论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0810-04

腺病毒介导 CTLA4Ig 转染正常人肝细胞株的研究

刘潇聪,陈耀凯,李俊刚,刘国栋,谭朝霞,郭 艳,程 玲,王宇明 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军感染病研究所)

[摘要] **目的** 研究腺病毒介导 CTLA4Ig 基因转染正常人肝细胞株 L02 后,CTLA4Ig 在 L02 细胞内的表达、生物学活性以及对 L02 细胞生物学特性的影响。**方法** 重组腺病毒载体 Ad-CTLA4Ig-EGFP 转染体外培养的正常人肝细胞株 L02,观察绿色荧光在细胞内的表达情况。以免疫细胞化学、Western blot、ELISA 等方法检测 CTLA4Ig 在 L02 细胞内、外的表达情况;通过绘制细胞生长曲线、检测尿素合成能力观察转染前后 L02 细胞的生物学特性;转染后的 L02 细胞与大鼠脾脏细胞共培养,通过检测脾脏细胞增殖情况评价表达 CTLA4Ig 的 L02 细胞在体外的免疫耐受活性;收集共培养体系中的大鼠脾脏细胞,再分别与正常 L02 细胞、HeLa 细胞共培养,检测脾细胞增殖情况以评价转染后 L02 细胞免疫耐受的特异性。**结果** 转染后的 L02 细胞可在细胞质内大量表达 CTLA4Ig 蛋白,并分泌至培养上清中;转染后 L02 细胞生长速度无明显改变($P>0.05$),单个细胞尿素合成能明显升高[(0.56 ± 0.01) pmol/d,$P<0.01$];转染后的 L02 细胞在体外可显著抑制大鼠脾脏细胞的增殖(抑制率约为 36.8%,$P<0.05$),被抑制后的大鼠脾脏细胞在正常 L02 细胞刺激下增殖较低,但在 HeLa 细胞刺激下则可显著增殖($P<0.01$)。**结论** Ad-CTLA4Ig-EGFP 转染后的 L02 细胞可表达具有生物学活性的 CTLA4Ig,并在体外表现出显著的具有抗原特异性的免疫抑制活性。

[关键词] CTLA4Ig;腺病毒载体;L02 细胞

[中图法分类号] R322.47;R392.13;R392-33 **[文献标志码]** A

Normal human liver cell line L02 appears immunological inhibition after by CTLA4Ig gene modification

Liu Xiaocong, Chen Yaokai, Li Jungang, Liu Guodong, Tan Zhaoxia, Guo Yan, Cheng Ling, Wang Yuming (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of CTLA4Ig in normal human liver cell line L02 that transducted with Ad-CTLA4Ig-EGFP, and to explore their biological activity and changes in biological characteristics. **Methods** Normal liver cells L02 were transducted with Ad-CTLA4Ig-EGFP. The expression of green fluorescence in the cells was observed. Immunocytochemistry, Western blotting and ELISA were used to detect the expression of CTLA4Ig in L02 cells. Changes of biological characteristics in CTLA4Ig transducted L02 cells (CTLA4-L02) were observed through cell proliferation curve and urea synthesis. After the transducted cells were co-cultured with rat splenocytes for 72 h, the proliferation of splenocytes were detected by MTT assay. The co-cultured splenocytes were then co-cultured with HeLa cells and normal L02 cells respectively for another 72 h, then the proliferation of splenocytes was examined again. **Results** CTLA4Ig were highly expressed in the cytoplasm of CTLA4-L02 cells, and were secreted to the culture supernatant. No obvious change in growth speed was observed after transduction ($P>0.05$), but the synthesis of urea was enhanced after transduction [(0.56 ± 0.01) pmol/d, $P<0.01$]. The proliferation of rat splenocytes was inhibited by 36.8% ($P<0.05$) when co-cultured with CTLA4-L02. The inhibited splenocytes mentioned previously kept a low proliferative rate when co-cultured with normal L02 cells, but showed a high proliferative rate when co-cultured with HeLa cells ($P<0.01$). **Conclusion** After transfected with Ad-CTLA4Ig-EGFP, L02 cells express active CTLA4Ig and show immunological inhibition, but no obvious negative change in biological characteristics is observed.

[Key words] CTLA4Ig; adenovirus vector; L02 cells

Corresponding author: Chen Yaokai, E-mail: yaokaichen@hotmail.com

[通信作者] 陈耀凯,电话:(023)68754475,E-mail: yaokaichen@hotmail.com

肝细胞移植是治疗肝衰竭和代谢性肝病的重要手段之一,但排斥反应影响移植肝细胞的长期存活和远期疗效。细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4免疫球蛋白(cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4-immunoglobulin, CTLA4Ig)是CTLA4分子胞外功能区与免疫球蛋白IgG恒定区相结合的融合性可溶性蛋白,可与T淋巴细胞表面的CD28分子竞争性结合抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)表面的B7分子,阻断T细胞活化的共刺激通路,抑制T细胞活化,诱导对特异性抗原的免疫耐受[1,2]。近年研究显示,体内注射CTLA4Ig蛋白或CTLA4Ig基因体内转染,可有效诱导包括肝细胞移植在内的多种动物器官移植模型免疫耐受[3-6]。但全身应用CTLA4Ig可能干扰机体免疫功能并导致非特异性免疫抑制。本实验利用重组腺病毒载体携带CTLA4Ig基因,在体外转染正常人肝细胞株L02,观察CTLA4Ig在L02中的表达及其生物学活性,以期建立一种通过移植肝细胞自身表达CTLA4Ig诱导免疫耐受的方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料

重组人CTLA4Ig腺病毒载体Ad-CTLA4Ig-EGFP(由第三军医大学西南医院烧伤研究所移植免疫组惠赠),正常人肝细胞株L02(中国科学院上海细胞库),山羊抗人CTLA4Ig多克隆抗体(Sant Cruz,美国),甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)(Sigma,美国),CTLA4 ELISA试剂盒、IL-2 ELISA试剂(Bender MedSystems,奥地利),生化检测仪(Hitachi日本)。

1.2 方法

1.2.1 腺病毒介导CTLA4Ig基因转染L02细胞 选择生长至70%融合的L02细胞,PBS润洗2次,加入少量无血清DMEM培养基,根据细胞数加入Ad-CTLA4Ig-EGFP(腺病毒滴度为7.5×10^{10} PFU/ml),使重复感染度(multiple of infection, MOI)约为600,十字形晃动3次使腺病毒与细胞充分接触,于37 ℃、5% CO_2温箱内培养90 min后,加入含10%胎牛血清的DMEM培养基。转染后在倒置荧光显微镜下连续观察L02细胞绿色荧光蛋白表达情况。以正常L02细胞为对照,通过流式细胞仪检测绿色荧光蛋白以确定转染效率。

1.2.2 免疫细胞化学检测 Ad-CTLA4Ig-EGFP转染后L02细胞(CTLA4-L02)中CTLA4Ig蛋白表达:收集转染后72 h的L02细胞,制备细胞爬片,进行免疫细胞化学染色。以山羊抗人CTLA4Ig多克隆抗体为一抗,生物素标记兔抗山羊IgG为二抗,按常规免疫细胞化学方法进行检测,DAB显色,苏木精复染,显微镜下观察、照相。棕黄色染色为阳性信号。

1.2.3 Western blot检测CTLA4-L02培养上清中CTLA4Ig蛋白表达 以10 cm培养皿培养Ad-CTLA4Ig-EGFP转染后的L02细胞,分别收集转染后1、2、3、7、14、21 d的培养上清,浓缩离心提取蛋白;以山羊抗人CTLA4Ig多克隆抗体为一抗,生物素标记兔抗山羊IgG为二抗,按照Western blot常规方法检测上清中CTLA4Ig蛋白,以纯化的CTLA4Ig蛋白为阳性对照,以正常L02细胞的培养上清为阴性对照。

1.2.4 ELISA法检测CTLA4-L02 培养上清中CTLA4Ig蛋白含量:以6孔板培养转染后的L02细胞,分别收集转染后1、2、3、7、14、21、28 d的培养上清,于-80 ℃冻存。除第1天外,以后每次收集标本的前1 d均进行换液。按照CTLA4 ELISA试剂盒说明书步骤检测不同时间点培养上清中CTLA4Ig浓度($n=3$)。

1.2.5 CTLA4-L02细胞生长特性分析 取2个24孔板,分别接种正常L02细胞和CTLA4-L02细胞各1×10^4/孔。培养第2天起,每天每板选择3孔,弃去培养基,每孔加入450 μl无血清DMEM培养基和50 μl MTT工作液(5 mg/ml),37 ℃、5% CO_2温箱内孵育4 h后,弃去上清,每孔加入二甲亚砜(DMSO)500 μl,振荡10 min后,各孔吸取100 μl上清于96孔板中,以酶标仪检测490 nm波长下的光密度值[$D(490)$]。以$D(490)$值为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制细胞生长曲线。

1.2.6 CTLA4-L02细胞尿素合成能力检测 12孔板中分别接种正常L02细胞、Ad-EGFP转染后的L02细胞(EGFP-L02)以及CTLA4-L02细胞各3孔,剩余3孔留作空白对照。待细胞铺满孔底时,以PBS润洗细胞3次,加入新鲜无血清无酚红的RPMI1640培养基0.5 ml(包括空白孔),继续培养48 h后,收集上清,以生化仪检测尿素含量,同时消化细胞计数,并计算各组平均每天单个细胞合成尿素的能力($n=3$)。

1.2.7 CTLA4-L02细胞体外免疫学效应检测

1.2.7.1 对大鼠淋巴细胞增殖的抑制率检测 取1块24孔板,分别接种正常L02细胞、EGFP-L02细胞、CTLA4-L02细胞各3孔,每孔4×10^5个;空白组3孔,不接种细胞。细胞贴壁生长后,弃去上清,每孔接种自成年雄性SD大鼠脾脏分离的淋巴细胞2 ml(约含细胞2×10^6个),温箱中共同孵育72 h后,轻轻吹打混匀悬浮生长的淋巴细胞,各孔收集细胞悬液500 μl,MTT法检测细胞增殖情况。

1.2.7.2 抗原特异性免疫耐受检测 在另外一块24孔板中分别接种HeLa细胞、正常L02细胞各3孔,每孔4×10^5个;空白组3孔不接种细胞。每孔加入1.2.7.1中CTLA4-L02组共培养72 h后的淋巴细胞2×10^5个,温箱中共培养72 h,同上法检测淋巴细胞增殖。

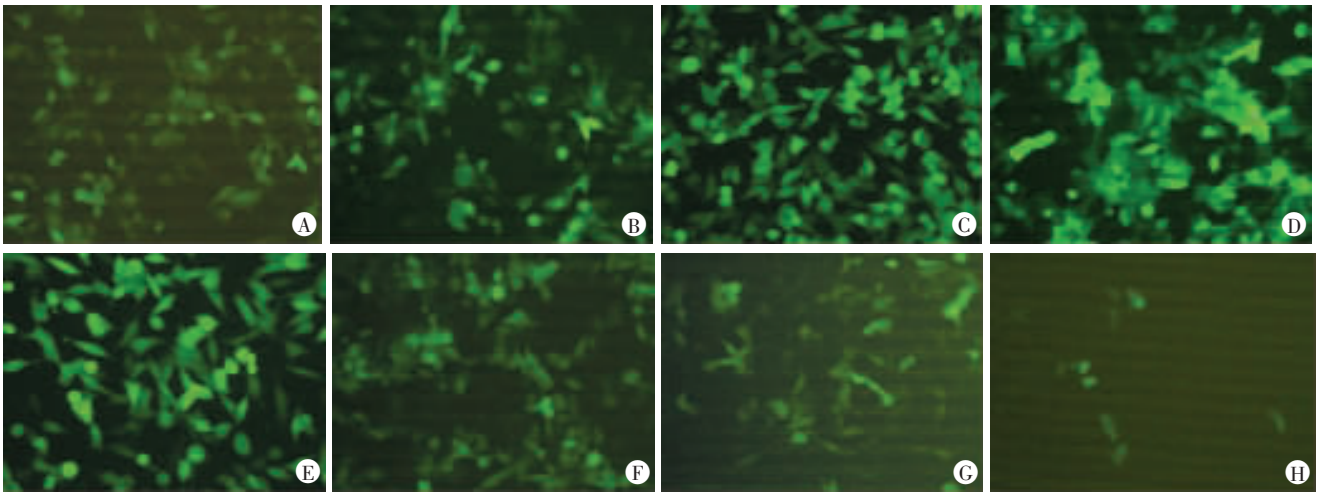
1.3 统计学处理

数据均以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,组间比较行t检验或方差分析。

2 结果

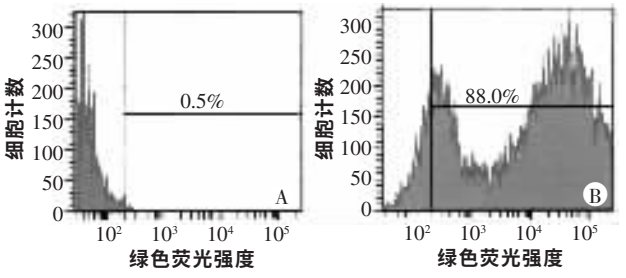
2.1 腺病毒介导CTLA4Ig在L02细胞内的表达

转染后6 h即可见细胞质表达绿色荧光,48~72 h时荧光强度达峰值,可持续较强表达2周,随后逐渐衰减,28 d时尚余微弱荧光(图1)。转染后细胞细胞质内可见增多的颗粒,大体形态无明显变化。经流式细胞仪检测,MOI约为600时,转染效率平均可达88%(图2)。免疫细胞化学染色显示,转染后L02细胞细胞质内有大量CTLA4Ig阳性表达,呈深棕色染色(图3)。Western blot检测结果显示CTLA4-L02培养上清中存在CTLA4Ig蛋白(图4)。ELISA检测结果显示,转染后1周时上清中CTLA4Ig浓度达峰值,为(16.55±1.20)ng/ml。



A:6 h;B:12 h;C:24 h;D:72 h; E:7 d;F:14 d;G:21 d;H:28 d

图1 Ad-CTLA4Ig-EGFP 转染 L02 不同时间荧光观察 （倒置荧光显微镜 ×400）



A:普通 L02 细胞;B:转染后 48 h L02 细胞

图2 流式细胞仪检测普通 L02 细胞与转染后 48 h 的 L02 细胞 EGFP 的表达 （MOI=600）

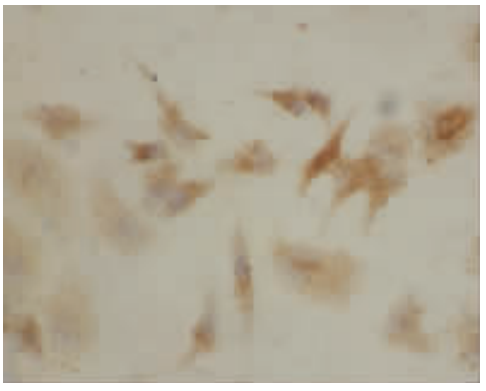
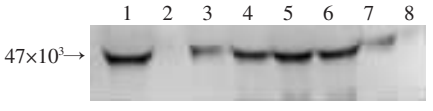


图3 转染后 72 h L02 细胞中 CTLA4Ig 蛋白的表达 （ICC ×400）



1:CTLA4Ig 标准品;2:未转染组;3~8:转染后 1、2、3、7、14、21 d

图4 Western blot 检测转染后不同时间 L02 培养上清中 CTLA4Ig

2.2 转染后 L02 细胞生长特性

转染后初期 L02 细胞生长速度减慢，营养消耗加大，换液频次增加。以 MTT 法绘制的细胞生长曲线显示，进入对数生长期后，CTLA4-L02 生长速度略微慢于 L02，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。随着培养时间的延长，表达绿色荧光的细胞逐渐减少、荧光强度逐渐减弱，L02 细胞生长速度及规律与转染前趋于一致（图5）。

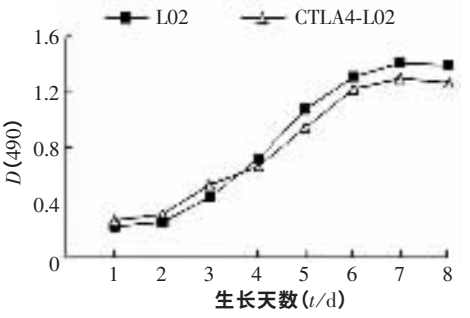


图5 Ad-CTLA4Ig-EGFP 转染后 L02 细胞生长速度的变化

2.3 转染前后 L02 细胞尿素合成能力分析

以生化仪测定培养上清中尿素含量，结果显示正常单个 L02 细胞尿素合成能力为（0.39±0.01）pmol/d，Ad-EGFP 转染后单个 L02 细胞尿素合成能力为（0.44±0.02）pmol/d（$P<0.05$），Ad-CTLA4Ig-EGFP 转染单个 L02 细胞后尿素合成能力为（0.56±0.01）pmol/d。转染后 L02 细胞合成尿素的能力较未转染组明显增强（$P<0.01$）。

2.4 转染后 L02 细胞表达 CTLA4-Ig 体外抑制 T 淋巴细胞增殖的活性

CTLA4-L02 与大鼠淋巴细胞混合培养后，MTT 法检测淋巴细胞增殖结果显示：大鼠脾脏细胞在正常 L02 细胞或 EGFP-L02 细胞的刺激下均可显著增殖，光密度值明显高于与 CTLA4-L02 细胞共培养的大鼠脾脏细胞（$P<0.05$），抑制率约为 36.8%。经 CTLA4-L02 抑制后的大鼠脾脏细胞（I-splenocytes）再接受正常 L02 细胞刺激时仅发生轻度增殖，光密度值明显低于接受 HeLa 细胞刺激的脾细胞（$P<0.01$）。

3 讨论

在排斥反应中，$CD4^+$ T 淋巴细胞活化是启动排斥反应的主要环节。T 淋巴细胞表面的多种辅助分子

(共刺激分子)与APC的配体互相作用,即所谓共刺激通路,是T淋巴细胞活化的必要条件[7]。B7/CD28通路是T细胞激活过程中起主要作用的共刺激通路之一。CTLA4Ig可与CD28分子竞争性结合B7配体,从而阻断B7/CD28通路,在基因转录前和转录后两个水平上减少白细胞介素(IL-2)产生,抑制T细胞活化、增殖[8]。因此,CTLA4Ig成为移植免疫研究的热点分子。

Fisher等[9]回顾性研究了1993年到2006年在全球范围内进行的78例临床肝细胞移植,结果显示移植的肝细胞能较好的提供近期和长期的肝功能。但同肝脏移植一样,排斥反应制约着肝细胞移植的发展。CTLA4Ig已被证实在肝细胞移植中可有效诱导免疫耐受。其主要应用方法为CTLA4Ig蛋白的全身应用或各种载体介导CTLA4Ig基因的全身转染[10,11]。但此类方法可能干扰机体整体免疫功能并导致非特异性免疫抑制[12]。我们希望通过体外基因转染使CTLA4Ig在肝细胞内短暂表达,达到既诱导免疫耐受,又不影响整体免疫功能的目的。

本研究以腺病毒载体携带人CTLA4Ig基因(Ad-CTLA4Ig-EGFP),体外转染正常人肝细胞株(L02),结果显示,在适合的MOI条件下,Ad-CTLA4Ig-EGFP对L-02细胞的转染效率可高达88%;Western blot和ELISA显示细胞培养上清中可检测到CTLAIg蛋白,表明转染后细胞质表达的CTLA4Ig蛋白可分泌至细胞外。以质粒、逆转录病毒等载体介导的基因转染,目的基因与宿主基因发生融合,因而可持续表达。但如果CTLAIg蛋白在体内持续长期表达,可能产生非特异性免疫抑制,从而使整体免疫功能受损。本实验中,通过对EGFP荧光报告基因的观察及对培养上清中CTLAIg的检测显示,腺病毒介导的CTLAIg基因表达可持续4周左右,然后逐渐减弱。这种短时表达则可避免以上情况发生。细胞生长曲线显示,转染后L02细胞生长速度有所减慢,但这种减慢并不显著,且随着CTLA4Ig目的基因表达的逐渐减少,其生长速度又回复正常。肝细胞合成能力方面,本实验结果显示,转染后的L02细胞尿素合成能力较转染前是增加的,目前尚无法对该现象作出合理解释。

将大鼠脾脏细胞分别与正常L02细胞、Ad-EGFP转染后的L02细胞(EGFP-L02)以及Ad-CTLA4Ig-EGFP转染后L02细胞(CTLA4-L02)混合培养后,检测脾脏细胞增殖结果显示:CTLA4-L02可显著抑制大鼠脾脏细胞的增殖,抑制率约为36.8%。显示L02细胞表达的CTLA4Ig在体外具有免疫抑制活性。在进一步实验中,我们将与CTLA4-L02共培养后的大鼠脾脏细胞分别与正常L02细胞以及HeLa细胞共培养,发现与L02细胞共培养的脾脏细胞增殖率明显低于与HeLa细胞共培养的脾脏细胞。结果显示,CTLA4Ig诱导的免疫抑制具有一定的抗原特异性,当诱导过的脾细胞再次接触同一细胞抗原时,其增殖仍可受到抑制,但接触其他不同细胞抗原时,这种抑制作用则表现不明显。这种特点提示我们,虽然腺病毒介导的CTLAIg表达只能持续一定时间,但只要在此期间可成功诱导机体免疫耐受,即使以后CTLAIg蛋白表达逐渐减少乃至消失,已经耐受的淋巴细胞仍可对同一抗原表现免疫耐受。

综上所述,本实验采用腺病毒载体携带CTLA4Ig基因体外转染L02细胞,可使其有效表达CTLA4Ig蛋白,并可在体外有效移植大鼠淋巴细胞的增殖;同时,转染并未对L02细胞的生长特性和生物合成功能产生明显负面影响。这种体外转染CTLA4Ig基因的肝细胞移植入体内后能否成功诱导免疫耐受值得进一步研究。

参考文献:

[1] Linsley P S, Wallace P M, Johnson J, *et al*. Immunosuppression *in vivo* by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule[J]. Science, 1992, 257(5071): 792-795.
[2] Gause W C, Halvorson M J, Lu P, *et al*. The function of costimulatory molecules and the development of IL-4-producing T cells[J]. Immunol Today, 1997, 18(3): 115-120.
[3] Lu S, Yu Y, Gao Y, *et al*. Immunological inhibition of transplanted liver allografts by adeno-associated virus vector encoding CTLA4Ig in rats[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2008, 7(3): 258-263.
[4] 潘华, 王璐, 张旭东, 等. 非清髓性方案在诱导大鼠后肢移植免疫耐受中的应用[J]. 中华外科杂志, 2009, 47(12): 937-940.
[5] Verbinnen B, Billiau A D, Vermeiren J, *et al*. Contribution of regulatory T cells and effector T cell deletion in tolerance induction by costimulation blockade[J]. J Immunol, 2008, 181(2): 1034-1042.
[6] Takekubo M, Tsuchida M, Haga M, *et al*. Hydrodynamics-based delivery of plasmid DNA encoding CTLA4-Ig prolonged cardiac allograft survival in rats[J]. J Gene Med, 2008, 10(3): 290-297.
[7] 何维. 医学免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 242.
[8] Sansom D M, Manzotti C N, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? [J]. Trends Immunol, 2003, 24(6): 314-319.
[9] Fisher R A, Strom S C. Human hepatocyte transplantation: worldwide results[J]. Transplantation, 2006, 82(4): 441-449.
[10] Schmitz V, Neumann U P, Fischer U, *et al*. Induction of long-term graft acceptance by a combination treatment of donor splenocytes and CTLA4Ig in a high responder rat liver transplantation model[J]. Transpl Int, 2005, 18(10): 1187-1196.
[11] Jiang G P, Hu Z H, Zheng S S, *et al*. Adenovirus mediated CTLA4Ig gene inhibits infiltration of immune cells and cell apoptosis in rats after liver transplantation[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(7): 1065-1069.
[12] Wang Y, Ni Y, Wei H, *et al*. Stable skin-specific overexpression of human CTLA4-Ig in transgenic mice through seven generations[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2006, 38(3): 171-178.

(**收稿**:2009-11-27;**修回**:2009-12-30)
(编辑 栾 嘉)