

In Vitro Anti-tumor Immune Effects Induced by 4-1BBL-transfected Mouse Colon Cancer Cells

LI Qiao-xia, SHAN Bao-en*, AI Jun, LI Hong, FU Xiao-mei

(Research Center of the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhang 050011, China)

4-1BBL 修饰小鼠结肠癌疫苗体外诱导抗肿瘤免疫反应的研究

李巧霞/单保恩*/艾军/李宏/付小梅

(河北医科大学第四医院科研中心, 石家庄 050011)

【摘要】背景与目的：研究 4-1BBL(4-1BB Ligand, 即 CD137 配体) 转基因小鼠结肠癌细胞瘤苗体外诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocytes, CTL)特异性杀伤活性及刺激淋巴细胞产生细胞因子的作用。材料与方法：采用脂质体介导法将真核表达质粒 pMKIT^{neo}/4-1BBL 导入小鼠结肠癌 colon26 细胞, 经 G418 筛选后获得 4-1BBL 高表达克隆, 用丝裂霉素 C(MMC)处理后, 制成肿瘤细胞瘤苗, 与经体外诱导的同系小鼠 CTL 共同培养, 测定对 CTL 特异性杀伤活性及对脾细胞产生细胞因子(IL-2、IL-4 和 IFN- γ)的影响。结果：转染 4-1BBL 的 colon26 细胞高表达 4-1BBL 蛋白, 将该细胞经 MMC 处理后制成的瘤苗, 与野生型 colon26 细胞相比, 对 CTL 特异性杀伤亲本肿瘤细胞的作用明显增强($P < 0.01$), 但 CTL 对非亲本肿瘤细胞的杀伤作用无明显影响($P > 0.05$); 该瘤苗在体外能显著增强脾细胞分泌细胞因子(IL-2、IL-4 和 IFN- γ)的能力($P < 0.01$)。结论：4-1BBL 转基因小鼠结肠癌细胞瘤苗能有效诱导抗肿瘤免疫反应。

【关键词】 4-1BB 配体; 细胞毒性 T 细胞; 细胞因子; 肿瘤疫苗

中图分类号: R733.4

文献标识号: A

文章编号: 1004-616(2007)02-0103-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To study the cytotoxic activity of CTL and cytokines production of lymphocytes induced by 4-1BBL-transfected colon26 *in vitro*. MATERIALS AND METHODS: The eukaryotic expression vector pMKIT^{neo}/4-1BBL was transfected into colon26 by lipofectamine²⁰⁰⁰, then the cells with high expression of 4-1BBL were selected by G418. The tumor cell vaccines (TCV) were obtained by treatment with mitomycin(MMC). The TCV were co-cultivated with syngeneic murine cytotoxic T lymphocytes (CTL). Then the cytotoxic activity of CTL and the cytokines production of spleen cells were tested. RESULTS: The colon26 cells transfected with 4-1BBL showed strong expression of 4-1BBL protein on cell surface. Compared with TCV-colon26, the TCV-colon26/4-1BBL cells could induce a more efficient cytotoxic activity of CTL against its parental tumor cell colon26($P < 0.01$), but not against non-parental tumor cell S180. The TCV-colon26/4-1BBL could significantly enhance the ability of murine spleen cells to produce cytokines($P < 0.01$). CONCLUSION: The murine colon26 tumor cells transfected with 4-1BBL could induce an efficient anti-tumor immune response.

【KEY WORDS】 4-1BB ligand; cytotoxic T lymphocyte; cytokine; tumor vaccines

4-1BBL(4-1BB Ligand, 即 CD137 配体)是肿瘤坏死因子配体超家族的成员之一, 它所介导的协同刺激信号可促进 T 细胞的活化、增殖和分化, 在免疫应答、免

疫调节以及肿瘤的免疫治疗等方面发挥着重要的作用。本文对 4-1BBL 转基因的小鼠结肠癌细胞瘤苗体外诱导细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)特

收稿日期: 2006-05-25; 修订日期: 2006-10-09

基金项目: 河北省科技攻关计划项目资助(NO.06276102D-95)

作者简介: 李巧霞, (1976-), 女, 医学硕士, 研究方向: 肿瘤免疫学。

Tel: 0311-86095290, E-mail: kyxlqx@yahoo.com.cn.

*Correspondence to: SHAN Bao-en Tel: 0311-86095283.

异性杀伤活性及刺激淋巴细胞产生细胞因子的能力进行了研究,为明确 4-1BBL 免疫调节机制以及通过免疫调控来治疗肿瘤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 pMKIT^{neo}、pMKIT^{neo}/4-1BBL 重组质粒 DNA 分别由日本千叶县癌中心病理研究部田川雅敏教授和日本齿科大学 Hideo Yagita 教授惠赠。小鼠结肠癌细胞株 colon26 和 S180 由本室保存培养。RPMI1640 培养基、G418 购自华美生物工程有限公司。脂质体 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司。藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记大鼠抗小鼠 4-1BBL 单克隆抗体购自 Biolegend 公司。小鼠 IL-2、IL-4 和 IFN- γ ELISA 检测试剂盒购自晶美生物公司。丝裂霉素 C (mitomycin, MMC) 为江苏恒瑞制药公司产品。

1.2 实验动物 BALB/c 小鼠 40 只,均为雌性,6 周龄,体重约 20 g,购自河北医科大学实验动物中心,合格证号:508010。

1.3 实验方法

1.3.1 脂质体介导的基因转染 按 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 试剂盒说明书,分别将 pMKIT^{neo} 和 pMKIT^{neo}/4-1BBL 质粒 DNA 转染 colon26 细胞。转染 24 h 后,加入 G418 (600 μ g/ml) 进行筛选。获得的 G418 抗性细胞,分别为 colon26/pMKIT^{neo} 和 colon26/4-1BBL 细胞。

1.3.2 流式细胞仪检测 4-1BBL 蛋白表达 收集野生型 colon26、colon26/pMKIT^{neo} 和 colon26/4-1BBL 细胞, PBS 洗涤 2 次后,按试剂说明书操作,分别用 PE 标记大鼠抗小鼠 4-1BBL 单克隆抗体进行标记后,用流式细胞仪检测 4-1BBL 表达^[4]。

1.3.3 肿瘤细胞疫苗的制备 收集对数生长长期的 colon26、colon26/pMKIT^{neo} 和 colon26/4-1BBL 细胞,用 PBS 洗涤 2 次,调整细胞浓度为 5×10^6 /ml,加入终浓度为 100 μ g/ml 的 MMC,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中作用 1h,用 PBS 洗涤 3 次。

1.3.4 CTL 的诱导 无菌取小鼠脾脏制备脾细胞悬液^[1],裂解红细胞后调整细胞浓度为 5×10^7 /ml,加入 24 孔板中 (100 μ l/孔),共分 3 组,每组 8 孔,各组再分别加入 MMC 处理的 colon26、colon26/pMKIT^{neo} 和 colon26/4-1BBL 细胞 (5×10^6 /ml, 每孔 100 μ l) 及终浓度为 50 U/ml 的重组 IL-2, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 5 d,收集细胞后,用 PBS 洗 2 次,台盼蓝染色后计数活细胞,用含 5% 胎牛血清 (FCS) 的 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 2×10^6 /ml。

1.3.5 CTL 杀伤活性的测定 用含 5% FCS 的

RPMI 1640 培养液调整靶细胞 colon26 浓度为 2×10^5 /ml,加入 96 孔培养板中,每孔 50 μ l,设 3 个复孔,每孔再加入经上述诱导的 CTL 细胞,每孔 100 μ l,使效应细胞:靶细胞 (E:T) 为 20:1,同时设空白对照组 (只加 RPMI 1640 液)、靶细胞对照组 (只加 colon26 细胞)、效应细胞对照组 (只加 CTL 细胞),每组均设 3 个复孔,每孔终体积 150 μ l,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 中培养 24 h,培养结束前 4 h,每孔加入 5 mg/ml MTT 10 μ l,培养结束后,1500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 100 μ l 二甲基亚砷震荡至蓝紫色沉淀溶解。用酶标仪测定 570 nm 吸光度值 (A)。CTL 杀伤活性按以下公式计算:

$$\text{CTL 杀伤活性}(\%) = \left(1 - \frac{A(E+T) - AE}{AT} \right) \times 100\%$$

CTL 对靶细胞 S180 的杀伤活性测定方法同上。

1.3.6 脾细胞细胞因子的产生及测定 将 MMC 处理的 colon26、colon26/pMKIT^{neo} 和 colon26/4-1BBL 细胞分别加入 96 孔板,各设 3 个复孔,每孔加入 100 μ l 细胞悬液,细胞数为 1×10^5 ;每孔再分别加入小鼠脾细胞悬液 100 μ l,脾细胞数为 2×10^6 ,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,分别收集各孔培养上清,按 ELISA 试剂盒说明书操作,测定 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 的含量。

1.4 统计学方法 结果采用 SPSS11.5 统计软件进行方差分析,Newman-Keuls 法进行两两比较,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 转染前后细胞中 4-1BBL 表达

与野生型 colon26 细胞和转染空载体的 colon26/pMKIT^{neo} 细胞相比,转 4-1BBL 基因的 colon26/4-1BBL 细胞,4-1BBL 的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$),结果见表 1。

表 1 转染前后细胞中 4-1BBL 的表达率

Table 1 The expression of 4-1BBL on transfected and untransfected cells

| Group | Expression rate ($\bar{x} \pm s, \%$) |
|------------------------------|---|
| Colon26 | 10.29 \pm 1.56 |
| Colon26/pMKIT ^{neo} | 14.77 \pm 2.31 |
| Colon26/4-1BBL | 97.44 \pm 6.84* |

Compared with colon26 and colon26/pMKIT^{neo}, * $P < 0.05$.

2.2 4-1BBL 修饰瘤苗对 CTL 杀伤活性的影响

经 colon26/4-1BBL 瘤苗诱导的 CTL,与经 colon26 和 colon26/pMKIT^{neo} 瘤苗诱导的 CTL 相比,其特异性杀伤亲本瘤细胞 colon26 能力的差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但对 S180 细胞的杀伤能力的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),结果见表 2。

表 2 41BBL 基因修饰瘤苗对 CTL 杀伤活性的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 The effect of 41BBL transfected tumor cells on CTL ($\bar{x} \pm s, \%$)

| Group | Cytotoxicity to colon26 | Cytotoxicity to S180 |
|------------------------------|-------------------------|----------------------|
| Colon26 | 54.12 ± 2.43 | 33.2 ± 1.38 |
| Colon26/pMKIT ^{neo} | 50.97 ± 1.96 | 35.1 ± 2.76 |
| Colon26/41BBL | 68.41 ± 1.74* | 31.9 ± 1.94 |

Compared with colon26 and colon26/pMKIT^{neo}, *P < 0.05.

2.3 41BBL 修饰瘤苗对小鼠脾细胞产生细胞因子的影响

经 colon26/41BBL 瘤苗诱导的小鼠脾细胞培养上清中细胞因子 (IL-2, IL-4 和 IFN- γ) 的含量, 与 colon26 和 colon26/pMKIT^{neo} 瘤苗诱导组相比差异有统计学意义 (P < 0.01), 结果见图 1。

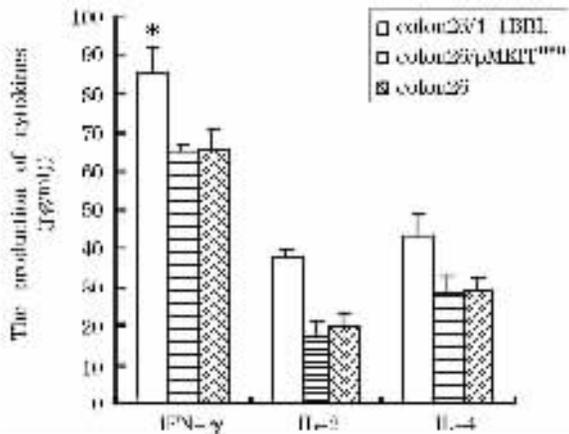


图 1 41BBL 基因修饰瘤苗对小鼠脾细胞产生细胞因子的影响

Figure 1 The effect of 41BBL transfected tumor cells on mice spleen producing of cytokines

Compared with colon26 and colon26/pMKIT^{neo}, *P > 0.01.

3 讨论

大量研究已证实, 肿瘤免疫逃逸的重要原因之一是肿瘤细胞低表达或不表达共刺激分子, 从而不能有效激活机体的免疫应答反应, 应用基因转染技术将共刺激分子基因导入低表达或不表达该基因的肿瘤细胞并使其表达, 能显著提高肿瘤细胞的免疫原性, 将其作为肿瘤疫苗免疫机体后, 对亲本肿瘤的发生有显著治疗作用^[1]。

41BBL 属于肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 配体超家族成员, 是 II 型跨膜糖蛋白, 与 TNF 家族胞膜外区有 20% 的同源性。41BBL 主要表达于活化的抗原提呈细胞表面, 包括巨噬细胞、B 细胞和树突状细胞^[2-3], 某些病毒感染的细胞及肿瘤细胞表面也可表达 41BBL^[4], 但不表达于静止或活化的 T 细胞。41BBL/41BB 是继 CD28/B7 之外的另一对重要的共刺激分子。41BBL 所介导的协同刺激信号可有力刺激免疫细胞的增殖、分化, 并提高其免疫杀伤能力, 因此, 应用 41BBL 诱发机体的抗肿瘤反应有重要的研究意义。

本实验通过流式细胞技术分析结果显示, 小鼠结肠癌细胞 colon26 表面 41BBL 的表达很低, 而采用脂质体介

导法将 41BBL 基因导入 colon26 细胞后, 获得的 colon26/41BBL 细胞能高表达 41BBL 蛋白。该细胞经 MMC 处理制备成肿瘤疫苗, 诱导产生的 CTL 对野生型 colon26 亲本瘤细胞的杀伤活性比野生型细胞瘤苗诱导的 CTL 对亲本瘤细胞的杀伤活性显著提高, 但对异源肿瘤细胞的杀伤作用无明显影响。该结果提示, 41BBL 作为共刺激分子能协助诱导 T 细胞的活化, 激发特异性抗肿瘤免疫反应。

Cannons 等^[5]报道 41BBL 可同时引起 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞增殖、分化及增强效应功能。机体抗肿瘤免疫反应主要由 CD8⁺T 细胞发挥作用, 而 CD4⁺T 细胞的活化对维持 CTL 的杀伤活性和免疫记忆功能具有重要作用。文献报道^[6], CD8⁺T 细胞可依赖 41BBL 产生 IL-2 和 IFN- γ , CD4⁺T 细胞可依赖 41BBL 产生 IL-2 和 IL-4。在同样条件下, 这些细胞因子分泌量增加可间接反映 T 细胞的活性。此外, IL-2 和 IFN- γ 本身具有一定的抗肿瘤作用, 是机体抗肿瘤细胞因子的重要组成部分。

总之, 41BBL 基因转染的 colon26 细胞瘤苗能显著提高 CTL 对野生型 colon26 细胞的特异性杀伤活性, 将 colon26/41BBL 瘤苗在体外与脾细胞共培养, 其培养上清中 IL-2, IFN- γ 和 IL-4 水平明显升高, 提示 41BBL 可能通过提高 CTL 活性、刺激免疫细胞分泌杀肿瘤细胞因子及调节免疫细胞间相互作用等多种途径实现抗肿瘤作用。

参考文献:

- [1] Foss FM. Immunologic mechanism of antitumor activity[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(3 suppl 7): 5-11.
- [2] Goodwine RG, Din T, Davis-Smith T, et al. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor[J]. *Eur J Immunol*, 1993, 23(10): 2631-2641.
- [3] Alderson MR, Smith TW, Tough TW, et al. Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand [J]. *Eur J Immunol*, 1994, 24(9): 2219-2227.
- [4] Seko Y, Ishiyama S, Nishikawa T, et al. Expression of tumor necrosis factor ligand superfamily costimulatory molecules CD27L, CD30L, OX40L and 4-1BBL in the heart of patients with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2002, 11(3): 166-170.
- [5] Cannons JL, Lau P, Ghumman B, et al. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy[J]. *J Immunol*, 2001, 167(3): 1313-1324.
- [6] Wen T, Bukecznski J, Watts TH, et al. 4-1BB ligand mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function[J]. *J Immunol*, 2002, 168(10): 4897-4906.

