

# 转 4-1BBL 基因的小鼠肝癌细胞瘤苗刺激脾细胞产生细胞因子的研究

刘承利<sup>1</sup>, 臧晓霞<sup>2</sup>, 窦科峰<sup>3</sup>, 朱帮福<sup>4</sup>, 张洪义<sup>1</sup>, 张宏义<sup>1</sup>

**Cytokines Production of Murine Spleen Cells Induced by Gene Transfer of 4-1BBL into Hepatocellular Carcinoma Hepa1-6 in Vitro**

LIU Cheng-li<sup>1</sup>, ZANG Xiao-xia<sup>2</sup>, DOU Ke-feng<sup>3</sup>, ZHU Bang-fu<sup>4</sup>, ZHANG Hong-yi<sup>1</sup>, ZHANG Hong-yi<sup>1</sup>

1. Department of Hepatobiliary Surgery, Air Force General Hospital, Beijing 100036, China, 2. Department of Stomatology; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 4. Institute of Biochemistry

**Abstract :Objective** To study the cytokines production of spleen cells induced in vitro by murine 4-1BBL gene transfected Hepa1-6. **Methods** Murine hepatocellular carcinoma cell line Hepa1-6-m4-1BBL which could highly express murine 4-1BBL was cultivated previously. The tumor cell vaccine (TCV-m4-1BBL) was obtained by treating Hepa1-6-m4-1BBL with mitomycin (MMC). Cocultivation TCV with syngeneic murine spleen cells and the supernatants were harvested for detecting the cytokines (IL-2, TNF- and GM-CSF). **Results** Comparing with TCV-Hepa1-6, high levels of IL-2, TNF- and GM-CSF were released by the spleen cells after stimulated by TCV-m4-1BBL. **Conclusion** Stimulation signals delivered by 4-1BBL remarkably increased the production of IL-2, TNF- and GM-CSF.

**Key words**: murine 4-1BBL; Costimulatory molecule; Tumor cell vaccine; Hepatocellular carcinoma; Cytokines

**摘 要**:目的 研究转 4-1BBL 基因的小鼠肝癌细胞瘤苗体外刺激同系小鼠脾细胞产生细胞因子(IL-2、TNF- 和 GM-CSF)的能力。方法 以丝裂霉素 C(MMC)处理高表达转 m4-1BBL 基因的小鼠 Hepa1-6 肝癌细胞,制成肿瘤细胞瘤苗(TCV),体外与同系小鼠脾淋巴细胞共同培养后,观察其对脾细胞产生细胞因子(IL-2、TNF- 和 GM-CSF)的影响。结果 TCV-4-1BBL 刺激后,脾细胞体外分泌细胞因子 IL-2、TNF- 和 GM-CSF 的水平明显增高。结论 转 4-1BBL 基因的小鼠肝癌细胞瘤苗能刺激脾细胞产生细胞因子 IL-2、TNF- 和 GM-CSF。

**关键词**:小鼠 4-1BBL; 共刺激分子; 肿瘤疫苗; 肝细胞癌; 细胞因子

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)01-0115-03

## 0 引言

机体对肿瘤的免疫主要靠细胞免疫,特别是 T 细胞免疫。而 T 细胞的激活除了 MHC-抗原多肽复合物与 T 细胞受体(TCR)的结合所提供的第一信号外,共刺激分子(Costimulatory molecules)提供的第二信号也起着至关重要的作用<sup>[1]</sup>。缺乏这些共刺激分子将导致 T 细胞进入克隆无能或凋亡。因此,将共刺激分子导入肿瘤细胞以制备肿瘤疫苗成为近来肿瘤生物治疗的研究热点。我们在研究中发现将小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 中导入 4-1BBL 基因能明显增强其体内诱导机体产生免疫应答的能力<sup>[2]</sup>,

本文应用上述基因工程瘤苗研究了其体外刺激同系小鼠脾细胞产生细胞因子(IL-2、TNF- 和 GM-CSF)的能力,以对其抗肿瘤机制作进一步的探讨。

## 1 材料及方法

1.1 材料 小鼠肝癌细胞株 Hepa1-6 由上海第二军医大学国际合作肿瘤研究所郭亚军教授惠赠,转 m4-1BBL 基因的高表达细胞株 Hepa1-6-m4-1BBL 及转空载体的 Hepa1-6-neo 为作者建立<sup>[3]</sup>,DMEM 培养基为 Gibco 公司产品,新生牛血清为杭州四季青公司产品。大鼠抗小鼠 4-1BBL 抗体(BD 公司产品)购自深圳晶美公司,羊抗大鼠 IgG-FITC、PHA-P、MTT、DMSO 为 Sigma 公司产品。丝裂霉素 C(MMC)为 Kyowa Hakko Kogyo 公司产品。TR-Izol 试剂及 superscript 反转录试剂盒为 Invitrogen 公司产品。Taq 酶为华美公司产品。C57BL/6

收稿日期:2006-01-16;修回日期:2006-04-14

作者单位:1. 100036 北京,空军总医院肝胆外科,2. 口腔科;3. 第四军医大学西京医院肝胆外科,4. 第四军医大学基础部生化教研室

作者简介:刘承利(1971-),男,博士,主治医师,主要从事肿瘤免疫学研究

小鼠购自第四军医大学实验动物中心,6 周龄,雌性。淋巴细胞分离液购自 TBD 生物技术发展中心。放线菌素 D(ACD)为 Fluka 公司产品。IL-2 标准品、TNF- $\alpha$  标准品、GM-CSF 标准品为第四军医大学生物技术中心及免疫教研室提供。L929 细胞株、TF-1 细胞株为第四军医大学免疫教研室提供。引物由上海生工生物工程公司合成,根据 GeneBank 中 m4-1BBL 基因全长序列设计上游引物 P<sub>1</sub>:5' GCGGA TCCA TGGACCA GCACACACTTGA-3', 下游引物 P<sub>2</sub>:5' CCGA TTCTCA TTCCCA TGGGTTGTCGG-3'。预计扩增片段长度为 945bp。

## 1.2 方法

### 1.2.1 肿瘤细胞疫苗的制备

收集培养的 Hepa1-6、Hepa1-6-neo 及 Hepa1-6-m4-1BBL 细胞,1  $\times$  PBS 液洗 2 次,细胞数调至 1  $\times 10^{10}$ /L,用 MMC(80mg/L)于 37  $^{\circ}$ C、50% CO<sub>2</sub> 处理 1h,1  $\times$  PBS 液洗 3 次,重悬细胞,制成肿瘤细胞疫苗备用(分别称为 TCV-Hepa1-6、TCV-Hepa1-6-neo、TCV-m4-1BBL)。

### 1.2.2 MMC 处理前后转染细胞 m4-1BBL 表达的变化

取对数生长期的 Hepa1-6-m4-1BBL 细胞稳定表达克隆,以 1  $\times 10^5$ /孔的浓度铺 6 孔板,培养 48h 后,1  $\times$  PBS 洗 2 次,用 MMC(80mg/L)于 37  $^{\circ}$ C、50% CO<sub>2</sub> 处理 1h,1  $\times$  PBS 洗 3 次,重新加完全培养液培养,分别于作用前、作用后 6h、24h、48h 收集细胞提取总 RNA,用于 RT-PCR 检测。

### 1.2.3 C57BL/6 小鼠脾细胞悬液制备及混合淋巴细胞培养

无菌取 C57BL/6 小鼠脾脏,无菌玻璃针芯研磨并过 150 目筛网,制备单细胞悬液,RPMI1640 洗涤一次,以含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 重悬细胞,调整细胞浓度为 1  $\times 10^7$ /ml,置 12 孔培养板,分别加入培养液,TCV-Hepa1-6,TCV-Hepa1-6-neo,TCV-m4-1BBL,细胞浓度为 5  $\times 10^5$ /ml(脾细胞与 TCV 比例 20:1),37  $^{\circ}$ C、50% CO<sub>2</sub> 培养 36h,离心收集培养上清,用于检测细胞因子。

### 1.2.4 IL-2 的测定

采用小鼠脾 T 母细胞的 MTT 法<sup>[4]</sup>。无菌取 C57BL/6 小鼠脾脏,研磨,过 150 目钢网,0.87% 氯化铵(30~60s)溶解红细胞,PBS 洗涤 3 次,用含 15 $\mu$ g/ml PHA-P、青霉素 100U/ml、链霉素 100 $\mu$ g/ml、10% 新生牛血清的 1640 培养液制成 1  $\times 10^7$ /ml 细胞悬液,37  $^{\circ}$ C、50% CO<sub>2</sub> 培养 48~72h,细胞悬液用淋巴细胞分离液分离,1500r/min 离心 15min,取中间层淋巴细胞。PBS 洗涤 2 次,计数,调细胞浓度

为 1  $\times 10^6$ /ml。取 100 $\mu$ l 的待测样品及稀释 IL-2 标准品(浓度为 100U/ml),于 96 孔培养板内作倍比稀释,设 3 个复孔及阴性对照(培养液),每孔另加入上述细胞悬液各 100 $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C、50% CO<sub>2</sub> 培养 24h,或观察至阴性对照组细胞全部死亡时,进行 MTT 检测。于 96 孔培养板中每孔加入 MTT 20 $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C、50% CO<sub>2</sub> 培养 4~6h,离心 1000 r/min,5min,吸弃上清,每孔加入 DMSO 200 $\mu$ l,充分吹打混匀或过夜,于酶标分析仪上测定 570nm 的吸光度值(A)。

计算公式:IL-2 活性单位 = (达 50% 最大 A 值的样品稀释度/达 50% 最大 A 值的标准品稀释度)  $\times$  标准品单位

### 1.2.5 TNF- $\alpha$ 的测定方法

采用对小鼠 L929 细胞的细胞毒效应的 MTT 检测法<sup>[4]</sup>。检测时收集细胞悬液,PBS 洗涤 3 次,调细胞浓度为 2  $\times 10^5$ /ml。于 96 孔板内每孔 100 $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C、50% CO<sub>2</sub> 培养 24h,弃上清。取 100 $\mu$ l 的待测样品及稀释 TNF- $\alpha$  标准品(浓度为 100U/ml),于 96 孔培养板内作倍比稀释,设 3 个复孔及阴性对照(培养液)组,每孔另加入放线菌素 D 10 $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C、50% CO<sub>2</sub> 培养 12~14h,或观察至阴性对照组细胞全部死亡时,于每孔加入 MTT 10 $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C、50% CO<sub>2</sub> 培养 4~6h,吸弃上清,每孔加入 DMSO 100 $\mu$ l,震荡后在酶标分析仪上测定 570nm 的 A 值

计算公式:TNF- $\alpha$  活性单位 = (导致 50% 细胞死亡的 TNF- $\alpha$  标准品最大稀释度/导致 50% 细胞死亡的 TNF- $\alpha$  样品最大稀释度)  $\times$  标准品单位

### 1.2.6 GM-CSF 的测定方法

采用 GM-CSF 依赖的 TF-1 细胞株作为靶细胞的 MTT 法<sup>[4]</sup>。用含 10% 小牛血清、GM-CSF 60U/ml 的 RPMI1640 培养液培养 TF-1 细胞,检测时收集细胞悬液,PBS 洗涤 3 次,调细胞浓度为 1  $\times 10^5$ /ml。取 100 $\mu$ l 的待测样品及稀释 GM-CSF 标准品(浓度为 200U/ml),于 96 孔培养板内作倍比稀释,设 3 个复孔及阴性对照(培养液)组,每孔另加入上述细胞悬液各 100 $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C、50% CO<sub>2</sub> 培养 24h,或观察至阴性对照组细胞全部死亡时,MTT 法检测。于 96 孔培养板中每孔加入 MTT 20 $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C、50% CO<sub>2</sub> 培养 4~6h,离心 1000 r/min,5min,吸弃上清,每孔加入 DMSO 200 $\mu$ l,充分吹打混匀或过夜,于酶标分析仪上测定 570nm 的吸光度(A)值。

计算公式:GM-CSF 活性单位 = (样品达 50% 标准品最大 A 值稀释度/标准品 50% 最大 A 值稀释度)  $\times$  标准品单位

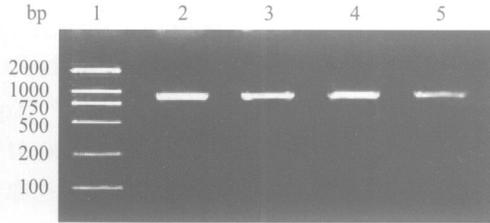
### 1.2.7 统计学方法

结果以 SPSS 10.0 统计软件行方差分析,  $P <$

0.05为相差显著。

### 2 结果

2.1 MMC 作用前后肿瘤细胞表达 m4-1BBL 的变化  
经 RT-PCR 检测显示 Hepa1-6-m4-1BBL 细胞  
经 MMC 作用后于 48h 仍能表达 m4-1BBL ,见图 1。



1: DL-2000; 2: MMC 作用前; 3: MMC 作用 6h 后; 4: MMC 作用 24h 后; 5: MMC 作用 48h 后

图 1 MMC 作用前后 m4-1BBL 的表达

2.2 肿瘤细胞疫苗对脾细胞产生细胞因子的影响  
将野生型的 Hepa1-6、Hepa1-6-neo 及转基因的 Hepa1-6-m4-1BBL 细胞经丝裂霉素 C 作用后与同系的 C57BL/6 小鼠脾细胞共同培养,36h 后取培养上清用于检测相关细胞因子,结果显示转 4-1BBL 基因的瘤苗体外刺激脾细胞产生的 IL-2、TNF- 及 GM-CSF 水平均上升。统计分析表明,与野生型的 Hepa1-6 瘤苗有显著差异 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 肝癌细胞瘤苗对脾细胞产生细胞因子的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	IL-2 (U/ml)	TNF (U/ml)	GM-CSF (U/ml)
supernatant of splenocytes	-	-	-
Splenocytes + TCV- Hepa1 - 6	55.7 $\pm$ 4.2	24.3 $\pm$ 6.9	-
splenocytes + TCV - Hepa1 - 6 - neo	50.8 $\pm$ 5.8	26.4 $\pm$ 5.4	35.2 $\pm$ 6.7
splenocytes + TCV - m4 - 1BBL	89.3 $\pm$ 6.0	77.6 $\pm$ 7.8	145.6 $\pm$ 12.2

转 4-1BBL 组与野生组及空载体组比较,  $P < 0.05$

### 3 讨论

4-1BBL 为肿瘤坏死因子超家族成员,属于胞膜表面的 型糖蛋白,主要表达于活化的抗原呈递细胞如 B 细胞、巨噬细胞、树突状细胞表面,部分的肿瘤细胞也能表达 4-1BBL<sup>[5]</sup>。4-1BBL 与其受体 4-1BB 作用后可以调节多种免疫细胞的功能,可以有力地共刺激 T 细胞,使其增殖,增加它们的溶细胞能力<sup>[6]</sup>。因此,应用 4-1BBL 诱发机体的抗肿瘤 T 细胞反应有着广阔的前景。

为了研究 4-1BBL 在抗肝癌免疫中的应用价值,我们将 4-1BBL 基因导入已知不表达 4-1BBL 的小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 中并制成肿瘤疫苗,为了保证所需的肿瘤细胞疫苗能保持其高免疫原性及低致

瘤性,我们在实验中采用了合适剂量的丝裂霉素 C 处理肿瘤细胞,结果显示,丝裂霉素 C 处理后 48h 肿瘤细胞仍能表达 4-1BBL,并且在培养瓶中部分细胞能保持贴壁一周左右,将此瘤苗接种小鼠后不能成瘤。

以往认为 4-1BBL 在体内优先诱导 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化<sup>[7]</sup>。但是,最近 Cannons JL 等人却报道了 4-1BBL 刺激后,CD4<sup>+</sup> T 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞在发生细胞分裂、维持存活及增强效应功能等方面并无明显区别<sup>[8]</sup>。CD8 是杀伤性 T 淋巴细胞表面标志物。CD4 是 T<sub>H</sub>细胞表面标志物。目前认为,肿瘤免疫主要激活 MHC-I 类分子限制的 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞,同时 MHC-II 类分子限制的 CD4<sup>+</sup> T 细胞的活化对维持 CTL 的杀伤活性和免疫记忆都具有十分重要的意义。CD4<sup>+</sup> 的 T<sub>H</sub> 细胞能产生 IL-2、IFN-、TNF- 和 GM-CSF 等细胞因子。我们在先前的实验中发现 m4-1BBL 基因转染的 Hepa1-6 细胞疫苗能较有效诱导 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞产生针对野生型 Hepa1-6 细胞的特异性杀伤活性。本研究结果显示,将 TCV-4-1BBL 体外与脾淋巴细胞共培养,其上清中 IL-2、TNF- 和 GM-CSF 水平明显上升,这也说明 4-1BBL 不但能刺激诱导 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化,同时也能激活 CD4<sup>+</sup> T 细胞产生细胞因子,通过这些细胞因子间接激活 CD8<sup>+</sup> 细胞可能是其抗肿瘤机制之一。

### 参考文献:

- [1] Hodge JW, Schlom J. Costimulatory molecules in vaccine design [J]. Ernst Schering Res Found Workshop, 2000, 30:23-52.
- [2] 刘承利, 窦科峰, 朱帮福. 转 4-1BBL 基因的小鼠肝癌细胞瘤苗体内抗癌作用的研究[J]. 中华普通外科杂志, 2004, 19 (6): 352-355.
- [3] 刘承利, 窦科峰, 朱帮福. 转 4-1BBL 基因的小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 生物学特性的观察[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(6): 1145.
- [4] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 第 1 版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 255-284.
- [5] Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, et al. Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells [J]. J Immunol, 2000, 165(5): 2903-2910.
- [6] Tamada K, Chen L. Renewed interest in cancer immunotherapy with the tumor necrosis factor superfamily molecules [J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(4): 355-362.
- [7] Tan J T, Whitmire J K, Ahmed R, et al. 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses [J]. J Immunol, 1999, 163(9): 4859-4868.
- [8] Cannons JL, Lau P, Ghumman B, et al. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy [J]. J Immunol, 2001, 167(3): 1313-1324.

[编辑:周永红]