文章编号:1000-5404(2011)14-1467-04

论著

β防御素2在恶性黑色素瘤B16细胞中的稳定表达及其生物学效应研究

梅寒芳[1,2],金小宝[1],朱家勇[1] (510006 广州,广东药学院;广东省生物活性药物研究重点实验室[1],基础学院生物化学与分子生物学系[2])

[摘要] **目的** 建立稳定表达防御素mBD2的恶性黑色素瘤细胞B16-mBD2,研究mBD2对B16细胞生物学特性的影响。**方法** 在前期构建好mBD2真核表达质粒的基础上,脂质体法转染恶性黑色素瘤B16细胞,G418筛选得到稳定表达细胞株B16-mBD2,RT-PCR和Western blot从mRNA和蛋白角度鉴定mBD2分子的表达;MTT法鉴定其生长曲线;流式细胞仪分析细胞周期分布、凋亡情况及细胞膜表面分子CD80、CD86、MHCⅠ(H-2K^d)、MHCⅡ(I-A^d)的表达。**结果** 成功构建稳定表达mBD2的B16细胞,RT-PCR和Western blot分别从mRNA及蛋白水平验证了mBD2分子表达;稳定表达mBD2的细胞B16-mBD2与转染空载体的B16-p细胞及野生型B16细胞相比,细胞增殖明显减慢,从48 h开始,各时间点细胞活力显著降低($P<0.05$);B16-mBD2细胞处于S期的比例(36.03±0.97)%显著增高($P<0.05$);凋亡率及细胞膜表面分子CD80、CD86、MHCⅠ(H-2K^d)、MHCⅡ(I-A^d)表达无明显差异($P>0.05$)。**结论** mBD2明显抑制恶性黑色素瘤B16细胞的增殖,其机制可能与诱导细胞周期S期阻滞有关;mBD2对细胞凋亡率及细胞膜表面免疫分子的表达无影响。

[关键词] 防御素;天然免疫;恶性黑色素瘤
[中图法分类号] R392.2;R730.2;R739.5 [文献标志码] A

Stable expression of β defensin 2 in melanoma B16 cells and study on its biological effect

Mei Hanfang[1,2], Jin Xiaobao[1], Zhu Jiayong[1] ([1]Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510006, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct melanoma B16 cells which can stably express mouse β defensin 2 (B16-mBD2), and to investigate the effect of mBD2 on the biological characteristics of B16 cells. **Methods** After constructing the eukaryotic expression plasmid of mBD2, we transfected B16 cells with the plasmid using Liposome 2000 and screened transfected B16 cells with 400 mg/L G418 for 8 weeks to obtain stably expressed B16-mBD2 cells. Identification of the stable expression of mBD2 cells was confirmed by RT-PCR and Western blot. MTT assay was used to determine the growth curve of B16-mBD2 cells. Flow cytometry was used to detect the cell cycle distribution, apoptosis and expression of cell membrane surface molecules such as CD80, CD86, MHC Ⅰ (H-2K^d) and MHC Ⅱ (I-A^d). **Results** B16-mBD2 cells were constructed. The stable expression of mBD2 was confirmed by RT-PCR and Western blot at the mRNA and protein levels. Compared with that of empty-vector-transfected B16 cells (B16-p) or wild-type B16 cells, the proliferation of B16-mBD2 cells decreased significantly ($P<0.05$). Flow cytometry analysis showed that compared with that of B16-p or B16 cells, the proportion of B16-mBD2 cells in S phase increased significantly ($P<0.05$). The apoptosis and expression of cell membrane surface molecules, such as CD80, CD86, MHC Ⅰ (H-2K^d) and MHC Ⅱ (I-A^d) in the three cells were not significantly different ($P>0.05$). **Conclusion** mBD2 significantly inhibits the proliferation of B16 cells, and the mechanism seems to be related to its capacity in inducing S phase blocking. mBD2 has no effect on the apoptosis and expression of cell membrane surface molecules in B16 cells.

[基金项目] 国家自然科学基金(36071832)
[通信作者] 朱家勇,电话:(020)39352222,E-mail: Zhujy@gdpu.edu.cn

[**Key words**] defensin; innate immune response; melanoma

Supported by the National Natural Science Foundation of China(36071832). Corresponding author: Zhu Jiayong, Tel:86-20-39352222, E-mail: Zhujy@gdpu.edu.cn

恶性黑色素瘤是恶性肿瘤中发病率增长最快的肿瘤,年增长率3% ~5%[1],其早期治疗主要以手术为主,但晚期预后很差,尚无有效治疗手段。恶性黑色素瘤对一般的综合性治疗措施如放疗、化疗都不敏感,但由于其具有较强的免疫原性,因此免疫治疗一直是其重要的治疗手段[2-3]。现有恶性黑色素瘤疫苗在动物水平虽然可诱发出良好的免疫保护作用,但在临床实验中有效率仅10% ~30%[4],进一步提高恶性黑色素瘤疫苗的临床疗效,是目前面临的瓶颈问题。鼠源性β-防御素2(mouse beta-defensin-2,mBD2)是天然免疫的重要组成部分,它可通过趋化因子受体6(chemokine receptor,CCR6)趋化未成熟树突状细胞,还可作为Toll样受体4(Toll-like receptor 4,TLR4)的内源性配体促进树突状细胞成熟,产生一系列促炎症因子、趋化因子,上调共刺激分子表达[5],是一种天然的免疫佐剂。本研究构建稳定表达mBD2分子的恶性黑色素瘤B16细胞,探讨mBD2对B16细胞的增殖、细胞周期分布、凋亡及相关细胞膜表面分子CD80、CD86、MHCⅠ(H-2K^d)、MHCⅡ(I-A^d)表达的影响,旨在为后续研究开发临床效果更好的新型恶性黑色素瘤疫苗奠定细胞学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

已构建好的mBD2分泌性真核表达质粒pcDNA3.1(+)-Igκ-mBD2为本室保存[6],B16细胞株由中山医科大学细胞中心提供。RPMI1640细胞培养基及胎牛血清为HyClone公司产品,DNA标准(DL 2000)为TaKaRa公司产品,引物由上海生工生物工程公司合成。羊抗鼠mBD2多克隆抗体购自Santa Cruz公司,辣根过氧化物酶标记兔抗羊IgG抗体购自北京博奥森生物技术公司,DAB显色试剂盒为中杉金桥公司产品,真核转染试剂Lipofectamine2000购自Invitrogen公司,MTT购自美国Sigma公司,FITC标记的抗小鼠CD80、CD86、MHCⅠ(H-2K^d)、MHCⅡ(I-A^d)单克隆抗体及相应的同型对照抗体购自美国Biolegend公司,其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染及RT-PCR鉴定 脂质体法将本室保存的mBD2分泌性真核表达质粒pcDNA3.1(+)-Igκ-mBD2转染B16细胞。B16细胞在含100 ml/L胎牛血清、100 mg/L青霉素及1×10^5 U/L链霉素的RPMI1640培养基中于37 ℃、50 ml/L CO_2条件培养。将对数生长期细胞用上述培养基调至浓度为2×10^8 ~5×10^8/L,2 ml/孔种至6孔板,细胞贴壁生长至大约80%融合时进行脂质体转染。以pcDNA3.1(+)-Igκ-mBD2质粒4 μg/孔、转染试剂10 μl/孔转染,同时设立空载体pcDNA3.1(+)转染组(B16-p)及不转染的对照组(野生型B16)。5 h后换液,48 h后用含有400 mg/L G418的完全培养液进行筛选,G418筛选4周挑选单克隆进行扩增,8周后提取细胞总RNA,RT-PCR鉴定目的基因Igκ-mBD2 mRNA及G418抗性基因neo的表达。所采用的引物序列:Igκ-mBD2基因上游引物(下划线处为酶切位点):5′-CGGGATCCATGGAGTCAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCC-3′,下游引物:5′-GCTCTAGATTATCATTTCATGTACTTGCAAC-3′,扩增产物长度:202 bp;neo基因上游引物:5′-GGTGGAGAGGCTATTCGGCT-3′,下游引物:5′-GATAGAAGGCGATGCGCTGC-3′,扩增产物长度:728 bp。

1.2.2 稳定表达株培养上清mBD2蛋白的Western blot鉴定 各组细胞调整至浓度为10^6/ml,培养3 d后,收集细胞培养上清,采用16.5% Tris-Tricine凝胶进行SDS-PAGE分离,转膜,5%的脱脂奶粉室温封闭2 h,再与1∶500稀释的羊抗mBD2多克隆抗体4 ℃孵育过夜;TBS洗涤后,与1∶5 000稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG抗体室温孵育2 h,洗涤后,ECL显色。

1.2.3 MTT法鉴定细胞生长曲线 将对数生长期细胞(B16-mBD2、B16-p和B16)调节细胞浓度为10^3/ml,接种各组细胞200 μl/孔,即200个细胞/孔,每种细胞接种5个时相点,每个时相点5孔,分别为24、48、72、96、120 h,各时间点提前4 h加入20 μl(5 mg/ml)的MTT,继续培养4 h,吸走相应组各孔培养液,加入150 μl DMSO,室温摇床摇晃15 min,酶标仪测定各孔$D(490)/D(630)$。计算各组数据平均值,以此代表细胞活力,以时间为横轴,光密度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡 将对数生长期细胞(B16-mBD2、B16-p和B16)调整浓度为2.5×10^5/ml,种入小培养瓶培养24 h,细胞融合度在60% ~80%,消化收集细胞,PBS洗涤,70% PBS-乙醇固定24 h以上,离心除去乙醇,PBS洗涤,500 μl PBS重悬细胞,加入RNase A至终浓度为250 mg/L,37 ℃ 30 min,加入5 μl PI,使PI终浓度为50 μg/ml,室温避光染色30 min,流式检测细胞周期分布及凋亡率。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞CD80、CD86、MHCⅠ(H-2K^d)、MHCⅡ(I-A^d)表达 将融合度在60% ~80%的对数生长期细胞(B16-mBD2、B16-p和B16)消化收集至1.5 ml EP管,每管10^6待测细胞,PBS洗涤2次,100 μl PBS混悬细胞,将FITC标记的抗小鼠CD80、CD86、MHCⅠ(H-2K^d)、MHCⅡ(I-A^d)、单克隆抗体及相应的同型对照抗体各1 μl分别加入待测细胞,混匀,4 ℃,避光孵育30 min,PBS洗涤2次,400 μl PBS重悬细胞,流式检测各组细胞荧光表达阳性率。

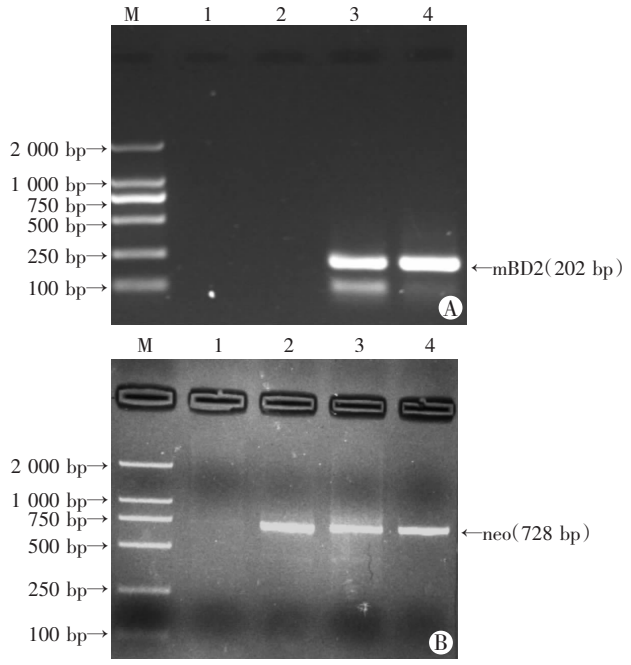
1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件，mBD2 基因转染后各组细胞的生长曲线采用重复测量因素的方差分析；细胞周期分布、细胞凋亡、细胞膜表面免疫分子的表达变化采用单向方差分析。

2 结果

2.1 稳定表达株的 RT-PCR 鉴定

单克隆扩大培养后，各细胞株进行总 RNA 提取，RT-PCR 扩增同样得到了 202 bp 的 Igκ-mBD2 目的片段，证实稳定筛选得到的 B16-mBD2 细胞有 mBD2 mRNA 表达；neo 基因是载体上的 G418 抗性基因，可证明载体成功转染入细胞（图 1）。

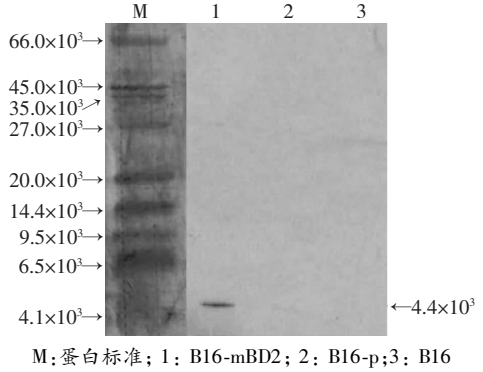


M：DNA 标准（DL 2000）；1：B16；2：B16-p；3：B16-mBD2；4：pcDNA 3.1(+)-Igκ-mBD2 阳性对照

图 1　RT-PCR 检测 mBD2（A）、neo（B）基因在 B16 细胞中的表达

2.2 稳定表达株的 Western blot 鉴定

单克隆扩大培养后，收集各细胞株培养上清，Western blot 检测结果证实 B16-mBD2 细胞培养上清中有 mBD2 蛋白的表达（图 2）。

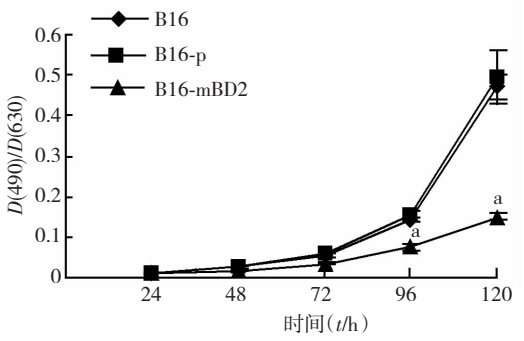


M：蛋白标准；1：B16-mBD2；2：B16-p；3：B16

图 2　Western blot 检测稳定表达细胞株培养上清中 mBD2 的表达

2.3 MTT 法检测细胞生长曲线

B16-mBD2 与 B16-p、B16 相比，细胞增殖明显减慢，从 48 h 开始，各时间点细胞活力显著降低（$P<0.05$）。



a：$P<0.05$，分别与 B16、B16-p 比较

图 3　MTT 法检测 3 株细胞生长曲线

2.4 流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡

与 B16-p 及 B16 相比，B16-mBD2 细胞处于 S 期的比例增高（$P<0.05$）；而凋亡率各细胞间没有统计学差异（$P>0.05$，表 1）。

表 1　3 株细胞的细胞周期分布及凋亡率的比较［$n=3$，$(\bar{x}\pm s)\%$］

细胞	$G_1\sim G_0$	S	$G_2\sim M$	凋亡率
B16	59.73±0.85[a]	33.27±0.96[a]	7.00±0.46	0.30±0.10
B16-p	59.20±1.15[a]	32.83±1.08[a]	7.97±0.65	0.37±0.15
B16-mBD2	56.33±0.64	36.03±0.97	7.67±0.35	0.40±0.10

a：$P<0.05$，与 B16-mBD2 比较

2.5 3 株细胞 MHC 分子及 CD80、CD86 共刺激分子表达变化

流式细胞仪检测细胞 MHC Ⅰ（H-2K^d）、MHC Ⅱ（I-A^d）及共刺激分子 CD80（B7-1）、CD86（B7-2）的表达，结果表明，与 B16-p 和 B16 相比，B16-mBD2 细胞膜表面 MHC Ⅰ（H-2K^d）、MHC Ⅱ（I-A^d）及共刺激分子 CD80、CD86 表达无统计学差异（$P>0.05$，表 2）。

表 2　3 株细胞 MHC 分子及 CD80、CD86 共刺激分子表达变化

［$n=3$，$(\bar{x}\pm s)\%$］

细胞	CD86	CD80	MHC Ⅱ（I-A^d）	MHC Ⅰ（H-2K^d）
B16	0.78±0.36	1.03±0.60	0.83±0.50	3.60±0.79
B16-p	0.80±0.73	1.00±0.20	0.75±0.17	3.40±0.70
B16-mBD2	0.88±0.05	0.97±0.21	0.78±0.28	4.10±0.44

3 讨论

mBD2 是一种重要的免疫调节因子[5]，在抗肿瘤免疫研究方面具有重要的价值，例如，用编码非免疫原性淋巴瘤抗原与 mBD2 融合蛋白的 DNA 质粒免疫小

鼠,在小鼠体内诱发明显的抗肿瘤活性[7];用 mBD2 与血管内皮钙黏附素或 mBD2 与血管内皮生长因子 2 融合质粒免疫小鼠,可通过抑制血管增生而发挥抗肿瘤作用[8-9]。可见,mBD2 可协助非免疫原性抗原诱导出有效的特异性获得性免疫反应,是一种天然的免疫佐剂。免疫治疗是恶性黑色素瘤治疗的重要手段之一,现有恶性黑色素瘤疫苗主要包括 6 类:完整细胞疫苗、树突状细胞疫苗、肽疫苗、神经节苷脂疫苗、DNA 疫苗、病毒载体疫苗,但这些疫苗的临床有效性仅 10% ~30%[4]。研究表明,疫苗的临床有效性与所选择的佐剂密切相关。本研究利用基因转染的方法建立稳定表达 mBD2 分子的恶性黑色素瘤 B16 细胞,并研究了 mBD2 对 B16 细胞生物学特性的影响,为进一步将 mBD2 佐剂应用于恶性黑色素瘤的免疫治疗奠定细胞学基础。

我们首先克隆 mBD2 成熟肽基因片段,再采用重叠 PCR 的方法在 mBD2 成熟肽基因片段前面加入鼠源性 Igκ 信号肽基因序列,保证无移码突变,成功构建了 pcDNA3.1(+)-Igκ-mBD2 分泌性表达载体[6]。将该表达载体转染入 B16 细胞后,在培养上清中可检测到分泌表达的 mBD2 分子,说明我们成功构建了稳定分泌性表达 mBD2 的 B16-mBD2 细胞株。本研究结果表明,与 B16 及 B16-p 相比,B16-mBD2 增殖明显减慢,提示 mBD2 能够抑制 B16 细胞的增殖,可能与其诱导 B16 细胞发生细胞周期 S 期阻滞有关。Cyclin D_1-CDK4-pRb 细胞信号通路在细胞周期 G_1 ~S 转变中有重要作用[10],我们将在接下来的工作中对此分子机制进行探讨。Ma 等[11]将含有 mBD2 目的基因的载体转染急性淋巴细胞性白血病细胞 L1210 后,并不影响 L1210 细胞本身的生长和增殖以及细胞周期分布,这可能是由于不同的肿瘤细胞生物学特性不同而引起对 mBD2 的敏感性不同。另外,王淑为等[12]采用鼠 mBD2 与 IL-18 基因共转染鼠白血病细胞 L1210,制备的疫苗在小鼠体内诱发出明显的抗白血病免疫反应。我们拟采用辐射的方式处理细胞制备疫苗,辐射后的细胞失去增殖性,保留抗原性,相当于一种疫苗性药物。因此,只要在辐射之前准确控制细胞数量,就能控制好给予到动物体内的疫苗数量,保证各免疫组之间的可比性。另外,我们通过流式细胞术检测了 3 株细胞 MHC Ⅰ(H-2K^d)、MHC Ⅱ(I-A^d)、CD80、CD86 分子的表达水平,结果显示,3 株细胞以上分子的表达并没有显著性差异,提示 mBD2 并不直接影响肿瘤细胞本身免疫相关分子的表达。但 mBD2 基因转染 B16 细胞后,可直接抑制 B16 细胞的增殖的确切分子机制还有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Giblin A V, Thomas J M. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2007, 60(1): 32-40.

[2] Lens M. The role of vaccine therapy in the treatment of melanoma[J]. Expert Opin Biol Ther, 2008, 8(3): 315-323.

[3] Huo L, Yao H, Wang X, *et al*. Inhibition of melanoma growth by subcutaneous administration of hTERTC27 viral cocktail in C57BL6/J mice [J]. PLoS One, 2010, 5(9): e12705.

[4] Kochenderfer J N, Gress R E. A comparison and critical analysis of preclinical anticancer vaccination strategies[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2007, 23(9): 1130-1141.

[5] Biragyn A, Ruffini P A, Leifer C A, *et al*. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2[J]. Science, 2002, 298(5595): 1025-1029.

[6] 梅寒芳, 金小宝, 朱家勇. β-防御素 2 真核表达载体的构建及其在肝癌细胞 Hepa1-6 中的稳定表达[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(9): 1213-1215.

[7] Biragyn A, Surenhu M, Yang D, *et al*. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens [J]. J Immunol, 2001, 167(11): 6644-6653.

[8] 王国庆, 王永生, 王瑞, 等. β 防御素 2 融合 VE-Cadherin 重组质粒的抗血管生成免疫作用[J]. 四川大学学报: 医学版, 2006, 37(3): 344-348.

[9] Wang Y S, Wang G Q, Wen Y J, *et al*. Immunity against tumor angiogenesis induced by a fusion vaccine with murine beta-defensin 2 and mFlk-1[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(22 Pt 1): 6779-6787.

[10] 刘洁, 庄乾元, 张维怡. 葡萄籽提取物原花青素对人膀胱癌 BIU87 细胞周期的影响及其机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(17): 1661-1663.

[11] Ma X T, Xu B, An L L, *et al*. Vaccine with beta-defensin 2-transduced leukemic cells activates innate and adaptive immunity to elicit potent antileukemia responses[J]. Cancer Res, 2006, 66(2): 1169-1176.

[12] 王淑为, 马晓彤, 徐玢, 等. 小鼠 β-防御素 2 与白介素 18 肿瘤疫苗的协同抗白血病作用研究[J]. 现代免疫学, 2009, 29(1): 40-44.

(**收稿**:2011-01-14;**修回**:2011-03-16)

(编辑 张 维)