

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )04-0317-05

## 稳定表达 sCD40L 的 CHO 细胞系的建立和鉴定

蒋华蔚,任秀宝\*,于津浦,李慧,曹水(天津医科大学附属肿瘤医院免疫学研究室,天津市肿瘤防治重点实验室,天津 300060)

**[ 摘要 ]** 目的:建立稳定表达 sCD40L 的 CHO 细胞系。方法:从含 sCD40L 的载体 pDC316-sCD40L 中,将 sCD40L 编码序列克隆入真核表达载体 pIRES2-EGFP,获得重组质粒 pIRES2-EGFP-sCD40L,酶切及测序鉴定。电穿孔转染 CHO 细胞,G418 筛选抗性克隆,有限稀释法获取单克隆后扩大培养。流式细胞术、倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达;使用 PCR、RT-PCR、ELISA 方法分别从 DNA、mRNA、蛋白水平对 sCD40L 的表达进行检测。Western blotting 检测 CHO-sCD40L 分泌的 sCD40L 与膜型 CD40 的结合;将 CHO-sCD40L 与 MDA-MB-231 细胞共孵育 24 h 后,流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞表面分子 Fas 的表达变化;加入 Fas 激活性抗体(CH-11)后观察 MDA-MB-231 细胞的凋亡。结果:成功构建质粒 pIRES2-EGFP-sCD40L,转染 CHO 细胞后经克隆化培养获得稳定表达 sCD40L 的细胞系 CHO-sCD40L。流式细胞术、倒置荧光显微镜检测绿色荧光蛋白表达高达 90% 以上;PCR 检测证实 sCD40L 基因整合入细胞基因组 DNA;RT-PCR 检测到 sCD40L mRNA 的转录;ELISA 法检测到细胞培养上清中有 sCD40L 蛋白表达,高达  $(4.5 \pm 2.1)$  ng/ml。Western blotting 证实 CHO-sCD40L 分泌的 sCD40L 可与膜型 CD40 结合。CHO-sCD40L 与 MDA-MB-231 细胞共培养后,MDA-MB-231 细胞表面 Fas 表达由  $(3.0 \pm 1.02)$ % 升高到  $(34.8 \pm 8.75)$ %;加入 CH-11 24 h 后,凋亡率由  $(5.4 \pm 1.32)$ % 提高到  $(20.7 \pm 5.24)$ % ( $P < 0.01$ )。结论:成功获得稳定表达 sCD40L 的 CHO 细胞系,为研究 CD40/CD40L 途径在肿瘤免疫治疗中的应用提供了有用的工具。

**[ 关键词 ]** 可溶性 CD40 配体;CHO 细胞;绿色荧光蛋白;凋亡;Fas

**[ 中图分类号 ]** R730.3 **[ 文献标志码 ]** A

## Establishment and identification of a Chinese hamster ovary cell line stably expressing sCD40L

JIANG Hua-wei, REN Xiu-bao\*, YU Jin-pu, LI Hui, CAO Shui( Department of Immunology, Cancer Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Tianjin 300060, China )

**[ Abstract ]** **Objective:** To establish a Chinese hamster ovary cell line stably expressing sCD40L. **Methods:** sCD40L was obtained from vector pDC316-sCD40L by restricted enzymatic resection and was inserted into eukaryotic expression plasmid pIRES2-EGFP to construct a recombinant expression plasmid pIRES2-EGFP-sCD40L. The recombinant plasmid was then digested with *Bgl* II and *Sal* I and was confirmed to contain full length of pIRES2-EGFP-sCD40L cDNA by agarose gel analysis and DNA sequence analysis. The CHO cells were transfected with the recombinant plasmid by using electroporation and screened with antibiotic G418. Single clones expressing sCD40L were obtained by limited-dilution method. EGFP-positive cells were detected by flow cytometry and inverted fluorescence microscopy. The DNA integration and mRNA expression of sCD40L in positive clones were detected by PCR and RT-PCR; the protein of sCD40L was evaluated by ELISA; and the conjugation between sCD40L and CD40 was detected by Western blotting. MDA-MB-231 cells were cocultured with CHO-sCD40L for 24 h and the changes of Fas expression on MDA-MB-231 cell surface were detected by FCM; the apoptosis of MDA-MB-231 cells was observed 24 h after cocultured with anti-Fas activating antibody(CH11). **Results:** A recombinant eukaryotic expression plasmid pIRES2-EGFP-sCD40L was successfully constructed. A CHO-sCD40L cell line stably expressing sCD40L was subsequently obtained. FCM and inverted fluorescence microscope showed that 90% of the cells had positive fluorescent signals; PCR and RT-PCR confirmed that incorporation of sCD40L DNA and expression of sCD40L mRNA; ELISA revealed an expression of sCD40L protein of  $(4.5 \pm 2.1)$  ng/ml in the supernatant; and Western blotting displayed CHO-sCD40L cells-secreted sCD40L could conjugate with CD40. The expression of Fas on

**[ 基金项目 ]** 天津市自然科学基金资助项目( No.023611011 ). Supported by Natural Science Foundation of Tianjin( No.023611011 )

**[ 作者简介 ]** 蒋华蔚( 1981 - ),女,山西省运城市人,硕士,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究, E-mail: jianghuawei411@163.com

\* Corresponding author. E-mail: rwziyi@yahoo.com

the surface of MDA-MB-231 cells increased from ( 3.0 ± 1.02 )% to ( 34.8 ± 8.75 )% after cocultured with CHO-sCD40L cells; the apoptotic rates of MDA-MB-231 cells increased from ( 5.4 ± 1.32 )% to ( 20.7 ± 5.24 )% after cocultured with CH-11 (  $P < 0.01$  ). **Conclusion:** We have successfully established a CHO cell line stably expressing sCD40L, which may help to investigate the role of CD40/CD40L pathway in the adjuvant immunotherapy of tumor.

[ **Key words** ] soluble CD40 ligand; CHO cell; green fluorescent protein; apoptosis; Fas

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14( 4 ): 317-321 ]

CD40 配体 ( CD40 ligand, CD40L ), 也称 CD154, 是肿瘤坏死因子 ( tumor necrosis factor, TNF ) 家族成员。CD40 与其配体 CD40L 是免疫反应中重要的共刺激分子, 在细胞和体液免疫反应中发挥重要作用, 被广泛应用于多种疾病研究。CD40/CD40L 与肿瘤的发生、发展及治疗的关系受到了越来越多的重视。研究表明两者相互作用能诱导凋亡和抑制肿瘤细胞生长<sup>[1]</sup>, 且 CD40L 抗肿瘤基因治疗在动物实验、临床应用上也取得了一定效果<sup>[2]</sup>。

CD40L 除位于细胞膜上相对分子质量为 39 000 的全长 CD40L 外, 还有 3 种天然存在形式, 它们的相对分子质量分别为约 29 000、18 000、14 000, 均为可溶性分子, 也称可溶性 CD40L ( soluble CD40L, sCD40L ), 研究表明其中仅 18 000 的 sCD40L 具有生物学活性<sup>[3]</sup>。本研究构建了携带 18 000 的 sCD40L 编码序列的真核表达质粒载体, 转染 CHO 细胞, 并在该细胞中获得稳定持久表达, 通过体外功能实验进一步考察其在抗肿瘤免疫中的活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

质粒 pDC316-sCD40L 和 pIRES2-EGFP 由本室提供。中国仓鼠卵巢上皮细胞 CHO、乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MCF-7 为本室保存。感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、Oligo- ( dT ) 15、RNase inhibitor、ExTaq 酶、dNTP、限制性内切酶 *Bgl* II、*Sal* I 购自 TaKaRa 公司, M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司, PCR 产物回收试剂盒、真核细胞蛋白提取试剂盒购自博大泰克公司。T4 DNA 连接酶购自 Roche 公司。人 sCD40L ELISA 试剂盒购自 Bender MedSystems 公司。核酸提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。G418 购自 Gibco BRL 公司。Fas 激活性抗体 CH11 购自 Upstate Biotechnology 公司。SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate 试剂盒购自 Pierce 公司。一抗兔抗人 CD154 多克隆抗体 ( sc-978 ) 购自 SANTA CRUZ Biotechnology 公司, 二抗辣根过氧化物酶 ( HRP ) 标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自中衫金桥生物公司。预染蛋白 Marker ( prestained Broad

Range Markers sc-2361 ) 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。AnnexinV-FITC 凋亡试剂盒购自 BD Pharmingen 公司。

### 1.2 质粒 pDC316-sCD40L 和 pIRES2-EGFP 的扩增及鉴定

分别从 pDC316-sCD40L 和 pIRES2-EGFP 质粒的菌种中各取出 200  $\mu$ l, 均匀涂布于 Amp<sup>+</sup> 和 kan<sup>+</sup> LB 琼脂糖平板, 37  $^{\circ}$ C 温箱过夜, 次日从转化有两种质粒的琼脂糖平板中各挑取 10 个克隆, 分别接种于 5 ml Amp<sup>+</sup> 和 kan<sup>+</sup> LB 培养基中, 于 37  $^{\circ}$ C 摇床上 300 r/min 振荡培养过夜。按照碱裂解法提取质粒, 并行 *Bgl* II、*Sal* I 双酶切, 反应产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察酶切结果。

### 1.3 重组质粒 pIRES2-EGFP-sCD40L 的构建

取酶切鉴定正确的两种质粒菌种分别接种于 100 ml Amp<sup>+</sup> 和 kan<sup>+</sup> LB 培养基中, 于 37  $^{\circ}$ C 摇床 300 r/min 振荡培养过夜。按照碱裂解法提取质粒, 并行 *Bgl* II、*Sal* I 双酶切, 反应产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切取含有目的片段 sCD40L 和载体 pIRES2-EGFP 的凝胶并回收纯化, 利用 T4 DNA 连接酶进行连接。将连接体系转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  后, 涂布于 Kan<sup>+</sup> LB 琼脂糖平板, 37  $^{\circ}$ C 温箱过夜, 挑取发育良好、直径 1~2 mm 的单个菌株 10 个, 分别接种于 5 ml Kan<sup>+</sup> LB 培养基, 于 37  $^{\circ}$ C 摇床上 300 r/min 振荡培养过夜。碱裂解法提取重组质粒, 并酶切鉴定, 选取酶切后电泳证实酶切片段与预期大小一致的克隆送 TaKaRa 公司测序鉴定。

### 1.4 重组质粒 pIRES2-EGFP-sCD40L 转染 CHO 细胞及筛选

将酶切鉴定正确的 pIRES2-EGFP-sCD40L 质粒大量提取并纯化, 采用电穿孔转染法 ( Eppendorf 电穿孔转染仪 ) 将质粒转染 CHO 细胞 ( 电压 290 V、时间 40  $\mu$ s )。转染后 48 h 加入 G418 工作液, 终质量浓度 800  $\mu$ g/ml, 每 3~5 d 更换培养液, 同时以未转染的 CHO 细胞作为阴性对照。培养 14 d 后, 转染细胞有抗药克隆长出, 而对照组细胞全部死亡。将转染细胞有限稀释并克隆化培养于 96 孔培养板中。培养 5 d 后, 挑选单克隆细胞生长孔于倒置荧光显

显微镜下观察,发绿色荧光的细胞为阳性细胞,待孔中细胞约铺满半孔后,相继传代于 24 孔、6 孔培养板、25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中扩大培养,命名为 CHO-sCD40L。

### 1.5 转染细胞的鉴定

1.5.1 EGFP 的表达 ①倒置荧光显微镜观察 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中 CHO-sCD40L 细胞,镜下任意选取 10 个视野,分别于明暗视野计数细胞绿色荧光表达率。

②胰酶消化 CHO-sCD40L 细胞,PBS 洗 2 遍,100 μl 1% 多聚甲醛固定,用流式细胞仪(BD FACS Aria)检测绿色荧光表达率,同时以 CHO 细胞作对照。

### 1.5.2 sCD40L 基因在 CHO 细胞中的整合与转录

取 CHO-sCD40L 细胞及 CHO 细胞,提取细胞基因组 DNA。用 PCR 方法检测筛选出的细胞克隆是否已整合有基因 sCD40L,引物由大连宝生物公司合成,序列为:上游 5'-ACAGATCTAGAAAACAGCTTTGAAATG-3';下游 5'-ATCTCGAGGAGTTTGAGTAGC-3'。反应条件:94 ℃ 5 min,然后 94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。收集 CHO-sCD40L 细胞及 CHO 细胞,分别以 Trizol 法提取细胞总 RNA,取细胞总 RNA 约 2 μg,按 cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行逆转录反应,取 0.5 μl 进行 PCR 反应(方法同前),PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.5.3 ELISA 法检测 sCD40L 蛋白表达 CHO-sCD40L 细胞于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中生长至约 80% 后,留取细胞培养上清,ELISA 法检测 sCD40L 分泌量,同时以 CHO 细胞做对照。操作按说明书进行。酶标仪(Labsystem Multiscann MS)读取 450 nm 处的 D 值,绘制标准曲线,用待测样品的值在标准曲线上查出样品中 sCD40L 的含量。

### 1.6 Western blotting 检测 CHO-sCD40L 细胞分泌的 sCD40L 与膜型 CD40 结合

CHO-sCD40L 细胞于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中生长至约 80% 后,留取细胞培养上清,添加于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中的 MDA-MB-231 细胞,孵育 4 h 后,PBS 充分清洗作为实验组;另取 MCF-7 细胞作为阳性对照组,未做处理 MDA-MB-231 细胞作为阴性对照组。按照真核细胞蛋白提取试剂盒说明书提取细胞总蛋白,行聚丙烯酰胺凝胶电泳,而后转移至 PVDF 膜上,封闭液震荡过夜。加一抗室温震荡孵育 2 h,TBST 洗 3 遍;二抗室温震荡孵育 1 h,TBST 洗 3 遍,TBS 洗 1 遍。按照 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate 试剂盒说明书进行化学发光显色。

### 1.7 CHO-sCD40L 细胞分泌的 sCD40L 对 MDA-

### MB-231 细胞表面 Fas 表达及细胞凋亡的影响

CHO-sCD40L 细胞与 MDA-MB-231 细胞按效靶比为 5:1 分别加入 Transwell 12 孔培养板的上室和下室,同时准备稳定表达 pIRES2-EGFP 的 CHO 细胞(CHO-EGFP)以及 MDA-MB-231 细胞作为对照,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 h 后,收获下室 MDA-MB-231 细胞,流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞表面 Fas 的变化。于该培养体系孵育 24 h 后加入 CH-11(1 μg/ml),37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 h,收集肿瘤细胞行 Annexin V/PI 染色,流式细胞术测其凋亡率。

### 1.8 统计学处理

SPSS13.0 统计软件分析结果,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用单因素方差分析, $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pIRES2-EGFP-sCD40L 的酶切鉴定

质粒 pIRES2-EGFP 大小为 5.3 kb,pDC316 质粒本身大小为 3 913 bp,插入片段 sCD40L 大小为 479 bp,故 pDC316-sCD40L 大小为 4 392 bp。由图 1 可见,经 *Bgl* II、*Sal* I 双酶切的两种质粒与预期大小一致。载体 pDC316-sCD40L 用 *Bgl* II、*Sal* I 进行双酶切获得的的目的片段插入经同样酶切的表达载体 pIRES2-EGFP 中,获得重组质粒 pIRES2-EGFP-sCD40L。重组质粒转化大肠杆菌后,*Bgl* II、*Sal* I 双酶切可获得两条条带。大条带与载体 pIRES2-EGFP 大小一致,小条带与目的片段 sCD40L 大小一致(图 1)。经测序鉴定证实 sCD40L 编码序列正确克隆入载体 pIRES2-EGFP。

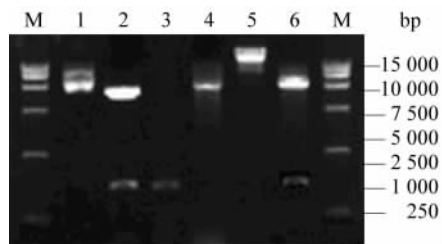


图 1 重组质粒 pIRES2-EGFP-sCD40L 的酶切鉴定

### Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pIRES2-EGFP-sCD40L by enzymatic digestion

M: TaKaRa DNA marker DL15000; 1: pDC316-sCD40L; 2: pDC316-sCD40L (*Bgl* II/*Sal* I); 3: sCD40L; 4: pIRES2-EGFP (*Bgl* II/*Sal* I); 5: pIRES2-EGFP-sCD40L; 6: pIRES2-EGFP-sCD40L (*Bgl* II/*Sal* I)

### 2.2 重组质粒 pIRES2-EGFP-sCD40L 转染 CHO 阳性细胞筛选鉴定

2.2.1 CHO-sCD40L 细胞 EGFP 的表达 经有限稀释法克隆化,获得 3 个单克隆,连续传代培养后,选 1 株生长良好的 CHO-sCD40L 细胞扩大培养,单克隆在倒置荧光显微镜下观察呈绿色荧光,表达率达 95% 以上(图 2)。经流式细胞仪检测,绿色荧光表达率达 90% 以上。

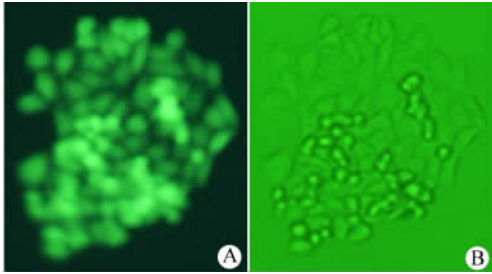


图 2 EGFP 在 CHO-sCD40L 细胞上的表达 (荧光显微镜, ×100)

Fig.2 Expression of EGFP on CHO-sCD40L cells (fluorescent microscope, ×100)  
A: CHO-sCD40L cells; B: CHO cells

2.2.2 sCD40L 基因在 CHO 细胞中的整合与转录 PCR 法及 RT-PCR 检测结果显示,CHO-sCD40L 细胞能检测出 sCD40L 基因及其 mRNA,而 CHO 细胞未见相应的扩增条带,提示 sCD40L 基因成功整合入 CHO-sCD40L 细胞的基因组并可转录为 mRNA(图 3)。

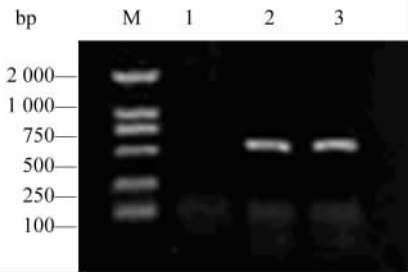


图 3 PCR 及 RT-PCR 检测 CHO-sCD40L 细胞中 sCD40L mRNA 的表达

Fig.3 Expression of sCD40L mRNA in CHO-sCD40L cells examined by PCR and RT-PCR

M: TaKaRa DNA marker DL2000; 1: PCR product of CHO; 2: PCR product of CHO-sCD40L; 3: RT-PCR product of CHO-sCD40L

2.2.3 CHO-sCD40L 细胞 sCD40L 蛋白的表达 取 CHO-sCD40L 细胞培养上清,ELISA 法检测 sCD40L 分泌量为(4.5 ± 2.1) ng/ml,未转染的 CHO 细胞上清液中未检测到 sCD40L。

2.3 Western blotting 检测 sCD40L 与 MDA-MB-231

细胞表面 CD40 的结合

Western blotting 结果显示,MDA-MB-231 经 CHO-sCD40L 细胞分泌的 sCD40L 处理后,在相对分子质量约 18 000 处可以得到 sCD40L 的杂交信号,说明 CHO-sCD40L 细胞分泌的 sCD40L 与膜型 CD40 发生了结合。MCF-7 细胞分别在相对分子质量约 39 000、29 000、18 000、14 000 处得到不同形式 CD40L 的杂交信号。而在 DDW 以及未经处理的 MDA-MB-231 细胞未观察到 CD40L 的杂交信号(图 4)。

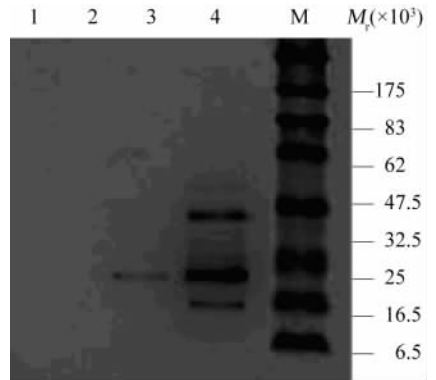


图 4 CHO-sCD40L 细胞分泌的 sCD40L 与 MDA-MB-231 细胞膜分子 CD40 的结合

Fig.4 sCD40L secreted by CHO-sCD40L cells conjugating with CD40 of MDA-MB-231 cells confirmed by Western blotting

M: Prestained broad range markers sc-2361; 1: DDW; 2: MDA-MB-231; 3: MDA-MB-231 cocultured with sCD40L; 4: MCF-7

2.4 sCD40L 对 MDA-MB-231 细胞表面 Fas 表达及细胞凋亡的影响

结果如表 1 所示,CHO-sCD40L 作用于 MDA-MB-231 细胞 24 h,肿瘤细胞表面 Fas 水平升高( $P < 0.05$ )。加入 CH-11 24 h 后,可明显观察到 MDA-MB-231 细胞凋亡,与两组对照比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而对照组之间差异无统计学意义。

表 1 sCD40L 对 MDA-MB-231 细胞表面 Fas 表达及细胞凋亡的影响( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Expression of Fas and the apoptotic rates of MDA-MB-231 cell influenced by sCD40L

Groups	Fas	Apoptotic rate (%)
Control	3.0 ± 1.02	5.4 ± 1.32
CHO-EGFP	3.8 ± 0.65	6.8 ± 2.11
CHO-sCD40L	34.8 ± 8.75*	20.7 ± 5.24*

\*  $P < 0.05$  vs Control or CHO-EGFP group

### 3 讨论

CD40L 一过性表达在活化的白细胞表面, 其中主要表达在活化的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞表面, 在肥大细胞、嗜酸性粒细胞、白细胞介素 2 活化的自然杀伤细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞和树突状细胞(dendritic cells, DCs)上也可检测到<sup>[4]</sup>。CD40L 和 CD40 的相互作用在胸腺依赖的体液免疫及细胞免疫的调控中居于重要地位, 可以直接抑制人的乳腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、膀胱癌、非小细胞肺癌和鳞状上皮癌的生长, 此作用与 CD40L 能够诱导肿瘤细胞的细胞周期阻滞和(或)凋亡有关<sup>[5]</sup>。sCD40L 作为 CD40L 的有效成份, 保留了 CD40L 的生物学活性, 成为肿瘤免疫治疗的一个很有前景的佐剂。有研究者<sup>[6]</sup>应用 sCD40L 与表达 CD40 分子的肺癌细胞株 A549 共育, 发现 sCD40L 对细胞的生长有明显的抑制作用。CD40L 还能诱导 DCs 细胞表型和功能的成熟, 可以通过上调共刺激因子的表达及细胞因子的分泌来增强上皮源性肿瘤的免疫原性<sup>[7]</sup>。因此, CD40L 能够增强抗癌免疫反应。

EGFP 目前被广泛作为一种荧光报道分子, 应用荧光显微镜和流式细胞仪可方便地检测到 EGFP 基因的表达、筛选出阳性克隆, 而且不影响宿主细胞的生物学特性<sup>[8-9]</sup>。本研究使用的载体启动子后具有多克隆位点结合外源基因, 随后的 pIRES2-EGFP 具有内部核糖体进入位点, 两者的表达互不干扰, 利用 EGFP 的表达可观察 sCD40L 基因的表达。本实验证实, EGFP 具有与 sCD40L 表达的等效性, 可利用其对重组质粒进行跟踪和快速检测。为促进载体编码的相对分子质量为 18 000 的 sCD40L 能够被分泌到细胞外, 在 sCD40L 编码序列前添加了 IL12B 亚基的分泌型信号肽, 该信号肽在 CD40L 初始合成时能促进该蛋白的分泌, 本实验也证实了可以有效地促进 sCD40L 的分泌。通过酶切测序鉴定成功构建了重组真核表达载体 pIRES2-EGFP-sCD40L, 并以其转染 CHO 细胞, 通过 PCR、RT-PCR、ELISA 方法分别从 DNA、mRNA、蛋白水平证实 sCD40L 整合入细胞基因组并获得表达。

乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 高表达 CD40, 而无 CD40L 表达<sup>[10]</sup>, MCF-7 为 CD40 表达阴性、CD40L 表达阳性的细胞系<sup>[11]</sup>。一抗 sc-978 识别的是 CD40L 的碳端氨基酸序列, 阳性对照 MCF-7 可以检测到 4 种不同分子质量 CD40L 表达形式。而 MDA-MB-231 经与 CHO-sCD40L 上清孵育, 细胞表面 CD40 可与 CHO-sCD40L 分泌的 sCD40L 结合。

清洗细胞以排除上清中残余 sCD40L 干扰后, 提取的细胞总蛋白经 Western blotting 检测可于 18 000 处检测到 sCD40L 的杂交信号, 未处理的 MDA-MB-231 则未检测到。表明构建的 CHO-sCD40L 细胞表达的 sCD40L 可与膜型 CD40 结合。

Fas 在体外培养肿瘤细胞系中均有或高或低表达。MDA-MB-231 有高 CD40、低 Fas 表达率, 对 Fas 诱导的凋亡具有抵抗性。本实验中发现 MDA-MB-231 在 sCD40L 的作用下, Fas 表达率增高, 凋亡明显增加, 提示 sCD40L 可以通过与 MDA-MB-231 表面 CD40 结合并相互作用逆转其凋亡抵抗性, 转化为 Fas 配体敏感性细胞, 同时也表明了本实验构建的细胞系具有生物学活性。

### [参考文献]

- [1] Airoidi L, Lualdi S, Bruno S, *et al.* Expression of costimulatory molecules in human neuroblastoma. Evidence that CD40<sup>+</sup> neuroblastoma cells undergo apoptosis following interaction with CD40L [J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(10): 1527-1536.
- [2] Rousseau RF, Biaoqi E, Dutour A, *et al.* Immunotherapy of high-risk acute leukemia with a recipient (autologous) vaccine expressing transgenic human CD40L and IL-2 after chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation [J]. *Blood*, 2006, 107(4): 1332-1341.
- [3] Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C, *et al.* Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(13): 7025-7028.
- [4] Tong AW, Stone MJ. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(1): 1-13.
- [5] Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(3): 295-299.
- [6] Higuchi T, Aiba Y, Nomura T, *et al.* Cutting edge: ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease [J]. *J Immunol*, 2002, 168(1): 9-12.
- [7] Wang TL, Huang JA, Yu GH, *et al.* Biological effects of soluble CD40 ligand on lung cancer cell line A549 and its mechanism [J]. *Ai Zhong*, 2004, 23(11): 1278-1282.
- [8] 赵晓蓉, 曹利民, 彭吉林, 等. 稳定表达 EGFP-GFP 融合蛋白细胞系的建立 [J]. *邵阳医学院学报*, 2006, 25(3): 129-132.
- [9] 张秀敏, 隋延仿, 司少艳, 等. MAGE-3 基因稳定转染的 HHCC 细胞系的建立及其 mRNA 的表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(4): 450-453.
- [10] 蒋国勤, 刘艳, 傅晋翔. CD40 配基化对乳腺癌细胞株 M231 药物敏感性的影响 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2005, 12(14): 1058-1060.
- [11] Tong AW, Papayoti MH, Netto G. Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(3): 691-703.

[收稿日期] 2007-04-20

[修回日期] 2007-07-27

[本文编辑] 韩丹