

[文章编号] 1003-4684(2022)05-0076-03

表达人源 PD-L1 的 4T1 细胞系的构建

王迪, 王润杨, 杨俊寒, 张乐, 胡翰, 汪洋, 刘滨磊

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北武汉 430068)

[摘要] 为构建稳定表达人源 hPD-L1 分子的小鼠乳腺癌细胞系(4T1), 建立 BALB/c 小鼠乳腺癌肿瘤模型, 采用 Lipofactamine 3000 转染试剂将携带绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)和 hPD-L1 的质粒转入 4T1 细胞中, 经嘌呤霉素筛选获得 4T1-hPD-L1 单克隆细胞系, 通过流式细胞术检测细胞纯度。将构建成功的细胞系皮下植入 BALB/c 小鼠背部, 建立乳腺癌皮下肿瘤模型。流式细胞术检测 4T1-hPD-L1 细胞中 GFP、PD-L1 双阳性率为 97.0%。将 4T1-hPD-L1 单克隆细胞系皮下接种于 BALB/c 小鼠背部可成瘤。成功构建稳定表达 hPD-L1 分子的 4T1 单克隆细胞系, 并建立 BALB/c 小鼠乳腺癌肿瘤模型, 为进一步研究 PD-L1 抗体药物提供参考。

[关键词] 4T1 细胞; PD-L1; 绿色荧光蛋白

[中图分类号] R153 **[文献标识码]** A

PD-L1 又称程序性死亡配体 1, 是共刺激分子 B7 家族成员之一, 由 CD274 基因编码。PD-L1 分子不仅广泛表达于活化 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、树突状细胞等^[1], 在许多肿瘤细胞中也高表达, 如肺癌、肝癌、胃癌、卵巢癌、黑色素瘤、霍奇金淋巴瘤细胞等^[2-3]。PD-L1 与 PD-1(程序性死亡受体 1)结合传递免疫抑制信号, 抑制 T、B 细胞增殖分化和细胞因子等的产生^[4]。PD-1/PD-L1 途径在诱导维持外周免疫耐受、自身免疫疾病、移植排斥反应、肿瘤免疫疾病等中发挥关键作用。PD-1/PD-L1 免疫疗法在针对晚期或转移性乳腺癌的部分临床试验中显示出了良好的疗效^[5]。但是 PD-L1 的过表达是否与乳腺癌的不良预后密切相关仍存在争议^[6]。为更好地了解 PD-L1 在肿瘤细胞中的作用和机制, 本研究构建了稳定表达人源 hPD-L1 的单克隆细胞株, 并将构建成功的 4T1-hPD-L1 细胞系皮下植入 BALB/c 小鼠的右侧背部, 观察肿瘤生长情况。

1 实验材料

hPD-L1 基因片段, 金斯瑞生物科技股份有限公司; PBDP 转座酶辅助质粒, System Biosciences 公司; 小鼠乳腺癌 4T1 细胞, 北京协和医院细胞资源中心; 细胞培养所用 DME/F-12 培养基, 美国 HyClone 公司; 胎牛血清, 四季青; 嘌呤霉素, 德国 Biofrox 公司; 抗人源 PD-L1 鼠单克隆抗体, 美国 BD 公司; Lipofactamine3000 转染试剂盒, Thermo

Fisher Scientific 公司; 质粒小提试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。BALB/c 小鼠, 湖北省疾病预防控制中心。

2 实验方法

2.1 4T1 细胞嘌呤霉素敏感性实验

收集 T-75cm² 培养瓶中的 4T1 细胞, 以每孔 2×10^5 个细胞接种在 12 孔板中, 于 37℃ 恒温、5% CO₂ 浓度的细胞培养箱中培养。第 2 天更换培养基, 避光加入不同浓度梯度的嘌呤霉素。连续 7 d 观察记录细胞存活率, 以 4 d 内杀死孔板中所有细胞的最低嘌呤霉素浓度为最佳筛选浓度^[7]。

2.2 质粒提取

hPD-L1 基因片段由金斯瑞公司合成。冰上解冻大肠杆菌感受态 DH5 α , 加入 2 μ L 质粒, 冰上静置 10 min, 42℃ 水浴热激 90 s, 冰上静置 5 min, 涂 LB-Amp 平板, 37℃ 倒置培养过夜。第 2 天挑取单菌落, 接种在 LB 液体培养基中(含 Amp 抗性), 置于 37℃ 摇床 200 r/min 振荡培养 14 h。参照诺唯赞质粒小提试剂盒说明书进行质粒提取。

2.3 细胞转染

转染前 1 d, 将 4T1 细胞以 2×10^5 个/mL 细胞密度接种于 12 孔板。待细胞汇合度至 85%, 更换培养基。参照 Lipofactamine3000 说明书进行实验操作。取两个 1.5 mL EP 管, A 管中加入 95 μ L DME/F-12 培养基, 5 μ L P3000, 20 μ L PBDP-hPD-

[收稿日期] 2021-07-26

[第一作者] 王迪(1997-), 女, 安徽安庆人, 湖北工业大学硕士研究生, 研究方向为生物工程

[通信作者] 刘滨磊(1962-), 男, 湖北武汉人, 湖北工业大学教授, 研究方向为生物制药

L1 质粒和 5 μL PBDP 转座酶辅助质粒(质粒与辅助质粒质量比为 4 : 1);B 管中加入 125 μL DME/F-12 培养基和 3.75 μL Lipofactamine3000^[8]。A、B 管溶液混合,室温孵育 10 min,加入细胞孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温、5% CO_2 浓度的细胞培养箱中培养。转染 48 h 后,在倒置荧光显微镜下观察细胞 GFP 表达情况,加入嘌呤霉素连续筛选 7 d,每隔 2~3 d 更换培养基并补加嘌呤霉素。

2.4 单克隆细胞获取

收集经嘌呤霉素筛选后的细胞,稀释至 500 个/mL。取 96 孔板,每孔加入 100 μL 完全培养基(含 10% 胎牛血清的 DME/F-12 培养基)和 2 μL 细胞悬液,将细胞培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温、5% CO_2 浓度的细胞培养箱中培养。7 d 后,在倒置荧光显微镜下观察并记录只有单个细胞团且发绿色荧光的孔。当细胞汇合度达到 80%,消化,依次扩大培养至 12 孔板、6 孔板。

2.5 流式细胞术检测 4T1-hPD-L1 细胞纯度

收集 1×10^6 个培养在 6 孔板中的 4T1-hPD-L1 细胞,取野生型 4T1 细胞作为空白对照,加 1 mL PBS 洗 1 次,加入 5 μL 偶联 APC 荧光染料的抗人源 PD-L1 鼠单克隆抗体,室温避光孵育 25 min。加 1 mL PBS 洗 2 次,用 BD Accuri C6 流式细胞仪对样品进行检测。用 FlowJo V10 软件分析检测结果。

2.6 4T1-hPD-L1 成瘤性实验

从湖北省疾控中心购买 3 只 6 周龄雌性的 BALB/c 小鼠。将 4T1-hPD-L1 细胞稀释至 1×10^7 个/mL,在每只 BALB/c 小鼠右侧背部皮下注射 1×10^6 个 4T1-hPD-L1 细胞(100 μL)^[9]。7 d 后观察成瘤性,连续观察 40 d。用游标卡尺测量小鼠肿瘤体积大小,计算公式为: $V = 1/2 \times \text{长径} \times \text{短径} \times \text{短径}$ 。

3 实验结果

3.1 PBDP-hPD-L1 质粒构建

PBDP-hPD-L1 转座子载体质粒序列全长 8102 bp。人源 hPD-L1 序列在 NCBI 上查找获得(Gene ID: 29126)。hPD-L1 基因由 CMV 强启动子启动转录。CopGFP 和 PuroR 基因由 T2A 肽连接。连接后的序列由 EF-1 α 核心启动子启动转录(5'LTR 包含增强子等调控原件),二者共享同一个 polyA 信号,由此构建 PBDP-hPD-L1-GFP 质粒。

3.2 4T1 细胞转染

PBDP-hPD-L1 质粒和 PBDP 转座酶辅助质粒共同转染 4T1 细胞,转染 48 h 后,在倒置荧光显微

镜下能观察到细胞发绿色荧光。

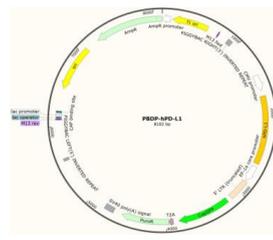


图 1 PBDP-hPD-L1 质粒图谱

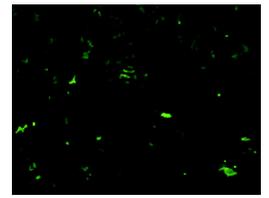


图 2 PBDP-hPD-L1 转染 4T1 48 h

3.3 4T1-hPD-L1 细胞挑取单克隆、扩培

将 4T1-hPD-L1 细胞稀释至 500 个/mL,在 96 孔板中培养 7 d 后,可在倒置荧光显微镜下观察到单个且带有绿色荧光的细胞团。将细胞扩培(图 3)。

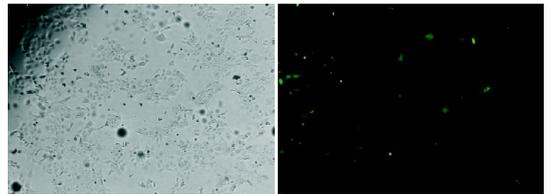


图 3 4T1-hPD-L1 单克隆细胞扩培

3.4 流式细胞术检测 4T1-hPD-L1 单克隆细胞

流式检测对照组 4T1 细胞和实验组 4T1-hPD-L1 细胞中 GFP 和 PD-L1 的表达量,结果显示实验组细胞双阳性率为 97.0%(图 4)。

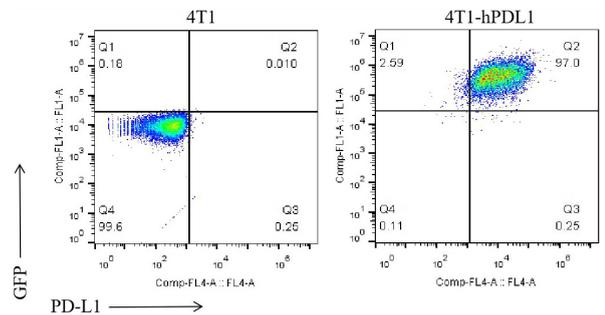


图 4 4T1-hPD-L1 单克隆细胞 GFP 和 PD-L1 表达

3.5 4T1-hPD-L1 肿瘤模型建立

将 4T1-hPD-L1 细胞皮下植入 BALB/c 小鼠右侧背部,3 只小鼠背部均长出瘤块,14 d 后体积生长至 100 mm^3 ,成瘤率达 100%。绘制肿瘤生长曲线(图 5),肿瘤体积随着时间增长而增加。

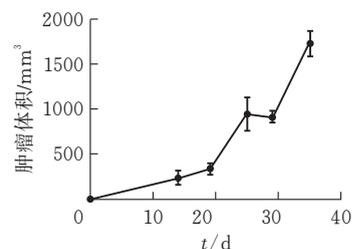


图 5 BALB/c 皮下肿瘤生长曲线

4 结束语

PD-L1 通过与 PD-1 结合抑制 T 细胞功能,从而使肿瘤发生免疫逃逸,阻断 PD-1/PD-L1 通路成为目前免疫治疗的研究热点^[10]。目前国内外已有 3 种 PD-L1 单克隆抗体药物被批准上市,可用于治疗非小细胞肺癌和尿路上皮癌等癌症。但 PD-L1 抗体药物并非对所有患者有效,原因可能和原发性耐药、继发性耐药、肿瘤突变负荷、患者体内 PD-L1 表达量不同等相关^[11]。

转座子是一段可插入宿主基因组内并改变位置的 DNA 序列。通过将外源基因引入到特定的细胞、组织中,转座子系统广泛应用于基因敲除、诱导突变、转基因动物等实验研究中^[12]。通过转座子系统构建 PD-L1 高表达的肿瘤细胞,可为研究 PD-L1 抗体药物提供参考。

本实验采用脂质体将 PBBDP-hPD-L1 质粒和 PBBDP 转座酶辅助质粒转入小鼠乳腺癌 4T1 细胞中,在倒置荧光显微镜下观察转染效率;经过嘌呤霉素筛选、有限稀释法获得单克隆细胞系;通过流式细胞术检测细胞中 GFP 和 PD-L1 双阳性率为 97.0%,成功构建稳定表达 GFP 和人源 hPD-L1 的鼠乳腺癌 4T1-hPD-L1 细胞系。将构建成功的细胞系皮下植入 BALB/c 小鼠背部,建立乳腺癌皮下肿瘤模型。此模型的成功构建为研究 PD-L1 抗体药物提供了稳定可靠的动物模型,为进一步研究 PD-L1 分子的功能提供参考。

[参 考 文 献]

[1] 宋莉,葛彦,曹莎莎,等. 人 PD-L1 基因转染细胞株

的构建及其对活化的 Jurkat 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 江苏大学学报, 2015,25(2):123-127.

- [2] ZOU W, CHEN L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment[J]. Nature Reviews Immunology, 2008,8(6):467-477.
- [3] HIRANO F, KANEKO K, TAMURA H, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity[J]. Cancer Research, 2005,65(3):1089-1096.
- [4] 朱云霞,胡振华,陈永井,等. 人 PD-L1 真核表达载体的构建及其在 HEK293 细胞系中的稳定转染[J]. 苏州大学学报, 2009,29(3):459-462.
- [5] 张郢樊,杨建新. PD-1/PD-L1 信号通路及其在乳腺癌治疗中的研究进展[J]. 中国医学创新, 2017,14(2):145-148.
- [6] 李佳,敖宁,乔东波,等. PD-L1 表达与乳腺癌临床病理特征及预后关联 Meta 分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018,25(19):1395-1402.
- [7] 屠珏,黄宇,凌云,等. 电转系统介导的荧光素酶稳定表达 PANC-1 细胞的构建及其生物发光成像检测[J]. 中国细胞生物学学报, 2016,38(7):37-38.
- [8] 段海潇,杨俊寒,王琳,等. 表达近红外荧光蛋白的结肠癌细胞系的建立[J]. 湖北工业大学学报, 2020,35(5):71-74.
- [9] 刘向云,杨荣富,胡文娟,等. 人 OC-3-VGH 卵巢癌细胞裸小鼠肿瘤模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2009,17(2):108-110.
- [10] 田季平,张剑,周金培,等. 免疫检查点 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2019,50(1):1-10.
- [11] OKAZAKI T, HONJO T. PD-1 and PD-1 Ligands: from discovery to clinical application[J]. International Immunology, 2007,19(7):813-824.
- [12] 雷占翔,刘芳芳,于才勇,等. PB-GF 转座子系统的构建及其在真核细胞中转座的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014,30(6):652-655.

Construction of 4T1 Cell Line Expressing Human PD-L1

WANG Di, WANG Runyang, YANG Junhan, ZANG Le, HU Han, WANG Yang, LIU Binlei

(School of Food and Biological Engin., Hubei Univ., of Tech .Wuhan 430068, China)

Abstract: This paper is to construct mouse breast cancer cell line (4T1) stably expressing human PD L1 molecule, and to establish BALB/c mouse breast cancer tumor model. The plasmid carrying green fluorescent protein (GFP) and PD-L1 was transfected into 4T1 cells with Lipofactamine 3000 transfection reagent, and 4T1-hPD-L1 monoclonal cell lines were obtained by purinamycin screening. Cell purity was determined by flow cytometry. The successfully constructed cell lines were implanted subcutaneously into the back of BALB/c mice to establish the transplanted breast cancer tumor model. Results show that the double positive rate of GFP and PD-L1 in 4T1-hPD-L1 cell was 97.0% by flow cytometry. The 4T1-hPD-L1 monoclonal cell line was inoculated subcutaneously into the back of BALB/c mice to form tumors. The 4T1 monoclonal cell line with stable expression of human PD-L1 molecule was successfully constructed, and the breast cancer tumor model of BALB/c mice was established, which laid a foundation for further study of PD-L1 antibody drugs.

Keywords: 4T1; PD-L1; green fluorescent protein

[责任编辑:张 众]