

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)11-1046-03

以 GFP 为标记的肝癌细胞 RNA 转染树突状细胞的体外效应

张利旺, 张红梅, 刘文超, 潘伯荣, 斯晓明, 任 军 (第四军医大学西京医院肿瘤中心, 陕西 西安 710033)

Effect of dendritic cells transfected with total RNA of HepG2 cell line using GFP marker *in vitro*

ZHANG Li-Wang, ZHANG Hong-Mei, LIU Wen-Chao, PAN Bo-Rong, SI Xiao-Ming, REN Jun

Center of Clinical Oncology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate the feasibility of GFP as a marker to observe the dendritic cells (DCs) transfected with total RNA of tumor cells and the feasibility of the transfected DCs serving as a vaccine for potential immunotherapy. METHODS: Plasmid pGFP-C3 was transfected into HepG2 stably. Total RNA was extracted from the HepG2-GFP using Trizol; DCs were induced by liver cancer patients' peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and transfected with the total RNA. The effect of transfection was observed by a fluorescence microscope, the changes of phenotype were detected by flow cytometry, and the change of IL-12 secretion in the supernatant of DCs was detected by ELISA assay. The cytotoxic effect of CTLs was assessed by MTT assay. RESULTS: GFP was expressed stably in the HepG2-GFP cells that presented green fluorescence under a fluorescence microscope, so did DCs transfected with total HepG2-GFP cell RNA. After transfection, the expression of membrane molecules such as CD80 (13.2% to 86.7%), HLA-DR (38.9% to 97.9%), CD83 (0.9% to 97.1%), CD86 (31.2% to 92.5%) was increased dramatically, IL-12 secretion in the supernatant was elevated significantly [(61.3 ± 8.1) ng/L to (287.4 ± 29.3) ng/L, $P < 0.05$]. The CTLs activated by DCs transfected with total HepG2-GFP RNA showed a potent specific lysis to HepG2 cells. CONCLUSION: GFP could be used as a marker to observe the effect of transfection of DCs with total tumor cell RNA. DCs transfected with total tumor cell RNA may serve as a promising vaccine of immunotherapy.

【Keywords】 dendritic cell; green fluorescent protein; RNA; transfection

【摘要】目的 探讨 GFP 作为标记观察肝癌细胞 RNA 转染 DCs 效果的可行性及肿瘤细胞 RNA 转染 DCs 制备疫苗的可行性. 方法 绿色荧光蛋白质粒载体 pGFP-C3 稳定转染肝癌细胞 HepG2, Trizol 法提取筛选后细胞 HepG2-GFP 总 RNA; 分离肝癌患者外周血单个核细胞体外诱导 DCs 细胞, 总 RNA 转染 DCs, 荧光显微镜下观察转染效果, 流式细胞仪检测转染前后 DCs 表型变化, ELISA 法检测转染前后上清中 IL-12 变化情况, MTT 法检测效应细胞对靶细胞的杀伤率. 结果 pGFP-C3 稳定转染肝癌细胞 HepG2 后可得到稳定表达 GFP 的细胞 HepG2-GFP, 荧光显微镜下呈绿色荧光; 总 RNA 转染的 DCs 荧光显微镜下呈绿色荧光, CD80 (13.2% 上升至 86.7%), HLA-DR (38.9% 上升至 97.9%), CD83 (0.9% 上升至 97.1%), CD86 (31.2% 上升至 92.5%) 表达明显升高, 上清 IL-12 分泌量 ng/L 显著增高 (61.3 ± 8.1 → 287.4 ± 29.3, $P < 0.05$), 诱导的 CTL 能够对肝癌细胞株 HepG2 起特异性杀伤作用. 结论 GFP 可以作为肿瘤细胞 RNA 转染树突状细胞的观察标记, 肿瘤细胞 RNA 转染 DCs 可作为一种有效的肿瘤疫苗.

【关键词】 树突状细胞; 绿色荧光蛋白; RNA 转染

【中图分类号】 R739.41 **【文献标识码】** A

0 引言

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种常见的恶性肿瘤, 适合手术治疗的患者只占一小部分, 具有较高的复发率, 预后很差, 严重威胁人类健康^[1]. DCs (dendritic cells, DCs) 是体内功能强大的专职性抗原提呈细胞, 它能够高效的摄取、处理抗原, 并将处理后的多肽呈递给静息型 T 细胞, 引起针对该抗原的特异性免疫反应^[2]. 国内外类似的研究中, 都没有明确的可以观察肿瘤 RNA 转染 DCs 效果的指标. 我们应用绿色荧光蛋白质粒载体 pGFP-C3 稳定转染肝癌细胞 HepG2, 提取筛选后细胞 HepG2-GFP 总 RNA 转染 DCs, 观察转染后 DCs 绿色荧光蛋白表达及特异性表面标志及功能相关分子表达, 检测其上清细胞因子分泌, 探讨其作为肿瘤疫苗的可行性.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌患者外周血单个核细胞来源于我科造血干细胞移植患者; HepG2 肝癌细胞株由我科常

收稿日期 2005-11-11; 接受日期 2005-11-21

通讯作者: 任 军. Tel (029) 84773224 Email: xjcancer@fmmu.edu.cn

作者简介: 张利旺, 博士生(导师任 军). Tel (029) 82554110

Email: zhanglw@fmmu.edu.cn

规传代培养。流式细胞仪(BD) ,DG3022-A型酶联免疫检测仪(华东电子管厂) ,荧光显微镜 Optiphot XIF (Nicon) 等均为我院常备。FITC-CD80 ,FITC-HLA-DR ,PE-CD83 ,PE-CD86 抗体购自 BD 公司 ;rhGM-CSF ,rhIL-4 购自 Peporotec 公司 ;TNF- α 购自我校生物技术中心 ;绿色荧光蛋白载体 pGFP-C3 由陕西省肿瘤医院贾军博士惠赠 ;脂质体 Transfection2000 ,Trizol Reagent 购自 Invitrogen ;RPMI 1640 培养基、胎牛血清、G418 购自 Gibco 公司 ,X-vivo 无血清培养基购自 BioWhittaker ;IL-12 ELISA 检测试剂盒购自 Bioscience 公司 ;MTT 购自 Sigma 公司。

1.2 方法 参照 Transfection2000 说明书 ,pGFP-C3 转染 HepG2 ,G418 筛选 2 mon. 筛选细胞命名 HepG2-GFP ,荧光显微镜下观察。Trizol 试剂提取 HepG2-GFP 总 RNA ,紫外灯下观察 , -80°C 冻存储用。同样方法提取 HepG2 总 RNA。取肝癌患者造血干细胞分离液 ,贴壁法分离单核细胞 ,贴壁细胞在细胞因子 rhGM-CSF ,rhIL-4 作用下 ,诱导 DCs。倒置显微镜、电子显微镜观察细胞形态 ,流式细胞仪检测细胞表型。

1.2.1 转染树突状细胞 收集培养 4 d 的 DCs ,转入 6 孔板 ,转染 HepG2-GFP 总 RNA。另设转染 HepG2 总 RNA 及空白对照组。继续培养 48 h。荧光显微镜下观察。

1.2.2 细胞因子分泌的测定 48 h 后 ,收集各组 DCs 上清 ,ELISA 法检测转染前后各组细胞上清中 IL-12 分泌量。

1.2.3 CTL 效应 收集各组 DCs $30\text{ Gy }^{60}\text{Co}$ 照射后与复苏冻存的非贴壁细胞按 20:1 比例混合接种于 24 孔板 ,培养 5 d ,收集的细胞即为效应细胞。收集对数生长期的 HepG2 细胞作为靶细胞 ,将效应细胞与靶细胞按 20:1 比例混合接种于 96 孔板。同时设单一靶细胞组、单一效应细胞组。培养 24 h 后 ,MTT 法检测。以下述公式计算杀伤效率。CTL 杀伤效率 = $[1 - (\text{效靶 } A_{490} - \text{效应细胞 } A_{490}) / \text{靶细胞 } A_{490}] \times 100\%$ 。

统计学方法 结果采用 SPSS 10.0 统计软件分析。

2 结果

2.1 HepG2-GFP 总 RNA 转染 DCs 稳定转染及筛选后得到的 HepG2-GFP 细胞 ,能够稳定的表达 GFP ,荧光显微镜下所有细胞都呈现绿色荧光(图 1) ,传代 20 次以上仍无消失。与对照细胞相比 ,GFP 基因修饰细胞在形态、生长等特性上均无显著改变 ,也未见 GFP 表达对靶细胞的毒性。使用 Trizol 提取 HepG2-GFP 细胞总 RNA 后 ,取 $2\ \mu\text{L}$ 总 RNA 进行凝

胶电泳 ,可见 5 s ,18 s 和 28 s 条带(图 2)。单个核细胞贴壁后 ,贴壁细胞在细胞因子 GM-CSF ,IL-4 的作用下 ,培养第 2 日出现细胞集落 ,但细胞集落较小。5 d 后 ,集落明显增加、变大 ,出现具有毛刺状突起的细胞。至 7 d ,集落开始减少 ,产生大量具有树枝状突起的细胞(图 3A ,B)。荧光显微镜下 ,HepG2-GFP 总 RNA 转染 DCs 组细胞呈绿色荧光 ,而 HepG2 总 RNA 转染组及空白对照组则无明显荧光表达(图 4A ,B ,C)。



图 1 荧光显微镜下 pGFP-C3 稳定转染后 HepG2 胞浆荧光阳性 $\times 250$

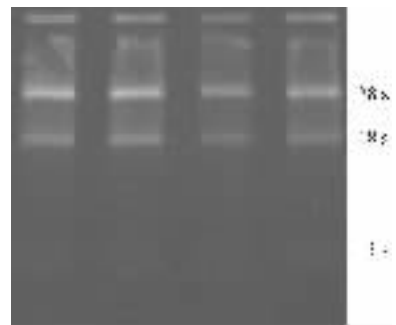
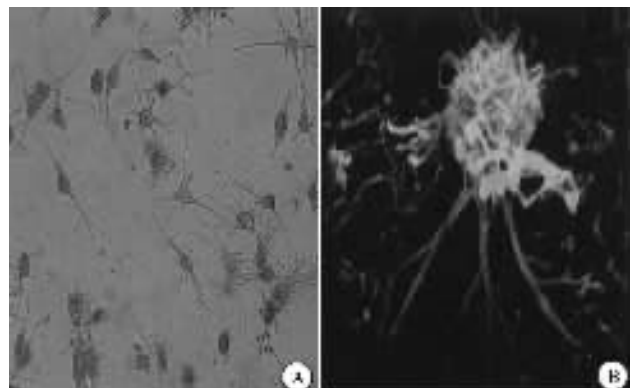


图 2 HepG2-GFP 细胞的总 RNA 电泳

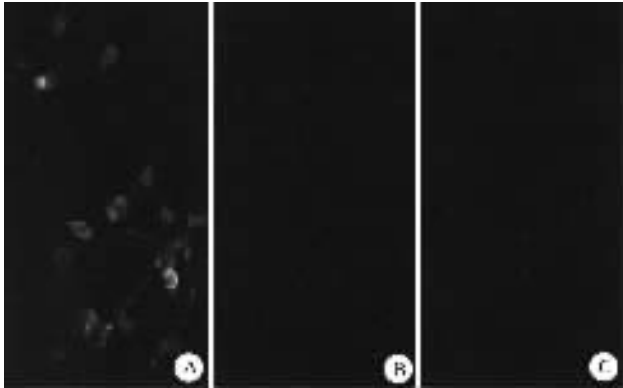


A 倒置显微镜下 DCs 形态 $\times 250$; B 扫描电镜下 DCs 形态 $\times 3000$ 。

图 3 树突状细胞形态(第 7 日)

2.2 流式细胞仪检测细胞表型 诱导 d 7 DCs 表达

CD80 13.2% ,HLA-DR 38.9% ,CD86 31.2% ,CD83 低表达,仅 0.9% 转染后上述分子表达明显升高,分别为 CD80 86.7% ,HLA-DR 97.9% ,CD86 92.5% ,CD83 97.1% 提示转染后细胞具有成熟 DCs 特征。



A :HepG2-GFP 总 RNA 转染 DCs ,部分细胞胞浆绿色荧光阳性 ; B HepG2总 RNA 转染后 DCs ,未见明显荧光 ; C 未转染 DCs ,未见明显荧光。

图 4 总 RNA 转染 DCs ×250

2.3 ELISA 检测 IL-12 分泌 HepG2-GFP 总 RNA 转染 DCs 组上清中 IL-12 分泌明显增加,显著高于转染前(287.4 ± 29.3) ng/L vs (61.3 ± 8.1) ng/L ; $n = 6$, $P < 0.05$]。

2.4 CTL 介导细胞毒效应 HepG2-GFP 总 RNA 转染 DCs 刺激的 CTL 对 HepG2 细胞杀伤率为(62.6 ± 2.9)% ,未转染的 DCs 刺激的 T 细胞对 HepG2 的杀伤作用为(20.8 ± 1.5)% ,无 DCs 刺激 T 细胞对 HepG2 的杀伤作用为(20.8 ± 1.5)% ,总 RNA 转染 DCs 刺激的 CTL 对 HepG2 细胞杀伤率明显高于两个对照组($n = 6$, $P < 0.05$)。HepG2-GFP 总 RNA 转染 DCs 刺激的 CTL 对 SMMC7721 和 K562 细胞杀伤率分别为(37.7 ± 1.8)% 和(26.8 ± 1.1)% ,对 HepG2 细胞杀伤率明显高于 SMMC7721 和 K562 细胞($n = 6$, $P < 0.05$)。

3 讨论

DCs 是体内功能最强大的专职性抗原提呈细胞,它在 T 细胞免疫中发挥着极其重要的作用^[2]。应用各种肿瘤抗原致敏 DCs 制备疫苗是近年来研究的热点^[3-8]。肿瘤细胞总 RNA 转染 DCs 制备疫苗与其他方法相比,具有如下优越性:首先,它不受已知肿瘤抗原的限制,可诱导出多克隆的 CTL;其次,转染所需的 RNA 可以通过扩增方法得到,很少量的肿瘤组织样本即可扩增得到大量的 RNA^[8]。但目前国内外的研究中,尚未有可以明确观察总 RNA 转染 DCs 效率的

方法。我们应用稳定表达 GFP 的 HepG2-GFP 总 RNA 转染 DCs,以 GFP 为标记观察总 RNA 转染 DCs 的效率,探讨其作为肿瘤疫苗的可行性,为肝癌临床治疗提供实验基础。

本试验中, HepG2-GFP 总 RNA 转染后的 DCs 在荧光显微镜下观察,胞质呈现绿色荧光,证实 GFP mRNA 可以在 DCs 胞质内正常表达,同时说明肿瘤细胞总 RNA 同样也可以在 DCs 胞浆内进行翻译表达。转染后 CD83 ,CD80 ,CD86 ,HLA-DR 表达明显升高,IL-12 分泌明显增加,说明 RNA 转染,促进了 DCs 的体外成熟。成熟 DCs 主要通过 MHC-I 类途径,将肿瘤细胞总 RNA 在 DCs 胞质内进行翻译表达的肿瘤抗原呈递给 T 淋巴细胞。此途径诱导的 T 淋巴细胞主要为 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)。本试验中,诱导的 CTL 对 HepG2 的细胞毒效应明显高于对照组 T 细胞,证实诱导的 T 淋巴细胞为肿瘤特异性的。因此,在当前仍未发现肝癌特异性抗原情况下,应用肝癌细胞总 RNA 转染 DCs 制备疫苗,诱导针对肝癌细胞的多克隆 CTL,可以作为肝癌 DCs 疫苗的一个发展方向。

【参考文献】

- [1] Qin LX , Tang ZY . The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma [J] . World J Gastroenterol , 2002 , 8 (3) : 385 - 392 .
- [2] 张红梅 , 任军 , 张利旺 , 等 . 外周血造血干细胞体外定向诱导树突状细胞及功能鉴定 [J] . 第四军医大学学报 , 2003 , 24 (1) : 83 - 85 .
- [3] Kaplan JM , Yu Q , Piraino ST , et al . Induction of antitumor immunity with dendritic cells transduced with adenovirus vector encoding endogenous tumor-associated antigens [J] . J Immunol , 1999 , 163 (2) : 699 .
- [4] Schnurr M , Galambos P , Scholz C , et al . Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells : An *in vitro* model for the assessment of tumor vaccines [J] . Cancer Res , 2001 , 61 (17) : 6445 - 6450 .
- [5] Barbuto JA , Ensina LF , Neves AR , et al . Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer [J] . Cancer Immunol Immunother , 2004 , 53 : 1111 - 1118 .
- [6] Heiser A , Maurice MA , Yancey DR , et al . Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA [J] . J Immunol , 2001 , 166 : 2953 - 2960 .
- [7] Heiser A , Coleman D , Dannull J , et al . Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors [J] . J Clin Invest , 2002 , 110 (3) : 409 - 417 .
- [8] Kalady MF , Onaitis MW , Emani S , et al . Dendritic cells pulsed with pancreatic cancer total tumor RNA generate specific antipancreatic cancer T cells [J] . J Gastrointest Surg , 2004 , 8 (2) : 175 - 181 .