

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.007

CD80-链亲和素融合蛋白锚定的鼻咽癌 CNE2 细胞增强 T 细胞的杀伤活性

李金龙¹, 常红², 胡志明^{1*}, 高基民¹ (1. 南方医科大学生物技术学院生物治疗研究所, 广东广州 510515; 2. 解放军第 534 医院五官科, 河南洛阳 471000)

[摘要] 目的: 制备 CD80-链亲和素(streptavidin, SA)融合蛋白, 研究 CD80-SA 锚定的鼻咽癌 CNE2 细胞对 T 细胞杀伤活性的影响。方法: pET21a-CD80-SA-6His 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导 CD80-SA 融合蛋白的表达, 经 Ni-NTA 亲和层析纯化后透析复性。流式细胞仪检测 CD80-SA 融合蛋白在 CNE2 细胞表面的锚定效率; LDH 释放法检测 CD80-SA 锚定的 CNE2 细胞对 T 细胞杀伤活性的影响。结果: 成功制备和纯化了 CD80-SA 融合蛋白。CNE2 细胞表面低表达 CD80 分子 [(2.2 ± 0.18)%]。CD80-SA 融合蛋白可有效地锚定于生物素化的 CNE2 细胞表面, 锚定效率可达 73%。CD80-SA 锚定的 CNE2 细胞可有效激活 T 细胞的杀伤作用, 效靶比在 1:1、1:20、1:40 时 T 细胞的杀伤率分别约为 (37 ± 3.12)%、(51 ± 2.63)% 和 (58 ± 2.47)%, 均显著高于对照 CNE2 细胞激活的 T 细胞(均 $P < 0.01$)。结论: CD80-SA 融合蛋白可有效锚定于生物素化的 CNE2 细胞表面, 从而增强 T 细胞对 CNE2 细胞的杀伤活性。

[关键词] CD80; 链亲和素; 生物素; 融合蛋白; 鼻咽癌细胞; T 细胞; 杀伤

[中图分类号] R392.12; R739.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)04-0398-05

CD80-streptavidin-decorated CNE2 cells enhance cytotoxicity of T cells

LI Jin-long¹, CHANG Hong², HU Zhi-ming^{1*}, GAO Ji-min¹ (1. Institute of Biotherapy, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China; 2. Department of Otolaryngology, No. 534 Hospital of PLA, Luoyang 471000, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare CD80-streptavidin (CD80-SA) fusion protein and immobilize it on the surface of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells (CD80-SA-CNE2 cells), so as to investigate the effect of CD80-SA-CNE2 cells on cytotoxicity of T cells. **Methods:** pET21a-CD80-SA-6His expression plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The CD80-SA fusion protein was induced by IPTG, purified by Ni-NTA affinity chromatography and refolded by dialysis. The immobilization rate of CD80-SA on CNE2 cell surface was analyzed by flow cytometry, and the effect of CD80-SA-CNE2 cells on cytotoxicity of T cells was detected by LDH assay. **Results:** CD80-SA fusion protein was successfully prepared and purified. CD80 was lowly expressed on CNE2 cells [(2.233 ± 0.176)%]. CD80-SA fusion protein was effectively immobilized on the surface of biotinylated-CNE2 cells, with the immobilization rate being 73%. Moreover, CD80-SA-CNE2 cells effectively induced cytotoxicity of T cells; the cytotoxic rates of T cells were (37 ± 3.12)%, (51 ± 2.63)% and (58 ± 2.47)% at the E:T ratios of 1:1, 1:20 and 1:40, respectively, which were significantly higher than those of control CNE2 cells (all $P < 0.01$). **Conclusion:** CD80-SA fusion protein can be effectively immobilized on the surface of biotinylated-CNE2 cells, enhancing the cytotoxicity of T cells against CNE2 cells.

[Key words] CD80; streptavidin; biotin; fusion protein; nasopharyngeal carcinoma cell; T cell; cytotoxicity

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(4): 398-402]

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(No. 2006AA02Z4C4);广州市白云区科技计划资助项目(No. 2009-SZ-40)。Project supported by the National High Technology Research and Development Program (863 Program) of China(No. 2006AA02Z4C4), and the Science and Technology Research Program of Baiyun District of Guangzhou City (No. 2009-SZ-40)

[作者简介] 李金龙(1975 -),男,山东省枣庄市人,博士,主要从事肿瘤药理学研究。E-mail: lijnlong75@sina.com

[通信作者] 高基民(GAO Ji-min, corresponding author), E-mail: jimingao@yahoo.com; 胡志明(HU Zhi-ming, corresponding author), E-mail: hzhiming99@126.com。* 共同通信作者

T 细胞介导的免疫反应在机体抗肿瘤过程中发挥关键作用, T 细胞活化需要“双信号”, 即 TCR 与 MHC-抗原多肽复合物结合产生的第一信号; 抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)或肿瘤细胞表达的共刺激分子与 T 细胞上的相应配体结合后提供的 T 细胞活化第二信号(共刺激信号)。“双信号”模式是 T 细胞活化的必须条件, 二者缺一不可^[1]。B7 分子是 T 细胞最重要的共刺激分子, 包括 B7-1(CD80)和 B7-2(CD86), CD80 与相应配体 CD28 的结合能诱导 T 细胞活化并增殖^[24]。许多肿瘤细胞缺乏或低表达共刺激分子, 诱导 T 细胞无能, 逃逸机体免疫系统的攻击^[5-7]。本研究利用肿瘤细胞表面易于被生物素化, 以及链亲和素(streptavidin, SA)与生物素间的高效结合这两个特性, 研制 CD80-SA 融合蛋白, 借助链亲和素与生物素的高效结合的特性, 将 CD80 锚定在生物素化的鼻咽癌细胞 CNE2(低表达 CD80 分子)表面, 增强共刺激信号, 刺激机体产生特异性的 CTL, 达到杀伤肿瘤细胞的目的, 为鼻咽癌的免疫治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株和试剂

菌株 *E. coli* BL21(DE3)和原核表达质粒 pET21a-CD80-SA-6His 由本室构建^[8], 鼻咽癌细胞株 CNE2 购自 307 医院肿瘤生物研究所。IPTG 购自 Sigma 公司, IL-2 购自 Cytolab 公司, 无血清 AIM-V 培养基购自 Hyclone 公司, 高糖 DMEM 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物公司, 淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂, 生物素购自 Pierce 公司, 鼠抗人 CD80-PE 抗体、鼠抗人 CD86-PE 抗体、鼠抗人 HLA-ABC 抗体购自 BD Pharmingen 公司。

1.2 CD80-SA 融合蛋白的诱导表达

将 pET21a-CD80-SA-6His 质粒转化到 BL21(DE3)宿主菌中, 转化后的细菌用含氨苄青霉素(终质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 LB 平皿筛选。随机挑选单菌落, IPTG 诱导后, 用 12% SDS-PAGE 筛选。挑取表达高的单菌落, 37 $^{\circ}\text{C}$ 扩增至光密度值(D_{600})为 0.4 ~ 0.5 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 3.5 h, 离心收获菌体称重, 用 12% SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达水平。

1.3 CD80-SA 融合蛋白的纯化

细胞破碎仪破碎细菌, 离心取包涵体, 先后用 A 液(20 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, pH 8.0)、B 液(20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 2 mmol/L β -ME, 0.1% Triton X-100, pH 8.0)、C 液

(20 mmol/L Tris-HCl, 2 mol/L 尿素, 2 mmol/L EDTA, pH 8.0)、D 液(20 mmol/L Tris-HCl, 50% 异丙醇, 2 mmol/L EDTA, pH 8.0)和 E 液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)洗涤, 最后离心所得的沉淀即为融合蛋白粗品。用 8 mol/L 尿素磷酸盐将其溶解, 离心后取上清, 用 6 mol/L 的尿素磷酸盐(含 β -ME)稀释 2 倍, 之后用亲和层析 Ni-NTA 柱纯化。12% SDS-PAGE 检测 CD80-SA 融合蛋白的纯度。

1.4 CD80-SA 融合蛋白的复性

将纯化的 CD80-SA 融合蛋白调 D_{280} 至 0.2, 用大于 20 倍体积的复性液(20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, pH 8.0)将溶解好的样品脉冲稀释复性, 然后用 50 mmol/L 的 PBS 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 8 h, 每 4 h 换 1 次透析液。离心收集上清, 以 10% SDS-PAGE 检测融合蛋白的复性情况。目的蛋白除菌后, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 Western blotting 鉴定 CD80-SA 融合蛋白

CD80-SA 融合蛋白行 10% SDS-PAGE, 利用半干电转仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。用 5% 的脱脂奶粉于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h 后, 加入鼠抗人 CD80 单克隆抗体(1:3 000 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 加入偶联辣根过氧化物酶的羊抗鼠 IgG 二抗(1:500 稀释), 室温孵育 1 h, 洗涤后用 DAB 显色试剂盒显色。

1.6 流式细胞仪检测 CNE2 细胞 HLA-I、CD80 和 CD86 分子的表达

0.25% 胰蛋白酶消化对数生长期的 CNE2 细胞, 调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, PBS 洗涤 2 次。分别加入鼠抗人 CD80-PE 抗体、鼠抗人 CD86-PE-CY5 抗体和鼠抗人 HLA-ABC 抗体, 室温下避光孵育 15 min, 洗涤后进行流式细胞仪检测。

1.7 CD80-SA 融合蛋白锚定生物素化的 CNE2 细胞

用 0.25% 胰蛋白酶消化对数生长期的 CNE2 细胞, 调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。经优化条件, 选定锚定条件为: 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 生物素常温孵育肿瘤细胞 1 h, 其间不时摇动; PBS 洗涤 3 次后, 加入 CD80-SA (100 ng/ 10^6 细胞)常温孵育 2 h。PBS 洗涤后, 用鼠抗人 CD80-PE 抗体标记, 室温下避光孵育 15 min, 洗涤后进行流式细胞仪检测。

1.8 LDH 法检测 T 细胞杀伤功能

人外周血来自健康志愿者, 采用 Ficoll 淋巴细胞分离液, 离心获得 PBMC(peripheral blood mononuclear cell), 在塑料培养瓶中培养 2 h, 去除贴壁的单核细胞。AIM-V 培养基重悬后, 调整细胞密度至 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 60 U/ml 的 IL-2, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2

条件下培养,3 d后半量换培养基,并补充 IL-2。

用 0.25% 胰蛋白酶消化 CNE2 细胞和 CD80-SA 锚定的 CNE2 细胞,调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。加入 MMC 使其终质量浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$,培养箱内孵育 30 min,用 PBS 洗涤 3 次,作为刺激细胞。以 1:5 比例与 PBMC 混合培养,加入 $60 \text{ U}/\text{ml}$ 的 IL-2,3 d 后半量换培养基,并补充 IL-2,即为 CNE2 细胞和 CD80-SA-CNE2 细胞分别激活的 T 细胞。

取上述激活的两种 T 细胞作为效应细胞,CNE2 细胞作为靶细胞。以 1:1、20:1、40:1 的效靶比,用 LDH 法检测 T 细胞杀伤功能。设置实验孔、靶细胞自发释放孔、效应细胞自发释放孔、靶细胞最大释放孔,每组设 3 个复孔。于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 4 h,离心后取上清 $100 \mu\text{l}$,加入平底酶标板中,加入 $100 \mu\text{l}$ LDH 底物反应液,室温下避光放置 30 min,每孔加 $50 \mu\text{l}$ 盐酸中止酶促反应。酶标仪测定光密度值 (D),测定波长为 490 nm 。细胞杀伤活性 (%) = (靶细胞释放 D 值 - 靶细胞自发释放 D 值 - 效应细胞自发释放 D 值) / (靶细胞最大释放 D 值 - 靶细胞自发释放 D 值) $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件进行多组间方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD80-SA 融合蛋白的表达、纯化与复性

将重组质粒 pET21a-CD80-SA-6His 导入大肠杆菌,经转化筛选后获得表达工程菌。SDS-PAGE 显示,在相对分子质量 40 000 左右有蛋白带,而未经诱导的工程菌无此蛋白带。工程菌经大规模培养诱导和超声裂解后,目的蛋白主要存在于沉淀中,用镍金属螯合层析柱纯化,目的蛋白被吸附,以 $100 \text{ mmol}/\text{L}$ 咪唑缓冲液洗脱。目的蛋白纯化后,SDS-PAGE 和薄层扫描分析,目的蛋白纯度达 95.7%。纯化的 CD80-SA 融合蛋白在尿素体系中采用脉冲稀释法复性,复性后得到的 CD80-SA 融合蛋白非变性条件下以多聚体的形式存在(图 1)。

2.2 Western blotting 鉴定 CD80-SA 融合蛋白与 CD80 单克隆抗体的结合

Western blotting 结果(图 2)证实,制备的 CD80-SA 融合蛋白单体和多聚体均能与 CD80 单克隆抗体结合,并发生显色反应。

2.3 CNE2 细胞表面 HLA-I、CD80 和 CD86 分子的表达

为明确 CNE2 细胞表面与 T 细胞活化相关信号分

子的表达特征,采用流式细胞仪检测了 CNE2 细胞表面 HLA-I、CD80 及 CD86 分子的表达。结果显示,CNE2 细胞的 HLA-I 类分子表达率为 $(99.7 \pm 0.01)\%$,CD86 分子表达率为 $(2.3 \pm 0.56)\%$,CD80 分子表达率为 $(2.2 \pm 0.18)\%$ 。检测证实了 CNE2 细胞表面存在 T 细胞活化的第一信号分子,但是第二信号分子表达缺失。

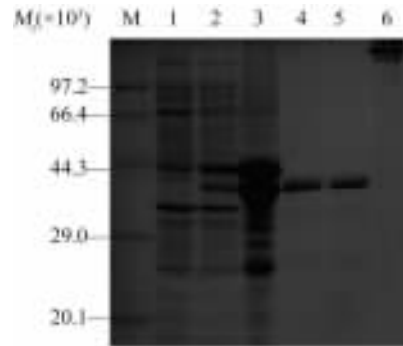


图 1 CD80-SA 融合蛋白表达、纯化与复性的鉴定
Fig. 1 Identification of expression, purification and refolding of CD80-SA fusion protein

M: Marker; 1: Total protein of bacteria not induced by IPTG; 2: Total protein of bacteria induced by IPTG; 3: Inclusion body; 4: Protein purified by Ni-NTA; 5: CD80-SA fusion protein monomer; 6: CD80-SA fusion protein polymer

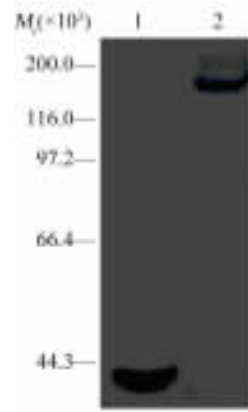


图 2 Western blotting 鉴定 CD80-SA 融合蛋白与 CD80 单克隆抗体的结合
Fig. 2 Interaction of CD80-SA fusion protein with anti-CD80 antibody as detected by Western blotting analysis

1: CD80-SA fusion protein monomer; 2: CD80-SA fusion protein polymer

2.4 CD80-SA 融合蛋白锚定在生物素化的 CNE2 细胞表面

将制备的 CD80-SA 融合蛋白锚定在生物素化的 CNE2 细胞后,流式细胞仪检测锚定后 CNE2 细胞表面 CD80 表达。结果(图 3)显示,CD80-SA 融

合蛋白可有效地锚定于生物素化的 CNE2 细胞表面,锚定效率约 73%。

2.5 CD80-SA 融合蛋白锚定的 CNE2 细胞增强 T 细胞杀伤作用

为明确 CD80-SA 融合蛋白锚定于 CNE2 细胞表面后,是否能增强 T 细胞的杀伤作用,本研究以 CNE2 细胞和 CD80-SA-CNE2 细胞分别激活 T 细胞作为效应细胞,CNE2 细胞作为靶细胞,比较了不同效靶比时 T 细胞的杀伤率。结果(图 4)表明:CD80-SA-CNE2 激活 T 细胞的杀伤率高于 CNE2 激活的 T 细胞($P < 0.01$);而且 T 细胞对 CNE2 的杀伤率随效靶比增加而增高($P < 0.01$)。

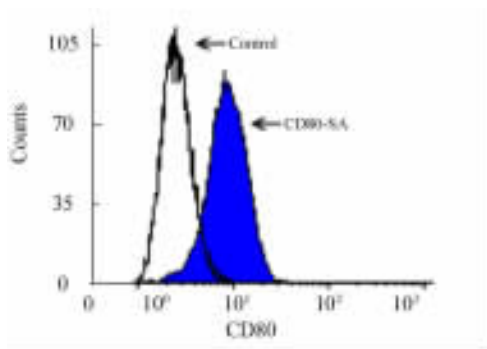


图 3 CD80-SA 融合蛋白锚定在生物素化的 CNE2 细胞表面

Fig. 3 Binding of CD80-SA fusion protein on surface of biotinylated-CNE2 cells

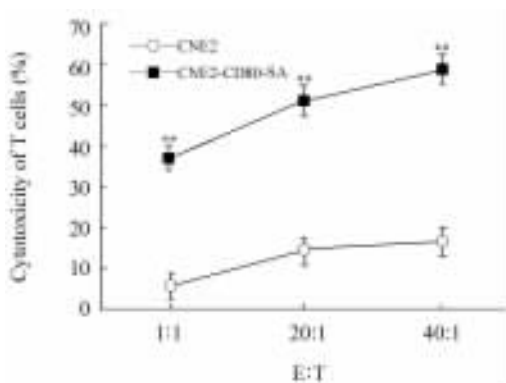


图 4 CD80-SA 锚定的 CNE2 增强 T 细胞的杀伤活性

Fig. 4 CD80-SA-decorated CNE2 cells enhanced cytotoxicity of T cells

** $P < 0.01$ vs CNE2

3 讨论

肿瘤可通过多种方式逃逸机体的免疫监控,肿瘤细胞表面协同刺激因子表达的缺乏是肿瘤细胞逃

避免免疫监视的重要原因之一。大多数肿瘤细胞表达 MHC-I 类分子,但除少数 B 细胞淋巴瘤以外,肿瘤细胞不表达 B7 分子,因此缺乏 T 细胞活化的第二信号,难以诱导肿瘤特异性 T 细胞反应,因此上调肿瘤细胞 B7 分子的表达可增强 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。许多研究试图通过各种途径增加肿瘤细胞表面共刺激信号的表达,其中,通过基因转染等方法增强肿瘤细胞共刺激分子的表达,在实验和临床中均显示出很好的效果^[9-11]。经基因工程改造后表达 B7-1 或者 B7-1a 的 LM8 肿瘤细胞能够显著抑制野生型 LM8 细胞的皮下移植瘤^[12];表达 B7 分子的淋巴瘤 EL4 细胞和肥大细胞瘤 P815 细胞免疫小鼠后可对抗野生型肿瘤细胞,而且其特异性 CTL 活性较野生型肿瘤疫苗显著增高^[13]。针对转移性肿瘤的研究^[14]发现,B7 基因转染的 B16-BL6 肿瘤细胞可以有效抑制经静脉注射野生型 B16-BL6 细胞诱发的肺部转移癌。但是基因转染存在转染和蛋白表达效率低以及生物安全等诸多问题,其临床应用受到限制。另外,通过药物上调肿瘤细胞 B7 的表达也可产生有效的抗肿瘤作用,如阿糖胞苷可上调白血病细胞 K562 及多药耐药 K562/A02 细胞表面 B7 分子的表达,增强 T 细胞对靶细胞的杀伤^[15]。

本研究利用链亲和素-生物素之间高效结合特性,通过制备 CD80-SA 融合蛋白,将 CD80 锚定在生物素化的鼻咽癌 CNE2 细胞表面,此方法简易、高效,并避免了基因转染的诸多缺陷。本研究首先检测了 CNE2 细胞表面 T 细胞活化相关信号分子的表达情况,结果显示,CNE2 细胞表达 HLA-I 类分子,而缺乏 CD80 与 CD86 分子的表达。将制备的 CD80-SA 融合蛋白锚定于生物素化后 CNE2 细胞表面,提供共刺激因子,将有助于其活化 T 细胞。研究结果显示,CD80-SA 融合蛋白可有效地锚定于生物素化 CNE2 细胞表面(图 3),而且 CD80-SA 锚定后的 CNE2 细胞能增强 T 细胞的杀伤活性(图 4)。与基因转染的方法相比,蛋白锚定法有许多优点:首先,蛋白锚定法不依赖于细胞增殖潜能,故可用于较难转染的细胞,对被锚定的细胞没有毒性;其次,在同一细胞中多种基因的共转染及协同表达较困难,但蛋白锚定原则上可允许多种蛋白同时或先后锚定在同一细胞表面;第三:与基因转染不同,蛋白锚定是一个非常迅速的过程,可在体外迅速地进行目的蛋白的细胞锚定。

除本研究外,也有研究采用其他方法在细胞表面进行目的蛋白的锚定或修饰,包括利用糖基磷脂酰肌醇^[16]、棕榈酸^[17]以及 IgG Fc 段^[18-22]将目的蛋

白锚定于细胞膜上, 以及构建 CD80 人鼠嵌合抗体^[23], 但是这些方法的锚定效率往往不高, 而且锚定时间不持久, 其原因可能是锚定基团之间的结合力较弱。本研究中采用的链亲和素和生物素间亲和常数很大, 为抗原-抗体结合力的百万倍, 两者结合的解离常数很小, 呈不可逆性; 而且酸、碱、变性剂、蛋白溶解酶以及有机溶剂等均不影响链亲和素-生物素的结合。因此, 本研究的蛋白锚定技术具有简易、有效、安全的特点, 可应用于肿瘤免疫尤其是肿瘤疫苗的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Greenberg PD. Adoptive T cell therapy of tumors: Mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells [J]. *Adv Immunol*, 1991, 49: 281-355.
- [2] Martín-Fontecha A, Moro M, Crosti MC, Veglia F, Casorati G, Dellabona P. Vaccination with mouse mammary adenocarcinoma cells coexpressing B7-1(CD80) and B7-2(CD86) discloses the dominant effect of B7-1 in the induction of antitumor immunity [J]. *J Immunol*, 2000, 164(2): 698-704.
- [3] Leitner J, Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P. Receptors and ligands implicated in human T cell costimulatory processes [J]. *Immunol Lett*, 2010, 128(2): 89-97.
- [4] Seliger B, Marincola FM, Ferrone S, Abken H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology [J]. *Trends Mol Med*, 2008, 14(12): 550-559.
- [5] Driessens G, Kline J, Gajewski TF. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity [J]. *Immunol Rev*, 2009, 229(1): 126-144.
- [6] Quesnel B. Tumor dormancy and immune escape [J]. *APMIS*, 2008, 116(7-8): 685-694.
- [7] Peggs KS, Quezada SA, Allison JP. Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy [J]. *Immunol Rev*, 2008, 224: 141-165.
- [8] Gao J, Huang S, Li M, Luo R, Wang X, Takashima A. GM-CSF-surface-modified B16. F10 melanoma cell vaccine [J]. *Vaccine*, 2006, 24(25): 5265-5268.
- [9] Yuan S, Shi C, Lv Y, Wang T, Wang H, Han W. A novel *Bacillus Calmette-Guérin*-based breast cancer vaccine that coexpresses multiple tandem repeats of MUC1 and CD80 breaks the immune tolerance and inhibits MUC1-positive breast cancer growth [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2009, 24(5): 607-613.
- [10] Todo T, Martuza RL, Dallman MJ, Rabkin SD. *In situ* expression of soluble B7-1 in the context of oncolytic herpes simplex virus induces potent anti-tumor immunity [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(1): 153-161.
- [11] 刘承利, 臧晓霞, 窦科峰, 朱帮福, 张洪义, 张宏义. 4-1BBL 基因的小鼠肝癌细胞疫苗刺激脾细胞产生细胞因子的研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(2): 115-117.
- [12] Nagamori M, Kawaguchi S, Murakami M, Wada T, Nagoya S, Yamashita T, et al. Intrinsic and extrinsic manipulation of B7/CTLA-4 interaction for induction of anti-tumor immunity against osteosarcoma cells [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(6): 3223-3227.
- [13] Chen L, Mc-Gowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellström I, et al. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity [J]. *J Exp Med*, 1994, 179(2): 523-532.
- [14] Fujii H, Inobe M, Kimura F, Murata J, Murakami M, Onishi Y, et al. Vaccination of tumor cells transfected with the B7-1(CD80) gene induces the anti-metastatic effect and tumor immunity in mice [J]. *Int J Cancer*, 1996, 66(2): 219-224.
- [15] 杨 铭, 范冬梅, 高瀛岱, 赵英新, 周 圆, 许元富, 等. 阿糖胞苷增强白血病细胞 B7 分子表达及促进双功能抗体对靶细胞的杀伤 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(5): 447-451.
- [16] McHugh RS, Ahmed SN, Wang YC, Sell KW, Selvaraj P. Construction, purification and functional incorporation on tumor cells of glycolipid-anchored human B7-1(CD80) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(17): 8059-8063.
- [17] Wahlsten JL, Mills CD, Ramakrishnan S. Antitumor response elicited by a superantigen-transmembrane sequence fusion protein anchored onto tumor cells [J]. *J Immunol*, 1998, 161(12): 6761-6767.
- [18] Chen A, Zheng G, Tykocinski ML. Hierarchical costimulator thresholds for distinct immune responses: Application of a novel two-step Fc fusion protein transfer method [J]. *J Immunol*, 2000, 164(2): 705-711.
- [19] Sturmhoefel K, Lee K, Gray GS, Thomas J, Zollner R, O' Toole M, et al. Potent activity of soluble B7-IgG fusion proteins in therapy of established tumors and as vaccine adjuvant [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(19): 4964-4972.
- [20] Liu A, Hu P, Khawli LA, Epstein AL. Combination B7-Fc fusion protein treatment and Treg cell depletion therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(23): 8492-8502.
- [21] 李和军, 李 频, 周小玲, 郑祥雄. CD80-IgG1 Fc 段融合蛋白真核表达载体的构建及表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(1): 40-46.
- [22] 李 频, 李和军, 张家永, 石国勋, 郑祥雄. CD80-IgG1 Fc 融合蛋白修饰的 HepG2 细胞对淋巴细胞抗肿瘤免疫的影响 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(6): 745-747.
- [23] 王艳茹, 马泓冰, 陈永井, 朱华亭, 刘玉华, 杜阳阳, 等. CD80 人-鼠嵌合抗体对 B 淋巴瘤细胞株 Raji 与 Daudi 的生长抑制及杀伤作用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(7): 615-618.

[收稿日期] 2010-04-22

[修回日期] 2010-06-10

[本文编辑] 徐红梅