

Rev Med, 1987, 38:417

- 2 Alain H, Anza F, Frank K, *et al.* Resistance to endo - toxin shock and reduced dissemination of gram - neg - ative bacteria in CD14 - deficient mice. *Immunity*, 1996, 4:407
- 3 Lei M G, Stimpson S A, Morrison D C. Specific endotoxini lipopolysaccharide - binding receptors on murine splenocytes (Ⅲ): binding specificity and characterization. *Immunol*, 1991, 147:1925
- 4 Hampton R Y, Golenbock D T, Penman M, *et al.* Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature*, 1991, 352:342
- 5 Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, *et al.* CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990, 249:1431
- 6 Ingalls R R, Golenbock D T, CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 1995, 181:1473
- 7 Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, *et al.* Lipopolysaccharide (LPS) binding Protein is carried on lipoproteins and acts a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med*, 1994, 180(3):1025
- 8 Edwin S Van Amersfoort, Theo J C. Van Berkel, *et al.* Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 2003, 16(3):379

-414

- 9 Regine Landmann, Hans - Peter Knope, Susanne Link. Human Monocyte CD14 Is Upregulated by Lipopolysaccharide. *INFECTION AND IMMUNITY*, 1996, 64(5):1762 - 1769
 - 10 Thomas Gutschmann, Mareike Muller, Stephen F Carroll. Dual Role of Lipopolysaccharide (LPS) - Binding Protein in Neutralization of LPS and Enhancement of LPS - Induced Activation of Mononuclear Cells. *INFECTION AND IMMUNITY*, 2001, 69(11):6942 - 6950
 - 11 Regine Landmann, Susanne Link. Soluble CD14 Activates Monocytic Cells Independently of Lipopolysaccharide. *INFECTION AND IMMUNITY*, 1998, 66(5):2264 - 2271
 - 12 William A, Lynn, Yannan Liu. Neither CD14 nor Serum Is Absolutely Necessary for Activation of Mononuclear Phagocytes by Bacterial Lipopolysaccharide. *Infection and immunity*, 1993, 61(10):4452 - 4461
 - 13 Eric Hailman, Henri S, Lichenstein, *et al.* Lipopolysaccharide (LPS) - binding Protein Accelerates the Binding of LPS to CD14. [J]. *Exp. Med*, January, 1994, Volume 179:269 - 277
 - 14 Roselaar S E, A Daugherty Lipopolysaccharide decreases scavenger receptor mRNA in vivo. *J. Interferon Cytokine Res*, 1997, 17:573 - 579
- (收稿:2010-08-13)
- (修回:2010-12-23)

B7 - H4 在人类肝癌细胞株中的表达及药物作用后其在 BEL - 7404 中的表达变化

杜振东 于嘉屏 徐晓萍 林炜炜 徐 磊 彭 凤

摘 要 目的 研究 B7 家族的新成员 B7 - H4 mRNA 在肝癌细胞株中的表达,以及 BEL - 7404 在抗肿瘤药物索拉非尼作用下 mRNA 的表达变化。**方法** 采用反转录聚合酶链反应(RT - PCR)方法检测 10 株肝细胞株中 mRNA 的表达;使用不同浓度索拉非尼杀伤 BEL - 7404 后检测其 B7 - H4 mRNA 的表达。**结果** B7 - H4 mRNA 在部分肝癌细胞株中有表达;在使用索拉非尼后 BEL - 7404 B7 - H4 表达明显下降。**结论** B7 - H4 基因与肿瘤细胞生长活性密切相关。

关键词 肝细胞癌 B7 - H4 肿瘤免疫 索拉非尼

The Expression of B7 - H4 mRNA in HCC Cell Lines and the Changes in BEL - 7404 after Using Sorafenib. Du Zhendong, Yu Jiaping, Xu Xiaoping, Lin Weiwei, Xu Lei, Peng Feng. Department of Clinical Laboratory, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

Abstract Objective To study the mRNA expression of B7 - H4 in hepatocellular carcinoma(HCC) cell lines and the expression changes in BEL - 7404 under anticancer drug sorafenib. **Methods** The mRNA expression of B7 - H4 in ten liver cell lines was detected by reverse transcription polymerase chain reaction(RT - PCR). With different concentrations sorafenib, we observed the change of B7 - H4 mRNA expression in BEL - 7404. **Results** B7 - H4 mRNA was expressed partly in these liver cancer cell lines. B7 - H4 mRNA of BEL - 7404 was significantly decreased after using sorafenib. **Conclusion** B7 - H4 gene is closely related to tumor cell growth activity.

Key words Hepatocellular carcinoma; B7 - H4; Tumor immunity; Sorafenib

作者单位:200127 上海交通大学医学院附属仁济医院检验科

通讯作者:于嘉屏,电子信箱:Yujiapin@online.sh.cn

共刺激分子 B7 家族对激活和抑制 T 细胞免疫非常关键。这些分子不仅提供起始、增强和维持 T 细胞免疫关键的正向第 2 信号,而且产生限制、减弱和中止 T 细胞反应的关键信号^[1];介导机体的抗肿瘤免疫,在肿瘤的发生、发展以及基因治疗等方面具有重要意义。目前为止已经发现的 B7 分子家族共有 7 个成员,分别是 B7-1、B7-2、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-DC 和 B7-H4。B7-H4 的基因表达在卵巢癌、乳腺癌、肺癌和肾癌等都有研究^[2-8];而在肝癌中的研究较少,我们应用 RT-PCR 技术在部分肝癌细胞株中进行筛查。

材料与方法

1. 主要试剂与仪器:培养液 RPMI-1640、DMEM 购自杭州吉诺生物医药技术有限公司,小牛及胎牛血清购自 Gibco; Trizol 及 RNA 反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司; Hotstar Taq DNA 多聚酶购自 Qiagen 公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 购自 Dojindo 日本同仁化学研究所;索拉非尼(sorafenib)购自 LKT Laboratory;引物由上海生工合成;凝胶成像系统(Alpha Innotech);PCR 仪(Biometra T_{GRADIENT});水平电泳仪(Bio-Rad)和全波长酶标仪(TECAN)。

2. 研究对象:8 株人类肝癌细胞株 HepG2 (ATCC HB-8065)、Hep3B (ATCC HB-8064)、BEL-7402、BEL-7404、BEL-7405、QGY-7701、QGY-7703 和 SMMC-7721 及 2 株正常肝细胞株 HL-7702 (又称 L-02) 和张氏肝均购自中国科学院上海细胞生物研究所。HepG2、Hep3B 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养;BEL-7402、BEL-7404、BEL-7405 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养;QGY-7701、QGY-7703、SMMC-7721 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养;HL-7702、张氏肝用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养,均培养于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。

3. 方法:(1)各细胞株 mRNA 水平 B7-H4 的表达:总 RNA 的提取:取对数生长期 1×10^6 个细胞加 1ml Trizol 抽提 RNA,经紫外分光光度计进行总 RNA 定量。cDNA 的合成 20μl 反转录体系中含有 5×缓冲液 4μl、RNA 反转录酶 1μl、3μg/μl 随机引物 1μl、40U/μl RNA 酶抑制剂 1μl、10mmol/L dNTPs 1μl、0.1mol/L DTT 2μl、总 RNA 1μg。操作步骤严格按照产品说明书进行。1)参照文献[9]设计引物:人 B7-H4 引物:上游:5'-GTCGAGCAGGATGAA-3';下游:5'-GAAGCCTTTGAGTTAGC-3',扩增产物为 507bp。人 GAPDH 内参引物:上游:5'-CGGGAAGCTTTCATCAATGG-3';下游:5'-GGCAGTGATGGCATGGACTG-3',扩增产物为 354bp。2)PCR 扩增:B7-H4:PCR 反应体积为 25μl,内含 cDNA 2μl、10×缓冲液 2.5μl、10mmol/L dNTP 0.5μl、上下游引物(5μmol/L)各 1μl、Hotstar Taq DNA 聚合酶 1U,以去离子水补足 25μl。反应条件为:95℃ 15min 预变性,94℃ 变性 20s,56℃ 复性 20s,72℃ 延伸 1min,循环 35 次,72℃ 延伸 10min。GAP-

DH:PCR 反应体系与 B7-H4 相同,反应条件中循环次数减少为 25 个。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。(2)CCK-8 确定索拉非尼对 BEL-7404 细胞的半数致死量:选择对数生长期的 BEL-7404 细胞,以 0.2% 胰酶消化离心后,将细胞浓度调整至 4×10^4 /ml,铺入 96 孔平底板,每孔 100μl,分别加入不同浓度的索拉非尼,使其终浓度为 1.25μmol/L、2.5μmol/L、5μmol/L、10μmol/L、20μmol/L、40μmol/L,终体积为每孔 200μl,每个浓度设 6 复孔,37℃、5% CO₂ 培养 72h。在培养至 68h 时,每孔加入 20μl CCK-8 液体,继续培养 4h。以 450nm 主波长、630nm 校准波长检测各孔吸光度值。用 IC50 计算器计算索拉非尼对 BEL-7404 的半数致死量。(3)索拉非尼作用后 BEL-7404 细胞 B7-H4 表达的改变:选择 5μmol/L、10μmol/L 索拉非尼作为工作浓度。将 BEL-7404 细胞浓度调整至 2×10^5 /ml,铺入 6 孔板中,每孔 1ml。其中 4 孔加入索拉非尼,使其终浓度分别为 5μmol/L、10μmol/L,终体积为 2ml。各设 2 复孔,另外两孔补足培养液至 2ml,作为正常对照。置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。72h 后,弃上清液,用 PBS 洗去残留培养液,每孔加入 500μl Trizol 直接裂解细胞,提取 RNA,进行 RT-PCR 反应。

结 果

1. 各细胞株 B7-H4 mRNA 的表达:8 株肝癌细胞株中,BEL-7404、BEL-7405、SMMC-7721 和 Hep3B 有 B7-H4 表达,且 BEL-7404 的表达量最高;2 株正常肝细胞中均无 B7-H4 表达。各细胞株 B7-H4 mRNA 的表达和灰度比分别见图 1、图 2 所示。

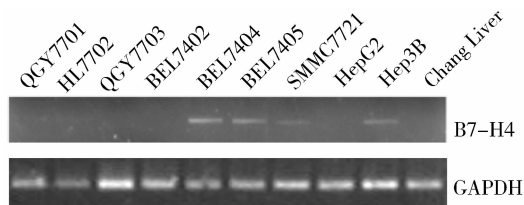


图 1 各细胞株中 B7-H4mRNA 的表达

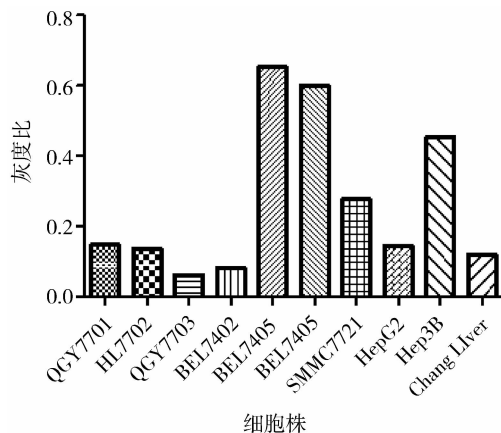


图 2 各细胞株中 B7-H4mRNA 表达的灰度比

2. 索拉非尼对 BEL-7404 细胞的杀伤作用及 B7-H4 表达的影响: 索拉非尼对 BEL-7404 的杀伤作用随药物浓度的增加而加强, 杀伤曲线见图 3 所示。其对 BEL-7404 作用 72h 的半数致死量 (IC_{50}) 经计算后为 $9.1 \mu\text{mol/L}$ 。根据 IC_{50} 计算结果, 以 $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 索拉非尼作为工作浓度, 培养 BEL-7404 72h 后, 镜下观察细胞状态明显不佳。取细胞抽提 RNA 做 RT-PCR 检测, 结果显示 B7-H4 mRNA 表达明显下降, 且随索拉非尼的浓度增高而下降越明显 (图 4、图 5)。

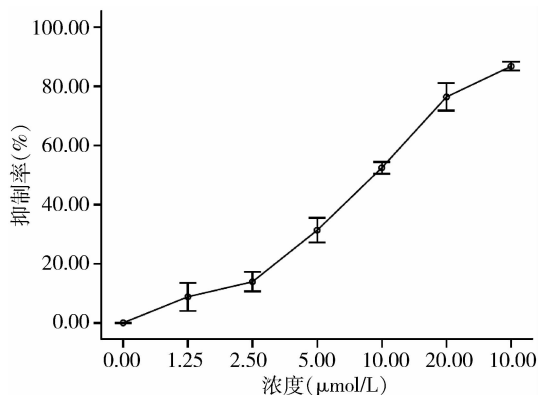


图 3 不同浓度时索拉非尼对 BEL-7404 细胞的抑制率

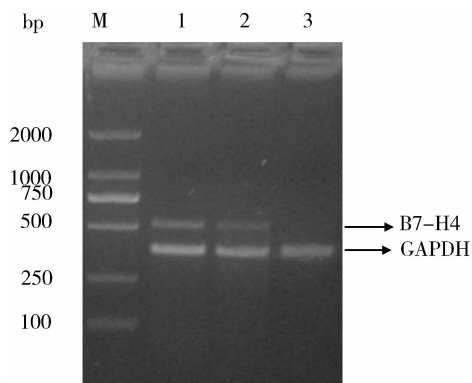


图 4 BEL-7404 细胞在索拉非尼作用下 B7-H4 mRNA 的表达

图中 M 为核酸电泳标准相对分子质量; 1. 正常对照组;
2. 加入 $5 \mu\text{mol/L}$ 索拉非尼组; 3. 加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 索拉非尼组

讨 论

B7-H4 (又称 B7S1、B7x、) 是最近发现的 B7 分子, 它是 B7 分子家族中第 1 个 GPI (glycosylphosphatidylinositol) 偶联蛋白, 而其他成员是 I 型跨膜糖蛋白, 主要表达在 B 细胞、巨噬细胞、成熟的树突状细胞 (dendritic cell, DC) 和某些肿瘤细胞^[10]。在人体抗

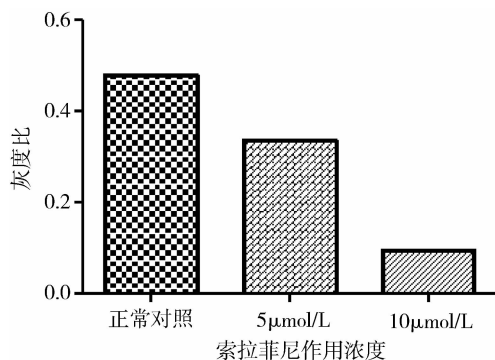


图 5 索拉非尼对 BEL-7404 细胞作用后 B7-H4 mRNA 表达的灰度比

肿瘤免疫的机制中, T 细胞介导的细胞免疫是主要方式。而初始 T 细胞的活化既需要由 T 细胞受体 (TCR) 与抗原递呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 上的抗原肽-MHC 分子复合物结合提供的第 1 信号, 还需要由 APC 上的协同刺激分子与 T 细胞上的相应配体结合提供的第 2 信号协同刺激, 只有双信号共同刺激才能有效地调节 T 细胞功能。近年来研究表明, B7-H4 通过抑制 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的增殖、细胞因子的分泌和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 细胞周期的进程来负性调控 T 细胞的免疫应答。B7-H4 能把 T 细胞阻止在细胞周期的 G_0/G_1 期, 抑制其成熟, 并且抑制 T 细胞对异常抗原的免疫应答, 使其处于克隆无能或无应答状态, 无法有效地杀伤肿瘤, 最终致使肿瘤细胞逃避机体免疫系统的监控而生长、分裂和增殖^[11]。总之, B7-H4 是 T 细胞免疫应答的负向调节因子^[12]。

在已进行的肿瘤 B7-H4 的研究中, 多涉及乳腺癌、卵巢癌、肾癌和肺癌等, 但在肝癌方面研究甚少, 尤其在国内外鲜有报道。本研究中的 8 株肝癌细胞株、2 株正常肝细胞株为国内外常用细胞株, 我们首先对其 mRNA 水平的 B7-H4 进行检测报道, 为以后的工作提供了初步依据。在我们所选的 8 株肝癌细胞株中, BEL-7404、BEL-7405、SMMC-7721 和 Hep3B 有 B7-H4 mRNA 表达, 表明 B7-H4 是这 4 株肝癌细胞逃避机体免疫监控的一种方法; 当然, 肿瘤细胞逃避机体免疫监控的机制是多样的, 肿瘤细胞的免疫逃逸是多因素多机制共同作用的结果。B7-H4 只是众多方法中的一种, 我们仅对这一种做了简单的分析。B7-H4 分子不仅在肿瘤中, 也在肿瘤免疫治疗、移植后排斥反应和自身免疫性疾病中 T 细胞的免疫应答中起重要作用, 有待我们进一步研究。

索拉非尼是一种口服多激酶抑制剂,一方面通过靶向作用于 Raf/MEK/ERK 信号传导通路中的 RAF 激酶阻断肿瘤细胞增殖,另一方面靶向作用于血管内皮生长因子受体 2、3(VEGFR-2、3)和血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β)而发挥抗血管生成效应。Raf/MEK/ERK 级联的信号传导在肝细胞癌进展中发挥重要作用^[13],并有研究发现 RAF 激酶在大部分肝细胞癌中过度表达^[14]。因此,通过阻断 RAF 激酶的信号传导及 VEGFR 的作用可能会对肝细胞癌起到治疗效果。本研究中 BEL-7404 在索拉非尼的作用下,细胞生长明显受抑,表明索拉非尼阻断了肿瘤细胞的信号传导通路,抑制了肿瘤细胞的生长。同时 B7-H4 基因表达明显下降,提示其与肿瘤细胞的活性密切相关。

参考文献

- 1 Carreno B M, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for co-stimulation and inhibition of immune response [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 29-53
- 2 Anderson GL, McIntosh M, Wu L, *et al*. Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case-control study [J]. *Natl Cancer Inst*, 2010, 102(1): 26-38
- 3 Oikonomopoulou K, Li L, Zheng Y, *et al*. Prediction of ovarian cancer prognosis and response to chemotherapy by a serum-based multiparametric biomarker panel [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(7): 1103-1113
- 4 Tringler B, Zhuo S, Pilkington G, *et al*. B7-h4 is highly expressed in ductal and lobular breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(5): 1842-1848
- 5 Zhang J, Zhang M, Jiang W, *et al*. B7-H4 gene polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in a Chinese Han population

- [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 394
- 6 Sun Y, Wang Y, Zhao J, *et al*. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2006, 53(2): 143-151
- 7 Crispin PL, Boorjian SA, Lohse CM, *et al*. Predicting disease progression after nephrectomy for localized renal cell carcinoma: the utility of prognostic models and molecular biomarkers [J]. *Cancer*, 2008, 113(3): 450-460
- 8 Krambeck AE, Thompson RH, Dong H, *et al*. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature associations with cancer progression and survival [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(27): 10391-10396
- 9 Y Chen, C Yang, Z Xie, *et al*. Expression of the novel co-stimulatory molecule B7-H4 by renal tubular epithelial cells [J]. *Kidney Int*, 2006, 70(12): 2092-2099
- 10 Chambers CA. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited [J]. *Trends Immunol*, 2001, 22(4): 217-223
- 11 Sica G L, Choi I H, Zhu G, *et al*. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity [J]. *Immunity*, 2003, 18(6): 849-861
- 12 Prasad DV, Richards S, Mai XM, *et al*. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation [J]. *Immunity*, 2003, 18(6): 863-873
- 13 Wieseaaue CA, Yip Schneider MT, Wang Y, *et al*. Multiple anti-cancer effects of blocking MEK-ERK signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *J Am Coll Surg*, 2004, 198(3): 410-421
- 14 Hwang YH, Choi JY, Kim S, *et al*. Over expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatol Res*, 2004, 29(2): 113-121

(收稿: 2010-09-16)

(修回: 2010-11-15)

OPV 诱导恒河猴黏膜免疫应答研究

杨卉娟 陈俊英 和占龙 孙强明 施海晶 李 华 马绍辉

摘 要 **目的** 评价 OPV 诱导恒河猴黏膜免疫应答效果。**方法** 将 20 只恒河猴随机分成 3 个实验组(第 1 组: OPV + OPV + OPV, 第 2 组: IPV + IPV + OPV + OPV, 第 3 组: IPV + IPV + OPV)和 1 个对照组, 采集不同时间恒河猴粪便和唾液, 检测粪便和唾液中脊髓灰质炎病毒特异性 IgA; 通过细胞培养和中和试验对口服 OPV 后恒河猴粪便排毒状况进行分析。**结果** 粪便和唾液中 IgA 效价随着接种剂数增加而增高, 3 个组全程免疫后 30 天粪便样品中 IgA 效价第 1 组最高, 第 2 组次之, 第 3 组最低, 3 组间两两比较有统计学差异(方差分析, $P < 0.05$)。口服 OPV 后恒河猴粪便中均可分离到 3 个型的疫苗病毒。**结论** OPV 可诱导恒河猴咽部和肠道产生良好的黏膜免疫应答, 口服 OPV 后 3 个型疫苗病毒均能在肠道增殖。

关键词 OPV 黏膜免疫应答 脊髓灰质炎病毒 IgA 疫苗病毒排泄

作者单位: 650118 昆明, 中国医学科学院医学生物学研究所

通讯作者: 马绍辉, 电子信箱: shaohuima70@126.com