

# 人肿瘤坏死因子- 基因转染对舌癌细胞的抑制作用

高振南 李声伟 高家让 田卫东 刘 磊 陈伟辉

**摘要** 目的:探讨人肿瘤坏死因子- (hTNF- )基因转染对舌癌细胞生长的影响。方法:制备和纯化含 hTNF- 基因的穿梭质粒,用 DOSPER 阳离子脂质体介导转染 Tca8113 舌癌细胞,对照组只给予等量的脂质体,不加入质粒;转染基因 24、48、72、92 h 后用 ELISA 法检测细胞培养上清液中 hTNF- 的浓度,并用 MTT 法检测细胞的存活率。结果:基因转染 24、48、72、96 h 后转染组与对照组细胞培养上清液中 hTNF- 浓度之间的差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ),转染组各个时期浓度均高于对照组;MTT 法检测相应各时期转染组与对照组平均 OD 值之间的差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ),转染组各个时期平均 OD 值均低于对照组,转染细胞的存活率降低,生长受抑制。结论:阳离子脂质体介导的 hTNF- 基因体外转染可在 Tca8113 舌癌细胞中高表达并抑制舌癌细胞的生长。

**关键词** 人肿瘤坏死因子- 舌癌 基因转染 阳离子脂质体

## Suppression Effect of Human Tumor Necrosis Factor- Gene Transfection on Tongue Carcinoma Cells

Gao Zhennan, Li Shengwei, Gao Jiarang, et al

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

### Abstract

**Objective:** The aim of this study was to investigate suppression effects of the transfection of human tumor necrosis factor- (hTNF- ) gene on tongue carcinoma cells. **Methods:** The shuttle plasmid containing hTNF- gene was extracted and purified, then it was transferred into Tca8113 tongue carcinoma cells with cationic liposome DOSPER. The control group was only given equivalent liposomes, except the plasmid. After culturing for 24, 48, 72 and 96 hours, the expression of hTNF- gene in Tca8113 cells was analyzed by ELISA and, the survival rate of transferred cells was assayed by MTT enzymatic labeling technique. **Results:** The transferred Tca8113 cells displayed significantly overexpression of hTNF- ( $P < 0.05$ ). The survival rate of the transferred Tca8113 cells was decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Transfection of hTNF- gene in vitro mediated by cationic liposomes can induce the overexpression of hTNF- and inhibit the growth of tongue carcinoma cells.

**Key words:** human tumor necrosis factor- tongue carcinoma gene transfection cationic liposome

1975 年, Carswell 等<sup>[1]</sup> 首先在小鼠血清中发现了一种可诱导肿瘤细胞坏死的细胞因子, 并命名为肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)。但是, 给肿瘤患者全身使用人肿瘤坏死因子(human TNF, hTNF)却引起严重的毒副作用, 以至临床实际使用

剂量远远不能达到所需的抗癌治疗剂量<sup>[2]</sup>。口腔鳞癌是口腔颌面部最为常见的恶性肿瘤, 占口腔恶性肿瘤发病率的 90% 以上, 其中尤以舌部鳞癌最为多见, 居口腔鳞癌发病率的第一位。然而, 目前以手术切除、化学治疗和放射治疗为主的传统治疗效果仍不能令人满意。自 1990 年美国第一例用腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)基因治疗 ADA 缺陷综合征获得成功以来, 基因治疗在遗传病、肿瘤、心血管疾病等方面取得了飞速的发展, 本文通过应

本课题为卫生厅科学研究基金资助项目(编号 960039)

作者单位: 610041 四川大学华西口腔医学院口腔颌面外科学教研室

用 hTNF- 基因转染舌癌细胞,观察其对舌癌细胞的影响,探索其应用于舌癌治疗的可能性。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和仪器

含 hTNF- 基因的 pSV23SHINF 穿梭质粒转化的 *E. coli* K12 MC 1061 大肠杆菌株(比利时根特大学分子生物学系 W. Fiers 教授惠赠)。Tca8113 人舌粘膜鳞癌细胞株(四川大学华西医院肿瘤研究所提供)。

RPMI 1640 培养基(GIBCO BRL 公司,美国),DOSPER 阳离子脂质体转染试剂(Boehringer Mannheim 公司,德国),hTNF- ELISA 试剂盒(晶美生物工程有限公司),MTT 试剂(SERVI 公司,德国),二甲基亚砷(DMSO,辽宁盘锦新兴化工厂)。

SANYO MCO-17AI 型自控式 CO<sub>2</sub> 孵箱(Sanyo 公司,日本),NUAIRE 超净工作台(Nuaire 公司,美国),Bio-Rad550 酶标测定仪(Bio Rad 公司,美国),倒置相差显微镜(Olympus 公司,日本)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 质粒的制备和纯化 采用碱裂解法<sup>[3]</sup>从 *E. coli* K12 MC 1061 大肠杆菌株中大量制备质粒 pSV23SHINF,用聚乙二醇沉淀法<sup>[3]</sup>进行纯化,紫外分光光度计测定 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.8~2.0 之间,即可用于细胞转染。

1.2.2 细胞培养 Tca8113 舌癌细胞解冻复苏,于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基、37 °C、含 5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中密闭培养,取处于对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 3 × 10<sup>5</sup> 个/ml,按实验分组、分期和拟研究方法,分别接种于培养板中,培养至细胞贴壁长满底面积的 70%~80% 时进行转染实验。

1.2.3 转染基因 按照脂质体转染试剂 DOSPER 说明书中贴壁细胞转染法,按 4 μl DOSPER / 1.5 μgDNA 的脂质体/DNA 复合物比例转染 Tca8113 舌癌细胞,对照组只加入等量的脂质体 DOSPER,不加入 DNA 质粒。

1.2.4 ELISA 法测定细胞培养上清液中 hTNF- 浓度 接种上述细胞于 6 孔板,分别于转染基因 24、48、72、96 h 后,取细胞培养上清液 100 μl,ELISA 一步法测定其中的 hTNF- 浓度。每组每个时期设 3 个样本进行测量。

1.2.5 MTT 法测定转染基因后对舌癌细胞的抑制作用 接种上述细胞于 96 孔板,转染基因 24、48、72、96 h 后,用 PBS 配制 5 mg/ml 的 MTT 溶液,另设单纯 RPMI1640 培养基孔,用于机器调零,每个待测孔中加入 20 μl MTT 溶液,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养 4 h,吸出孔内的培养液,每孔内加入 150 μl 的二甲基亚砷,振荡 10 min,用 Bio-Rad 550 酶标仪,选择 570 nm 波长测定 OD 值,细胞存活率用(转染基因组平均 OD 值/同一时期对照组平均 OD 值) × 100% 来表示<sup>[4]</sup>。每

组每个时期设 3 个样本进行测量。

### 1.3 统计学分析

比较转染组与对照组各时期细胞培养上清液中 hTNF- 浓度有无差别采用单因素方差分析。比较转染组与对照组各时期 OD 值有无差异采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 细胞培养上清液中 hTNF- 浓度

ELISA 法测定转染组与对照组各时期 Tca8113 细胞培养上清液中 hTNF- 浓度见表 1,单因素方差分析表明基因转染 24、48、72、96 h 后转染组与对照组细胞培养上清液中 hTNF- 浓度间均具有显著性差异(*P* < 0.05),转染组各时期浓度均高于对照组,尤以转染基因 48 h 后最高,达 248.0 pg/ml。

表 1 转染基因后各个时期细胞培养上清液中 hTNF- 浓度( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml, n = 3)

检测时期(h)	对照组	转染组	F 值	P 值
24	27.6 ± 5.5	65.6 ± 15.5	15.94	0.0162
48	33.0 ± 9.2	248.0 ± 82.1	20.30	0.0108
72	30.3 ± 8.1	174.3 ± 65.2	14.40	0.0191
96	32.0 ± 13.1	137.7 ± 28.7	33.68	0.00438

### 2.2 转染 hTNF- 基因对舌癌细胞的抑制作用

MTT 法检测转染组与对照组转染基因后各时期 Tca8113 舌癌细胞的 OD 值及存活率见表 2。*t* 检验显示基因转染 24、48、72、96 h 后转染组与对照组平均 OD 值之间的差异均具有显著性(*P* < 0.05),转染组各个时期平均 OD 值均低于对照组。转染基因 48 h 时 Tca8113 细胞的存活率最低,达到 58.3%。

表 2 转染基因后各个时期 MTT 法检测舌癌细胞的 OD 值及存活率( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

检测时期(h)	对照组 OD 值	转染组 OD 值	P 值	存活率 (%)
24	0.663 ± 0.021	0.506 ± 0.065	0.016	76.3
48	1.174 ± 0.062	0.685 ± 0.022	0.0002	58.3
72	1.211 ± 0.046	0.760 ± 0.043	0.0002	62.8
96	1.263 ± 0.054	1.093 ± 0.083	0.041	86.5

## 3 讨论

TNF- 是由激活的单核细胞和巨噬细胞产生的一种细胞因子,由于最初发现其具有诱导某些类型的恶性肿瘤细胞坏死的能力而被命名为肿瘤坏死

因子<sup>[1]</sup>, TNF- $\alpha$  抑瘤作用的机理现在还不完全清楚。体外实验<sup>[5]</sup>证明 TNF- $\alpha$  对多种肿瘤细胞有杀伤作用, 体内实验也证明给荷瘤小鼠注射 TNF- $\alpha$  可诱导小鼠体内肿瘤细胞显著的选择性凋亡, 但是在人类肿瘤治疗中效果却不甚理想, 原因是人与鼠对 TNF- $\alpha$  的耐受量有很大差别, 小鼠的耐受剂量是人的 50 倍。在临床治疗中, 如果全身给予患者足够的抗瘤剂量常发生头痛、寒战、发热、心动过速和呕吐等严重毒副作用<sup>[2]</sup>。尽管 Alexander 等<sup>[6]</sup>报道解剖隔离肢体或肝脏后, 灌注 hTNF- $\alpha$  治疗四肢的黑色素瘤、肉瘤以及无法切除的肝脏肿瘤, 取得了良好的治疗效果, 但是, 对于无法进行解剖隔离的器官或部位(包括口腔颌面部), 局部灌注 TNF- $\alpha$  的治疗方法仍然有其应用的局限性。

应用基因治疗的方法, 以 hTNF- $\alpha$  基因转染细胞, 则能够在肿瘤局灶持续地产生高浓度的细胞因子 hTNF- $\alpha$ , 达到治疗肿瘤的目的, 并能够避免对全身的毒副作用<sup>[7,8]</sup>。基因转移的靶向性是决定基因治疗获得成功的关键性问题。由于舌部鳞癌肿瘤的部位比较表浅, 通过局部注射或气雾剂喷射的方法可以比较容易地将目的基因特异地导入靶细胞, 因此, 在目前还未构建出靶向可控性基因治疗载体的情况下, 舌癌是最适合进行基因治疗研究的恶性肿瘤之一。

在本实验中, ELISA 检测证明阳离子脂质体介导 hTNF- $\alpha$  基因在 Tca8113 舌癌细胞中高水平表达。MTT 法检测表明转染 hTNF- $\alpha$  基因显著抑制了 Tca8113 细胞生长。这些结果反映了 hTNF- $\alpha$  基因作为舌癌基因治疗的靶基因将具有良好的应用前景。

将 hTNF- $\alpha$  基因高效率地转移到肿瘤细胞中, 是实现 hTNF- $\alpha$  基因抑瘤作用的一个重要环节。由于 hTNF- $\alpha$  介导的肿瘤基因治疗最终要采用体内转移基因策略, 因此需要有一个转导效率高和安全的载体系统。研究证实, 逆转录病毒载体系统只能感染处于分裂期的细胞, 但由于它进入细胞核后整合入染色体 DNA 的部位有不确定性, 所以安全性差。腺病毒虽然整合入染色体 DNA 的部位较确定、较安全, 但它却能感染非增殖细胞, 对正常细胞或组织会产生影响<sup>[9]</sup>。非病毒载体系统为基因治疗提供较病毒载体更安全的基因转染方式, 阳离子脂质

体是近年发展起来的最有前途的非病毒载体之一, 阳离子脂质体介导的基因转染对细胞增殖有依赖性, 增殖速度越快、处于分裂期(G<sub>2</sub>/M)的细胞数目越多的肿瘤细胞, 阳离子脂质体的转染效率越高, 提示今后通过控制目标细胞的细胞周期, 还可提高阳离子脂质体的转染效率和质粒进入细胞核的机会<sup>[10]</sup>。本实验也证实阳离子脂质体能达到很高的转导效率和目的基因的高水平表达。总之, 阳离子脂质体具有安全、转染效率高和免疫原性低的特点, 比较适合用于人体的肿瘤基因治疗。

### 参考文献

- 1 Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that cause necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72(9): 3666 ~ 3670
- 2 Budd GT, Green S, Baker LH, et al. A Southwest oncology group: Phase trail of recombinant tumor necrosis factor in metastatic breast cancer. Cancer, 1991, 68(8): 1694 ~ 1695
- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 著. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南. 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1992: 24 ~ 27
- 4 程金科, 林 晨, 牟巨伟, 等. 野生型 p53 基因重组体腺病毒介导的肿瘤抑制作用. 自然科学进展, 1999, 9(6): 505 ~ 511
- 5 Helson L, Green S, Carswell E, et al. Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells. Nature, 1975, 258(5537): 731 ~ 732
- 6 Alexander HR, Bartlett DL, Libutti SK, et al. Isolated hepatic perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for unresectable cancer confined to the liver. J Clin Oncol, 1998, 16(4): 1479 ~ 1489
- 7 Cao G, Kuriyama S, Du P, et al. Complete regression of established murine hepatocellular carcinoma by in vivo tumor necrosis factor gene transfer. Gastroenterology, 1997, 112(2): 501 ~ 510
- 8 Hwu P, Yannelli J, Kriegl M, et al. Functional and molecular characterization of tumor-infiltrating lymphocytes transduced with tumor necrosis factor- $\alpha$  cDNA for the gene therapy of cancer in humans. J Immunol, 1993, 150(9): 4104 ~ 4115
- 9 Verma IM, Sonnia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. Nature, 1997, 389(6648): 239 ~ 242
- 10 Scheule RK. Gene therapy lung cancer-an application for cationic lipid-mediated gene delivery. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(15): 1118

(2001-08-27 收稿, 2001-11-26 修回)

(本文编辑 刘 怡)