

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)01-0053-04

人 IFN- β 基因脂质体转染胶质瘤细胞对凋亡的诱导作用

林 伟 章 翔 王占祥 费 舟 张剑宁 付洛安 刘卫平 郭 衍 王西玲 梁景文

(第四军医大学西京医院全军神经外科研究所 陕西 西安 710033)

Induction of apoptosis of glioma cell line SHG44 by transfection of human interferon- β gene liposome

LIN Wei, ZHANG Xiang, WANG Zhan-Xiang, FEI Zhou, ZHANG Jian-Ning, FU Luo-An, LIU Wei-Ping, GUO Yan, WANG Xi-Ling, LIANG Jing-Wen

Chinese PLA Institute of Neurosurgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate the transfection of liposome containing pSV2IFN- β and its effects on the induction of apoptosis of human glioma cell line SHG44. **METHODS:** MTT assay was used to measure the proliferation of SHG44 cells transfected by human interferon- β liposome containing pSV2IFN- β and the IFN- β expression in SHG44 cells was observed by indirect immunofluorescence staining. FCM Annexin was used to detect the apoptotic SHG44 cells after transfection with pSV2IFN- β and the morphological changes of SHG44 cells were detected by electron microscopy. **RESULTS:** The proliferation of SHG44 was obviously inhibited after transfection of human interferon- β liposome containing pSV2IFN- β and the inhibition rates were 16.7% and 32.7% respectively on d 4 and d 6 after transfection. The results of indirect immunofluorescence staining showed that the IFN- β expressions of SHG44 cells were obvious after transfection and the results of FCM showed that the apoptotic cell rate of the transfection group and control group were 66.8% and 19.8%, respectively. Significant differences were found between the two groups ($P < 0.01$). Morphological changes of apoptosis were also found by electron microscopy. **CONCLUSION:** Human interferon- β gene liposome containing pSV2IFN- β can transfect human glioma cell line SHG44 and significantly induce the apoptosis of cells line SHG44.

【Keywords】 interferon- β liposome transfection glioma cell; apoptosis

收稿日期 2004-09-07; 修回日期 2004-10-12

基金项目 国家自然科学基金(30370512)

通讯作者 章 翔. Tel.(029)83375567 Email. xzhang@fmmu.edu.cn

作者简介 林 伟(1975-)男(汉族)江苏省无锡市人. 硕士 医师 助教. Tel.(029)83375330 Email. 18852@sina.com

【摘要】目的 观察 β -干扰素(IFN- β)基因脂质体 pSV2IFN- β 转染人胶质瘤细胞系 SHG44 及其转染后对 SHG44 细胞的凋亡诱导作用. 方法 应用 MTT 比色法检测脂质体 pSV2IFN- β 转染后转染组与对照组 SHG44 细胞增殖的差异, 细胞免疫荧光染色检测脂质体 pSV2IFN- β 转染后 SHG44 细胞 IFN- β 的表达情况. 应用流式细胞仪 Annexin 法检测脂质体 pSV2IFN- β 转染后 SHG44 细胞的凋亡情况, 采用透射电镜观察肿瘤细胞凋亡的形态学改变. 结果 :IFN- β 基因脂质体 pSV2IFN- β 转染 SHG44 胶质瘤细胞系后 4 d 和 6 d 时, 对肿瘤细胞具有明显的增殖抑制作用, 抑制率分别为 16.7% 和 32.7%. 细胞免疫荧光法检测表明转染后胶质瘤细胞具有显著的 IFN- β 表达, 流式细胞仪 Annexin 法检测表明转染组与对照组的凋亡率分别为 66.8% 与 19.8%, 两组相比具有显著差异($P < 0.01$). 透射电镜观察, 发现有凋亡细胞存在, 表现为细胞皱缩, 染色质边集. 结论 :IFN- β 基因脂质体 pSV2IFN- β 可转染 SHG44 胶质瘤细胞系, 并对胶质瘤细胞的凋亡具有明显的诱导作用.

【关键词】 β -干扰素 脂质体 转染 胶质瘤细胞 凋亡

【中图分类号】 R739.41 **【文献标识码】** A

0 引言

人脑恶性胶质瘤是常见的中枢神经系统肿瘤, 肿瘤的死亡率高, 治疗效果很不理想. 基因治疗研究已越来越引起人们的重视. 我们探讨了人干扰素- β (IFN- β)基因脂质体 pSV2INF- β 转染人脑胶质瘤细胞系 SHG44, 观察其对人脑胶质瘤细胞的凋亡诱导作用如下.

1 材料和方法

1.1 材料 胶质瘤 SHG44 细胞系由本研究所冻存. 人 IFN- β 基因脂质体 pSV2INF- β (15 nmol 脂质体包含 0.3 μ g DNA)由日本名古屋大学医学院神经外科惠赠; DMEM 培养基和消化用胰酶均购自 Gibco 公司; 即用型 FITC 免疫荧光试剂盒购自武汉博士德公司; 兔抗人 IFN- β mAb 为英国 Peprotech EC 公司产品; MTT 购自 Sigma 公司; 免疫荧光显微镜为德国 LeiCa Microsystems 公司的 DMIRB 型; 流式细胞仪为 Beckman Coulter 公司产品; 透射电子显微镜为 JEM-EX2000 型.

1.2 方法 细胞用含 100 mL/L 灭活胎牛血清的 DMEM 培养液在 37℃ 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 2.5 g/L 胰酶消化传代。取对数期生长状态良好的 SHG44 胶质瘤细胞, 分为 2 组, 一组进行脂质体转染, 一组作为阴性对照。用 DMEM 培养液稀释细胞并计数, 调整细胞数至 1×10^5 /L, 移入 25 mL 玻璃培养瓶中, 加入含 100 mL/L 灭活胎牛血清的 DMEM 培养液 4 mL, 37℃ 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养 12 h, 使细胞贴壁。次日弃去原培养液, 用无血清的培养液洗涤细胞 1 次, 并加入等量无血清培养液 4 mL 和 IFN- β 基因脂质体 pSV2IFN- β 160 μ L 并混匀, 37℃ 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 更换含 100 mL/L 胎牛血清的培养液, 同时进行细胞爬片, 继续 CO₂ 培养箱中培养 72 h。取出细胞爬片用 40 g/L 多聚甲醛固定。

1.2.1 脂质体 pSV2IFN- β 转染后对 SHG44 细胞增殖的影响 取脂质体 pSV2IFN- β 转染后的 SHG44 胶质瘤细胞, 调整细胞数至 1×10^9 /L, 培养于 96 孔板, 100 μ L/孔, 同时设立对照组, 对照组除用空载体和 PBS 代替脂质体转染外, 其余条件完全一致。每组设 12 个复孔。在 37℃ 50 mL/L CO₂ 培养箱中分别培养 2, 4 和 6 d 后每孔加 5 g/L MTT 20 μ L, 培养 4 h 后吸去培养液, 每孔加二甲基亚砜 (DMSO) 150 μ L, 混匀 0.5 h 后, 用酶标仪测定 $A_{570 \text{ nm}}$ 值以间接反映存活细胞数量, 据此绘制出细胞的生长曲线。计算 SHG44 细胞增殖的抑制率 = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{转染组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.2.2 间接免疫荧光染色检测 huIFN- β 表达 取固定好的转染组和对照组细胞爬片, 放入盖玻片染色缸, 用 PBS 振荡 5 min, 取出, 吹干。加入 3 g/L Triton-X100 进行膜穿孔, 室温中作用 10 min, PBS 洗涤后, 滴加一抗(兔抗人 IFN- β mAb, 稀释 1:100)。4℃ 冰箱孵育过夜。再用 PBS 振荡 3 次, 每次 5 min, 吹干。滴加生物素化的二抗(羊抗兔 IgG)用 PBS 以 1:600 稀释, 细胞爬片在二抗中室温孵育 60 min, PBS 洗 3 遍。将荧光素 FITC 标记的兔抗羊 IgG 按 1:200 稀释后滴加至细胞爬片上, 置湿盒中, 37℃ 孵育 60 min。PBS 振荡 3 次, 每次 5 min, 然后用蒸馏水振荡 1 次。滴一滴 PBS 在载玻片中央, 小心取出盖玻片, 细胞面朝下轻轻置于载玻片液滴上, 荧光显微镜下观察并照相。同时以正常兔血清和 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.3 脂质体 pSV2IFN- β 转染后 SHG44 细胞凋亡 用 24 孔板每孔 500 μ L 培养 SHG44 细胞, 细胞分为转染组和对照组 2 组, 每组 12 孔。转染组和对照

组分别用脂质体 pSV2IFN- β 和 PBS 作用 72 h, 加入 Annexin V-FITC 5 μ L 于含 1.5 mmol CaCl₂ 的培养液中, 37℃ 孵育 10 min。用含 1.5 mmol/L CaCl₂ 的培养液洗涤细胞 2 次, Rubber Policeman 收集细胞。用 $1 \times$ 的结合缓冲液(10 mmol/L HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl₂)重悬细胞。加入终浓度为 2.5 mg/L 的碘化丙啶(PI), 轻轻混匀, 置冰上孵育 15 min 后流式细胞仪检测。另用 4℃ 预冷的 30 mL/L 戊二醛固定脂质体 pSV2IFN- β 转染后的 SHG44 胶质瘤细胞, 电镜制片并观察照相。

统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 两两比较使用 Dunnett- t 检验。

2 结果

2.1 脂质体 pSV2IFN- β 转染后对 SHG44 细胞增殖的影响 转染组于转染前以及转染后 2, 4 和 6 d 时 MTT 的 $A_{570 \text{ nm}}$ 值见 Tab 1。转染组细胞的增殖明显抑制, 经统计学分析, 脂质体 pSV2IFN- β 转染后的 6 d 时 $A_{570 \text{ nm}}$ 值与空载体转染对照组和 PBS 对照组相比较, 有显著的差异 ($P < 0.01$)。

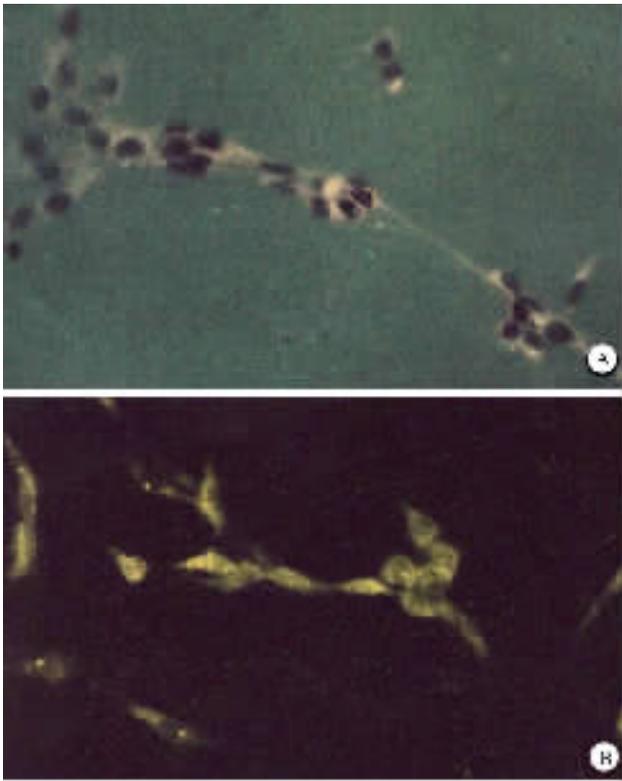
表 1 pSV2IFN- β 转染后 SHG44 细胞的 $A_{570 \text{ nm}}$ 值

Tab 1 $A_{570 \text{ nm}}$ of SHG44 cells after transfection with pSV2IFN- β ($n = 12$, $\bar{x} \pm s$)

Group	$A_{570 \text{ nm}}$			
	0 d	2 d	4 d	6 d
Transfection	0.226 \pm 0.022	0.248 \pm 0.022	0.296 \pm 0.017	0.326 \pm 0.022
Empty liposomes	0.231 \pm 0.023	0.266 \pm 0.024	0.364 \pm 0.021	0.492 \pm 0.021*
PBS	0.232 \pm 0.023	0.279 \pm 0.022	0.375 \pm 0.023	0.509 \pm 0.023*

* $P < 0.01$ vs transfection.

2.2 间接免疫荧光染色法检测 huIFN- β 表达阳性细胞 用荧光显微镜镜下观察可见脂质体 pSV2IFN- β 转染后 SHG44 细胞呈现分布均匀、质感细腻的特异性的强绿色荧光, 而 PBS 对照组的肿瘤细胞未见特异性荧光 (Fig 1)。每组取 5 张切片, 每张切片用 Lasersharp 图像分析软件随机选取 4 个视野中的细胞, 通过测量每个细胞中象素的相对数及荧光强度, 计算其平均荧光道数(表示荧光强度的专用单位)作为免疫荧光定量分析的指标, 转染组为 24 ± 10 , 对照组为 8 ± 5 (两组 $n = 20$)。统计结果表明脂质体 pSV2IFN- β 转染组与 PBS 对照组荧光强度差别有统计学意义 ($P < 0.01$)。以上结果表明, 脂质体 pSV2IFN- β 转染后, SHG44 细胞有明显的 huIFN- β 的表达。



A : Control FITC $\times 400$; B : Transfection FITC $\times 450$.

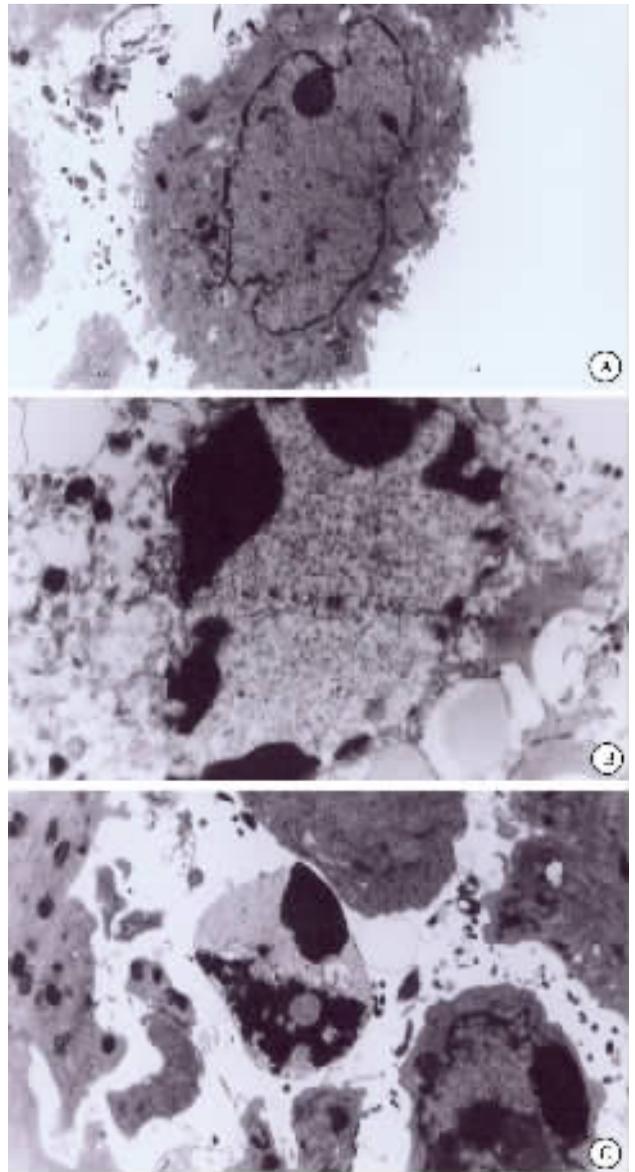
Fig 1 Positive expression of huIFN- β in SHG44 cells

图 1 huIFN- β 表达阳性细胞

2.3 脂质体 pSV2IFN- β 转染后对 SHG44 细胞凋亡的影响 使用流式细胞仪技术检测脂质体 pSV2IFN- β 转染后 SHG44 细胞凋亡,结果对样品组凋亡细胞百分率为 19.8%,而转染组凋亡细胞百分率为 66.8%。表明脂质体 pSV2IFN- β 转染后对 SHG44 细胞的凋亡具有显著的诱导作用。脂质体 pSV2IFN- β 转染后 SHG44 细胞显示典型的凋亡细胞形态学特征,核仁消失,核内异染色质明显增多,并沿核膜边集、浓缩、成块。胞质内充满大小不等的空泡,并可见典型的凋亡小体(Fig 2)。

3 讨论

IFN- β 具有抗病毒、抗肿瘤及免疫调节等多种功能,但其抗肿瘤机制尚未完全阐明。既往研究资料表明^[1-3],IFN- β 可以通过调节机体的免疫功能、抑制肿瘤血管增生、激活体内的多种肿瘤杀伤细胞如细胞毒性 T 淋巴细胞及自然杀伤细胞等间接发挥抗肿瘤活性,此外,IFN- β 也可直接抑制肿瘤细胞的增殖与分化,杀伤肿瘤细胞,这种作用机制可通过瘤体内直接注射干扰素而得以证实。最近资料显示,IFN- β 可以通过诱导多种肿瘤细胞发生凋亡而发挥其抗肿瘤作用^[4]。在开展 IFN- β 对肿瘤治疗作用研究的同时,



A : Normal SHG44 cells TEM $\times 3000$; B : Late apoptotic SHG44 cells TEM $\times 12\ 000$; C : Apoptotic body TEM $\times 5000$.

Fig 2 Morphology of SHG44 cells after transfection with pSV2IFN- β

图 2 pSV2IFN- β 转染后透射电镜下 SHG44 细胞形态

研究者开始尝试 IFN- β 的基因治疗。陆续开展了 pSV2IFN- β 脂质体转染多种肿瘤细胞的相关研究^[5]。我们首次在国内应用了 pSV2IFN- β 脂质体转染人脑胶质瘤细胞系 SHG44,并应用间接免疫荧光染色法检测到转染后的 SHG44 细胞有显著的 IFN- β 的表达,流式细胞仪 Annexin 法检测脂质体 pSV2IFN- β 转染后对 SHG44 细胞的凋亡具有显著的诱导作用。同时观察了 pSV2IFN- β 脂质体转染后对 SHG44 细胞增殖的影响,发现在转染后 4 d 和 6 d 转染组较对照组有明显的增殖抑制作用。透射电镜结果显示典型的凋亡细胞形态学特征,核仁消失,核内异染色质明显

增多,并沿核膜边集、浓缩、成块。胞质内充满大小不等的空泡,并可见典型的凋亡小体。因而,pSV2IFN-β脂质体转染对人脑胶质瘤 SHG44 细胞具有明显的增殖抑制和促进凋亡的作用。

【参考文献】

[1] Blankenstein T, Qin Z. The role of IFN-gamma in tumor transplantation immunity and inhibition of chemical carcinogenesis [J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(2): 148-154.

[2] VanDeusen JB, Caligiuri MA. New developments in anti-tumor efficacy and malignant transformation of human natural killer cells [J]. *Curr Opin Hematol*, 2003, 10(1): 55-59.

[3] Nakanishi H, Mizutani Y, Kawauchi A et al. Significant antitumoral activity of cationic multilamellar liposomes containing human IFN-beta gene against human renal cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(3): 1129-1135.

[4] Yoshida J, Mizuno M, Nakahara N et al. Antitumor effect of an adenovirus-associated virus vector containing the human interferon-beta gene on experimental intracranial human glioma [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2002, 93(2): 223-228.

[5] Kageshita T, Mizuno M, Ono T. Growth inhibition of human malignant melanoma transfected with the human interferon-β gene by means of cationic liposomes [J]. *Melanoma Res*, 2001, 11(4): 337-342.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2005)01-0056-01

恶性卵黄囊瘤 1 例临床病理分析

王文雅, 宋旭东, 佟树文, 王献华
(华北煤炭医学院病理教研室, 河北 唐山 063000)

【关键词】恶性卵黄囊瘤, 临床, 病理
【中图分类号】R692.5 【文献标识码】B

1 病例报告 女, 20 岁。因下腹痛伴腰痛 1 wk, 查体发现盆腔肿物入院。B 超: 盆腔实性占位, 异常低回声。CT: 盆腔多发实性占位。血 HCG > 12 U/L。血 AFP 3000 μg/L。术中见右卵巢肿物, 12 cm × 11 cm × 8 cm, 界限清楚, 质硬, 蒂部扭转 540°。右输卵管水肿。左卵巢及输卵管未见异常。肿物及部分左卵巢送病理检查。肉眼所见: 右卵巢肿物大小同术中所见, 表面略呈结节状, 包膜完整。切面多彩状, 有出血、坏死, 大部分为实性, 夹有多个小囊腔(直径 1 cm), 腔内含有清亮液体及黏液。镜下所见: 瘤组织结构复杂、多样, 有大片出血及坏死。并可见以下病变: ①疏松网状结构。瘤细胞胞质互相交织成网状, 形如迷路, 网眼内可见黏液样基质(图 1); ②嗜酸性透明小球及基膜样物质(图 2); ③腺泡状结构; ④血管上皮套。血管周围围绕单层或多层瘤细胞(图 1); ⑤ S-D 小体。瘤细胞形成乳头状突起突入囊腔内, 似肾小球结构; ⑥大小不等的囊腔, 有的呈葫芦样外观; ⑦部分区域瘤细胞成团片状。左卵巢未见明显病变。病理诊断: 右卵巢恶性卵黄囊瘤。

2 讨论 恶性卵黄囊瘤为高度恶性肿瘤, 术后复发转移, 预后很差^[1]。常为单侧发生, 多见于右卵巢, 多见于婴儿及青少年, 年龄 2~35 岁, 平均 18 岁, 肿瘤一般较大, 多数超过 10 cm^[2]。本例发生于右卵巢, 年龄 20 岁, 瘤体 12 cm × 11 cm × 8 cm, 与文献^[2]报道相符。本病病理诊断应以疏松网状结构、透明小球、基膜样物质、腺泡状或囊状结构为主要依据^[2]。本例病理变化均有上述改变。患者血清中甲胎蛋白(AFP)增高, 这种免疫反应可作为本病早期诊断及判断术后复发的免

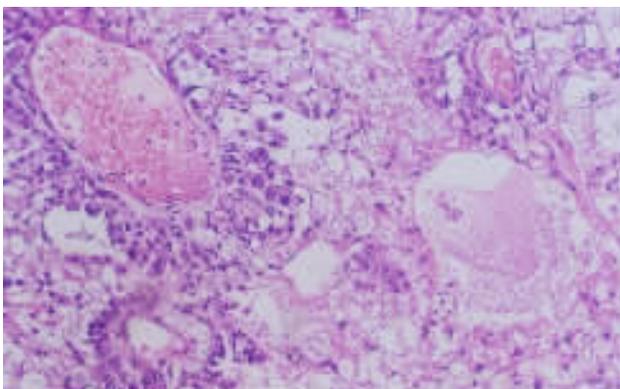


图 1 血管上皮套及疏松网状结构 HE ×100

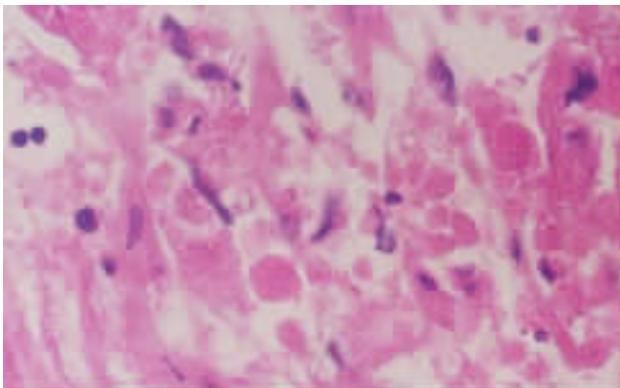


图 2 嗜酸性透明小球 HE ×400

疫学指标^[2]。结合临床表现、年龄、部位、病理变化及血 AFP 增高, 本例可确诊为恶性卵黄囊瘤。本例血 HCG 明显升高, 胚胎性癌及绒癌可出现 HCG 升高, 但本例可除外上述疾病。

【参考文献】

[1] 刘复生, 刘彤华. 肿瘤病理学 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997: 1570.

[2] 中山医科大学-同济医科大学. 外科病理学 [M]. 第 2 版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1999: 857-858.

编辑 潘伯荣

收稿日期 2004-10-27; 修回日期 2004-11-10
作者简介: 王文雅(1963-), 女(汉族), 河北省唐山市人, 学士, 副教授。
Tel. (0315) 3725737 Email. wangwenya-3@126.com