

细胞因子基因转导对人乳腺癌细胞 MHC 抗原及细胞膜糖蛋白表达的影响*

于晓斌 唐佩弦 张明伟 彭善云

刘元林 黄碧莲 侯春梅 毛宁

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

近年来众多的实验结果表明,将细胞因子基因转导入肿瘤细胞中,在使肿瘤细胞自分泌产生细胞因子的同时,还可在不同程度上影响肿瘤细胞的生物学及免疫学特性。为探讨细胞因子基因转导影响肿瘤细胞生物学行为的作用机制,我们构建了含人 IL-2、IL-6 基因的逆转录病毒载体,将其分别导入人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞中,检测了细胞因子基因转导对肿瘤细胞 MHC 抗原、及细胞膜多种糖蛋白表达的影响。

材料和方法

1. 质粒

含人 IL-2 及 IL-6 基因全长的 IL-2 及 IL-6 质粒分别由美国 Holbrook 及日本 Toshio Hirano 教授惠赠。逆转录病毒载体 pLXSN 由美国郭亚军教授(Sidney Kimmel Cancer Center)赠送。

2. 试剂

所用试剂及内切酶等分别购自 Promega 及华美生物制剂公司,抗人 HLA-ABC、HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ 单抗购自北京华美及邦定生物制品公司,生物素标记的刀豆球蛋白 A 凝集素(ConA)、大豆凝集素(SBA)、荆豆凝集素(UEA)、麦胚凝集素(WGA)、豌豆凝集素(PSA)及花生凝集素(PNA),均为 Vector 公司产品。

3. 逆转录病毒载体的构建

采用 PCR 方法分别扩增人 IL-6 及 IL-2 基因的编码区片段,于两种基因的 5' 端加入 EcoRI 酶切位点,于 3' 端加入 BamHI 酶切位点。将两种基因分别插入逆转录病毒载体 pLXSN 中,构建成含人 IL-6 及 IL-2 的逆转录病毒载体。

4. 细胞转染

人乳腺癌细胞系 MCF-7,本室冻存。Lipofectin (Gibco)介导的基因转染方法参见试剂盒说明书。

5. 外源基因的检测

MTT 法测定细胞培养上清细胞因子生物活性。以 CTTLL-2 (IL-2 依赖细胞株)测定 IL-2 生物活性,以 7TD1 (IL-6 依赖细胞株)测定 IL-6 活性。

6. 细胞表面 MHC 抗原检测

采用间接免疫荧光染色,流式细胞仪测定。

7. 细胞表面凝集素受体测定

参照 Couch 等人^[2]的方法进行。

8. 统计学处理

采用一元单方差分析。

结 果

1. 靶细胞外源基因检测

以 MTT 法测定 MCF-7 转基因细胞培养上清中的 IL-2 或 IL-6 活性,各基因转导细胞克隆可程度不同地表达 IL-2 或 IL-6,空载体转染细胞 MCF-Neo 培养上清未测出细胞因子活性,测定结果见表 1。

表 1 转基因细胞培养上清细胞因子活性测定

	IL-2 活性 (units/ml/1×10 ⁶ cells/24hr)	IL-6 活性
MCF-7	—	—
MCF-Neo	—	—
MCF-IL2	70—169	—
MCF-IL6	—	21—32

2. 基因转导对 MCF-7 细胞 HLA 抗原表达的影响

对各转基因细胞 HLA 抗原表达的测定

* 本课题受国家博士后科学基金资助。

表明,IL-2、IL-6 基因转导均可明显增强 MCF-7 细胞 MHC I 型抗原的表达,表现为平均荧光强度增强,而对 MHC II 型抗原的表达无明显影响,测定结果见表 2。

3. 基因转导对 MCF-7 细胞膜植物凝集素受体表达的影响

植物凝集素受体是细胞膜表面的一类糖蛋白,不同的植物凝集素及其所对应的糖类见表 3 所示。我们检测了 IL-2、IL-6 基因转导后 MCF-7 细胞表面凝集素受体含量的变化,结果

显示两种基因转导均可使 SBA,UEA 及 WGA 三种凝集素受体的表达明显降低,而使 ConA 受体的表达获得增强,对 PNA 及 PSA 两种凝集素受体的影响 IL-2 及 IL-6 基因转导影响作用不同。IL-2 基因转导可明显增强转导细胞 PNA 受体的表达,对 PSA 受体的表达没有影响,IL-6 基因转导则可使转导细胞 PSA 受体的表达降低,而不影响 PNA 受体的表达。测定结果见表 4.1,4.2。

表 2 三种基因转导对 MHC 抗原表达的影响

Group	MHC I 类抗原		MHC II 类抗原	
	HLA-ABC	DR	DP	DQ
MCF-7	5.94±2.3	11.48±2.8	37.40±10.9	6.24±1.7
MCF-Neo	7.34±2.6	9.32±1.0	38.77±10.1	4.62±0.1
MCF-IL2	17.92±2.6**	15.76±3.1	39.71±9.1	4.65±0.1
MCF-IL6	11.09±3.8**	10.56±1.8	ND	5.03±0.1

各转基因组与对照组比较 ** $P<0.01$ * $P<0.05$ (下同)

表 3 凝集素与其相对应的糖类

植物凝集素	糖
ConAPSA	D-葡萄糖,D-甘露糖
UEA	岩藻糖
PNA	D-半乳糖-(1,3)-N-乙酰半乳糖
SBA	N-乙酰半乳糖胺
WGA	N-乙酰葡萄糖胺,唾液酸

讨 论

细胞因子基因转导可以在不同程度上引起细胞表面成分发生改变,这种改变本身可能与

转基因肿瘤细胞抗原性增强密切相关。IL-6 可增强 MHC 及 CEA、ICAM-1 的表达已有众多报道^[3,4],IL-2 对上述抗原成分的影响如何尚有争议。我们的实验结果表明经细胞因子基因转导的 MCF-7 细胞其 MHC I 型抗原的表达均较对照组增强,此外对细胞膜表面六种植物凝集素受体的测定也表明,尽管不同基因转导所致的改变并不完全相同,但两种细胞因子基因转导均可降低肿瘤细胞表面 SBA,UEA 及 WGA 的表达,提高 ConA 的表达,提示转基因细胞表面糖蛋白的结构或分布发生了明显改

表 4.1 三种基因转导对细胞表面凝集素受体表达的影响

	平均荧光强度		
	ConA	PNA	PSA
MCF-7	20.47±0.46	22.92±2.30	102.96±3.93
MCF-Neo	20.75±1.22	32.42±4.66	109.08±5.96
MCF-IL2	31.65±0.79**	49.75±2.75**	112.83±4.31
MCF-IL6	22.08±0.64*	24.30±1.60	56.56±2.40**

表 4.2 三种基因转导对细胞表面凝集素受体表达的影响

	平均荧光强度		
	SBA	UEA	WGA
MCF-7	113.51±3.01	581.18±19.10	367.99±10.34
MCF-Neo	109.31±4.09	700.48±22.36**	339.21±10.23
MCF-IL2	100.04±4.49*	466.55±14.57**	245.75±7.42**
MCF-IL6	75.21±2.51**	317.08±12.10**	298.68±10.25**

变。Gorelik 等人将 $\alpha 1,3$ 半乳糖转移酶基因导入小鼠黑色素瘤细胞中,结果表明基因转移细胞表面多种凝集素的表达发生明显改变并伴之以转移能力降低。推测其原因是 $\alpha 1,3$ -半乳糖转移酶可降低肿瘤细胞膜的唾液酸化程度^[7]。肿瘤细胞表面的唾液酸化程度高有助于减低肿瘤特异的免疫原性,因为 NK 细胞及巨噬细胞表面存在识别与结合甘露糖及 N 乙酰氨基葡萄糖的凝集素,唾液酸化则遮盖此凝集素配体的被识别位点,从而有助于逃避宿主的天然免疫机制^[8]。细胞因子基因转导为何能改变 MHC 抗原及细胞膜各种糖蛋白的表达,其机制尚不清楚,但细胞膜抗原及糖蛋白的变化显然是导致转基因肿瘤细胞致瘤性降低,免疫原性增强的重要因素之一。

摘 要

为探讨细胞因子基因(人 IL-2、IL-6)转导对于肿瘤细胞膜 MHC 抗原及细胞膜糖蛋白表达调控的影响,本文利用脂质体介导的方法,将含人 IL-6、IL-2 基因的逆转录病毒载体分别导入人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞中,采用间接免疫荧光染色流式细胞仪测定法,对基因转导的瘤细胞细胞膜糖蛋白及 MHC 抗原表达进行

测定。结果表明经两种基因修饰的 MCF-7 细胞 MHC I 型抗原表达均获得增强,此外,基因转导细胞可程度不同地表现出细胞膜多种糖蛋白表达的变化。提示肿瘤细胞膜抗原及糖蛋白表达的改变可能是细胞因子基因转导影响肿瘤细胞免疫原性的重要结构基础。

关键词: 细胞因子 基因转导 MHC 抗原 糖蛋白

参 考 文 献

- [1] Zhao CH, et al., 1994, *Stem Cells*, **12**:339-345.
- [2] Couch MJ, et al., 1987, *JNCI*, **78**:971-977.
- [3] Tsang KY, et al., 1993, *Immunol Lett*, **36**:179-186.
- [4] Ullmann CD, et al., 1992, *J Immunother*, **12**:231-241.
- [5] Glinsky GV, 1993, *Critical Rev Oncol/Hematol*, **14**:229-278.
- [6] Lapis K, et al., 1992 *Metastasis: Basic Research and its Clinical Applications*, ed. by Rabes H et al., pp. 176-184, Basel. Karger.
- [7] Gorelik E, et al., 1995, *Cancer Res*, **55**:4168-4173.
- [8] 周柔丽, 1994, 生物膜与疾病, 程时主编, pp. 232-256, 北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社, 北京。

EFFECT OF CYTOKINE GENE TRANSDUCTION ON EXPRESSION OF MHC ANTIGEN AND CELL SURFACE GLYCOCONJUGATES

YU Xiao Dan TANG Pei Xian ZHANG Ming Wei PENG Shan Yun

LIU Yuan Lin HUANG Bi Lian HOU Chun Mei and MAO Ning

(Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT

The possible mechanism of cytokine gene transfer modulating tumor cell immunogenicity was investigated via comparing the effect of cytokine genes transfection (IL-2 and IL-6) on tumor cell membrane MHC antigens and cell surface glycoconjugates. The retroviral vectors for human IL-2 and IL-6 were constructed respectively and were introduced into human mammary carcinoma MCF-7 cell line. The effect of various gene transduction on the expression of tumor cell MHC antigen and lectin receptors was investigated by indirect immunofluorescence stain and FACS assay. The data show that both IL-2 and IL-6 gene-modified cells demonstrate increased expression of major histocom-

patibility complex class I. Modulation of the cell surface glycoconjugate expression was also observed in the gene-modified MCF-7 cells. It was suggested that the changes of tumor cell surface antigens and glycoconjugate expression modulated by cytokine gene transfer may be one of the most important structure basement which affect the tumor recognition and induce antitumor immunity.

Key words: Cytokine Gene-transfer MHC antigen Glycoconjugate

应用氯化锶和放线菌酮对小鼠卵母细胞进行孤雌活化的研究*

李光鹏 魏 鹏 孟庆刚 孙兴参 谭景和

(东北农业大学生物工程系 哈尔滨 150030)

卵母细胞活化(activation)是影响胚胎细胞核移植成功率的关键技术环节。研究化学介质对卵母细胞的活化也是了解细胞信号系统及活化动力学问题的重要途径。排出的小鼠卵母细胞在蛋白类因子如促成成熟因子(maturation promoting factor, MPF)和其他系列作用下,停滞在MII中期^[1,2]。这些细胞因子对Ca²⁺敏感。当Ca²⁺升高到一定水平时,能够破坏CSF进而引起MPF失活^[3,4],卵母细胞激活而排出第二极体和形成原核。有人认为,卵母细胞活化过程中蛋白质合成的抑制起到了仅次于Ca²⁺升高的作用^[5]。已证明,机械刺激、温度刺激、电刺激、渗透压刺激以及酶、二价阳离子、钙离子载体、乙醇、蛋白合成抑制剂等均能有效激活小鼠卵母细胞^[1]。然而,对于SrCl₂引起卵母细胞活化的研究尚少^[5,6],国内还未见报道。本试验研究了SrCl₂浓度和作用时间以及卵龄和蛋白合成抑制剂放线菌酮(cycloheximide, CHX)等对小鼠卵母细胞活化的影响,为研究哺乳动物孤雌生殖和提高胚胎细胞核移植成功率提供基础数据。

材料与方 法

1. 卵母细胞的获得

于下午3:00给控光(6:00—20:00光照,20:00—6:00黑暗)饲养的8—12周龄昆明种小白鼠腹腔注射PMSG 10 IU/只,48小时后注射hCG 10 IU/只。于注射hCG次日按所需卵龄用断颈椎法处死小

鼠,取输卵管。划破输卵管壶腹部收集卵丘-卵母细胞复合体(COC)。

2. 活化处理

将COC洗涤3—5次,按不同的试验设计放入覆有石蜡油的活化液或对照组液体中,在37℃、5%CO₂的培养箱中进行活化处理。处理结束后,将COC置相应液体中洗涤5—8次后,转入M16培养液中培养6小时。培养结束时,用含0.1%透明质酸酶的M16液脱除COC的卵丘细胞并洗涤3次后,在倒置镜下观察和记录卵母细胞活化情况。

3. 活化鉴定

只有出现1原核1极体(1PN,1Pb)、1原核2极体(1PN,2Pb)、2原核1极体(2PN,1Pb)或2-细胞各有一个原核的卵母细胞判断为活化^[7]。卵质膜破裂者判断为死亡。胞质分裂一次或多次但不出现原核者判断为碎裂(fragmentation)。本试验将碎裂卵均划归未活化。每组试验均重复3次以上。

4. 数据分析

实验数据经t检验进行统计学处理。

结 果

一、SrCl₂浓度对小鼠卵母细胞活化的影响

SrCl₂活化液是先用0.9%生理盐水配制16mmol/L和20mmol/L SrCl₂浓储液,使用前加无钙M16稀释到所需浓度。取注射hCG后

* 国家教委跨世纪优秀人才基金和黑龙江省杰出青年科学基金资助项目。