

# B7 基因转染对小鼠肝癌细胞致瘤性的影响

刘晓平<sup>1</sup> 区庆嘉<sup>1</sup> 黄洪莲<sup>2</sup> 王小宁<sup>2</sup>

(1 中山医科大学孙逸仙纪念医院外科; 广州, 510120 2 第一军医大学分子免疫学研究所; 广州, 510515)

**摘要** 目的: 研究小鼠 B7 基因转染对小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 细胞株细胞形态、生长速度及致瘤性的影响。方法: 用逆转录病毒载体, 将小鼠 B7 基因导入小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 细胞株中, 经 G418 筛选, 获得高表达 B7 分子的阳性细胞克隆, 采用 CTLA-4Ig 的间接免疫荧光法检测 B7 分子的表达情况, 并观察了 B7 基因转染对细胞形态、生长速度及致瘤性的影响。结果: ① 亲本小鼠肝癌细胞株 Hepa1-6 不表达 B7 分子, 转染 B7 基因的 Hepa1-6 细胞高表达 B7 分子; ② 转染 B7 基因的 Hepa1-6 细胞与亲本 Hepa1-6 细胞相比, 体外生长速度和细胞形态无明显改变, 但免疫原性大大增强, 致瘤性消失。结论: B7 基因转染使得小鼠肝癌细胞株 Hepa1-6 免疫原性大大增强, 致瘤性消失。

**主题词** 抗原, CD80; 抗原 CD86; 转染; 免疫活性; 肝细胞癌; 小鼠

**中图分类号** R 735.7

## THE TRANSFECTION OF B7 GENE IN MURINE HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL LINE

Liu Xiaoping Ou Qingjia Huang Honglian Wang Xiaoning

(Department of Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital

Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

**Abstract Objective:** To study the effects of transfecting B7 gene on syngeneic murine hepatocellular carcinoma cell line Hepa1-6. **Methods:** The B7-1 or B7-2 genes were transferred by using retrovirus vectors into syngeneic murine hepatocellular carcinoma cell line Hepa1-6, termed as Hepa1-6-B7-1 or Hepa1-6-B7-2 respectively. The expression of B7-1 or B7-2 molecules on cell surface and the immunogenicity of the cell line were investigated. **Results:** ① The cell line Hepa1-6-B7-1 or Hepa1-6-B7-2 could express B7 molecules on their surface and the Hepa1-6 did not; ② The life pattern and the growth property of cell lines Hepa1-6, Hepa1-6-B7-1 or Hepa1-6-B7-2 in vitro were similar, but the immunogenicity of Hepa1-6-B7-1 or Hepa1-6-B7-2 were increased. **Conclusion:** The findings suggest that the transfection of B7 gene into syngeneic murine hepatocellular carcinoma cell line can not affect the life pattern and the growth property of the cell line, but may promote its immunogenicity.

**Subject headings** antigens CD80; antigens CD86; transfection; immunocompetence; carcinoma hepatocellular; murine

现代免疫学的研究进展表明, T 细胞的激活, 需要两大信号系统的共同刺激: 抗原递呈细胞上 MHC(Major histocompatibility complex)/多肽复合物与 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)/CD3 复合物结合产生第 1 信号; 抗原递呈细胞上一组粘附分子所组成的协同刺激分子(Costimulatory molecules, CMs)与 T 细胞上相应的受体结合, 产生第 2 信号。第 2 信号决定着 T 细胞是增殖、分化为效应细胞还是进入克隆无能(anergy)或凋亡。协同刺激分子 B7 及其受体对在 T 细胞激活双信号系统中, 提供主要的协同刺激信号。本研究应用基因工程手段, 通过逆转录病毒载体, 将 B7-1 和 B7-2 基因导入缺乏 B7 的小鼠肝癌细胞株 Hepa1-6 中, 经 G418 筛选后获得高表达 B7 分子的阳性克隆细胞, CTLA-4Ig(Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 Ig)间接免疫荧光法检测 B7 分子的表达情况, 并观察了基因转染体外对细胞形态、生长速度以及体内对致瘤性的影响, 为进一步应用协同刺激分子 B7 基因治疗肝癌提供了良好的

实验基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 化学及免疫试剂 G418、Polybrene、胰酶: Sigma 公司产品。胎牛血清(FCS): 中国医学科学院血液学研究所产品。完全培养液: RPMI 1640 培养基和 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)培养基各一半加 10%(v/v)FCS。羊抗人 IgG-FITC: 军事医学科学院微生物流行病学研究室产品。CTLA-4Ig: 第一军医大学分子免疫学研究所提供。

1.1.2 细胞株及动物 NIH3T3 细胞株、小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞株、含 B7-1 和 B7-2 基因的抗性包装细胞: 第一军医大学分子免疫学研究所提供。C57BL/6 小鼠: 5~6 周龄, 雌性, 第一军医大学动物中心提供。

## 1.2 病毒上清的收集和滴度的测定

参照文献<sup>[1]</sup>, 将长满单层的抗性 PA317 包装细胞(分别含 B7-1、B7-2), 按 1:3 传代, 用不含 G418 的完全培养液置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养 72 h 或更长, 收集病毒上清, 过滤, 采用 NIH3T3 细胞筛选法测定病毒滴度。计算公式: 病毒效价(CFU/L)= 平均克隆数×病毒上清稀释倍数。

## 1.3 B7 基因转染小鼠肝癌细胞

1.3.1 确定 G418 筛选浓度 取对数生长期 Hepa1-6 细胞, 按细胞浓度  $1 \times 10^8$ /L 接种于 6 孔培养板中, 分别加入含浓度为 0、200、400、600、800、1 000 mg/L G418 的完全培养基中进行筛选, 以杀死所有 Hepa1-6 细胞的最小 G418 浓度为筛选浓度。

1.3.2 B7 基因转染小鼠肝癌细胞及筛选 参照文献<sup>[2]</sup>, 取对数生长期的靶细胞 Hepa1-6 1:3 传代, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下培养 24 h, 细胞达 60%~70% 汇合时, 用作转染的靶细胞。取含 8 mg/L polybrene 的重组 B7-1 或 B7-2 逆转录病毒上清原液加入细胞表面, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下培养 4 h, 补充新鲜培养液, 48 h 后 1:2 传代并加入含有 600 mg/L G418 的培养液, 2 周后, G418 抗性克隆开始存活, 4 周后克隆基本形成。收集 G418 抗性克隆, 经有限稀释法获单个抗性克隆, 大量扩增后用于体外试验(转染 B7-1、B7-2 的 Hepa1-6 阳性细胞克隆分别称为 Hepa1-6-B7-1、Hepa1-6-B7-2)。

## 1.4 转染肝癌细胞表面 B7 分子的表达情况

参照文献<sup>[3]</sup>, 采用 CTLA-4Ig 的间接免疫荧光法: 取无菌盖玻片 6 片, 置于 6 孔板中, 分别加入 Hepa1-6、Hepa1-6-B7-1、Hepa1-6-B7-2 细胞悬液, 细胞浓度为  $1 \times 10^9$ /L, 待细胞生长达 60%~80% 汇合时, 取出长有细胞的盖玻片, 95% 乙醇固定 5~10 min, 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 洗涤 3 次, 风干。置另一 6 孔培养板中, 加入 CTLA-4Ig, 湿盒中 37 °C 1~2 h, PBS 洗涤 3 次, 洗去未结合的 CTLA-4Ig。分别加入羊抗人 IgG-FITC, 湿盒中 37 °C 30~60 min, PBS 充分洗涤, 风干, 封片。荧光显微镜下观察并照片。

## 1.5 转染肝癌细胞的生长特性

取 Hepa1-6、Hepa1-6-B7-1、Hepa1-6-B7-2 细胞, 按  $5 \times 10^7$ /L 为起始浓度, 分别接种于 6 孔培养板中, 2~3 d 换液 1 次, 每天计数 1 孔细胞, 共 6 d, 观察细胞生长情况及细胞形态。

## 1.6 转染肝癌细胞的致瘤性

1.6.1 动物模型的建立 C57BL/6 小鼠 32 只, 随机分 4 组, 每组 8 只, 分笼饲养。分别皮下接种肝癌细胞株 Hepa1-6, 细胞总数分别为每鼠  $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  个, 观察肿瘤发生情况, 以确定成瘤最佳细胞数。

1.6.2 转染肝癌细胞的致瘤性 C57BL/6 小鼠 24 只, 随机分 3 组, 每组 8 只, 分笼饲养。分别皮下接种肝癌细胞株 Hepa1-6、Hepa1-6-B7-1、Hepa1-6-B7-2, 细胞总数为每鼠  $5 \times 10^6$

个, 每隔 5 d 观察, 记录肿瘤大小及小鼠生长情况。

## 2 结果

### 2.1 病毒上清滴度

NIH3T3 细胞筛选法测定的病毒滴度分别为: B7-1 病毒上清的滴度为  $4.2 \times 10^8$  CFU/L, B7-2 病毒上清的滴度为  $4.0 \times 10^8$  CFU/L。

### 2.2 B7 基因转染小鼠肝癌细胞

经不同浓度的 G418 筛选, 能杀死所有 Hepa1-6 细胞的最小 G418 浓度为 600 mg/L, 故确定该浓度为本实验的 G418 筛选浓度。分别用 B7-1 上清和 B7-2 上清感染 Hepa1-6 细胞, 经 600 mg/L G418 筛选和有限稀释法得到单个抗性克隆的 Hepa1-6-B7-1、Hepa1-6-B7-2, 说明 B7-1、B7-2 基因转染成功。

### 2.3 转染肝癌细胞表面 B7 分子的表达情况

采用 CTLA-4Ig 的间接免疫荧光法, 检测到 Hepa1-6-B7-1、Hepa1-6-B7-2 细胞呈强荧光反应, 而亲本 Hepa1-6 则无荧光反应, 说明 Hepa1-6-B7-1、Hepa1-6-B7-2 细胞表面表达 B7 分子, 而亲本 Hepa1-6 则不表达 B7 分子。

### 2.4 转染肝癌细胞的生长特性

Hepa1-6-B7-1、Hepa1-6-B7-2 及亲本 Hepa1-6 细胞体外培养时细胞形态、生长速度和增殖能力无明显差异。

### 2.5 转染肝癌细胞的致瘤性

2.5.1 成瘤细胞数的确定 分别以每鼠  $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  个不同细胞数, 接种小鼠亲本肝癌细胞株 Hepa1-6 于同系小鼠皮下, 结果发现, 每鼠  $5 \times 10^6$  个细胞数以上的成瘤率为 100%, 故以下研究均采用每鼠  $5 \times 10^6$  个细胞数。不同 Hepa1-6 细胞数成瘤率见表 1。

表 1 不同 Hepa1-6 细胞数的成瘤率  
Table 1 Efficiency of tumor growth of Hepa1-6 cell line

Number of cell/ mouse	Number of tumor
$5 \times 10^5$	0/8
$1 \times 10^6$	3/8
$5 \times 10^6$	8/8
$1 \times 10^7$	8/8

2.5.2 转染肝癌细胞的致瘤性 以每鼠  $5 \times 10^6$  个细胞数, 分别接种 Hepa1-6-B7-1、Hepa1-6-B7-2 及亲本 Hepa1-6 细胞于同系小鼠皮下, 结果发现: Hepa1-6-B7-1 和 Hepa1-6-B7-2 的成瘤率为 0%, 并保持无瘤状态长期存活; 而 Hepa1-6 细胞的成瘤率为 100%, 所有动物在 42 d 内死亡。说明转染了 B7-1 或 B7-2 基因以后, 小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 致瘤性消失。Hepa1-6-B7-1、Hepa1-6-B7-2 和 Hepa1-6 细胞的成瘤率见表 2。

表2 Hepal-6-B7-1、Hepal-6-B7-2 和 Hepal-6 细胞的成瘤率

Table 2 Efficiency of tumor growth of Hepal-6, Hepal-6-B7-1 and Hepal-6-B7-2

Cell line	Number of tumor
Hepal-6	8/8
Hepal-6-B7-1	0/8
Hepal-6-B7-2	0/8

### 3 讨论

有效的基因治疗有赖于外源基因的高效、稳定的表达。在基因转移的手段中,应用病毒载体进行基因转移仍是基因治疗的主要技术线路和应用最广泛的方法。逆转录病毒载体因较高的感染率、能整合和拷贝数恒定、表达期较长及方法成熟,已被用于介导大部分肿瘤基因治疗的研究,进入临床研究的基因治疗项目也多由逆转录病毒所介导。LN 系列是目前最常用的少数几种经美国 FDA 批准可用于临床基因治疗的逆转录病毒载体,其中 LXS<sub>N</sub> 载体全长约 5.8 kb, L 代表逆转录病毒长末端重复序列(Long terminal repeat, LTR), X 代表一可供插入外源治疗基因用的多限制性酶切位点, S 代表猿猴病毒 40(Simian virus 40, SV40)的启动子序列, N 代表新霉素抗性基因(Neo R)。本研究选用逆转录病毒载体作为基因转移的手段,取得了良好效果,基因转移作用稳定。

B7 分子在细胞膜上的表达一般是通过 B7 分子的抗体进行检测。CTLA-4 是 B7 分子的亲和受体,其亲和力远远大于 CD28。CTLA-4Ig 是编码人 CTLA-4 胞膜外区的 cDNA 片段与编码人 IgG1 绞链区 C<sub>H</sub>2 和 C<sub>H</sub>3 区 cDNA 片段融合后产生的融合蛋白,也与 B7 分子高度亲和,我们采用 CTLA-4Ig 的间接免疫荧光法检测 B7 分子在细胞膜上的表达,实验结果表明效果满意。通过 CTLA-4Ig 检测到亲本

Hepal-6 细胞不表达 B7 分子。而许多资料均表明,肿瘤细胞缺乏协同刺激分子 B7 是其免疫治疗疗效不佳的原因之一[4-6]。

免疫基因治疗的一个主要目的就是提高肿瘤细胞的免疫原性。以往人们大多采用导入细胞因子基因或导入 MHC 基因来增强肿瘤细胞的免疫原性,希望藉此能够刺激机体产生强大的免疫抗瘤效应。我们通过逆转录病毒载体将 B7-1、B7-2 基因导入肝癌细胞,研究结果显示,转入 B7 基因的小鼠肝癌细胞,其免疫原性大大增加,致瘤性消失,为进一步应用协同刺激分子 B7 基因治疗肝癌提供了良好的实验基础。

### 参 考 文 献

- 1 修方明,曹雪涛,周正芳,等. 逆转录病毒介导的肿瘤坏死因子基因转染的肿瘤细胞克隆株的建立及其生物学活性的观察. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1995, 2(1): 39
- 2 楼国良,曹雪涛,闵碧荷,等. 腹腔内注射 TNF 基因转染的 LAK 细胞对于腹水型肝癌小鼠的疗效. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1995, 2(1): 32
- 3 Natesan M, Razi-Wolf Z, Reiser H, *et al.* Costimulation of IL-4 production by murine B7-1 and B7-2 molecules. *J Immunol* 1996, 156(8): 2783
- 4 Chen L, McGowan P, Ashe S, *et al.* Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation of T-cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med*, 1994, 179(2): 523
- 5 Chen L, Ashe S, Brady W A, *et al.* Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 1992, 71: 1093
- 6 Hodge J, Abrams S, Schlom J, *et al.* Induction of antitumor immunity by recombinant vaccinia viruses expressing B7-1 or B7-2 costimulatory molecules. *Cancer Res*, 1994, 54: 5552

(1998-01-07 收稿 1998-04-13 修回)