

肝癌患者 PBMC 中 TH1/ TH2 类细胞因子 mRNA 表达

王 华¹, 张天一², 朱昌来², 张春辉¹, 倪启超¹

Expression of TH1/ TH2 Cytokines mRNA of PBMC in Hepatocarcinoma Patients

WANG Hua¹, ZHANG Tian-yi², ZHU Chang-lai², ZHANG Chun-hui¹, NI Qi-chao¹

1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China; 2. Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University

Abstract :Objective To explore the expression pattern of TH1 type cytokines IL-2, IFN- γ mRNA and TH2 type cytokine IL-4 mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of primary hepatic cancer (PHC) patients, and observe the different expression of IL-2 and IFN- γ mRNA before and after the tumor resection. **Methods** The expression of IL-2, IL-4 and IFN- γ mRNA of 18 patients and 15 normal volunteers in PBMC was detected by RT-PCR method and the results were analyzed by gel image analysis system. **Results** The expression of IL-2, IFN- γ mRNA were 16.7% and 5.6%, which lower than that of IL-4 (88.9%, $P < 0.05$) in 18 patients and it shows the typical TH2 shift. The expression value of IL-2, IFN- γ mRNA was between 0.10 ~ 0.11 lower than that of IL-4. The expression of IL-2 and IFN- γ mRNA were 25.0% and 12.5% with 8 patients of stage I before the operation, which was higher than that of control group; but, it was lower than that of the postoperative group (50.0%, 27.5% respectively). The expression value of pre-operative group and normal control group (0.10 ~ 0.11) was significantly lower than that of the postoperative group (0.20 ~ 0.22, $P < 0.05$). Besides, 10 cases of stage I patients have no expression of IFN- γ before and after the tumor excision. **Conclusion** The typical shift of TH2 occurred in PBMCs of PHC patients. Besides, surgical treatment might increase gene expression of TH1 type cytokines in PBMC of PHC patients with early stage, but it may be has no obvious effect on patients with intermedium or end stage in short period.

Key words: Hepatocellular carcinoma; TH1/ TH2 cytokines; RT-PCR

摘要:目的 探讨 TH1 类细胞因子 IL-2、IFN- γ 及 TH2 类细胞因子 IL-4 mRNA 在 I 期和 II 期肝癌患者外周血单个核细胞 (PBMC) 中的表达模式, 并观察 IL-2、IFN- γ mRNA 在手术前后的表达变化。方法 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法测定 8 例 I 期和 10 例 II 期原发性肝癌患者手术前后及 15 例健康人外周血中 IL-2、IFN- γ 的表达, 并用凝胶图像分析系统进行图像分析。结果 在 18 例肝癌患者中, IL-2、IFN- γ mRNA 的表达率分别为 16.7%、5.6%, 低于 IL-4 的表达率 88.9% ($P < 0.05$), 呈现明显的 TH2 偏移状态, 且 IL-2、IFN- γ 的表达强度在 0.10 ~ 0.11 之间, 也远低于 IL-4 的 0.21 ~ 0.22; 在 8 例 I 期肝癌患者中, 术前有 25.0% (2/8) 表达 IL-2 mRNA, 12.5% (1/8) 表达 IFN- γ , 高于对照组的 13.3% (2/15)、5.6% (1/15); 手术治疗后两者的表达率分别是 50.0%、37.5%, 高于术前组; 术前组及正常对照组两种细胞因子 mRNA 表达强度 (0.10 ~ 0.12) 明显低于术后组的 0.20 ~ 0.22 ($P < 0.05$)。另外, 10 例 II 期患者手术前后均无 IFN- γ mRNA 的表达。结论 原发性肝癌患者 PBMC 中也出现典型的 TH2 偏移, 另外, I 期肝癌经手术后可能增加外周血 TH1 类细胞因子 mRNA 的表达强度。但短期内对 II 期中晚期肝癌患者 PBMC 中的 TH1 类细胞因子 mRNA 的表达无明显影响。

关键词: 肝细胞癌; TH1/ TH2 细胞因子; RT-PCR

中图分类号: R735 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)01-0026-04

0 引言

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。自

从 TH1、TH2 的概念提出以来, 肿瘤的 TH1/ TH2 反应是近年来国内外研究的热点, 我们用 RT-PCR 法, 检测 18 例 I 期和 II 期原发性肝癌患者手术前 IL-2、IFN- γ 及 IL-4 mRNA 表达并探讨手术治疗对 IL-2、IFN- γ mRNA 的表达的影响。

收稿日期: 2005-01-17; 修回日期: 2005-02-25

作者单位: 1. 226001 江苏, 南通大学附属医院普外科;

2. 南通大学神经再生重点实验室分析细胞学研究室

1 资料与方法

1.1 临床资料 18 例原发性肝癌患者,其中 8 例, 期 10 例,均系南通大学附属医院普外科 2003 年 11 月~2004 年 2 月确诊的住院病人。分别于手术前后一周各抽取外周血 4ml。术前均未接受放疗、化疗及免疫治疗。其中男 11 例,女 7 例,年龄 40~75 岁,中位年龄 50.2 岁;健康对照组中男 10 例,女 5 例,中位年龄 48.5 岁。

1.2 主要仪器与试剂 PCR 扩增仪(美国 MJ 公司 PTC-100 型扩增仪),凝胶图像分析系统(上海复旦四星高科技技术公司); Trizol (Sangon), 逆转录酶 M-MLV 试剂盒 (GIBCO), Taq DNA 聚合酶 (Sangon), 各细胞因子引物由 Sangon 公司合成。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 制备及逆转录反应 见参考文献 [1]。

1.3.2 PCR 反应 在 50 μ l 反应体系中,加入 10 \times PCR 缓冲液 5 μ l, 25mM MgCl₂ 5 μ l, 10mM dNTPs 4 μ l 上下游混合引物 2 μ l, Taq 酶 0.4 μ l, cDNA 4 μ l, 灭菌双蒸水 29.6 μ l, 充分混合,适当离心。反应条件:94 3min, 94 30s, 51 30s, 72 45s, 共 32 个循环,再于 72 延伸 8min。同时以 β -actin 作内参照,扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察,四星凝胶图像分析系统拍摄。(见图 1,2)

表 1 PCR 引物 β -actin、IL-2 及 IFN- γ 的引物序列

细胞因子	序列	长度(bp)	合成单位
β -actin	5' tgaagggtcaccacactgtgccactcta3'	660	Sangon
	5' ctagaagcatttgcggtggacgatggagg3'		
IL-2	5' atgtacaggatgcaactcctgtctt3'	458	Sangon
	5' agtcagtgttgagatgatgctttgaca3'		
IFN- γ	5' tgaactgtcggcagcagctaaa3'	345	Sangon
	5' cctagtggcccctgagataaaagcc3'		
IL-4	5' caaatcgacacctattaatggg3'	360	Sangon
	5' tctggttgcttctctcaca3'		

1.3.3 RT-PCR 凝胶图像分析 以 β -actin 为内参照,应用 ScnImage 图像分析软件进行表达强度分析。结果的判断以同时扩增的 β -actin 表达强度为基准,各细胞因子的相对表达强度(灰度值)按下列公式计算:表达强度(相对强度 relative value, RV) = (背景灰度值 - 细胞因子灰度值) / (背景灰度值 - β -actin 灰度值)。

1.3.4 统计学处理 组间率的比较采用 Fisher 确切概率法

2 结果

2.1 在肝癌、正常对照组中, IFN- γ mRNA 的阳性

表达率分别为 5.6%、6.7% (1/15); IL-2 为 16.7%、13.3%, 表现为 TH1 类细胞因子低表达状态; IL-4 mRNA 在肝癌患者、对照组中的表达率分别为 88.9% (16/18)、6.7% (1/15), 两者有显著性差异, 表现出明显的强势表达。

表 2 肝癌组与对照组中三种细胞因子的表达

groups	Positive samples		
	IFN- γ	IL-2	IL-4
PHC group	1	3	16*
Control group	1	2	1

* $P < 0.01$, vs control group

2.2 正常人 PBMC 及原发性肝癌患者 PBMC 中几种细胞因子 mRNA 的表达强度分析 可见在对照组及肝癌组中 IFN- γ 、IL-2 mRNA 的表达强度都在 0.10~0.12 之间, 表达较弱; 而在肝癌组中的 IL-4 mRNA 的表达强度明显增高, 有显著性差异, 见表 3。

表 3 肝癌组与对照组中三种细胞因子的表达强度 ($\bar{x} \pm s$)

groups	IFN- γ		IL-2		IL-4	
	+	RV	+	RV	+	RV
PHC group	1	0.10	3	0.11 + 0.02	16	0.22 + 0.01*
Control group	1	0.10	2	0.11 + 0.01	1	0.11

* $P < 0.05$, 与对照组比较

2.3 术前及术后不同分期肝癌患者 PBMC 中 IL-2、IFN- γ mRNA 的表达差异 可见随病程发展, 两种 TH1 类细胞因子 mRNA 的表达呈下降趋势, 手术对肝癌患者 PBMC 中 IL-2、IFN- γ mRNA 表达无明显改善, 但可以提高 期患者 PBMC 中 IL-2、IFN- γ 两种细胞因子 mRNA 的表达水平, 见表 4。

表 4 不同分期手术前后 IL-2、IFN- γ mRNA 的表达

groups	Positive samples (%)			
	Pre-operation		Post-operation	
	IL-2	IFN- γ	IL-2	IFN- γ
stage	2 (25%)	1 (12.5%)	4 (50%)	3 (37.5%)
stage	1 (10%)	0	1 (10%)	0

2.4 肝癌患者术前组、正常对照组和术后组的 2 种细胞因子的表达强度分析, 术前组、对照组 IL-2、IFN- γ mRNA 的表达强度大多在 0.11~0.12 之间, 而术后组的两种细胞因子的表达强度在 0.20~0.22 之间, 明显高于另外二组, 见表 5。

表 5 手术前后及对照组中 IL-2、IFN- γ 的表达强度 ($\bar{x} \pm s$)

groups	IL-2		IFN- γ	
	+	RV	+	RV
Pre-operation	3	0.11 \pm 0.02	1	0.10 \pm 0.01
Post-operation	5	0.20 \pm 0.02*	3	0.22 \pm 0.01
Control group	2	0.11 \pm 0.01	1	0.11 \pm 0.01

* $P < 0.05$ 与术前及对照组相比

2.5 PCR 扩增产物电泳图 (1.5 % 琼脂糖凝胶电泳)

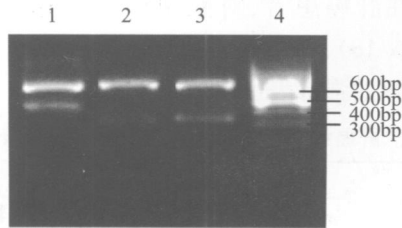


图 1 对照组 IL-2、IFN⁻、IL-4 mRNA 的 PCR 电泳图

注:1. IL-2 2. IFN⁻ 3. IL-4 4. 100bpDNA Make

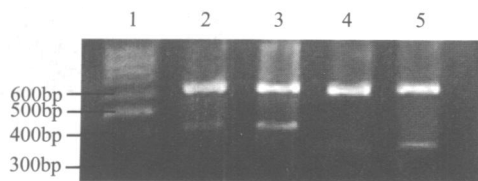


图 2 手术前后患者 IL-2、IFN⁻ mRNA 表达的 PCR 电泳图

注:1. 100bp DNA Maker 2. IL-2 (术前) 3. IL-2 (术后) 4. IFN⁻ (术前) 5. IFN⁻ (术后)

3 讨论

T 细胞介导细胞免疫是宿主抗肿瘤免疫的主要形式,辅助性 T 细胞可以分为 TH1 和 TH2 两个功能亚群,其中 TH1 细胞主要分泌 IL-2、IFN⁻ 和 TNF⁻、等细胞因子,主要介导细胞免疫,TH2 细胞主要分泌 IL-4、IL-10 和 IL-13 等细胞因子,主要介导体液免疫,TH1、TH2 都由其共同前身 TH0 细胞分化而来。正常情况下,机体内两类细胞因子处于平衡状态并互相抑制,但在一定情况下又可互相转化。当 TH1 类细胞因子向 TH2 类细胞因子发生漂移时机体的细胞免疫功能将受到抑制,甚至导致肿瘤的发生。Yamamura 等最先发现肿瘤患者以 TH2 型细胞占优势状态。随后,研究发现在非小细胞肺癌、绒癌、脑胶质瘤、胃癌、结肠癌、淋巴瘤等多类肿瘤中发生 TH2 漂移^[2]。

IL-2、IFN⁻ 是最重要的 TH1 类细胞因子,很多研究表明,在恶性肿瘤患者体内及肿瘤组织内呈低水平表达状态^[3,4]。但目前文献中多报道肿瘤组织及瘤旁组织局部的两类细胞因子表达模式,而在早期及进展期肝癌患者手术前后外周血中的两种细胞因子基因表达变化则鲜有报道。

我们用 RT-PCR 的方法研究了 18 例原发性肝癌患者 PBMC 中 TH1/TH2 的表达模式,并观察手术对 TH1 类细胞因子 IL-2、IFN⁻ mRNA 的表达影响。患者 IL-2 与 IFN⁻ 的表达与对照组并没有明显的差异,但肝癌患者中 IL-4 的 mRNA 的表达率和表达强度都明显高于对照组 ($P < 0.01$),说明肝癌患者外周血中也呈现出 TH2 的强势表达,抗肿

瘤处于抑制状态。在对不同分期肿瘤患者研究时发现,在 期原发性肝癌患者中,TH1 类细胞因子 IL-2 与 IFN⁻ mRNA 的表达水平要高于 期患者,也高于对照组,但 IL-4 mRNA 的水平低于 期患者。提示在肝癌的早期阶段 TH1 类细胞因子发挥了肿瘤免疫功能;但随肿瘤发展,机体的 TH1/TH2 平衡紊乱呈现典型的 TH2 漂移,机体的抗肿瘤免疫功能受到抑制,这与曹志林等^[5]的研究结果相同。在肿瘤切除一周后,IL-2、IFN⁻ mRNA 的表达率呈现出增高趋势,分别达到 27.8%、16.7%,提示手术治疗可能能够增加早期肝癌患者 PBMC 中 IL-2、IFN⁻ mRNA 的表达水平。

手术治疗能够明显增加 期肝癌患者 PBMC 中 IL-2、IFN⁻ mRNA 的表达率水平和表达强度,说明肝癌早期手术对改善患者体内的免疫功能也有着重要的作用,其机制可能与切除肿瘤组织后阻断或减少体内的免疫抑制因子有关^[6],使得机体的免疫功能有所恢复;而对于进展期肝癌,患者可能存在多中心病灶,手术很难清除体内所有的癌细胞,因而体内的免疫抑制在短期内不能得到完全的纠正,也有报道在 期及 期肝癌经手术切除 2 个月后外周血 IL-2、IFN⁻ mRNA 的表达也能较术前增高^[7]。因此,肝癌患者通过及早的手术治疗并联合主动免疫疗法对机体免疫功能的改善、提高肿瘤的手术疗效及促进术后肝功能的恢复可能都有十分重要的作用。

研究发现,10 例 期患者中,只有 1 例表达 IL-2mRNA,手术后也仅此 1 例表达,且术前术后均未见有 IFN⁻ mRNA 的表达,提示随病程的发展,此两种细胞因子 mRNA 在 PBMC 中的表达可能有下降趋势,曹志新等的研究也表明,在 期肝癌 PBMC 中这两种细胞因子在蛋白水平上的含量较 期及 期更高^[5]。IFN⁻ 和 IL-2 是具有多种重要活性功能的细胞因子,机体要处于良好的抗肿瘤免疫状态与这两种细胞因子表达密切相关。IL-2、IFN⁻ 在 期肝癌患者体内的低表达水平可能是体内处于 TH2 的漂移而导致抗肿瘤免疫的抑制状态,也提示这种细胞免疫抑制现象会随病程的发展而更加严重,从而导致肿瘤细胞能够处于免疫逃逸状态,使机体无法组织起有效的抗肿瘤免疫反应。已有的研究表明,通过主动免疫方式体内再激活 TH1 可以逆转 TH2 漂移,提高抗肿瘤效应,并且逆转后的肿瘤细胞对抗癌效应细胞的反应明显增强^[8]。也有研究表明^[9],在和其他消化系统器官的手术切除术相比,行肝切除术中的手术应激也能诱导体内明显短期的 TH2 反应和显著的高代谢状态。因此,在行肝癌的

肿瘤抑制基因 DOC-2 真核表达载体的构建及在卵巢癌细胞 HO-8910 中的表达鉴定

刘淑娟¹, 韩军涛², 辛晓燕¹, 吴元明³, 陈苏民³

Construction of The Eukaryotic Expression Vector pCDNA3.1-p93 and Its Expression in Ovarian Cancer Cell Line HO-8910

LIU Shurjuan¹, HAN Juntao², XIN Xiaoyan¹, WU Yuanming³, CHEN Sumin³

1. Department of Gynecology and Obstetrics, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, 2. Burn unit, Xijing Hospital; 3. Biochemistry and Molecular Biology Institute

Abstract: Objective To construct a recombinant vector consisted of pCDNA3.1 with DOC-2 cDNA (p93) and transfect it into human ovarian cancer cell line HO-8910 in order to investigate the function of DOC-2 gene on ovarian cancer cell. **Methods** The recombinant vector (pCDNA3.1-p93) was constructed by *XhoI* and its correction was confirmed by restriction pattern. Then pCDNA3.1-p93 was transfected into HO-8910 by Lipofectamin and the positive clone 8910-p93 and 8910-pCDNA3.1 were selected by G418. Finally, the expression of DOC-2 in 8910-p93 was proved by immunocytochemical method. **Results**

The recombinant vector pCDNA3.1-p93 was constructed successfully. After being transfected into HO-8910, the pCDNA3.1-p93 positive clone could be harvested by G418 and the steady expression of protein DOC-2 was confirmed by immunocytochemical method. **Conclusion** After the recombinant vector pCDNA3.1-p93 being constructed, DOC-2 gene could express steadily in HO-8910. This will allow us to study the function of DOC-2 gene in future.

Key words: DOC-2; Eukaryotic expression vector; Ovarian cancer

摘要:目的 构建肿瘤抑制基因 DOC-2 的真核表达载体 pCDNA3.1-p93, 将其转入人卵巢癌细胞系 HO-8910 中, 对其基因表达进行相关检测, 为进一步研究 DOC-2 的功能奠定基础。方法 利用 *XhoI* 酶

切含有 p93cDNA 的质粒得到 p93cDNA 基因片段, 将其接入真核表达载体 pCDNA3.1, 并通过酶切鉴定。用脂质体介导法将真核表达载体 pCDNA3.1-p93

收稿日期: 2005-01-25; 修回日期: 2005-06-01

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目 (2002C2-12)

作者单位: 1. 710032 西安, 第四军医大学西京医院妇产科, 2. 烧伤科; 3. 第四军医大学生物化学教研室

手术治疗过程中, 应该考虑由此带来患者机体免疫状态的变化。

众多的研究结果表明, 体内的 TH2 漂移将对机体的抗肿瘤免疫, 并能保护肿瘤细胞发生免疫逃逸及抑制 TH1 类细胞因子的产生。我们的研究也证实在肝癌患者的 PBMC 中也有 TH2 漂移, 并且这种 TH1/TH2 紊乱状态会随着肿瘤病程的发展而加重。而早期肝癌患者通过及时的手术治疗可改善体内的免疫状态。这可能为原发性肝癌的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] 周丽英, 王凡, 黄强, 等. 脑胶质瘤细胞优势表达 TH2 类细胞因子的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(4): 362-363.
- [2] Kharkevith D, Diseito-DI, Balch GC, et al. Characterization of antologous tumor-specific T-helper 2 cells in tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with metastatic melanoma[J]. Int J cancer, 1994, 58(3): 317-323.
- [3] Ren Z, Pang G, Clancy R, et al. Shift of the gastric T-cell re-

sponse in gastric carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(2): 142-148.

- [4] 张筱茵, 陈咏仪, 等. 胃癌局部细胞因子表达谱分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(1): 14-16.
- [5] 曹志新, 陈孝平, 吴在德, 等. 肝癌合并肝硬化患者脾脏 TH1/TH2 细胞因子免疫状态的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18(6): 518-519.
- [6] 杨兰泽, 高静, 等. 胃癌患者血清 IL-6、IL-8、sIL-2R 和 TNF- α 水平的检测分析[J]. 上海免疫学杂志, 2003, (23) 4: 224-275.
- [7] Cao ZX, Chen XP, Wu ZD. Changes of immune function in patients with liver cirrhosis after splenectomy combined with resection of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2003, 4(2): 562-565.
- [8] Tagawa M. Cytokine therapy for cancer[J]. Curr Pharm. Des, 2000, 6(6): 681-689.
- [9] Ishikawa M, Nishioka M, Hanaki N, et al. Hepatic resection induces a shift in the Th 1/2 balance toward Th2 and produces hypermetabolic and hyperhemodynamic states[J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51(59): 1422-1427.

[编辑: 贺文]