

应用反义 TGF-1 基因进行骨肉瘤免疫基因治疗的研究

潘海涛,杨述华,刘勇

Study on the Immunogenic Therapy for Osteosarcoma by Antisense TGF-1 Gene

PAN Hai-tao, YANG Shu-hua, LIU Yong

Department of Orthopedics, Affiliated Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of the treatment on the osteosarcoma by antisense TGF-1 gene in vivo. **Methods** LM8 were transfected with antisense TGF-1 gene through lipofectamine vector and selected by G418. The model of osteosarcoma was established by C3H mice which were inoculated with LM8 lines. The model tumor was treated by inactivated transduced and untransduced LM8 by way of original site and different site, and the treatment of PBS was applied in the group of comparison. **Results** The significant therapeutic effects was achieved by the treatment of the inactivated transduced LM8. The strong inhibition to generation rate and growth speed was exhibited. A better antitumor effect was achieved in the original site tumor compared with the different site. **Conclusion** The way of gene therapy for osteosarcoma by antisense TGF-1 gene was feasible and effective, which provided the foundation of gene therapy for human osteosarcoma.

Key words: Antisense TGF-1 gene; Osteosarcoma; Immunogene therapy

摘要:目的 探讨反义转化生长因子 1 基因治疗骨肉瘤的价值。方法 用转基因技术将反义转化生长因子基因导入骨肉瘤细胞 LM8, 构建转基因细胞株。用骨肉瘤细胞株 LM8 皮下注射 C3H 雄性小鼠建立小鼠骨肉瘤移植瘤模型。应用灭活的转基因骨肉瘤细胞、灭活的未转基因骨肉瘤细胞分原位和异位进行治疗。结果 两种治疗措施都可表现出一定程度的抑瘤作用, 其中以灭活的转基因骨肉瘤细胞治疗效果最佳, 原位治疗效果优于异位治疗。结论 灭活的骨肉瘤细胞也有一定的免疫治疗作用; 反义转化生长因子基因对小鼠移植性骨肉瘤有较好的实验治疗效果, 为人骨肉瘤进行反义转化生长因子基因治疗提供了一定的依据。

关键词: 反义转化生长因子; 骨肉瘤; 免疫基因治疗

中图分类号: R738.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)10-0637-03

0 引言

转化生长因子 1 是肿瘤细胞分泌的最主要的免疫抑制因子, 在骨肉瘤中有很高的表达, 通过自身分泌和旁分泌机制促进骨肉瘤生长。体外实验表明, 阻断转化生长因子自身分泌环, 可有效抑制骨肉瘤细胞的生长。本实验利用反义转化生长因子 1 基因, 对小鼠移植性骨肉瘤进行治疗, 探讨反义转化生长因子 1 基因的利用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 反义转化生长因子 1 表达载体 pcDNA3-anti-TGF-1 由本室构建^[1]; 骨肉瘤细胞株 LM8 由叶树楠博士保存; C3H 小鼠购自北京维通

利华实验动物有限公司, 雄性, 4~5 周龄; DMEM-高糖培养基、新生牛血清、胰蛋白酶、G418、Lipofectamine 均购自 Gibco 公司, 丝裂霉素购自华北制药厂, 鼠 TGF-1 ELISA 检测试剂盒购自 Bender 公司。

1.2 方法

1.2.1 反义转化生长因子 1 基因转染 按 lipofectamine 说明书进行。将对数生长期的骨肉瘤细胞传至 6 孔板, 使每孔细胞数在 1×10^6 左右。将 2 μ L 的质粒 (对照组为空载体 pcDNA3, 以及未进行转染的细胞) 用无血清培养基稀释至 100 μ L, 将 6 μ L 脂质体亦用无血清培养基稀释至 100 μ L, 二者混合后室温下静置 45 min, 用此混合物转染细胞, 6h 后加入 20% 血清培养基, 18h 后换 10% 培养基培养。

1.2.2 G418 筛选 待细胞生长接近融合时按 1:4 传代, 继续培养至汇合 70% 时换入含 400mg/

收稿日期: 2004-10-14; 修回日期: 2005-03-07

基金项目: 武汉市青年科技晨光计划 (20025001028)

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学附属协和医院骨

科

LG418 的培养基开始筛选,3~5 天后换入含 200mg/L G418 的培养基维持筛选,12 天后终止筛选,更换含 20%血清培养基扩大培养 2 周。

1.2.3 骨肉瘤移植瘤模型的制备 用 PBS 将对数生长期的 LM8 细胞稀释成 5×10^7 / mL 浓度,于每只小鼠左侧腋窝皮下注射 0.3 mL,第 3 日注射部位可触及硬结,第 5 日肉眼可见明显肿瘤结节,每 2 日测量一次并作记录。

1.2.4 骨肉瘤移植瘤的基因治疗及观察 于第 7 日将 30 只小鼠随机分组: 对照组 6 只; 转染骨肉瘤细胞治疗组 12 只:分原位治疗和异位治疗各 6 只,将转染骨肉瘤细胞用丝裂霉素(100 μ L/mL)灭活 1 小时后,用 PBS 将转染细胞稀释成 5×10^7 / mL 浓度,第 9 日开始每次注射 0.3 mL,每隔 3 日注射一次;连续注射 5 次。未转染骨肉瘤细胞治疗组 12 只:处理同。每 3 日测量肿瘤大小并记录一次;观察期间小鼠死亡时记录生存时间,切除肿瘤测量瘤体大小及质量;第 50 日将所有小鼠杀死,切除肿瘤并测量大小及质量,见表 1。

表 1 小鼠实验分组和治疗方法

分组	组别	n	每次注射剂量	注射次数	持续治疗时间(天)
转基因骨肉瘤细胞组	原位治疗	6	1.5×10^7	5	15
	异位治疗	6	1.5×10^7	5	15
未转基因骨肉瘤细胞组	原位治疗	6	1.5×10^7	5	15
	异位治疗	6	1.5×10^7	5	15
对照组(PBS)		6	0.3mL	5	15

1.2.5 转染骨肉瘤细胞和未转染骨肉瘤细胞致瘤性的比较 随机选取 6 只小鼠,用 PBS 将对数生长期的 pcDNA3-anti-TGF 1 基因转染的 LM8 细胞稀释成 5×10^7 / mL 浓度,于每只小鼠左侧腋窝皮下

注射 0.3 mL。与上述对照组小鼠进行比较。

1.2.6 灭活的未转染骨肉瘤细胞的免疫作用 随机选取 6 只小鼠,将未转染的骨肉瘤细胞用前述方法灭活后,用 PBS 将其稀释成 5×10^7 / mL 浓度,于每只小鼠左侧腋窝皮下注射 0.3 mL,每日 1 次,连续注射 5 次,3 日后用前述方法制作肿瘤模型。

1.2.7 TGF 1 在体外、体内的表达 采用双抗体夹心 ELISA 法进行检测。体外培养转染细胞在 2 天、14 天、21 天和 35 天四个时间点分别取 5 个复孔进行检测;荷瘤鼠死亡和杀死时取肿瘤组织(100mg)进行检测。方法参照说明书进行。

1.2.8 数据处理及统计学分析 检测数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。生存时间以日为单位,自骨肉瘤细胞注射日起,至死亡或处死日止;肿瘤体积大小按 $a \times b^2 \times 0.4$ 计算,a 为长径,b 为短径。数据分析采用 SPSS 11.0 软件在计算机上进行,采用 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 G418 筛选 实验组细胞在 2 周左右形成团簇样生长的抗性克隆,而对照组细胞则在 3~5 天左右全部死亡。

2.2 反义转化生长因子基因对肿瘤生成无明显抑制作用,LM8 骨肉瘤细胞对 C3H 雄性小鼠肿瘤生成率为 100%,转基因细胞肿瘤生成率亦为 100%,但后者的生存时间(38.5 ± 6.9)较前者(34 ± 6.1)有明显延长($P < 0.05$),后者的肿瘤生长速度也明显减缓,后者的肿瘤体积(1.324 ± 0.319) cm³,肿瘤质量(1.614 ± 0.717) g,较前者的(2.525 ± 0.982) cm³和(2.730 ± 1.039) g 明显减少($P < 0.05$)。这说明反义转化生长因子基因对骨肉瘤移植瘤的生长有明显的抑制作用,见表 2。

表 2 不同治疗对骨肉瘤移植瘤模型生存时间、肿瘤大小及肿瘤质量的影响

组别	原位治疗			异位治疗		
	生存时间(天)	体积(cm ³)	瘤重(g)	生存时间(天)	体积(cm ³)	瘤重(g)
转基因骨肉瘤细胞	48.5 ± 2.0	0.734 ± 0.138	0.796 ± 0.155	45.5 ± 2.3	1.029 ± 0.161	1.119 ± 0.167
未转基因骨肉瘤细胞	40.0 ± 2.2	1.576 ± 0.185	1.724 ± 0.193	37.5 ± 2.8	1.728 ± 0.260	1.905 ± 0.264
对照组(PBS)	34.0 ± 3.1	2.525 ± 0.501	2.730 ± 0.530			

2.3 灭活的未转染细胞对肿瘤生成无明显抑制作用,经其免疫后的 C3H 小鼠肿瘤生成率仍为 100%,但肿瘤的生成时间(从种植骨肉瘤细胞到肿瘤直径达 5 mm)明显延长,肿瘤的生长速度有所减缓(2.210 ± 0.642) cm³。这表明灭活的未转染肿瘤细胞可以提高肿瘤组织的免疫原性,对肿瘤生长有一定的抑制作用。

2.4 治疗组的平均生存时间均较对照组延长,肿瘤

体积、肿瘤质量则均低于对照组,而原位治疗又明显优于异位治疗。治疗组间有差异性($P < 0.05$),其中用灭活的转染细胞进行原位治疗效果最好。治疗组间的差异也很好地说明了反义转化生长因子基因对移植瘤生长的抑制作用。

2.5 体外培养骨肉瘤细胞 TGF 1 的表达量为(16.24 ± 3.25) ng/mL,转染反义转化生长因子基因后 TGF 1 的表达明显下降,四个时间点检测值分别



为(9.71 ±2.94)、(8.86 ±3.52)、(8.07 ±2.09)、(8.56 ±1.98) ng/ mL,见图 1;移植瘤原位治疗后 TGF 1 表达与异位治疗后表达有明显差异,与对照组比较均有明显差异,见表 3。

2.6 取出的肿瘤组织经切片 HE 染色证实为恶性肿瘤组织。

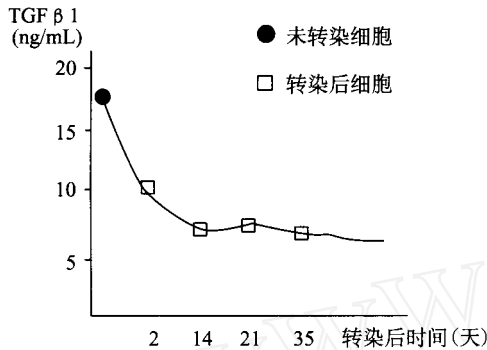


图 1 TGF 1 在骨肉瘤细胞中的表达曲线

表 3 移植瘤 TGF 1 含量变化

组 别	含量 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{mg}$)
转基因骨肉瘤细胞 原位治疗	46.73 ±7.86
治疗组 异位治疗	70.83 ±9.21
未转基因骨肉瘤细胞 原位治疗	66.29 ±6.84
治疗组 异位治疗	98.52 ±8.34
对照组 (PBS)	137.62 ±7.53

3 讨论

3.1 转化生长因子 1 作为肿瘤组织分泌的最主要的免疫抑制因子,在骨肉瘤的生长、转移过程中发挥着重要作用。转化生长因子 1 不但可抑制 T 细胞、B 细胞、LAK 细胞,而且还可以抑制免疫细胞产生免疫刺激因子如 IFN-、TNF- 等。转化生长因子 1 还能抑制肿瘤特异性 T 细胞(CTL)的产生和细胞毒作用,从而使肿瘤细胞逃避免疫杀伤^[1]。体外实验表明,采用反义转化生长因子 1 基因技术,可以阻断骨肉瘤细胞自分泌环,明显抑制骨肉瘤细胞的增殖活性^[2]。本实验则进一步证实反义转化生长因子 1 基因在体内同样可以对骨肉瘤细胞的生

长增殖产生抑制作用,并对致瘤动物的生存时间产生影响^[3]。在两种治疗方法中,转基因组要优于未转基因组,主要是反义转化生长因子 1 基因发挥了重要作用。

3.2 靶向治疗是反义转化生长因子 1 基因发挥作用的关键。本实验中原位治疗组要优于异位治疗组,这些结果提示靶向治疗是骨肉瘤基因治疗的关键问题之一。

3.3 肿瘤免疫原性低从而逃避机体的免疫监视是肿瘤形成发展的重要原因。本实验通过灭活骨肉瘤细胞增加骨肉瘤组织的免疫原性,达到一定程度上抑制肿瘤形成发展的目的。这种免疫治疗方法是肿瘤治疗研究中的热点之一。

3.4 应用反义转化生长因子 1 基因进行骨肉瘤基因治疗存在的问题:骨肉瘤细胞转染反义转化生长因子 1 基因后肿瘤生成率仍高达 100%,尽管后期肿瘤生长有所减缓。在已生成的所有肿瘤中,均表现出不同程度的持续生长,未观察到 1 例肿瘤生长明显停滞、缩小或消失。通过 ELISA 检测发现,无论是在体外还是在体内,TGF 1 的表达都仅仅表现为一定程度的下降,而非完全无表达。本实验仅仅证明应用反义转化生长因子 1 基因进行骨肉瘤基因治疗存在可行性和有效性,但对骨肉瘤病人的基因治疗及反义转化生长因子 1 基因如何在人体内发挥作用尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Epstein FH. Role of transforming growth factor in human disease[J]. N England J Med, 2000, 342 (12): 1350-1358.

[2] Visser K, Kast WM. Effects of TGF- on the immune system: implication for cancer immuno-therapy [J]. Leukemia, 1999, 13(10): 1188-1199.

[3] 刘勇,郑启新,杜靖远. 阻断转化生长因子 1 自分泌环对骨肉瘤细胞生物学活性和化疗药物敏感性的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20 (9): 825-826.

[编辑: 周永红]