

文章编号:1004 - 616X(2001)02 - 0077 - 04

论著 ·

转人 TNF 基因对肾细胞癌细胞致瘤性的影响

张晓琴¹, 陈 坚², 曹广文³, 万谟彬¹, 戚中田³

(1. 第二军医大学长海医院传染科,上海 200433; 2. 第二军医大学军队卫生教研室,上海 200433; 3. 第二军医大学微生物教研室,上海 200433)

摘要:目的:观察转人 TNF 基因对肾细胞癌细胞(RCC)致瘤性的影响,为进一步对 RCC 的基因治疗打下基础。方法:将人 TNF 基因构建入逆转录病毒载体,经包装、鉴定后,感染 RCC 细胞株 786-0,ELISA 法测转人 TNF 基因 786-0 细胞上清中 TNF 的活性,同时,将转人 TNF 基因的 786-0 细胞接种裸鼠,观测转 TNF 前后 RCC 细胞致瘤性的变化。结果:转人 TNF 786-0 细胞上清 TNF 的浓度平均为(5 004 ± 624) pg/ml,接种裸鼠后无肿瘤长出。结论:转人 TNF 基因使建株 RCC 失去了致瘤性。

关键词:TNF;肾细胞癌;致瘤性

中图分类号:Q78

文献标识码:A

INFLUENCE ON THE TUMORIGENICITY OF THE HUMAN RENAL CELL CARCINOMA (RCC) CELLS TRANSDUCED WITH HUMAN TNF GENE

ZHANG Xiao-qin¹, CHEN Jian², CAO Guang-wen³, WAN Mo-bing¹, QI Zhong-tian³.

收稿日期:2000-08-29;修订日期:2000-10-31

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39500147)

作者简介:张晓琴(1972-),女,上海市人,硕士,从事疾病的基因治疗研究。

交联(DNA-DNA-interstrand crosslinks)⁵。本研究表明,MMC 只有在高浓度(5.0 μg/ml)下才可诱导 TK6 细胞的 DNA 断裂;从表 3 可见,随着 MMC 剂量的增加,由 H₂O₂ 诱导的 DNA 迁移减小,说明 MMC 既具有断裂作用又有交联作用,但其交联作用不如甲醛强。

对甲醛作用的时间效应研究发现:在断裂剂浓度一定时,交联作用随交联剂作用时间的延长而增加;当作用时间一定时,交联作用又随交联剂浓度的增加而加强。为了获得较好的交联效果,染毒时间大约为 1.5 h 为佳。

综上所述,甲醛不能诱导 DNA 断裂,但具有很强的 DNA 交联作用;MMC 亦具有 DNA 交联作用,同时在高剂量下还具有轻微的 DNA 断裂作用。彗星试验可同时检测 DNA 断裂和 DNA 交联。在检测 DNA 交联时,既可检测 DNA 蛋白质交联,又可检测 DNA-DNA 交联,且对 DNA 蛋白质交联的检测更敏

感。

参考文献

- 1 Nancy LO, Song-mao C, Narayani R, et al. The formation, identification and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells J. *Br J Cancer*, 1987,55(Suppl.):135~140.
- 2 雷毅雄,庄志雄,张 桥. 外来化学物与 DNA 蛋白质交联物关系的研究进展 J. *国外医学卫生学分册*,1995,22(3):149~152.
- 3 Olive PL, Banath J P. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and DNA crosslinking agent J. *Exp Cell Res*, 1995,221:19~26.
- 4 张遵真,衡正昌,李 南,等. 五种氯化有机物对 V79 细胞 DNA 损伤作用的研究 J. *癌变 畸变 突变*,1999,11(1):5~8.
- 5 Merk O, Speit G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity J. *Environ Mol Mutagen*, 1999,33(2):167~172.
- 6 Merk O, Speit G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis J. *Environ Mol Mutagen* 1998,32(3):260~268.

(1. Infection Department, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Military Hygiene, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract : Purpose : To study the influence on the tumorigenicity of the human renal cell carcinoma (RCC) cells by transfection of human TNF gene. **Methods :** hTNF cDNA was inserted into retroviral vector to construct recombinant vector pL (TNF) SN. The packaged and confirmed retrovirus were infected to RCC cell line. Then, nude mice were injected by 786-0 cell infected with the hTNF gene or not, and the tumorigenicity of RCC was observed. **Results :** The mean expression level of TNF in the supernatant of TNF-transfected 786-0 cell-culture medium was $(5\ 004 \pm 624)$ pg/ml. And the nude mice injected with TNF gene engineered RCC cells had no tumor growth. **Conclusion :** The TNF gene engineered human RCC cells lost tumorigenicity.

Key words : TNF; renal cell carcinoma; tumorigenicity

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是第三种常见的泌尿系统恶性肿瘤,大约占成人恶性肿瘤的 3%。近年来,随着吸烟、肥胖、高蛋白饮食等因素的增加,RCC 的发病率也有增加趋势¹。大多数 RCC 患者对放疗、化疗不敏感。

文献报道,肿瘤坏死因子(TNF)作为生物反应调节剂全身给药有一定的抑制肿瘤生长作用²,大剂量给药才能达到治疗作用。而大剂量给药往往产生机体不能耐受的毒副作用,这限制了其治疗肿瘤的临床应用。本研究将人 TNF 基因构建入逆转录病毒载体,经包装、鉴定后,感染建株 RCC 细胞 786-0,ELISA 法测转入 TNF 基因的 786-0 细胞的 TNF 的表达,同时,将转入 TNF 基因的 786-0 细胞接种裸鼠,观测转入 TNF 基因前后 RCC 细胞致瘤性的变化,为转入 TNF 基因治疗肾细胞癌的临床应用打下了基础。

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株和细胞株 含 TNF 基因的质粒 pE4 和 NIH3T3 细胞购自 ATCC;过渡质粒 pSP72 购自 Promega 公司,逆转录病毒载体 pLXSN 由美国 Fred Hutchinson 癌病研究中心 A. Dusty Miller 博士惠赠,大肠杆菌 DH5、WEHF1640 细胞、包装细胞 pA317 及 2 为本室保存。

1.2 常用酶类、试剂及动物 限制性内切酶 EcoR、Hpa 及 T4 DNA 连接酶、碱性磷酸酶、Klenow 等分别购自上海华美、Promega 和 Boehringer Mannheim 公司,其他化学试剂为国产分析纯。4 周龄 BALB/c 裸鼠购自中科院上海药物研究所,为一级动物,合格证号:沪动合证字 122 号。

1.3 分子生物学常规方法 质粒 DNA 的抽提、酶切、连接、转化参见文献 3。

1.4 质粒转染、病毒包装及滴度测定⁴ 常规复苏包装细胞 PA317 和 2,培养于 RPMI1640 培养基,每 2~3 d 换液 1 次。用脂质体转染法将质粒转染包装细胞 2,并将收集后的病毒上清交叉感染 PA317。具体方法为:转染前 1 d 传代,加入 25 cm² 细胞瓶或 6 孔板内,使细胞达 70%~80%;配制 A 液(质粒 1~2 μ g 加入 100 μ l 无血清 1640 培养基中)、B 液(lipofectamine 6~8 μ l 加入 100 μ l 无血清 1640 培养基中),各自混匀后,再将 A、B 液混匀,放置 30 min 后,加入 0.8 ml 无血清 1640 培养基,混匀后,缓慢滴加入包装细胞(2)瓶中,培养 5 h 后,加 1 ml 含 20%牛血清的 1640 培养基,24 h 后,换为无双抗的 1640 培养基,继续培养;用 0.45 μ m 的滤器过滤转染质粒后的病毒上清,取 1 ml 感染另一包装细胞 PA317,加入终浓度为 8 μ g/ml 的 polybrene,3 h 后,加入无双抗的 1640,长满后传代。同时加入 400 μ g/ml 的 G418 进行筛选,阳性克隆转移至 6 孔板内,长满后再转移至培养瓶。将交叉感染所收集的各代病毒上清作 10²、10³、10⁴ 倍稀释作滴度测定,方法为:倒去 NIH3T3 细胞培养瓶内液体,分别吸取 1 ml 稀释的病毒液,加入培养瓶,使病毒吸附 2.5 h,补加 3 ml 含 400 μ g/ml 的 G418 的 1640 培养基,培养 3 d 后换液;用含 300 μ g/ml 的 G418 的 1640 培养基继续培养,3~4 d 换液 1 次,约 12 d 后克隆形成,计数其数目,并求出其滴度。

1.5 TNF 的 ELISA 测定法 已从平衡至室温的密封袋中取出所需板条,加入标准品稀释液 100 μ l 至空白孔和零孔;加入标本和已稀释的不同浓度的标

准备各 100 μl 至相应孔中,37 °C, 2 h;洗板中,加第一抗体 100 μl,37 °C, 1 h 后,洗板;加酶标抗体 100 μl,37 °C, 0.5 h,洗板;加底物 A 和 B 各 50 μl,避光,37 °C, 5~10 min,加终止液 50 μl;混匀,在 450 nm 处读数,绘制标准曲线,通过标本的 OD 值在标准曲线上查出浓度。

1.6 接种裸鼠 用胰酶消化细胞,台盼蓝染色,计数,使活细胞浓度达 10⁸ 个/ml,离心 500 r/min, 5 min,弃上清,加葡萄糖生理盐水洗一次,用葡萄糖生理盐水重悬细胞,取 0.4 ml 接种于 4 周龄雄裸鼠前腋窝边一侧,每隔 1 d,观察裸鼠成瘤情况,用游标卡尺测量瘤体大小。

2 结果

2.1 TNF 逆转录病毒载体 pL (TNF) SN 的构建 用 PstI 从 pE4 中切下人 TNF 的 cDNA,经 Klenow

补平后,插入经 HpaI 酶切后碱性磷酸酶处理的 pLXSN 载体上,构建成 pL (TNF) SN,构建过程见图 1。

2.2 病毒滴度测定 用脂质体转染法将质粒 pL (TNF) SN 转入 293T 细胞,取其上清再感染 PA317,经 G418 筛选,克隆长满瓶底后,收集上清测其滴度。pL (TNF) SN 转染者,其病毒上清滴度平均为 1.5 × 10⁶ CFU/ml,对照的空载体转染者,其病毒上清滴度平均为 9.2 × 10⁴ + 6 CFU/ml。

2.3 RCC 细胞的感染及其 TNF 的检测 取经鉴定的重组逆转录病毒上清感染建株 RCC 细胞 786-0 细胞,扩大培养(以 1:3 传代约培养 3 d),各长至约 10⁶ 细胞,用 ELISA 法测其上清,求其平均值。结果重组逆转录病毒感染 786-0 细胞者,其上清 TNF 的浓度平均为 (5 004 ± 624) pg/ (ml · 3d)。提示重组逆转录病毒有效感染 786-0 细胞,并表达了 TNF 。

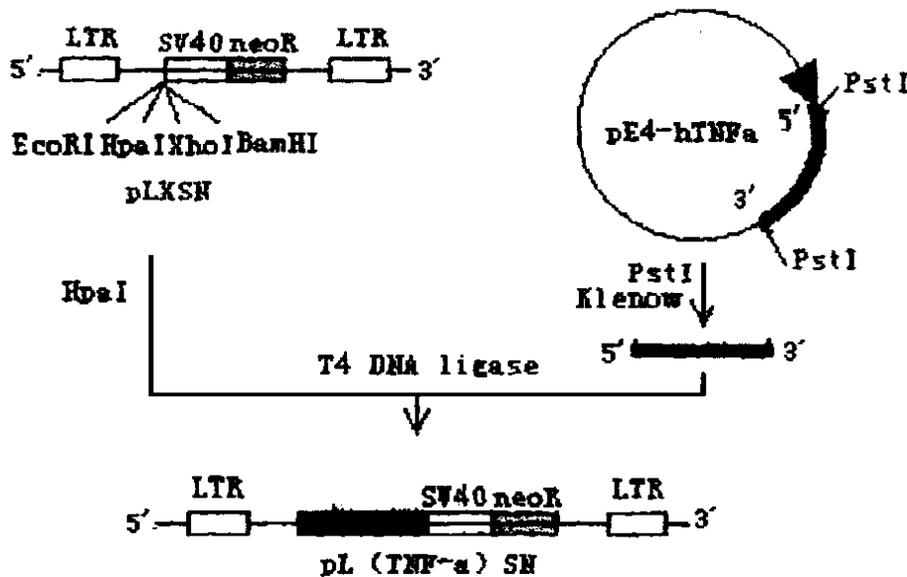


图 1. 质粒 pL (TNF) SN 的构建
Figure 1. Construction of pL (TNF) SN

2.4 转 TNF 的 786-0 细胞接种裸鼠情况 将感染重组逆转录病毒 pL (TNF) SN 前后的 786-0 细胞,分别接种裸鼠,每组各 4 只。结果显示,接种转 TNF 的 786-0 的裸鼠无肿瘤长出,而未转基因的 RCC 和转空载体 RCC 接种裸鼠在约 12 d 后均长出肿瘤;将转 TNF 后的 786-0 细胞和未感染的 786-0 细胞接种

于裸鼠同一部位,无肿瘤长出,将转 TNF 前后的 786-0 细胞,分别接种于裸鼠两侧,除接种转 TNF 基因侧无肿瘤长出外,对侧未感染的 786-0 细胞生长受到抑制,肿瘤长出时间较晚,且瘤体较小,有较显著的差异 (P < 0.05) 见图 2,表 1。

表 1. 皮下注射裸鼠 12 d 后长出的瘤体大小

Table 1. Size of tumor (12 d after inoculation) in the nude mice

Group	mean size of tumor
	(length × width)
786-0	2.0 cm × 1.8 cm
786-0- TNF	-
786-0(right) + 786-0- TNF(left)	1.1 cm × 0.9 cm

3 讨论

近年来,肿瘤的基因治疗研究越来越热。RCC 大多对放疗和化疗有抗性,因而,一些包括基因治疗在内的治疗策略正在研究之中,并取得了一定的进展⁵。例如,有文献报道^{6,7},将 TNF 基因导入其他肿瘤细胞,有一定的抗肿瘤生长作用。基因转移是基因治疗的关键和基础。用于基因治疗的主要是病毒介导的基因转移,其中较先应用的是逆转录病毒。逆转录病毒基因组较小,可较容易地插入外源基因,基因转移效率也较高,且可整合入宿主染色体,稳定地表达外源基因。因此,本研究利用了逆转录病毒载体将 TNF 转移入原代 RCC 细胞。

本研究表明,在裸鼠体内接种感染有空载体逆转录病毒的 RCC 和未转基因的 RCC 后,长出了肿瘤,而接种感染有重组逆转录病毒的 RCC 后,则无肿瘤长出,即失去了致瘤性。其原因可能是在接种位点局部持续产生较高水平的 TNF。TNF 一方面可促进 NK 等细胞的增殖以及增强它们的杀伤活性来抗肿瘤;另一方面, TNF 也可能促进 B 细胞的增殖以及促进合成和分泌抗体,而达到抗肿瘤的效果。这一结果与 Sato 等⁸ 将 TNF 基因转移到自身肿瘤细胞治疗人胃肠肿瘤的结果相似。在免疫原性上,胃肠肿瘤比 RCC 要低。他们在成功建立了 12 个病人的原代培养的肿瘤细胞的基础上,将 TNF 用逆转录病毒作载体转入肿瘤细胞,其中 10 个有 TNF 表达,其他 2 个约有 1 个 TNF 基因拷贝。12 个病人中 7 位检测到杀伤细胞与转基因的细胞共育对非转基因的自身肿瘤细胞有细胞毒活性,这一活性可被抗 HLA- I 类抗体所阻止,提示杀伤细胞是 CTL,其肿瘤抗原由 I 类 HLA 分子提供。通过荧光活化细胞分类 (FACS) 分析,在转 TNF 基因的肿瘤细胞表面 I 类 HLA 分子是表达增强的,而且 NK 和 LAK 细胞的活性,当它们与转基因细胞共育时,也是增强的。这些发现提示用转 TNF 的肿瘤细胞作疫苗治疗胃肠道肿瘤是可行的。本研究结果的获得为临床应用转入 TNF 基因治疗肾细胞癌打下了一定的基础。

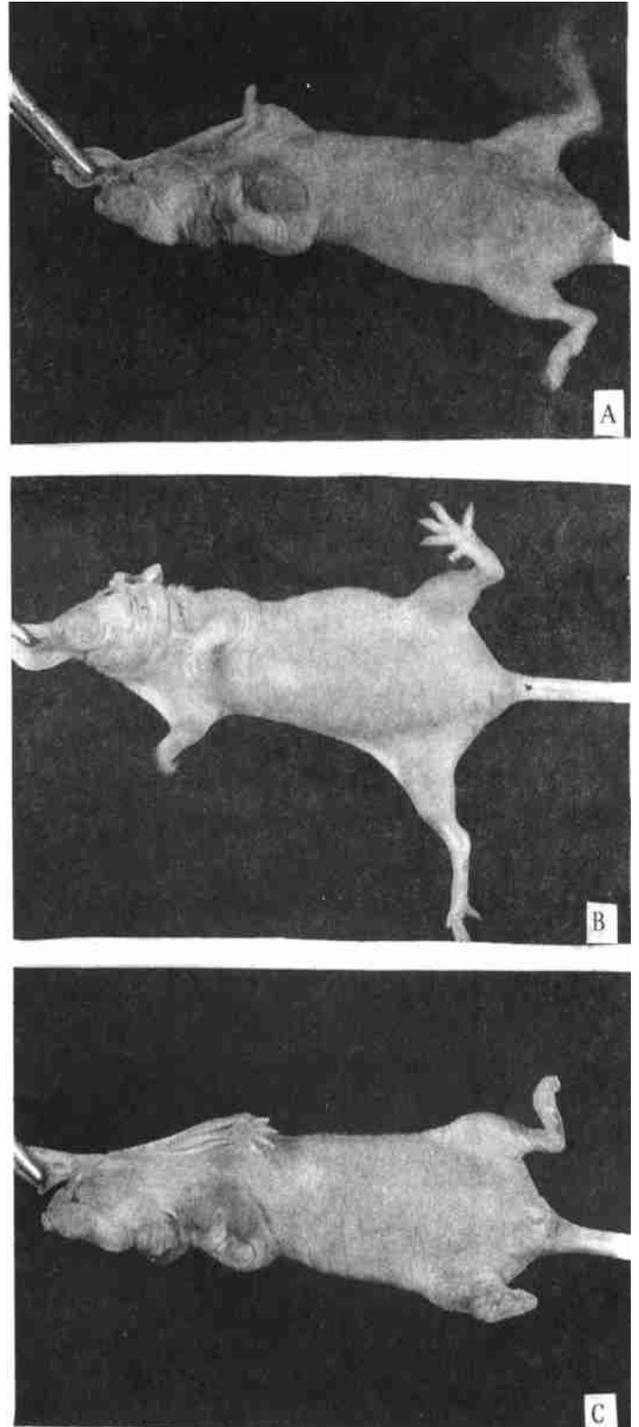


图 2. 各组 RCC 细胞在裸鼠体内的致瘤性(皮下注射 12 d 后)

Figure 2. Tumorigenicity of RCC in the nude mice (12 d after inoculation)

- A nude mice injected with 786-0
 B nude mice injected with TNF -transduced 786-0
 C nude mice injected with 786-0 on the right side ,
 and TNF -transduced 786-0 on the left side

文章编号:1004 - 616X(2001)02 - 0081 - 05

论著 ·

珍香胶囊对裸鼠原位移植的人胃癌的抗癌作用

许锦阶¹,徐小虎¹,杨善民²,陈福²

(1. 汕头大学医学院病理学和病理生理学系,广东 汕头 515031;2. 厦门大学抗癌研究中心,福建 厦门 361005)

摘要:目的:了解珍香胶囊对裸鼠原位移植的人胃癌的疗效,为临床试验提供科学依据。方法:用珍香胶囊分别对人胃低分化腺癌 SGC-7901 以及人胃高分化腺癌 MKN-28 裸鼠原位移植模型进行治疗。实验分 5 组:珍香胶囊高浓度组(4 800 mg/kg·bw)、中浓度组(2 400 mg/kg·bw)、低浓度组(1 200 mg/kg·bw)以及阳性对照组(丝裂霉素 C 1 mg/kg·bw)和阴性对照组(生理盐水)。珍香胶囊灌胃给药,每天 2 次,连续给药 40 次,丝裂霉素 C 皮下注射给药,每 2 天 1 次,共给药 10 次。实验以荷人胃癌裸鼠的生命延长率、胃指数、血清唾液酸(SA)含量作为疗效评价指标。实验重复 3 次。结果:珍香胶囊高、中、低三剂量对荷人胃癌 SGC-7901 裸鼠生命延长率分别为 57.78%~72.03%($P<0.01$),42.22%~56.59%($P<0.01$),28.13%~33.79%($P<0.01$),阳性对照丝裂霉素 C 对荷人胃癌 SGC-7901 裸鼠生命延长率为 52.58%~60.02%($P<0.01$);经珍香胶囊高、中剂量治疗后,荷人胃癌 MKN-28 裸鼠的胃指数、血清 SA 含量显著减少($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:在裸鼠可耐受的剂量下,珍香胶囊对裸鼠原位移植的人胃低分化腺癌 SGC-7901 以及人胃高分化腺癌 MKN-28 均有明显的抗癌作用,且随着剂量增加,其抗癌疗效增强。

关键词:珍香胶囊;胃癌;动物疾病模型;裸鼠

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

ANTITUMOR EFFECT OF ZHENXIANG CAPSULE ON THE HUMAN STOMACH CANCER XENOTRANSPLANTED ORTHOTOPICALLY IN NUDE MICE

XU Jin-jie¹, XU Xiao-hu¹, YANG Shan-ming², CHEN Fu²

(1. Department of Pathology and Pathophysiology, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China; 2. Anti-cancer Research Center of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

收稿日期:2000-06-08;修订日期:2000-09-22

基金项目:广东省中医药管理局科研基金资助项目(98416)

作者简介:许锦阶(1967-),男,广东潮阳市人,实验师,从事肿瘤实验性治疗研究。

参考文献:

- McLanghlin JK, Lindblad P, Meuemgaard A, et al. International renal cell cancer study. 1. Tobacco use. *Int J Cancer*, 1995, 60: 194~198.
- Teng MN, Park BH, Koeppen HKW et al. Long-term inhibition of tumor growth by tumor necrosis factor in the absence of cachexia or T-cell immunity J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:3 535~3 539.
- 萨姆布鲁克 J, 费里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. (金冬雁, 黎孟枫, 译). 分子克隆实验指南 M. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1995. 15~55.
- 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 第 2 版. 北京:北京出版社, 1997. 228~238.
- Mulders P, Figlin R, de Kernion JB, et al. Renal cell carcinoma: recent progress and future directions J. *Cancer Res*, 1997, 57(22): 5 189~5 195.
- Asher AL, Mul JJ, Kasid A, et al. Murine tumor cells transduced with the gene of tumor necrosis factor alpha: Evidence for paracrine immune effect of tumor necrosis factor against tumors J. *J Immunol*, 1991, 146:3 227~3 234.
- Blankenstein T, Qin Z, Uberla K, et al. Tumor suppression after tumor cell-targeted tumor necrosis factor gene transfer J. *J Exp Med*, 1991, 173(5): 1 047~1 052.
- Sato Y, Koshita Y, Hirayama M, et al. Augmented antitumor effects of killer cells induced by tumor necrosis factor gene-transduced autologous tumor cells from gastrointestinal cancer patients J. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(15): 1 895~1 905.