜与膜生物工程国家重点实验室资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62628740, E-mail: fengmf@panda.izs.ac.cn

收稿日期: 2002-04-10, 接受日期: 2002-06-02

1.2 真核表达载体的构建

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 与 HLA-G1 融合表达载体 (clontech) 的构建: 用 PCR 方法将连接在 pEGM-T Easy^[5] 载体上的 HLA-G1 片段克隆下来, 上游引物和下游引物的 5' 端分别带有 *EcoR* I 和 *Bam* H I 两个酶切位点. pEGFP-N1 空载体和 HLA-G1 的 PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶 (华美公司) 切后, 用 T4 DNA 连接酶 (Life Technologies) 进行连接, 挑选具有卡那霉素抗性的阳性菌落, 进行酶切、测序鉴定.

1.3 转染和阳性细胞克隆的筛选

依 LIPOFECTAMINETM Reagent (LIFE TECHNOLOGIES, Cat 18324-012, Lot EKK101) 试剂说明书进行. 将重组质粒及其对应的空载体分别转染 JAR、CHO 和 K562 细胞, CHO 细胞转染 72 h 后, 进行 1:10 稀释培养, 并于培养液中添加 G418 (800 mg/L) (华美公司) 进行抗性筛选. G418 维持培养约 4 周后, 细胞不再死亡, 用有限稀释法建立阳性细胞克隆. 人来源的 JAR 和 K562 细胞只做瞬时转染, 用于比较 HLA-G1 在同种和异种细胞内的分布.

1.4 抗体和流式细胞仪分析

抗 HLA-G 的特异性单克隆抗体 87G (IgG2a), 由 Geraghty 馈赠 (Fred Hutchinson Cancer Research, Institute, Seattle, WA); RPE-山 羊 抗 小 鼠 IgG (Southern Biotechnology Associates, Inc). 首先获取单细胞悬液, 并用 PBS (pH 7.4) 洗涤 2 遍, 调整细胞密度为 1×10^4 个/μl, 加入 1:30 稀释的 87G 抗体 3~5 μl, 4℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤 2 遍. 再将细胞重悬于 100 μl PBS 中, 再加入 10 μl 稀释 50 倍 RPE 标记的山羊抗小鼠 IgG, 4℃ 孵育 30~45 min. PBS 洗 2 遍, 重悬于 0.5 ml PBS 的 FACON 管中, 进行 FACS 分析.

1.5 HLA-G1 在细胞内分布

将瞬时转染 24 h 后及稳定筛选后的阳性细胞接种于玻璃盖玻片上, 次日于激光共聚焦显微镜下扫描分析 (激发波长为 488 nm, 透射波长为 507 nm), 观察 GFP 及 GFP-HLA-G 融合蛋白在活细胞内的分布.

1.6 细胞毒性实验

NK 细胞介导的细胞毒实验采用 $4\text{hr } ^{51}\text{Cr}$ 释放实验.

首先收集处于对数生长期的靶细胞, 重悬于胎

牛血清中, 细胞密度为 1.0×10^4 个/μl, 每 1.0×10^6 个细胞中加入 3.7×10^6 Bq 的 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Amersham). 于 37℃, 5% CO_2 孵箱中标记 2 h, 每隔 15 min 摇匀一次. 标记完毕后洗涤 3 次, 调整细胞浓度至 1.0×10^2 个/μl, 加入 V 型板中 (100 μl/孔, 每孔设 3 个重复), 再按 20:1 的效靶比加入 100 μl/孔的 NK92 效应细胞, 37℃, 5% CO_2 孵箱中孵育 4 h, 100 g 离心, 收集 100 μl 上清, 进行 γ-放射性计数, 按以下公式计算杀伤率.

$$\text{杀伤率}(\%) = \frac{\text{cpm}_{\text{实验释放组}} - \text{cpm}_{\text{自然释放组}}}{\text{cpm}_{\text{最大释放组}} - \text{cpm}_{\text{自然释放组}}} \times 100\%$$

1.7 胞内游离钙的测定

本实验以稳定表达 HLA-G1-GFP 的 CHO 细胞为靶细胞 (未转染的 CHO 和 GFP-CHO 为对照组), 以 Fura Red (Eugene, Oregon, USA) 为 Ca^{2+} 的探针, 对靶细胞进行负载, 加入 NK92 细胞 (效靶比为 20:1) 后 2 min 重新聚焦, 开始记录效靶识别 1 h 内靶细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化, 每间隔 30 s 记录一次, 共记录 120 张图片.

Fura Red 的负载过程如下: 首先将 1.5×10^5 个细胞接种于特制的培养皿中, 培养 24 h 后, 用含 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的 Hank's 液涮洗 3 遍, 加入 1 mmol/L 的工作液 100 μl, 于 37℃ 孵箱中温育 60 min, 再用 Hank's 液涮洗 4~6 遍, 于激光共聚焦显微镜下观察荧光在细胞内的分布.

2 结 果

2.1 HLA-G1-GFP 真核表达载体的构建

pEGFP-N1-HLA-G1 重组质粒经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切后呈 4.7 kb 和大约 1 kb 的两条带 (图 1-A, B), HLA-G1 的 PCR 产物约为 1 kb (图 1P).

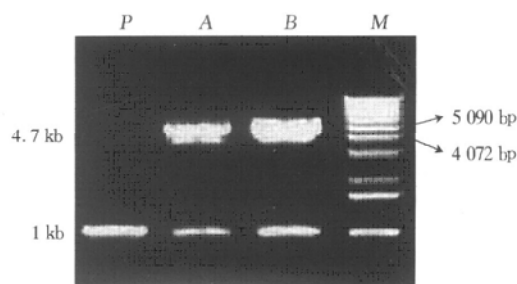


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis showing pEGFP-N1 and HLA-G1 fragment

A, B: *EcoR* I and *Bam* H I restriction fragment analysis of pEGFP-N1-HLA-G1 vector; M: DNA marker; P: PCR fragment of HLA-G1.

2.2 HLA-G1 的全长基因和蛋白质序列

测序获得的基因序列于 GenBank 进行 Blast 序列比较, 证实为 HLA-G1 的全长编码基因. 与周建军等^[5]从外周血获得的 HLA-G1cDNA 序列完全一致. 绿色荧光蛋白 GFP 位于 HLA-G1 的 C 端, 形成 HLA-G1-GFP 的融合蛋白.

2.3 HLA-G1 在细胞内的表达

在 K562, JAR, CHO 细胞中, GFP 在胞浆和

胞核内呈弥散性分布, 而且在核内的分布密度最高 (图 2a, b, d, e). HLA-G1 可以将 GFP 定位于胞浆和胞膜内侧, 细胞核内几乎没有 HLA-G1 的表达 (图 2c, f, g, h). 在胞浆内, HLA-G1 的分布并不均一, 在某些细胞器, 如内质网上, 可能密度最高, 而在某些囊泡区几乎没有 HLA-G1 的表达 (图 2c).

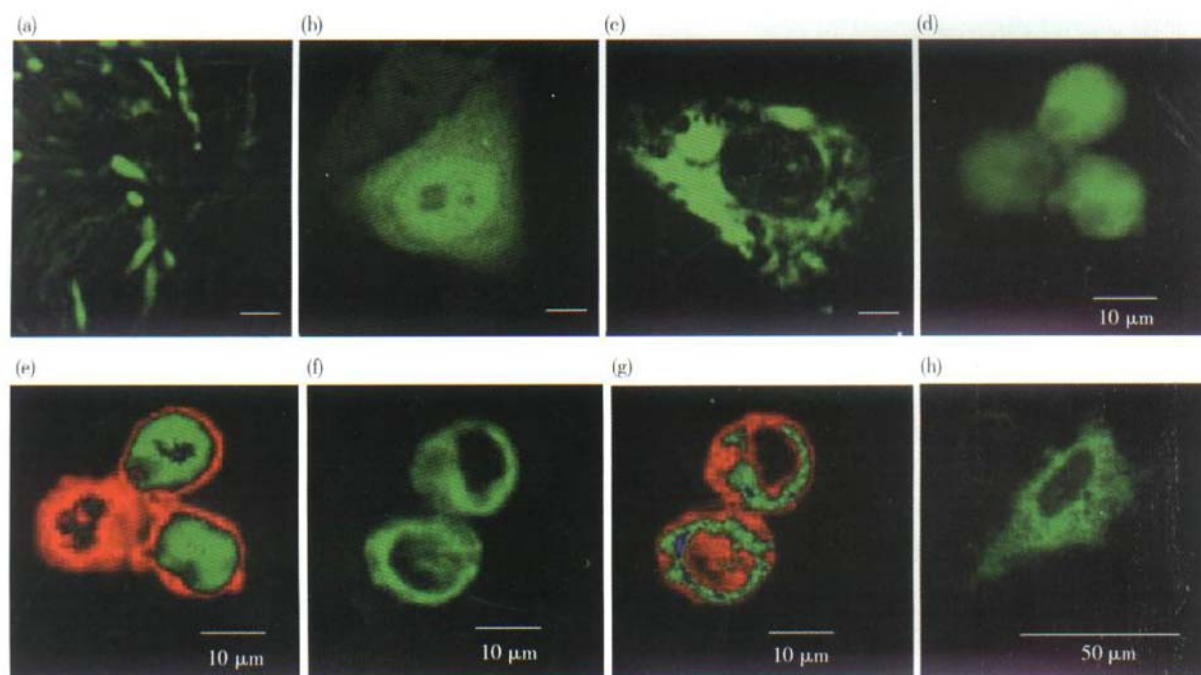


Fig 2 GFP and HLA-G1-GFP fusion protein expression in different cells

(a), (b) expression of GFP in CHO cells. GFP was diffusely expressed in the nucleus and cytoplasm; (c) expression of HLA-G1-GFP in CHO cells, HLA-G1-GFP was only expressed in the cytoplasm and membrane; (d) expression of GFP in K562 cells; (e) quantity of GFP expression in K562 cells, blue: highest, green: higher, red: high; (f) expression of HLA-G1-GFP in K562 cells; (g) quantity of HLA-G1-GFP expression in K562 cells, blue: highest, green: higher, red: high; (h) expression of HLA-G1-GFP in JAR cells.

用流式细胞术分析 GFP 和 HLA-G1 在细胞表面的表达 (图 3) (横纵座标的值是细胞数), 发现不同阳性细胞克隆内 GFP 的荧光强度与 HLA-G 在细胞表面的表达量成正比, GFP 荧光强度越强, HLA-G1 的表达量越高, GFP 完全可以作为 HLA-

G1 表达的一个标志. 在本实验中, 我们挑选了一株 HLA-G1 表达量最高 (达 76.07%) 的细胞克隆 (图 3c), 来研究与 NK92 细胞相互识别过程中胞内自由钙的变化.

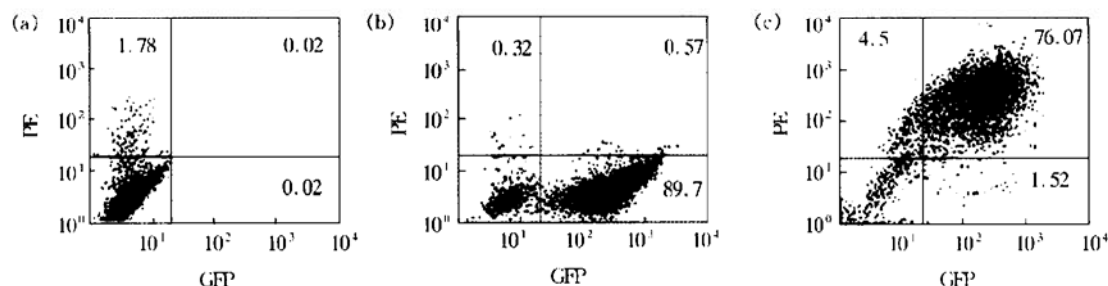


Fig 3 Expression of HLA-G1-GFP fusion protein the cell surface of CHO

(a) CHO cells; (b) GFP-CHO cells; (c) HLA-G1-GFP-CHO cells.

2.4 HLA-G1 的免疫抑制功能

通过 $4\text{h } ^{51}\text{Cr}$ 释放实验, 发现 HLA-G1 的融合蛋白具有较强的免疫抑制作用, 与 CHO 细胞相比, 其杀伤率下降了 29.11%, 与只转染空载体的

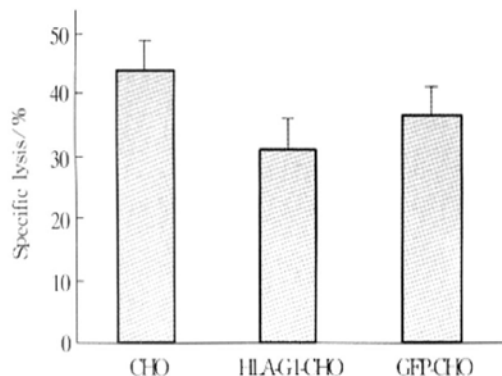


Fig. 4 Effect of HLA-G1 expression on the lysis of NK92 cells ($n = 3$)

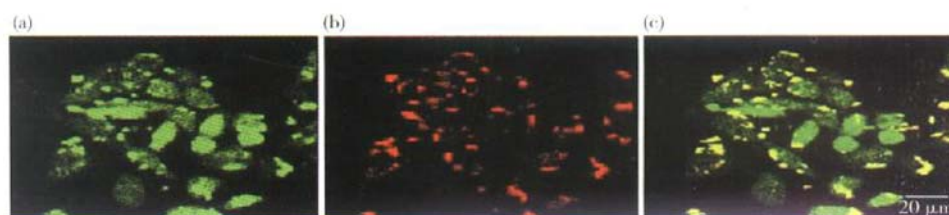


Fig. 5 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ distribution in CHO cells indicated by Fura Red

(a) GFP distribution in CHO cells; (b) CHO cells dyed by Fura Red; (c) overlapped image of (a) and (b).

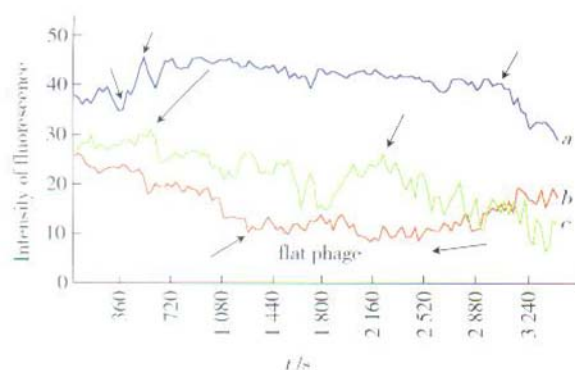


Fig. 6 The change of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in target cells during the recognition of effector target cells

a: HLA-G-CHO; b: CHO; c: GFP-CHO.

GFP-CHO 细胞与 NK92 作用后 570 s 内 (箭头表示平台期及急剧变化的地方), $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 稍有下降, 而后开始持续升高, 并且所有的细胞都在作用 2 280 s 时出现急剧的上升, 直到 3 510 s 一直呈上升趋势.

GFP-CHO 相比, 杀伤率下降了 14.8% (图 4).

2.5 HLA-G 对靶细胞胞内游离钙的影响

所用的 Ca^{2+} 指示剂 Fura Red 的激发波长为 488 nm, 发射波长为 660 nm, 在 488 nm 的激发下, 该指示剂一旦与 Ca^{2+} 结合, 其发射的荧光强度将会下降, 即荧光强度小的地方, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 越大 (图 5).

从图 6 可见, CHO 细胞与 NK92 作用后, 约有 62% 的细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在前 1 290 s 内 (箭头所示) 出现明显的升高, 升高以后, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 或维持在一个较高的水平, 或继续升高; 但大部分细胞在 1 350~2 970 s 左右都有一个平台期, 在这些平台期只出现了轻微的钙振荡. 平台期过后 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 又有轻微的下降.

转染了 HLA-G1 的融合蛋白以后, 在加入 NK92 细胞后 360 s 前, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 呈现了轻微的短暂升高, 而后急剧下降 360~510 s, 并在随后的 15~50 min 内, 没有出现明显的上升或下降趋势, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 一直维持在较低的水平, 3 120 s 后才出现明显的升高.

3 讨 论

全长的 HLA-G1 包括胞外区 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 链, 跨膜区及一个仅有 6 个氨基酸的胞浆尾部. 在它的膜定位过程中, 必须要有 $\beta 2$ 微球蛋白 ($\beta 2\text{m}$) 的参与^[6]. HLA-G1 表达缺陷的 CHO 细胞在转染了人的 HLA-G1 基因后, 用激光共聚焦显微镜观察到在 CHO 细胞膜上正确定位的 HLA-G1 蛋白, 表明 HLA-G1 在合成转运中可以利用仓鼠的 $\beta 2\text{m}$. 推测仓鼠的 $\beta 2\text{m}$ 在 HLA-G1 的膜定位过程中与人的 $\beta 2\text{m}$ 可以发挥相同的作用.

靶细胞表面表达的 HLA-G1 能够部分地抑制 NK92 的细胞毒作用. 这种抑制作用是通过与 NK

细胞上抑制性受体的识别作用而介导的. NK92 细胞系虽是一种具有很强杀伤活性的 NK 肿瘤细胞系, 但它本身也内源性表达 KIR2DL4、ILT2 等抑制性受体^[7]. 在 KIR2DL4 和 ILT2 的胞浆尾部分别带有 1 和 4 个 ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif), 它可以募集蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP-1, SHP-2 来启动 NK 细胞的抑制作用^[8~10]. Rajagopalan^[8] 等报道, KIR2DL4 可能在 NK92 对 HLA-G 转染的 LCL721. 221 靶细胞的免疫耐受中发挥重要的作用. 另外, 本实验室也对 ILT2 对 NK92 细胞毒过程中的影响, 以及与 HLA-G1 的识别作用进行了检测, 发现它确实参与了 HLA-G1 分子的识别, 并参与抑制了 NK92 的细胞毒作用 (待发表).

van Graft 等^[11] 将 NK 细胞和 K562 细胞以一定的效靶比混合后, 在 25℃ 水浴中孵育 25 min, K562 细胞内出现了明显的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高. Radosevic 等^[12] 发现在 NK 细胞和 K562 细胞的相互作用中, 靶细胞或由于膜不通透性的彻底瓦解而立即死亡, 或因为起始的膜损伤 (如膜通透性增加) 被修复, 细胞“逃避”了立即死亡的命运. 在这两种情况下, 靶细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 都出现了升高, 而且那些立即死亡的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高要比那些能够恢复起始损伤的细胞升高的多. van Graft 等^[13] 发现 K562 细胞在受到 NK 细胞攻击后 5~15 min, 可以导致靶细胞膜上产生一种球型的泡状物, 它的形成伴随着 $flc-3$ Ca^{2+} 信号的升高. Radosevic 等^[4] 发现一些与 NK 细胞结合的靶细胞 (conjugated target cells), 在细胞毒性过程启动几分钟内就检测到了 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高, 而在另一些靶细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高是短暂的, 其中有些细胞发生了钙振荡, 而其余的只在 10 min 后出现了单次的钙升高.

本实验中发现 CHO 和只转染了 GFP 的 CHO 细胞受到 NK92 攻击后, 在前 1 290 s 都出现了明显的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 尤其是 GFP-CHO 在 570 s 到 1 h 内呈现持续的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高. 综上所述, 在有效的细胞毒作用中, 靶细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的急剧升高是一个最明显的特征, 可能为有效的细胞毒作用的必要条件. 转染了 HLA-G1 融合蛋白的靶细胞在加入效应细胞 NK92 以后, 仅在 360 s 前出现了短暂的微弱 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 随后急剧下降, 并一直维持着较低的水平, 直到 3 000 s 左右. 推测在效靶

识别的早期, 阻断靶细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高可能为 HLA-G1 的免疫抑制功能的一个重要机制.

在 NK 细胞介导的细胞毒作用中, $[Ca^{2+}]_i$ 的快速升高, 最大的可能是由于 NK 细胞释放的穿孔素等细胞毒性分子使得膜通透性升高, 而被动地引起了胞外钙内流. 当然在某些细胞内也可能存在主动活化的机制参与了 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高, 这种主动的钙摄取可能是由于靶细胞膜的去极化, 产生了电压依赖性的钙通道活化^[12].

HLA-G1 与 NK 受体的识别作用对靶细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的这种抑制性调节作用究竟是通过抑制了胞外钙内流, 还是抑制了靶细胞本身的钙库释放, 还有待于进一步的实验证实, 但本实验确实从靶细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 信号传导机制上为 HLA-G 的免疫抑制功能提供了有利的证据.

致谢 感谢 D. Geraghty (Fred Hutchinson Cancer Research, Institute, Seattle, WA) 无偿馈赠 HLA-G 的特异性单克隆抗体; 感谢协和医科大学阜外医院心血管研究中心廖旭东博士在流式细胞术方面给予的大力指导.

参 考 文 献

- 1 Carosella E D, Paul P, Moreau P, *et al.* HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. *Immunology Today*, 2000, **21** (11): 532~534
- 2 Carosella E D, Dausset J, Rouas-Freiss N. Immunotolerant functions of HLA-G. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **55** (3): 327~333
- 3 Le Bouteiller P, Solier C. Is antigen presentation the primary function of HLA-G? *Microbes Infect*, 2001, **3** (4): 323~332
- 4 Radosevic K, van Leeuwen A M, Segers-Nolten I M, *et al.* Occurrence and a possible mechanism of penetration of natural killer cells into K562 target cells during the cytotoxic interaction. *Cytometry*, 1995, **20** (4): 273~280
- 5 周建军, 曲宏, 吴才宏, 等. 中国人 HLA-G1 的 cDNA 克隆、序列分析、表达和蛋白质空间结构预测. *北京大学学报 (自然科学版)*, 2002, **38** (2): 212~220
Zhou J J, Qu H, Wu C H, *et al.* *Acta Peking University*, 2002, **38** (2): 212~220
- 6 Mallet V, Proll J, Solier C, *et al.* The full length HLA-G1 and no other alternative form of HLA-G is expressed at the cell surface of transfected cells. *Human Immunology*, 2000, **61** (3): 212~224
- 7 Maki G, Klingemann H G, Martinson J A, *et al.* Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, nk-92. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, **10** (3): 369~383
- 8 Rajagopalan S, Long E O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med*, 1999, **189** (7): 1093~1099
- 9 Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue Antigens*, 1996, **48** (4)

- Pt 1): 285~ 294
- 10 Colonna M, Nakajima H, Cella M. Inhibitory and activating receptors involved in immune surveillance by human NK and myeloid cells. *J Leukoc Biol*, 1999, **66** (5): 718~ 722
 - 11 van Graft M, Kraan Y M, Segers I M, *et al.* Flow cytometric measurement of $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i in conjugated natural killer cells and K562 target cells during the cytotoxic process. *Cytometry*, 1993, **14** (3): 257~ 264
 - 12 Radosevic K, de Grooth B G, Greve J. Changes in intracellular calcium concentration and pH of target cells during the cytotoxic process: a quantitative study at the single cell level. *Cytometry*, 1995, **20** (4): 281~ 289
 - 13 van Graft M, Oosterhuis B, van der Werf K O, *et al.* A simple optical fiber device for quantitative fluorescence microscopy of single living cells. *J Immunol Methods*, 1993, **159** (1-2): 145~ 151

Effects of Human Leukocyte Antigen-G1 on The Recognition of NK92 Effector-target Cells*

TIAN Xing-Hui¹⁾, ZHOU Jiar-Jun²⁾, FANG Zhen-Fu³⁾, LOU Li-Ming¹⁾, WANG Yun¹⁾, FENG Mei-Fu^{1)**}

¹⁾ The Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

²⁾ The Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Peking University, Beijing 100871, China;

³⁾ College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract Human leukocyte antigen-G (HLA-G) is a nonclassical major histocompatibility complex I (MHC I) molecule. As the ligand of NK inhibitor receptors, it can transmit the inhibitory signal and inhibit the cytotoxicity of NK cells. In order to study the effect of HLA-G1 on the recognition of effector-target cells, laser scanning confocal microscopy (LSCM) and flow cytometry were used to analyse the expression and function of full-length HLA-G1 and the real-time change of $[Ca^{2+}]_i$ (free intracellular Ca^{2+} concentration) in the target cells. Results showed that full-length HLA-G1 was expressed in the cytoplasm and on the cytomembrane of K562, JAR and CHO cells. HLA-G1 partially inhibited the cytotoxicity of NK92 in a $4hr^{51}Cr$ -release assay. The $[Ca^{2+}]_i$ in the CHO and GFP-CHO (which expresses the green fluorescence protein) obviously rised after the addition of activated NK92. The expression of HLA-G1 inhibited this kind of rising. These results demonstrated that the rising of $[Ca^{2+}]_i$ in target cells is necessary for the effective cell cytotoxicity. The immune inhibition function of HLA-G1 is possible closely related to the inhibition of $[Ca^{2+}]_i$ in the target cells.

Key words HLA-G1, NK92 cells, target cells, intracellular Ca^{2+} , immunoinhibition

* This work was supported by a grant from The National Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology.

** Corresponding author. Tel: 86-10-62628740, E-mail: fengmf@panda.ioz.ac.cn

Received: April 10, 2002 Accepted: June 2, 2002