维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)03－0228－03

B7 转染白血病细胞 K562 的作用研究

蒋代凤[1]，罗云萍[1]，任　红[2]，凌　宁[2]，陈洁萍[2]

(1.重庆医科大学临床血液教研室　重庆　400046　2.重庆医科大学肝炎研究所　重庆　400010)

【摘　要】目的:探讨共刺激信号分子 B7 转化人白血病细胞株 K562 后,转化细胞的生物学性状变化及介导的免疫作用。方法:构建重组真核表达质粒 pcDNA3.1B7,转化人白血病细胞株 K562,获得单个细胞克隆,观察 K562－B7 的生长周期,绘制生长曲线,检测 K562－B7 诱导 T 细胞分泌 IL－2 的情况。结果:pcDNA3.1B7 可在 K562 中稳定表达,K562－B7 的生长增殖速度比野生型 K562 慢。在体外,K562－B7 可诱导 PMNC 分泌 IL－2,24h 上清液中 IL－2 含量比 B7 阴性 K562 高 1 倍左右。结论:B7 基因转入人白血病细胞株 K562 后,细胞本身增殖能力降低,且 K562—B7 可活化 CD_4^+ T 细胞分泌细胞因子 IL－2,提高宿主抗肿瘤免疫能力。

【关键词】B7;肿瘤免疫;K562;转染

【中国图书资料分类法分类号】R733.71　R979.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2000－11－22

The study of human leukemia cell K562 transfected with B7 gene

JIANG Dai-feng, et al

(Department of Hematology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: To assess the potential of costimulatory signal molecule B7 in inducing immune effect and the biological alternation of K562－B7. ***Methods***: First, insert B7 gene into eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1B7, then transfect K562 with plasmid pcDNA3.1B7 and select positive clone(K562－B7) by G418 (600μg/ml). Finaly, analyse the ability of growth and proliferation of K562－B7, The secretion of IL－2 was also observed in vitro. ***Results***: pcDNA3.1B7 can be stably expressed in K562, and K562－B7 grow more slowly than wild K562. In addition, IL－2 production per 24 hours in the supernatant stimulated by K562－B7 was about twice as much as that by B7 negative K562. ***Conclusion***: K562 transfected with B7 gene grow more slowly than K562 and K562－B7 can activate T cell to produce IL－2, and enhance anti－tumor immunity.

【Key words】B7;Tumor immunity;K562;Transfect

B7.1/CD80/B7cDNA 作为 T 细胞表面 CD28 的配体,在激活 T 细胞时产生第二信号,从而使表达肿瘤抗原的肿瘤细胞可被 T 细胞识别、杀灭。但大多数肿瘤细胞均不表达 B7[1~2],这就使得即使表达了 MHC－1 和肿瘤抗原的肿瘤细胞可逃逸宿主免疫系统的监控。因此,将 B7cDNA 转入有肿瘤抗原的肿瘤细胞可促进 T 淋巴细胞的激活和增加肿瘤细胞的免疫原性,为肿瘤的基因治疗提供有效途径。我们试图将 B7cDNA 转入人白血病细胞株 K562 后,观察转化细胞的生物学性状变化,为 B7 瘤苗用于临床白血病提供基础研究。

作者介绍:蒋代凤(1972－　),女,重庆市人,讲师,博士生。主要研究方向:肿瘤的基因治疗。

1　材料和方法

1.1　重组真核表达质粒 pcDNA3.1B7 的构建如图 1 所示

重组真核质粒 PiLNB7 和质粒 pcDNA3.1 由重医大肝炎所保存。质粒 DNA 的提取、回收、连接、转化、鉴定参照文献[3]。

1.2　重组真核表达质粒 pcDNA3.1B7 转化人白血病细胞株 K562

pcDNA3.1B7 和 pcDNA3.1 的中量提取参照 Qiagen Midi Plasmid Purification Kit 操作,转化方法采用电穿孔法,电转结束后,加入 600μg/ml G418 筛选,待 G418 抗性克隆长出后,用有限稀释法筛选出单个细胞克隆。即为 K562—B7。

1.3　转化细胞的 DNA 提取、鉴定

维普资讯 http://www.cqvip.com

采用细胞 DNA 提取法分别提取 K562—B7、K562—pcDNA3.1 的细胞 DNA，用 PCR 法检测转化细胞的 B7 基因，参照文献[2]。引物自行设计后由上海生工生物工程公司合成，用于 B7 的扩增。两条引物分别为：

P1:5′—TCTAGATTATACAGGGCGTAC—3′

P2:5′—AAGCTTCCATGGGCCACACA—3′

PCR 反应结束后，取 5μl 作琼脂糖凝胶电泳鉴定。

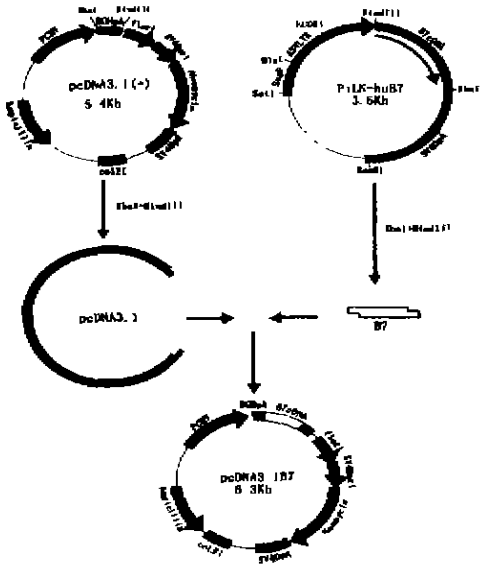


图 1 质粒 pcDNA3.1B7 的构建路线

1.4 RT—PCR 检测 B7 基因的表达

参照 Promega 公司 Total RNA Isolation Kit 方法分别提取 K562—B7、K562—pcDNA3.1、K562 的总 RNA。参照 Giboo 公司 Superscript Preamplification for first cDNA synthesis 说明，将提取的总 RNA 用 RNAase－free 的 DNAase 处理后，逆转录合成 cDNA 并进行 PCR，以 β－actin 为内对照，以 P1、P2 为引物。PCR 反应结束后，取 5μl 反应液进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 PI—FCM 检测 K562－B7 的细胞周期

将 K562－B7、K562－pcDNA3.1、K562 静止期诱导后、同步化处理 PI 染色，上流式细胞仪(FACS Can, B. D. USA)，用 Cell Quest 和 Modift LT 软件分析结果。

1.6 绘制 K562—B7、K562—pcDNA3.1 的生长曲线

将同步化处理的 K562、K562—pcDNA3.1、K562—B7 的细胞数稀释成 5×10^3/ml 后，分别加于 96 孔板中平行培养 7 天，每天分别计数 3 孔，每孔重复计数 3 次，取平均值，以时间为横坐标，细胞数为纵坐标，绘制细胞生长曲线。

1.7 细胞因子分泌检测

抽取正常人抗凝血分离单个核细胞(PBMC)。将 K562 细胞与 PBMC 以 1:20 加于 24 孔板中，37℃，5% CO_2 培养 6h 之后，将经 K562 刺激的 PMNC，分别与 K562—B7、K562—pcDNA3.1 按 20:1 于 96 孔板中混合培养，24h 和 72h 后分别收集上清液，用 ELISA 试剂盒(晶美公司)测定上清中 IL－2 含量。

2 结 果

2.1 重组真核表达质粒 pcDNA3.1B7 的鉴定

从重组体 PILN—B7 上切取 B7cDNA(880bp)定向克隆到 pcDNA3.1 上经 XbaⅠ和 HindⅢ双酶切后，出现 5.4 和 0.9Kb 左右的两条带，pcDNA3.1 经双酶切后只出现一条 5.4Kb 左右的条带，见图 2。



1. 质粒 pcDNA3.1
2. 质粒 pcDNA3.1B7
3. pcDNA3.1/XbaI + HindⅢ
4. pcDNA3.1B7/XbaI + HindⅢ
5. marker
6. K562－B7 的细胞 DNA 的 PCR 结果
7. K562－pcDNA3 1 的细胞 DNA 的 PCR 结果
8. K562－B7 的 RT－PCR 结果
9. K562－pcDNA3.1 的 RT－PCR 结果
10. K562 的 RT－PCR 结果
11. marker(1Kb)

图 2 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 转化 K562 细胞株后形成阳性克隆

通过电转法将 pcDNA3.1B7 转入 K562 细胞后，用 G418(600μg/ml)筛选一周左右，阴性对照的 K562 细胞全部死亡，而 K562—B7 和 K562—pcDNA3.1 在 10 天左右可见有散在的细胞生长，三周后将阳性克隆细胞进行有限稀释，于 96 孔板中搜集单个细胞克隆进行实验。

2.3 抗性克隆细胞 B7 的表达

2.3.1 抗性克隆细胞 DNA 的 PCR 鉴定

提取 K562—B7、K562 的细胞 DAN 作模板，利用 B7 的上、下游引物 P1 和 P2，经 PCR 扩增后见图 1，K562—B7 中有 B7 基因的扩增，而 K562—pcD-

维普资讯 http://www.cqvip.com

NA3.1 则未能扩增出相应条带,表明重组质粒 pcDNA3.1B7 已整合到 K562 细胞中。

2.3.2 抗性克隆细胞 RT－PCR 表达鉴定

提取转化细胞总 RNA,经逆转录合成 cDNA,再经 PCR 扩增,可见 K562—B7 有 mRNA 表达,而 K562—pcDNA3.1 不表达 B7 基因,结果见图 1。

2.4 PI－FCM 检测生长周期

将同步化处理的 K562—B7、K562—pcDNA3.1K562 经 PI 染色,流式细胞仪分析,三者的 G0－G1 期细胞分别占 53.85%、43.37%、39.52%,S 期分别占 35.34%、39.09%、48.99%,表明转化细胞的增殖速度较野生型 K562 略有降低,结果见图 3。

2.5 细胞生长分析

将同步化处理的 K562—B7、K562—pcDNA3.1、K562 平行培养一周后,绘制的生长曲线见图 3.结果显示转化细胞生长速度落后于野生型 K562,且随时间的延长,差异越明显;提示增殖活性发生了变化。

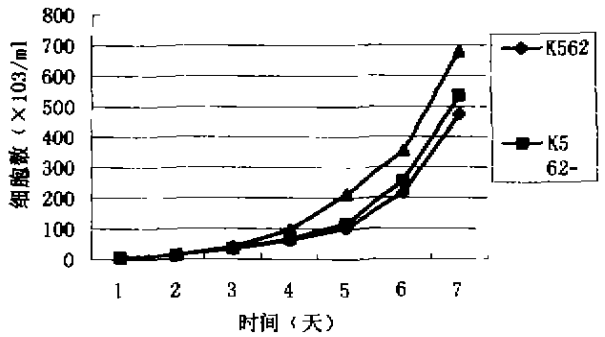


图 3 K562、K562－pcDNA3.1、K562－B7 的生长曲线

把体外经野生型 K562 肿瘤抗原刺激的 PMNC 作为效应细胞,将 K562—B7、K562—pcDNA3.1 作刺激细胞,混合培养后,24h 即可观察到 K562—B7 刺激 PMNC 分泌的 IL－2 为 K562—pcDNA3.1 或 K562 的一倍左右,结果见表 1。

表 1 IL－2 分泌量的测定

IL－2 含量(pg/ml)	24h	72h
K562	28.72	18.95
K562－pcDNA3.1	26.20	21.35
K562－B7	47.93	33.44

3 讨 论

大多数血液系统的恶性肿瘤,即使存在特异性的肿瘤肽,并可表达 MHC 抗原,但由于缺乏 B7,使接受了特异性抗原刺激的 CD_4^+ 或 CD_8^+ T 淋巴细胞出现免疫无反应性或凋亡,因此,人们日益关注对肿瘤细胞的基因修饰。由于人白血病细胞株 K562 本身不表达 B7,且有肿瘤特异性抗原,因此,将 B7 导入 K562 可增强肿瘤细胞的免疫原性,并通过共刺激信号途径活化 CD_4^+ 和 CD_8^+ 细胞,稳定并聚集多种细胞因子,如 IL－2、TNF－α、TNF－β、IFN－γ、GM－CSF 等,从而促进 T 细胞增殖,活化 CD_8^+ CTL,激活机体的抗肿瘤免疫能力,达到基因治疗的目的。

目前,基因治疗多采用逆转录病毒载体,但由于临床治疗的安全性考虑,本文采用了真核表达质粒 pcDNA3.1。该表达载体来源于 pcDNA3,含 CMV 启动子、BGH 和 SV40 polyA 加尾信号,前者可较强地表达外源基因,后两者可增强 mRNA 的稳定性及转录效率[4]。此外,pcDNA3.1 含 SV40orip,在表达 SV40large T antigen 的细胞(如 COS－7)中,可由于反式激活作用而以附加体的形式高拷贝复制进行高效瞬时表达,因此,外源基因整合到宿主基因组中的可能性较逆转录病毒载体小得多。结果表明将 pcDNA3.1B7 转入 K562 细胞后,B7 基因可稳定表达,且阳性克隆筛选时间短,勿需进行体外包装等过程。此外,目前有关 B7 转染肿瘤细胞作为免疫原进行基因治疗的研究多倾向于动物实验,且动物实验出现了较好的预期效果[5~8]。本文对 K562 的体外实验证实 B7 通过促进 CD_4^+ T 细胞分泌细胞因子 IL－2,从而增强细胞免疫功能,提高抗肿瘤免疫能力。

从 PI－FCM 及生长曲线可以看出,转化的人白血病细胞 K562—B7 其生长增殖能力降低,客观上有利于降低肿瘤细胞的恶性程度,可能与转化细胞的细胞周期改变有关。

在体外,PMNC 在野生型细胞株 K562 的初次刺激后,再次接受转化细胞 K562—B7 的刺激,通过第二信号途径就可使被 K562 肿瘤抗原活化的 CD_4^+ T 细胞分泌细胞因子,24h 后引起 IL－2 分泌增加,但增高幅度不是特别明显,一可能与选择的载体有关,二可能与体外获得的效应 T 细胞活性不高有关。至于 K562—B7 活化 CD_8^+ CTL 的研究,将在以后的工作中进一步展开。

(下转第 240 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

格掌握用药的适应症，用抗菌药物前，应尽可能进行病原学的检查及进行药敏实验，作为调整用药的参考。掌握适当的剂量和疗程，要避免剂量过大造成药物浪费和毒性反应的出现，又要注意由于剂量不足而至病情迁延、复发及细菌耐药性的产生。

参 考 文 献

[1] Quinn JP, Dudek EJ, DiVincezo CA, et al. Emergence of resistance to imipenem during therapy for Pseudomonas aeruginosa infections[J]. J Infect Dis, 1986; 154 (2): 289 - 294.

[2] Hamzehpour MM, Auckenthaler R, Regamey P, et al. Resistance occurring after fluoroquinolone therapy of experimental Pseudomonas aeruginosa peritonitis [J] Antimicrob Agents Chemother, 1987; 31(11): 1803 - 1808.

[3] Bouza E, Garnote FG, Cercenado E, et al. Pseudomonas aeruginosa: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999; 43(4): 981 - 982.

[4] Cambu E, Perina E, Dib C, et al. Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of Pseudomonas aeruginosa susceptible or resistant to imipenem[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995; 39(10): 2248 - 2252.

[5] Masuda N, Ohya S. Cross - resistance to meropenem, cephems, and quinolones in Pseudomonas aeruginosa[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1992; 36(8): 1847.

[6] Carmell Y, Troillet N, Eliopoulos GM, et al. Emergence of antibiotic - resistant Pseudomonas aeruginosa: comparison of risks associated with different antiseudomonal agents[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999; 43(6): 1379.

[7] Radberg G, Nillsson LE, Svensson S. Development of quinolone - imipenem cross resistance in Pseudomonas aeruginosa during exposure to ciprofloxacin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1990; 34(11): 2142.

(上接第 230 页)

本文在体外对人的白血病细胞株 K562 进行了初步探讨，认为，B7 转化的白血病细胞株同野生型细胞株相比，能激发有效的细胞免疫应答，但用于临床治疗，尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] ChenL, McGowan, P, Ashe S, et al. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 co - stimulation on T cell mediated tumor immunity [J]. J Exp Med, 1994; 179: 523 - 532.

[2] *Hirano, Takahashi, Ohtake, et al.* Expression of costimulatory molecules in human leukemias[J]. Leukemia, 1996; 10 (7): 1168 - 1176

[3] J 萨姆布鲁克，等著. 金冬雁，黎孟枫，等译. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 科学出版社，1996.

[4] John J Donnelly, Jeffrey B, W Schiver, et al. DNA vaccines[J]. Annu Rev Immunol, 1997; 15: 617 - 648.

[5] Joannopoulos, Weinstein, Nickerson, et al. Irradiated B7.1 transduced primary acute myelogenous leukemia(AML) cells can be used as therapeutic vaccines in murine AML[J]. Blood, 1996; 87(7): 2938 - 2946.

[6] Hirano, Takahashi, Azuma, et al. Protective and therapeutic immunity against leukemia induced by irradiated B7.1 - transduced leukemia cells[J]. Hum Gene Ther, 1997; 8(11): 1375 - 1384.

[7] Hirst, Buggin, Darling, et al. Enhanced immune costimulatory activity of primary acute myeloid leukemia blasts after retrovirus - mediated gene transfer of B7.1[J]. Gene Ther, 1997; 4(7): 691 - 699.

[8] Matulonis, Dosiou, Lamont, et al. Role of B7.1 in mediating an immune response to myeloid leukemia cells[J]. Blood, 1995; 85(9): 2507 - 2515.

(上接第 236 页)筛选试验。本实验显示肝癌细胞分泌物对正常血浆的外源性凝血无明显影响，但凝血功能不良时，可通过影响外源性凝血系统，使凝血功能更差；本实验还显示肝癌细胞分泌物使 TT 延长，这也许是由于肿瘤细胞分泌溶解纤维蛋白原的物质和抗凝物质[4]所致。

总之，肝癌细胞分泌物可直接影响凝血功能，在不同凝血状况下，影响不同凝血系统，促成截然相反的结果。

参 考 文 献

[1] 王振义，李家增，阮长耿. 血栓与止血基础理论与临床[M]. 第 2 版. 上海：上海科学技术出版社，1997; 546 - 554.

[2] Hu T, Bach RR, Horton R, et al. Procoagulant activity in cancer cells is dependent on tissue factor expression [J]. Oncol Res, 1994; 6(7): 321 - 327.

[3] Gordon SG, Mielicki WP. Cancer procoagulant: a factor X activator, tumor marker and growth factor from malignant tissue [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 1997; 8(2): 73 - 86.

[4] 沈 迪，凌柱三. 临床出血病学[M]. 第 1 版. 北京：科学技术文献出版社，1996; 379 - 383.