

表达大鼠IL-2、B7-1基因CBRH7919细胞的建立

史瑶平, 郭燕, 李鹤平, 沈俊杰, 杨建勇

■背景资料

肝细胞癌(HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一, 具有极高的发病率和肿瘤相关死亡率。随着分子生物技术的迅速发展和对肿瘤发生分子机制的深入研究, 生物免疫治疗已经成为肝细胞癌综合治疗的重要组成部分。肿瘤细胞疫苗是将完整的肿瘤细胞经物理或化学方法处理及基因修饰后接种于患者, 进入患者体内的肿瘤细胞表面相关或特异性抗原可诱导产生抗肿瘤免疫反应。

史瑶平, 郭燕, 李鹤平, 沈俊杰, 杨建勇, 中山大学附属第一医院放射科 广东省广州市 510080

国家自然科学基金面上资助项目, No. 30600156, No. 81071247, No. 30870692

作者贡献分布: 史瑶平与杨建勇对此文所作贡献均等; 此项研究经费由杨建勇与李鹤平提供; 课题由杨建勇、郭燕、李鹤平及史瑶平设计; 研究过程由史瑶平与沈俊杰操作完成; 数据分析及论文撰写由史瑶平完成; 郭燕、李鹤平及杨建勇提供指导。

通讯作者: 杨建勇, 教授, 510080, 广东省广州市, 中山大学附属第一医院放射科. cjr.yangjianyong@vip.163.com

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-08

Establishment of a CBRH7919 cell line expressing rat IL-2 and B7-1

Yao-Ping Shi, Yan Guo, He-Ping Li, Jun-Jie Shen, Jian-Yong Yang

Yao-Ping Shi, Yan Guo, He-Ping Li, Jun-Jie Shen, Jian-Yong Yang, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30600156, 81071247 and 30870692

Correspondence to: Professor Jian-Yong Yang, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. cjr.yangjianyong@vip.163.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-08

Abstract

AIM: To establish a CBRH7919 cell line CBRH7919 expressing rat IL-2 and B7-1 genes and to examine their ability to express the IL-2 and B7-1 genes *in vitro*.

METHODS: The IL-2 and B7-1 genes were amplified by RT-PCR and subcloned into retroviral vectors pBaBe-puro and pMSCV-neo, respectively, to obtain the recombinant retroviral vectors pBaBe-puro-IL-2 and pMSCV-neo-B7-1. The recombinant plasmids were then transfected into the 293FT packaging cells. The obtained infectious viruses were used to infect the CBRH7919 cell line, and puro/G418-resistant clones were acquired after puro/G418 selection. The expression of IL-2 and B7-1 was detected using Q-PCR, Western blot and ELISA.

RESULTS: The rat IL-2 and B7-1 genes were successfully amplified by RT-PCR, and the recombinant plasmids pBaBe-puro-IL-2 and pMSCV-neo-B7-1 were successfully constructed and verified by direct sequencing. A CBRH7919 cell line (CBRH7919/IL-2/B7-1) expressing rat IL-2 and B7-1 was established. Q-PCR analysis showed that the expression levels of IL-2 and B7-1 mRNAs in CBRH-7919/IL-2/B7-1 cells were 4.15 and 17.04 times higher than those in CBRH-7919-pmscv-neo cells. Western blot analysis showed that the expression level of B7-1 protein in CBRH-7919/IL-2/B7-1 cells was 3 times more than that in unmodified cells, while ELISA showed that expression level of IL-2 was 190 times more than that in unmodified cells.

CONCLUSION: A CBRH7919 cell line stably and effectively expressing rat IL-2 and B7-1 genes was obtained and provides a good basis for further research of immuno-gene therapy of liver cancer.

Key Words: Interleukin-2; B7-1; CBRH7919; Primary liver cancer

Shi YP, Guo Y, Li HP, Shen JJ, Yang JY. Establishment of a CBRH7919 cell line expressing rat IL-2 and B7-1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2660-2663

摘要

目的: 研究携带大鼠IL-2、B7-1目的基因的CBRH7919细胞(即CBRH7919/IL-2/B7-1)体外表达目的基因的能力。

方法: RT-PCR扩增Wistar大鼠IL-2、B7-1目的基因, 分别克隆至重组逆转录病毒载体pBaBe-puro及pMSCV-neo, 构建逆转录病毒载体pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1, 重组质粒转染病毒包装细胞293FT(胚胎肾细胞), 产生病毒后感染CBRH-7919, 用抗生素puro/G418筛选出细胞抗性克隆, 并用RT-QPCR、Western blot及ELISA实验证实抗性细胞在转录水平和蛋白水平IL-2、B7-1的表达情况。

结果: 用RT-PCR方法成功扩增了Wistar大鼠

■同行评议者

胡国信, 副教授, 南昌大学第一附属医院感染内科

IL-2及B7-1目的基因, 经测序结果证实成功构建了pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1重组质粒. 利用该重组质粒成功构建了CBRH7919/IL-2/B7-1细胞系, 实时荧光定量PCR检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞中IL-2和B7-1基因的平均表达量分别是CBRH-7919-pmscv-neo的4.153倍和17.040倍; West blot检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞B7-1表达是无基因修饰CBRH7919的3倍; ELISA法检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞IL-2表达量是无基因修饰CBRH7919的190余倍.

结论: 成功建立了稳定高效表达大鼠IL-2、B7-1的CBRH7919/IL-2/B7-1细胞系, 为下一步开展研究肝癌免疫基因治疗奠定了基础.

关键词: 白介素2; B7-1; CBRH7919; 原发性肝癌

史瑶平, 郭燕, 李鹤平, 沈俊杰, 杨建勇. 表达大鼠IL-2、B7-1基因CBRH7919细胞的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2660-2663
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2660.asp>

0 引言

恶性肿瘤是威胁人类健康和生命的主要疾病之一, 手术、放疗和化疗是肿瘤治疗的三大常规手段, 随着分子生物技术的迅速发展和对肿瘤发生分子机制的深入研究, 生物免疫治疗已经成为肿瘤综合治疗的第4种模式. 机体对肿瘤细胞的免疫排斥主要依赖于T细胞产生的细胞免疫反应^[1], T淋巴细胞的激活需要两类信号: 一类是传统的特异的抗原递呈信号; 另一类是非抗原特异的, 非MHC限制的共刺激信号^[2]. 将细胞因子基因和(或)共刺激分子基因导入肿瘤细胞, 造成肿瘤微环境中细胞因子高表达, MHC等抗原分子表达增加, 肿瘤细胞免疫原性增强, 能有效激活肿瘤特异性免疫反应^[3,4]. 本研究构建携带大鼠IL-2、B7-1目的基因的逆转录病毒, 通过病毒感染特定的大鼠CBRH 7919肝癌细胞, 建立稳定高效表达IL-2、B7-1基因的细胞系CBRH7919/IL-2/B7-1, 为进一步研究IL-2、B7-1的功能及为下一步开展研究肝癌免疫基因治疗奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 逆转录病毒载体质粒pBaBe-puro、pMSCV-neo(Biovector Science Lab); DH5 α 感受态细

胞(广州博川生物科技有限公司); 293FT(Sigma, Cat no. H9268); 引物合成(Invitrogen公司); 各种限制性内切酶(NEB公司); PrimeSTAR HS DNA聚合酶、T4 DNA ligase、DNA聚合酶(TaKaRa公司); 质粒提取试剂盒、DNA凝胶纯化试剂盒、DNA产物纯化试剂盒(Tiagen公司); β -actin一抗(博士德); B7-1一抗(Santa Cruz). 胎牛血清、DMEM高糖培养基(Gibco公司); 嘌呤霉素、硫酸新霉素(MD公司).

1.2 方法

1.2.1 大鼠IL-2及B7-1基因扩增: 以Wistar大鼠cDNA为模板, 通过PCR扩增出IL-2及B7-1基因. 根据NCBI上已经提交的IL-2及B7-1基因序列设计引物, IL-2基因可用BamH I和EcoR I进行酶切, B7-1基因可用EcoR I和Bgl II进行酶切. 引物序列为: IL-2-F: 5'CGGGATCCATGTACAGCATGCAGCTCG3', IL-2-R: 5'CCGGAATTCTTACTGAGTCATTGTTGAGAT3'; B7-1-F: 5'GCCGAATTCATGGCTTACAGTTGCCAGCT3', B7-1-R: 5'GCCAGATCTTCAAA-CAGTCTGTTTCGGCTG3'.

1.2.2 构建pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1重组载体: 用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒从PCR产物中回收目的基因片段. 把IL-2基因的胶回收产物和pBaBb-puro载体分别用EcoR I和BamH I进行酶切, B7基因的胶回收产物和pMSCV-neo载体分别用EcoR I和Bgl II进行酶切, 酶切产物均用天根生化的PCR产物纯化试剂盒进行纯化回收, 用TaKaRa的T4 DNA连接酶, 16℃连接过夜; 连接体系中PCR纯化产物和载体的摩尔比采用3:1到8:1的连接比例, 以此来调整连接体系中的PCR纯化产物所加的体积, 来优化连接体系. 将连接产物转化大肠杆菌DH5 α , 经菌落PCR筛选出阳性克隆后送公司测序.

1.2.3 重组逆转录病毒原液的制备: 磷酸钙转染法将pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1转染病毒包装细胞293FT(胚胎肾细胞). 转染48 h后收集病毒上清液, 0.45 μ m微孔滤膜过滤去除细胞及细胞碎屑, 此即病毒原液, 等份分装, 置-80℃冰箱保存备用.

1.2.4 表达大鼠IL-2及B7-1 CBRH7919细胞的建立: 将上述感染性病毒颗粒感染CBRH7919细胞, 37℃孵育3 h, 吸弃上清液, 换新病毒上清液孵育3 h, 重复2次. 48 h后, 用抗生素puro/G418(0.5 mg/L)筛选获得阳性细胞, 将该细胞系命名为CBRH7919/IL-2/B7-1细胞.

■ 相关报道

葛宁灵等报道了IL-2和B7-1基因联合修饰的Hep6-IL2/B7肝癌疫苗能有效激活小鼠体内的细胞毒性淋巴细胞, 并能对亲代肿瘤细胞产生明显的特异性杀伤作用. Alexander Buchner等用CD80和IL-2基因联合修饰的RCC-26/CD80/IL-2疫苗治疗晚期转移性肾癌患者, 证实大部分病人能够产生针对肿瘤相关抗原的免疫学反应.

■应用要点

本实验所建立的IL-2、B7-1双基因修饰的CBRH7919/IL-2/B7-1细胞,能广泛用于Wistar大鼠移植性肝癌模型(CBRH7919)的免疫治疗研究,而此模型相对于目前广泛应用的其他模型而言能更好地模拟人原发性肝癌的特性,故可以为肝癌基因免疫治疗提供实验基础。

表 1 ELISA法检测肿瘤细胞IL-2含量 (ng/L)

分组	样品浓度	A ₄₅₀	蛋白含量	平均
CBRH7919细胞	0.068	0.019	0.6837	0.304933
	0.068	0.019	0.6837	
	0.067	0.018	-0.4526	
空载组	0.066	0.017	-1.5889	-0.07383
	0.068	0.019	0.6837	
	0.068	0.019	0.6837	
CBRH7919/IL-2/B7-1	0.119	0.070	58.635	59.01377
	0.121	0.072	60.9076	
	0.118	0.069	57.4987	

1.2.5 CBRH7919/IL-2/B7-1细胞的体外鉴定: 实时荧光定量PCR的方法, 采用Sybrgreen染料法, 以 β -actin为内参基因, 对于空载组和CBRH7919/IL-2/B7-1细胞中IL-2、B7-1基因的表达量进行检测; ELISA法分别检测CBRH7919、空载组及CBRH7919/IL-2/B7-1细胞上清液中IL-2含量; Western blot法分别检测CBRH7919、空载组及CBRH7919/IL-2/B7-1细胞中B7-1含量。

2 结果

2.1 重组载体pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7的构建 利用Wistar大鼠成功扩增出IL-2及B7-1目的基因; 将目的基因分别克隆至重组逆转录病毒载体pBaBe-puro及pMSCV-neo构建了重组载体pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1, 将重组载体分别转化大肠杆菌DH5 α , 经菌落PCR鉴定后挑取的阳性克隆测序结果证实pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7载体构建成功。

2.2 表达大鼠IL-2和B7-1基因CBRH7919细胞的体外鉴定 实时荧光定量PCR检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞中IL-2和B7-1基因的平均表达量为4.15和17.04, 分别是CBRH-7919-pmscv-neo的4.15倍和17.04倍; Western blot检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞B7-1表达是无基因修饰CBRH7919的3倍(图1); ELISA法检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞IL-2表达量是无基因修饰CBRH7919的190余倍(表1)。

3 讨论

在肿瘤的发生过程中, 虽然机体具有严密的免疫监视机制, 但恶变的肿瘤细胞自身存在免疫原性减弱、MHC分子表达下调或异常, 共刺激分子B7等缺失等因素, 因此, 在某些情况下他们有可能通过多种机制逃避机体的免疫监视, 从

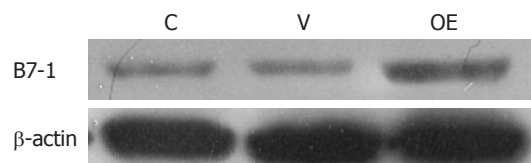


图 1 Western blot检测CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞中B7-1基因表达产物。C: CBRH7919细胞; V: 空载组; OE: CBRH7919/IL-2/B7-1。

而导致肿瘤的发生^[5]。

IL-2是由T淋巴细胞或NK细胞分泌产生的一种重要的细胞因子, 能够促进T细胞的增殖、活化, 并刺激MHC II类抗原等多种细胞表面分子的表达和多种细胞因子的产生, 从而增强疫苗免疫效果并发挥佐剂作用^[6]。B7-1作为共刺激分子, 在T细胞的活化中发挥重要的第二刺激信号的作用^[1]。由于绝大多数肿瘤不表达或低表达B7-1分子, 导致癌细胞逃避机体免疫监视, 因而机体免疫系统无法识别并有效杀伤^[7], 缺乏了共刺激信号, 体内的T淋巴细胞将不可能对肿瘤等抗原产生有效的反应进而出现免疫耐受, 机体也就易于形成肿瘤^[8]。B7-1基因在肿瘤细胞中的表达能够增强肿瘤细胞的免疫原性, 激活T淋巴细胞产生有效的抗肿瘤效应。Ge等^[9]报道了IL-2和B7-1基因联合修饰的Hep6-IL2/B7肝癌疫苗能有效激活小鼠体内的细胞毒性淋巴细胞, 并能对亲代肿瘤细胞产生明显的特异性杀伤作用。Buchner等^[10]用CD80和IL-2基因联合修饰的RCC-26/CD80/IL-2疫苗治疗晚期转移性肾癌患者, 证实大部分病人能够产生针对肿瘤相关抗原的免疫学反应。

本实验采用来源于Wistar大鼠的原发性肝癌细胞CBRH7919, 利用逆转录病毒的整合特性, 由逆转录病毒载体介导的pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1转移到CBRH7919细胞, 筛

选阳性克隆, 通过RT-QPCR、Western blot及ELISA等方法分别从mRNA和蛋白质水平上检测了IL-2、B7-1的表达情况. 以上结果提示与正常CBRH7919细胞相比, CBRH7919/IL-2/B7-1细胞在转录水平和蛋白水平IL-2和B7-1的表达均有明显的提高, 表明成功建立了高效表达IL-2、B7-1的大鼠CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞.

CBRH-7919细胞为二乙基亚硝胺诱发Wistar大鼠所得的甲胎蛋白阳性的原发性肝癌细胞^[1], 已有报道利用CBRH7919细胞建立Wistar大鼠移植性肝癌模型并进行相关研究^[12-15]. 由CBRH7919细胞建立的原位移植性肝癌模型相比Walker-256原位肝癌模型能更好地模仿人原发性肝癌的特性, 相比小鼠或裸鼠肝癌模型可进行更广泛的研究, 如肝动脉插管局部给药等介入治疗领域的研究. 故本实验采用CBRH7919细胞为研究对象, 成功建立了高效表达大鼠IL-2、B7-1的CBRH7919/IL-2/B7-1细胞, 为进一步研究IL-2、B7-1的功能及下一步开展研究肝癌免疫基因治疗奠定了基础.

4 参考文献

- 1 Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellström I, Hellström KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counter-receptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 1992; 71: 1093-1102
- 2 Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248: 1349-1356
- 3 Tepper RI, Mulé JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 153-164
- 4 Wu S, Ma J, Che X, Liu Y, Wang H, Zhao J, Shen F, Xie T, Trojan J, Wu M, Guo Y. Treatment of hepatocellular carcinoma with the cellular tumor vaccines generated by in vitro modification of tumor cells with non gene transfer approaches. *Adv Exp Med Biol* 1998; 451: 283-293
- 5 Ridolfi L, Petrini M, Fiammenghi L, Riccobon A, Ridolfi R. Human embryo immune escape mechanisms rediscovered by the tumor. *Immunobiology* 2009; 214: 61-76
- 6 Nunberg JH, Doyle MV, York SM, York CJ. Interleukin 2 acts as an adjuvant to increase the potency of inactivated rabies virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 4240-4243
- 7 Tatsumi T, Takehara T, Katayama K, Mochizuki K, Yamamoto M, Kanto T, Sasaki Y, Kasahara A, Hayashi N. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 25: 1108-1114
- 8 Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellström I, Hellström KE. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 1994; 179: 523-532
- 9 Ge NL, Ye SL, Zheng N, Sun RX, Liu YK, Tang ZY. Prevention of hepatocellular carcinoma in mice by IL-2 and B7-1 genes co-transfected liver cancer cell vaccines. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2182-2185
- 10 Buchner A, Pohla H, Willmsky G, Frankenberger B, Frank R, Baur-Melnyk A, Siebels M, Stief CG, Hofstetter A, Kopp J, Pezzutto A, Blankenstein T, Oberneder R, Schendel DJ. Phase 1 trial of allogeneic gene-modified tumor cell vaccine RCC-26/CD80/IL-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 2010; 21: 285-297
- 11 朱德厚, 叶秀珍, 陈瑞铭. 大鼠肝癌细胞(CBRH-7919)的建株及其生物学特性研究. *实验生物学报* 1980; 13: 22
- 12 沈俊杰, 李鹤平, 张冰, 谭国胜, 杨建勇. Wistar大鼠移植性肝癌模型的建立. *临床放射学杂志* 2011; 30: 56
- 13 Jiang H, Meng Q, Tan H, Pan S, Sun B, Xu R, Sun X. Antiangiogenic therapy enhances the efficacy of transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 2007; 121: 416-424
- 14 Sun X, Jiang H, Jiang X, Tan H, Meng Q, Sun B, Xu R, Krissansen GW. Antisense hypoxia-inducible factor-1alpha augments transcatheter arterial embolization in the treatment of hepatocellular carcinomas in rats. *Hum Gene Ther* 2009; 20: 314-324
- 15 Zhong XG, He S, Yin W, Deng JY, Cheng B. Selective tropism of liver stem cells to hepatocellular carcinoma in vivo. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3886-3891

■同行评价

本文的科学性、创新性和可读性基本能反映肿瘤免疫治疗基础研究的先进水平.

编辑 李薇 电编 何基才