

文章编号:1005-6947(2007)05-0442-04

· 基础研究 ·

CD1_D 基因与 B7-1 基因共转染胰腺癌细胞及其抗癌作用的实验研究

王昆华, 龚昆梅, 张勇学, 钟鸣, 欧阳一鸣, 凌平, 黄映光, 张剑, 朱宇, 刘为军, 赵喜荣

(云南省第一人民医院 普通外科, 云南 昆明 650032)

摘要:目的 观察共转染小鼠 B7-1 和 CD1_D 基因对小鼠胰腺癌细胞的免疫应答。方法 将表达 B7-1 和 CD1_D 基因的逆转录病毒载体导入包装细胞系, 然后转染入胰腺癌细胞。用 PCR 和 Western 方法鉴定细胞表达; 用 B7-1 和 CD1_D 阳性的细胞在体内诱导抗肿瘤免疫反应。结果 B7-1 和 CD1_D 阳性的细胞在同基因小鼠体内能诱导抗肿瘤免疫反应并抑制肿瘤生长。结论 B7-1 基因和 CD1_D 基因共转染肿瘤细胞, 能抑制肿瘤生长, 可能为肿瘤的基因治疗开辟一条新途径。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(5): 442-445]

关键词: 基因, CD1_D; 基因, B7-1; 转染; 胰腺癌细胞

中图分类号: R34-33; R735.9

文献标识码: A

Study of cotransfection of B7-1 gene and CD1_D gene in pancreatic carcinoma cell and its anti-tumor responses in mice

WANG Kun-hua, GONG Kun-mei, ZHANG Yong-xue, ZHONG Ming, OUYANG Yi-ming, LIN Ping, HUANG Ying-guang, ZHANG Jian, ZHU Yu, LIU Wei-jun, ZHAO Xi-rong
(Department of General Surgery, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

Abstract: Objective To study the cotransfection mB7-1 and mCD1_D gene into pancreatic cancer cells of rats and to observe its anti-tumor responses. **Methods** Recombinant retroviral vectors expressing mB7-1 and mCD1_D gene were packaged into GP2-293 cell lines and transfected. The expressions of mB7-1 and mCD1_D were detected with PCR and Western blot. The positive cells of mB7-1 and mCD1_D were used to induce the anti-tumor immunity in vitro. **Results** Anti-tumor immunity was induced after B7-1 and CD1_D positive cells were coinoculated in syngeneic mice. Furthermore, the growth of tumor was inhibited. **Conclusions** Cotransfection of B7-1 and CD1_D could induce anti-tumor effect. This study provide a foundation for the application of B7-1 and CD1_D gene therapy in tumor.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(5): 442-445]

Key words: Genes, CD1_D; Genes, B7-1; Transfection; Pancreatic Carcinoma Cell

CLC number: R34-33; R735.9

Document code: A

胰腺癌是消化系统高度恶性肿瘤, 5 年生存率在 4% 以下, 明确诊断后未经治疗的中位生存期不到 6 个月^[1]。手术切除是惟一有效手段, 但

切除率仍然很低, 因此寻求新的治疗方法具有重要意义。研究^[2]表明, 机体抗肿瘤免疫反应主要是细胞免疫过程。T 细胞在肿瘤排斥及对肿瘤产生特异性记忆中起着重要作用。T 细胞的激活存在双信号作用机制, CD1_D 是惟一存在于人和鼠中的蛋白分子^[3], 其抗原呈递加工途径不同于已知的 MHC-I 类和 MHC-II 类, 可能仍需“第二信

收稿日期: 2006-09-19; 修订日期: 2006-11-07。

作者简介: 王昆华, 男, 云南人, 云南省第一人民医院主任医师, 主要从事胰腺及胃肠方面的研究。

通讯作者: 王昆华 E-mail: wangkunhua1@medmail.com.cn

号”B7分子参与。本实验通过共转染CD1_D和B7-1基因,鉴定基因在细胞内的表达,筛选稳定转染细胞,并观察其在体内诱导机体抗肿瘤的效应,以期激发机体抗肿瘤免疫应答,开创新的基因治疗新模式。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

含小鼠CD1_D基因的重组逆转录病毒载体pLXSN-CD1_D,含小鼠B7-1基因的重组逆转录载体pLXSN-B7-1及纯系转基因小鼠C56BL/6,均由昆明医学院神经科学研究所提供。小鼠胰腺癌细胞系MPC-35,由昆明医学院第一附属医院临床中心提供。包装细胞系GP2-293购自BD公司。脂质体购自Promega公司。聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自大连宝生物公司。CD1_D基因扩增引物、B7-1基因扩增引物由大连宝生物公司合成。羊抗鼠CD1_D单克隆抗体、HRP标记的抗羊IgG、羊抗鼠B7-1单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的抗羊IgG购自晶美公司。

1.2 实验方法

1.2.1 包装细胞的感染及稳定细胞株的获得
通过脂质体方法将pLXSN-CD1_D和pLXSN-B7-1转染包装细胞系GP2-293细胞,经500μg/mL G418筛选后,用NIH3T3细胞测定病毒滴度。收集对G418抗性的细胞培养液,用0.45μm滤膜过滤后存于-70℃冰箱内。用其产生的病毒感染小鼠胰腺癌细胞。

1.2.2 重组逆转录病毒感染小鼠胰腺癌细胞
小鼠胰腺癌细胞新鲜传代24h后换新鲜培养液,按病毒细胞比为2:1加入pLXSN-B7-1和pLXSN-CD1_D以及终浓度为6μg/mL的聚凝胺(polybrene),设立3组对照。37℃温育24h,换新鲜培养液;48h后用500μg/mL G418进行筛选。

1.2.3 PCR鉴定共转染基因在小鼠胰腺癌细胞中的表达
扩增细胞克隆后,提取胰腺癌细胞基因组DNA;以其为模板,分别加入CD1_D和B7-1的引物。CD1_D基因扩增引物1为5'-atcggtacctacatgct-3',引物2为5'-tcaccggtgcttctgataag-3'; B7-1基因扩增引物1为5'-atggcttgcattgtcagttg-3',引物2为5'-ctaaggaagacggctctgc-3',进行PCR扩增反应。取PCR产物做凝胶电泳判断结果。

1.2.4 免疫印迹(Western blot)方法鉴定共转染基因在小鼠胰腺癌细胞中的表达
裂解细胞用Western方法鉴定瞬时表达,观察转基因胰腺癌细胞对肿瘤生长的影响。将pLXSN-B7-1和pLXSN-CD1_D共转染的小鼠胰腺癌细胞以及对照组细胞经裂解收集后,分别用抗小鼠B7-1单克隆抗体和抗小鼠CD1_D单克隆抗体进行Western印迹。

1.2.5 观察转基因胰腺癌细胞对肿瘤生长的影响
取20只8周龄的同基因小鼠分成4组,每组5只,分别在腹部皮下接种相应的转基因胰腺癌细胞。1周后于同一部位再次接种胰腺癌细胞。设立3组实验组(B7-1CD1_D共转染组,B7-1转染组,CD1_D转染组)及空白对照组,观察小鼠存活时间及肿瘤结节生长的变化。

1.3 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用SPSS11.0统计软件,采用t检验, $P < 0.01$ 差异有显著性统计学意义。

2 结 果

2.1 CD1_D基因和B7-1基因共转染胰腺癌细胞的克隆筛选

两基因共转染癌细胞,经G418筛选,于第12天长出细胞克隆,通过有限稀释法获得单克隆细胞株。

2.2 共转染基因在小鼠胰腺癌细胞中表达的PCR鉴定

凝胶电泳结果,可见两条特异的扩增产物,分子质量与CD1_D(1010bp)和B7-1(930bp)基因相符(图1-2)。

2.3 共转染基因在小鼠胰腺癌细胞中表达的Western鉴定

可检测到与小鼠B7-1蛋白分子质量和小鼠CD1_D蛋白分子质量大小相符的特异性条带。分别为35kD和37kD;其中B7-1仅在共转染的细胞中表达,而CD1_D在所有细胞中均可检得(图3-4)。

2.4 转基因胰腺癌细胞对肿瘤生长的影响

用经B7-1和CD1_D共转染的胰腺癌细胞接种小鼠,能明显延长接种胰腺癌细胞小鼠的寿命,且40d肿瘤瘤体明显较少。经单因素方差分析,共转染组与其它组比较差异有显著性($P < 0.01$)。

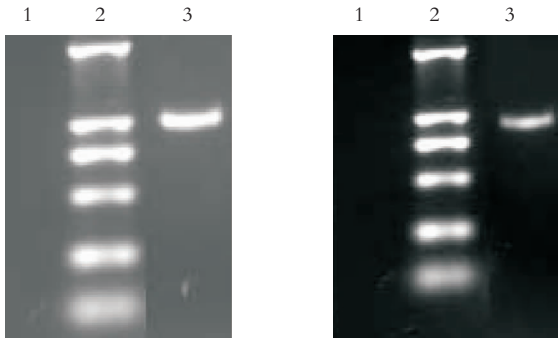


图1 CD1_d基因的PCR检测 1:空白对照; 2:DNA marker DL2000, 从上至下分子质量为2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100; 3: CD1_d基因的PCR产物, 1 010bp



图2 B7-1基因的PCR检测 1:空白对照; 2:DNA marker DL2000, 从上至下分子质量为2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100; 3.: B7-1基因的PCR产物, 930bp



图3 B7-1基因在小鼠胰腺癌细胞中表达的Western鉴定 1: pLXSN-B7-1 + pLXSN-CD1_d转染小鼠胰腺癌细胞; 2: pLXSN-CD1_d转染小鼠胰腺癌细胞; 3: pLXSN-B7-1转染小鼠胰腺癌细胞; 4: 无质粒转染的小鼠胰腺癌细胞

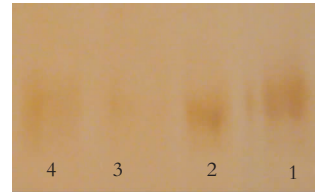


图4 CD1_d基因在小鼠胰腺癌细胞中表达的Western鉴定 1: pLXSN-B7-1 + pLXSN-CD1_d转染小鼠胰腺癌细胞; 2: pLXSN-CD1_d转染小鼠胰腺癌细胞; 3: pLXSN-B7-1转染小鼠胰腺癌细胞; 4: 无质粒转染的小鼠胰腺癌细胞

附表 接种同基因小鼠后小鼠生存时间及瘤体大小的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	瘤体大小(cm)	生存时间(d)
pLXSN-B7-1 + pLXSN-CD1 _d	0.87 [†]	>40 [†]
pLXSN-B7-1	1.28	35
pLXSN-CD1 _d	1.31	32
空白对照	1.32	32

注:†与其它组比较, $P < 0.01$

3 讨论

T细胞的双信号机制,即T细胞的有效激活除需APC提供加工后形成的主要组织相容性复合体(MHC)/抗原肽复合物(第一信号)供T细胞受体识别外,还需提供共刺激信号(第二信号)供T细胞表面的相应配体识别。

B7分子在第二信号的识别中起着重要作用,能活化细胞杀伤功能,导致靶细胞(癌细胞)裂解。此外CD1也具有抗原呈递功能,这是一类无多态性的蛋白质家族,包括CD1A, CD1B, CD1C, CD1_d, CD1E5类蛋白。

B7基因家族包括B7-1基因和B7-2基因,两者均可与CD28或CTLA-4结合并发挥作用^[4]。B7-1主要共刺激CD8+T细胞向CTL分化^[5], CD4+T细胞向Th1细胞分化,在增强和维持有效免疫应答中起着关键作用,其在抗肿瘤免疫中的作用也优于B7-2。故本实验选择以B7-1为对象研究抗肿瘤效应,而选择CD1_d系因它是惟一存在于人和鼠中的分子。由CD1介导的

抗原加工呈递明显不同于MHC I类分子和MHC II类分子介导的信号传递途径;CD1分子在内质网合成,经囊泡转运过程表达于细胞膜表面,通常内吞后与脂质配体结合。其呈递脂类抗原的过程也要经过一系列加工修饰。

本实验以B7-1基因和CD1_d基因共转染胰腺癌细胞,在细胞中检测两种基因表达。其中B7基因仅在转染细胞中表达,相应的转基因接种小鼠未见明显的抗肿瘤效应;CD1_d基因在所有细胞中均有表达,其相应的转基因接种小鼠,亦未见明显的抗肿瘤效应;而共转染两种基因能明显延长生存时间,肿瘤生长抑制。证实两种基因共转染能有效增强机体对胰腺癌的主动免疫排斥反应,加强胰腺癌细胞的免疫原性,对细胞保持免疫刺激及T细胞的活化均有重要作用。结果初步验证了本实验的初衷,即CD1的抗原呈递功能,可能需要第二分子B7参与^[6]。

本实验发现B7-1仅在共转染的细胞中表达,而CD1_d在所有细胞中可检获。结合相关报道^[7]认为,在人体肿瘤组织中B7-1的表达较为微弱,一般情况下难以启动肿瘤主动免疫应答。CD1_d蛋白主要在不成熟的皮质胸腺细胞或抗原呈递细胞中表达^[8-9]。胰腺癌细胞中有大量的抗原呈递细胞,故可检测到CD1_d蛋白。

胰腺癌细胞联合识别免疫效应系统的建立,有助于显著提高机体抗肿瘤的能力。它是一类为有目的地改变肿瘤细胞的抗原性,有效地产生抗肿瘤免疫排斥反应提供的新方法。B7分子与

CD1 分子联合表达对肿瘤特异性的协同刺激作用。使用逆转录病毒载体共转染 B7-1 基因和 CD1_D 基因,可能为肿瘤的基因治疗开辟了一条新途径。

参考文献:

- [1] 吕丽红,张波,曾庆东,等. 5-LOXmRNA 和 VEGFmRNA 在胰腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志,2005,14(11):813-816.
- [2] Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, et al. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. [J] Exp Med, 1991, 173(3):721-730.
- [3] Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids [J]. Ann Rev Immunol, 1999, 17(3):297-329.
- [4] Barnaba V, Watts C, De Boer M, et al. Professional presentation of antigen by activated human T cells [J]. Eur J Im-

- munol, 1994, 24(1):71-75.
- [5] Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses [J]. Ann Rev Immunol, 2002, 20(1):29-53.
- [6] Yashiro Y, Tai XG, Toyo-oka K, et al. A fundamental difference in the capacity to induce proliferation of naive T cells between CD28 and other co-stimulatory molecules [J]. Eur J Immunol, 1998, 28(3):926-935.
- [7] Gruss HJ, Pinto A, Duyster J, et al. Hodgkin's disease: a tumor with disturbed immunological pathways [J]. Immunol Today, 1997, 18(4):156-163.
- [8] Gerlini G, Hefti HP, Kleinhans M, et al. CD1_D is expressed on dermal dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells [J]. J Invest Dermatol, 2001, 117(3):576-582.
- [9] Ausubel FM, Brent R, Kingdom RE, et al. Current Protocols in Molecular Biology [M]. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2003, 177.

文章编号:1005-6947(2007)05-0445-01

· 病案报告 ·

右肝管汇入胆囊壶腹部畸形 1 例

朱大勇

(辽宁省营口市中医院 外二科, 辽宁 营口 115000)

关键词: 胆囊/畸形; 胆道疾病/外科学; 病例报告

中图分类号: R657.4

文献标识码: D

患者 女, 81 岁。3 年前因重症胆管炎进行胆总管切开取石引流术。术后恢复良好, 近 3 个月来反复发作腹痛, 发热, 黄疸入院。经超声及 CT 检查为胆囊结石胆总管扩张下段多发结石, 右肝管内泥沙结石。术中见胆总管扩张, 直径 1.7cm, 下段有多枚结石, 大小不等, 胆汁略混浊, 胆囊正常大小, 但水肿、壁厚, 胆囊颈部有结石嵌顿。解剖胆道时发现右肝管汇入胆囊壶腹, 右肝管直径 1.0cm, 胆

总管切开取石, 探查见十二指肠乳头通畅, 切开右肝管, 其内胆汁脓性, 且有大量泥沙结石及烂肉样物流出, 充分冲洗后行右肝管-胆总管端侧吻合, 于右肝管内置管经吻合口及胆总管引出体外引流, 切除胆囊。术后腹痛消失, 黄疸消退, 术后 3 周带夹闭的 T 管出院。但术后 1 个月患者又出现午后低热, 体温在 38℃ 以下, 经 T 管逆行造影证实左肝管通畅, 右肝管略窄, 考虑支撑占据空间所致引流不畅, 每天给予庆大霉素盐水逆行冲洗 1 次/d, 3d 后明显好转, 6 周后完全恢复正常, 术后 8 周 T 管造影无异常, 经 T 管植入细管于右肝管内, 拔

除 T 管, 见 T 管内有少许烂肉样物及泥沙结石。经该细管连续冲洗 1 周后拔出此管, 观察 1 周, 无异常后出院。出院后每天口服消炎利胆片, 随访 1 年, 患者情况良好, 病情无反复。

讨论 右肝管汇入胆囊是胆道畸形较少见的一种情况。此例因胆囊颈部结石嵌顿导致右肝管内胆汁引流不畅致胆道感染及结石形成。经胆道成形及引流管支撑手术治疗, 而未采用胆肠吻合, 使术后对出现的异常情况有较多的了解和处理手段, 可行造影, 可以置管引流, 可以置管冲洗, 取得了满意效果。

收稿日期: 2007-03-22。

作者简介: 朱大勇, 男, 辽宁人, 辽宁省营口市中医院副主任医师, 主要从事肝脏外科方面的研究。

通讯作者: 朱大勇