DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.054
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jur. 2002


文章编号:1000-5404(2002)07-0863-02

论著

# HL60细胞抗原多肽的提取和质量观察

张 怡,王庆余 (第三军医大学附属新桥医院血液科,重庆 400037)

提 要:目的 比较酸洗涤法和冻融法提取HL60细胞抗原多肽的质量。方法 应用酸洗涤法和冻融法进行了人早幼粒细胞白血病细胞系HL60抗原多肽的提取,冻干浓缩后并用Lowry's法定量。结果 酸洗涤法与冻融法获取的HL60细胞抗原多肽量分别为(62.916 3±13.999 9)μg/ml和(116.796 8±30.231 1)μg/ml。结论 两种方法提取的HL60细胞抗原多肽质量存在较大差异,可能具有不同的肿瘤免疫刺激活性。

关键词:HL60细胞;肿瘤抗原;酸洗涤;冻融
中图法分类号:R446.62;R733.7 文献标识码:A

# Extraction and qualification of antigen peptides from HL60 cells

ZHANG Yi, WANG Qing-yu (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract**: Objective To compare the qualities of HL60 cell antigen peptides extracted with acid elution or freeze-thaw method. Methods The cultured HL60 cells were treated with citrate-phosphate buffer or repeated freeze-thaw method to obtain the tumor antigen peptides. Lowry's method was used to analyze the peptides contents. Results The acid elution and freeze-thaw methods yielded HL60 cell antigen peptides of (62.916 3±13.999 9) μg/ml and (116.796 8±30.231 1) μg/ml respectively. Conclusion The antigen peptides obtained by these 2 methods have relative difference in quality, and may have different immune stimulating activity.

**Key words**: HL60; tumor antigen; acid elution; frozen-melt method

白血病的生物治疗是一种新型的治疗模式,是对放化疗的有益补充,其方法之一是通过相关的技术方法增强白血病细胞的免疫原性,进而诱导机体产生肿瘤特异性的细胞免疫应答消除肿瘤细胞。肿瘤的特异性和相关抗原的存在是免疫治疗的关键之一。通过不断改进的技术手段获取白血病细胞低表达或加工缺陷型的特异性肿瘤抗原(Tumor specific antigens, TSA),一直是人们关注的热点和难点。由于方法所限,迄今为止,尚未能从人类的白血病细胞中得到为正常细胞所缺的TSA。应用白血病细胞的抗原集合进行免疫刺激治疗,已经取得了显著效果。但提取白血病细胞抗原多肽的方法不同,最终获得的抗原质量和免疫原性差异很大,同时抗原与肿瘤量效关系研究不多,使抗原定向性的白血病生物治疗距临床推广尚待更多的研究结果支持。我们通过应用弱酸洗涤法和冻融法进行了人早幼粒细胞白血病细胞系HL60抗原多肽的提取、定量和比较,为白血病的生物治疗提供一定的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 人早幼粒白血病细胞系HL60的培养

将细胞浓度为5×10$^5$个/ml的HL60悬浮培养在50 ml的细胞培养瓶内,每瓶5 ml,培养基为含10%新生小牛血清的RPMI 1640,放入37 ℃、5% $CO_2$、饱和湿度的孵箱中,每2 d传代1次。细胞培养至对数生长期时,于后续的实验前24 h半量换液,取样并加入台盼蓝液至终浓度0.4%,染色2~5 min后滴片,于低倍镜下计数200个细胞/片进行台盼蓝鉴定,细胞活性应在95%以上。

### 1.2 酸洗涤法HL60细胞表面抗原多肽的提取、浓缩和定量

1.2.1 酸洗涤法提取HL60细胞表面抗原多肽 收集培养的HL60细胞1×10$^8$个左右,离心去上清后,加入PBS洗涤两次,细胞沉淀与酸洗液2 ml(柠檬酸5.505 7 g, $Na_2HPO_4$ 4.727 4 g,加双蒸水200 ml,搅拌使之完全溶解,制成pH 3.3的溶液,经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌)混匀作用1 min,1 500 r/min离心5 min。收集含抗原多肽的上清,置-20 ℃保存。如此反复收集共约1×10$^9$个细胞以上的酸洗液[1,2]。

### 1.2 酸洗涤法所获的HL60细胞表面抗原多肽的浓缩和定量

将收集的HL60细胞抗原多肽共约20 ml放入半透膜中,以1 000倍去离子水电磁搅拌透析3 h,共2次,-85 ℃低温冰箱放置过夜,于冻干机中-35 ℃冻干后加1.0 ml的去离子水彻底溶解样品。取10 μl冻干后重溶的抗原多肽在EP管中加入90 μl的去离子水,本底对照为100 μl去离子水,各管混匀后加167 μl碱性铜液,混匀,室温放置10 min,快速加入16.7 μl酚试剂,摇均,室温放置30 min,消除本底后得检测样品实际$A_{650}$。

标准曲线:精确量取标准多肽100 μg/ml胸腺素α1(Tα1,28个氨基酸的短肽)溶液,以去离子水配制成0、10、20、30、40、50、60、70、80 μg/ml的浓度梯度,各取10 μl置于EP管中,加去离子水补至100 μl,其余操作同抗原多肽,可得一标准曲线。从标准曲线经SPSS统计软件得出斜率K值和$K^{-1}$值。抗原多肽含量(μg/ml)= 抗原多肽$A_{650}$×$K^{-1}$值。得出抗原多肽的浓度后,加去离子水稀释成40 μg/ml,0.22 μm微孔滤膜过滤除菌。-20 ℃保存备用。

### 1.3 HL60细胞冻融液的制备、浓缩和定量

1.3.1 HL60细胞冻融液的制备 收集培养的HL60细胞,用

作者简介:张 怡(1969-),女,湖北省武汉市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事树突状细胞方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68755114-74609

收稿日期:2001-11-09;修回日期:2002-02-24

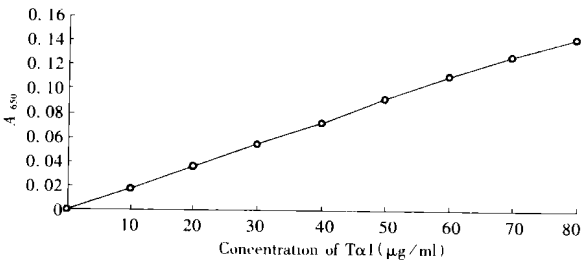
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PBS 洗涤 2 次, 再用 PBS 将细胞制成 5× $10^7$/ml 的细胞悬液, 放入冻存管内, 迅速投入液氮, 待冻结后取出, 在室温下自然解冻, 如此反复 4 次。共收集约× $10^9$ 个 HL60 细胞的冻融液。冻融液经 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 滤液-20 ℃冻存备用[3,4]。

1.3.2 HL60 细胞冻融液的浓缩和定量 同酸洗法。

## 2 结果

2.1 标准参照蛋白 Tα1 浓度(μg/ml)与 $A_{650}$ 对应曲线, 见图 1




Concentration of K= 1.792 9× $10^{-3}$, $K^{-1}$= 557.768 9

图 1 标准曲线

**Fig 1 Standard curve**

2.2 HL60 抗原多肽的定量, 见表 1

表 1 **HL60** 抗原多肽经冻干浓缩后浓度的定量测定

**Tab 1 Determination of antigen peptides from HL60 cells extracted by acid elution and frozec-melt method**

| Method | $A_{650}$ | Antigen of HL60 cells peptide (μg/ml) |
|---|---|---|
| Acid elution | 0.112 8±0.025 1 | 62.916 3±13.999 9 * |
| Freeze-thaw | 0.209 4±0.054 2 | 116.796 8±30.231 1 |

*: $P$< 0.01 *vs* freeze-thaw

酸洗涤法与冻融法所获得的 1× $10^9$ 个 HL60 细胞的抗原多肽分别为(62.916 3±13.999 9)μg 和(116.796 8±30.231 1)μg, 二者的比率为 1∶1.8。经酸洗后的 HL60 细胞培养 12 h 后存活率< 10%, 不继续培养。

## 3 讨论

无论是白血病 TSA 或非特异性抗原, 最终临床目的仍是用于白血病的生物治疗, 获取方法的差异对最后肿瘤抗原的收率具有决定性的影响, 同时肿瘤抗原的质和量对进一步生物治疗白血病的评价具有指导性作用。由于细胞纯度问题, 非实体性白血病细胞的收集存在一定困难, 我们在实验中选用了人早幼粒细胞白血病 HL60 细胞系为研究对象, 进而以冻融法和酸洗涤法提取该细胞系的肿瘤抗原, 使最终提取的白血病细胞抗原在质量上得到保障。

冻融法要求有大于 $10^9$ 的细胞数量[5]。经过冻融法获取 HL60 细胞抗原库, 方法简单, 易于操作。酸洗涤法的原理是在酸性条件下, 细胞膜 MHC-I 类分子复合体可特异地游离下来, 同时释放出结合的多肽[6,7]。因此酸洗涤法得到的 HL60 细胞表面抗原肽, 主要成分为 MHC-I 类。该肽段作为肿瘤抗原肽的有效成分, 较 HL60 细胞冻融抗原库具有更高质量的靶向性。酸洗涤法较好地保证了相对稳定的抗原特异性。冻融抗原溶液相对于酸洗抗原溶液更加浑浊, 可见较多大小不等的细胞碎片, 提示其成分复杂, 可能含有大量的胞内物质。据此推测, 应用冻融抗原进行白血病生物免疫治疗的免疫刺激活性将低于酸洗抗原。

目前用于白血病细胞抗原定量的方法较少。我们选择应用了不受特定氨基酸组成影响的 Lowry's 法定量冻融和酸洗 HL60 细胞抗原多肽, 取得了细胞数与抗原量之间较好的线性关系。为保证测定的准确性, 特别选用由 28 个氨基酸组成的人胸腺素 α1(Thymosinα 1, Tα1)短肽为标准参照品进行量化标定。由于实验所采用提取 HL60 细胞抗原多肽的两种方法溶液体积较大, 最终获取含 HL60 细胞抗原多肽的溶液浓度较小, 超过 Lowry's 法对蛋白多肽定量的可信范围, 无法检测出稳定而准确的浓度值。经过对 HL60 细胞冻融液和酸洗液透析除盐、0.22 μm 滤膜过滤并用冻干机冻干后重新溶解, 使 HL60 抗原多肽的浓度提高 10~1 000 倍后, 可达到标准曲线的可信范围之内。

本研究提示, 冻融法和酸洗涤法获取早幼粒细胞白血病细胞系 HL60 细胞抗原多肽的方法简便实用, 且酸洗涤法所获得的抗原可能具有更高的免疫刺激活性。透析脱盐、冻干浓缩 HL60 细胞抗原多肽的方法, 可有效地提高抗原浓度。Lowry's 法可应用于定量冻融法和酸洗涤法获取的肿瘤细胞抗原多肽。

## 参考文献:

[1] 邓卫文, 谢 弘. 快速反复洗脱人肺癌细胞表面肿瘤相关多肽[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1997, 4(2): 81-84.

[2] Storkus W J, Zeh H J, Salter R D, *et al*. Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution[J]. J Immunother, 1993, 14(2): 94-103.

[3] Banchereau J, Steinman R M. Dendritic cells and the control of immunity [J]. Nature, 1998, 392(6 673): 245-252.

[4] Lu L, Qian S, Hershberger P A, *et al*. Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation[J]. J Immunol, 1997, 158(12): 5 676-5 684.

[5] Storey K B, Mosser D D, Douglas D N, *et al*. Biochemistry below 0 degrees C: nature's frozen vertebrates[J]. Braz J Med Biol Res, 1996, 29(3): 283-307.

[6] Sharma P, Joyce S, Chorney K A, *et al*. Thymus-leukemia antigen interacts with T cells and self-peptides[J]. J Immunol, 1996, 156(3): 987-996.

[7] Wada H, Matsuo M, Uenaka A, *et al*. Rejection antigen peptides on BALB/c RL male 1 leukemia recognized by cytotoxic T lymphocytes: derivation from the normally untranslated 5' region of the c-akt proto-oncogene activated by long terminal repeat[J]. Cancer Res, 1995, 55(21): 4 780-4 783.

(编辑 汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net