

IFN- γ 基因诱导裸鼠胶质瘤 Fas 表达上调及细胞凋亡的实验研究

郭 衍, 章 翔, 蒋晓帆, 林 伟, 张剑宁, 王西玲

Study of IFN- γ Gene Inducing Nude Mice of Human SHG44 Glioma Up-regulating of Fas and Cell Apoptosis

GUO Yan, ZHANG Xiang, JIANG Xiao-fan, LIN Wei, ZHANG Jian-ning, WANG Xi-ling

Neurosurgery Institute of PLA, Xijing hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: **Objective** To study the effects of interferon- γ (IFN- γ) gene inducing human gliomas apoptosis and to observe whether interferon- γ can induce up-regulating of Fas expression. The relationship between cell apoptosis inducing by IFN- γ gene and up-regulating of Fas expression was discussed. **Methods** To establish the SHG44 glioma model of nude mice. Eukaryonic expression vector (pSV2IFN- γ) for IFN- γ packaged by liposome was injected into SHG44 glioma of nude mice; and observe the glioma growth and calculate tumor size. The effects of IFN- γ gene inducing human gliomas apoptosis and Fas expression were realized by immunohistochemistry and tunel. **Results** The expression of IFN- γ gene in the glioma nude mice were determined. The glioma growth of nude mice was inhibited. IFN- γ can induce glioma cell SHG44 apoptosis. Fas expression of glioma cell is significantly higher than that of the control group. **Conclusion** IFN- γ gene can inhibit the growth of human gliomas and induce the apoptosis of human glioma cells. The apoptosis inducing by IFN- γ gene may depend on the up-regulating of Fas expression.

Key words: Interferon- γ ; Glioma; Apoptosis; Fas

摘 要: **目的** 研究 干扰素基因对人脑胶质瘤的诱导凋亡作用, 以及能否诱导胶质瘤细胞 Fas 表达上调, 并探讨了 干扰素基因诱导细胞凋亡及 Fas 表达上调之间的联系。 **方法** 建立裸鼠 SHG44 胶质瘤模型, 用脂质体包埋法将 IFN- γ 基因的真核表达载体 pSV2IFN- γ 注入裸鼠皮下 SHG44 脑胶质瘤, 观察肿瘤生长情况并计算肿瘤体积, 通过免疫组化、TUNEL 染色, 了解 IFN- γ 基因诱导人脑胶质瘤细胞凋亡的作用以及胶质瘤细胞 Fas 表达情况。 **结果** IFN- γ 在荷瘤裸鼠瘤体内获得表达, 裸鼠皮下胶质瘤生长受到抑制, 并诱导 SHG44 胶质瘤细胞凋亡, 胶质瘤细胞 Fas 表达明显高于对照组。 **结论** IFN- γ 基因能够抑制人脑胶质瘤生长, 并诱导胶质瘤细胞凋亡; IFN- γ 基因诱导胶质瘤细胞凋亡可能是 Fas 表达上调的结果。

关键词: 干扰素; 胶质瘤; 凋亡; Fas

中图分类号: R730.264 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)04-0196-03

0 引言

诱导肿瘤细胞的凋亡是当前肿瘤治疗的主要机制之一, 而 Fas 信号系统在启动细胞凋亡的通路中起重要作用。本实验采用脂质体包埋法将 IFN- γ 基因的真核表达载体 pSV2IFN- γ 注入裸鼠皮下 SHG44 脑胶质瘤, 观察它对脑胶质瘤的生长抑制及诱导凋亡的作用, 并检测胶质瘤细胞 Fas 表达情况, 探讨 干扰素基因诱导胶质瘤细胞凋亡及 Fas 表达之间的联系。

1 材料和方法

1.1 材料

收稿日期: 2004-11-15; 修回日期: 2005-01-24
作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院全军神经外科研究所

IFN- γ 真核表达载体 pSV2IFN- γ 由日本名古屋大学医学部 Yoshida J 教授惠赠; 胶质瘤细胞株 SHG44 由本校全军神经外科研究所提供; 裸鼠由本校动物中心提供; 脂质体、兔抗人 IFN- γ 单抗(英国 Peprotech 公司); DMEM(Gibco 公司); 兔抗人 Fas 单抗、免疫组化试剂盒、TUNEL 试剂盒(博士德公司)。

1.2 方法

1.2.1 裸鼠 SHG44 胶质瘤模型 15 只成年裸鼠分为实验组 A、空载体组 B 和对照组 C, 每组 5 只。裸鼠每只右腿上部皮下注射 100 μ l 无血清培养液含 3 \times 10⁶ 个 SHG44 胶质瘤细胞, 接种后严密观察肿瘤生长情况。肿瘤形成后, 每日测量肿瘤大小并计算肿瘤体积: $V(\text{cm}^3) = D^3/6$, D 为肿瘤最长及最短径的平均值。

1.2.2 外源性 DNA 注射治疗 接种 SHG44 细胞后的第 2 周,裸鼠分别进行如下治疗:A 组瘤体内注射 20 μ l 脂质体包裹的 10 μ g pSV2IFN 质粒;B 组瘤体内注射 20 μ l 空脂质体;C 组瘤体内注射 20 μ l 无菌生理盐水。3 天后重复注射 1 次。每天定时观察肿瘤生长情况,计算肿瘤体积。

1.2.3 组织标本的处理与检测 接种 40 日后,取肿瘤标本,经常规处理制成 5 μ m 石蜡切片,进行常规 HE 染色。IFN- 以及 Fas 免疫组化检测:切片经脱蜡、入水,10 mg/L 过氧化氢/PBS、3mg/L TritonX-100/PBS 处理后,滴加正常羊血清 37 温育 30min,弃去血清后分别滴加兔抗人 IFN- 单抗 IgG 及兔抗人 Fas 单抗,4 过夜。滴加生物素化的羊抗兔 IgG,37 温育 30min,滴加 ABC 复合物 37 温育 30min,上述各步之间均以 PBS 充分振洗,最后浸入新鲜配制的 DAB 显色液,室温 10min,蒸馏水洗终止反应,苏木精衬染,逐级酒精脱水后二甲苯透明,中性树胶封片。IFN- 染色阳性标准为:细胞浆内呈棕黄色。Fas 染色阳性信号为棕黄色颗粒,分布于细胞膜和细胞浆内。记数方法:在光镜下随机选取 4 个高倍视野($\times 400$),计算 4 个视野内阳性细胞数占总细胞数百分率的平均值。

1.2.4 TUNEL 染色检测胶质瘤凋亡 裸鼠实体瘤切片经脱蜡、入水,3% H₂O₂ 封闭 30min,20mg/L 蛋白酶 K 消化液 20min,加 TUNEL 反应液,37 孵育 60min,过氧化物酶连接的抗荧光素抗体,37 孵育 30min,PBS 振洗 5min $\times 3$ 次,DAB 显色,苏木素复染,脱水透明,封片。以 PBS 替代 TUNEL 反应液作阴性对照,阳性标准为:细胞核内呈棕黄色。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 11.0 软件对数据进行统计分析,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 IFN- 对胶质瘤的抑制作用

接种后 20 天以内,A、B 和 C 组肿瘤大小基本相同,在第 20 天后,B 和 C 组肿瘤呈现快速生长,A 组肿瘤仍呈缓慢生长,至第 5 周实验结束,A、B 和 C 组肿瘤平均体积分别为 $(4.326 \pm 1.52) \text{ cm}^3$, $(7.918 \pm 1.76) \text{ cm}^3$ 和 $(8.043 \pm 1.68) \text{ cm}^3$,A 与 B 或 C 组肿瘤生长速率相比差异有显著性意义 ($P < 0.01$),B 和 C 组肿瘤生长速率相比差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

2.2 裸鼠 SHG44 胶质瘤免疫组化检测

裸鼠 SHG44 胶质瘤 HE 染色(见图 1)。免疫组化检测,IFN- 免疫组化显示 A 组肿瘤切片中肿

瘤细胞浆内呈棕黄色,提示有较高的 IFN- 蛋白表达(见图 2),而 B、C 组染色成阴性,无 IFN- 蛋白表达(见图 3)。Fas 免疫组化检测显示 A 组肿瘤切片中有较高的 Fas 蛋白表达(见图 4),阳性细胞数占总细胞数的百分率为 42%,B、C 组仅有少量表达,百分率分别为 11% 和 9%,A 与 B 或 C 组肿瘤 Fas 蛋白表达相比差异显著 ($P < 0.01$),B 和 C 组差异无显著性意义 ($P > 0.05$),提示 IFN- 基因可能诱导裸鼠 SHG44 胶质瘤 Fas 表达上调。

2.3 TUNEL 染色检测胶质瘤凋亡

A 组部分肿瘤细胞核质呈现均匀的染色,B 和 C 组肿瘤细胞呈阴性,提示转染了人干扰素基因的 SHG44 胶质瘤细胞呈现出明显的凋亡改变(见图 5)。

3 讨论

目前认为干扰素主要通过两种途径对肿瘤细胞的生长发挥作用,一是动员机体自身的免疫系统去攻击肿瘤,Nakahara、Natsume^[1-3] 等研究发现干扰素能提高系统性的细胞免疫,抑制胶质瘤细胞增殖。其次是对肿瘤细胞的直接作用。体外干扰素的细胞悬液培养发现,干扰素可直接影响有丝分裂的不同阶段,通常使细胞生长停滞于 G₁ 期,有时则延迟了 S 期或整个细胞周期。Zhang 等^[4] 用干扰素作用于体外培养的膀胱肿瘤细胞株,在所培养的上清液中检测到 TNF 的表达,干扰素可以阻止肿瘤细胞从 S 期进入 G₂ 期,其细胞毒性及抗增殖活性可能与 TNF 有关。干扰素还可通过诱导 C-myc 表达的改变调节细胞凋亡的敏感性。诱导肿瘤细胞凋亡的过程有赖于细胞中多种信号传导通路的开放、功能基因的转录和相互协同作用^[5]。同时,利用干扰素的诱导凋亡作用协同其他治疗,例如与放疗、化疗同时进行,可达到提高疗效的目的;干扰素和 ACNU、MCNU 等化疗药联合应用,以及和放疗联合作用,能提高化疗药对胶质瘤的毒性作用和放疗效果^[6,7]。

恶性肿瘤细胞发生凋亡和坏死通常有细胞周期调节基因的突变,导致过量表达生长启动蛋白,细胞周期失控,相应的各种 DNA 损伤得不到及时修复,各种突变积累,形成恶性循环。Tohma^[8] 对胶质母细胞瘤进行 Fas 表达研究,发现原发性胶质母细胞瘤均有缺血坏死灶,且 Fas 表达阳性区集中在缺血坏死灶周围。而由于继发性胶质母细胞瘤的坏死灶较少,Fas 表达阳性率亦较低。中枢神经系统的组织一般无表达。研究发现当 FasL 与细胞膜上的 Fas 结合后,能将胞外的凋亡信号传导入胞内,启动

表达 Fas 细胞的凋亡进程。Fas/ FasL 信号系统与机体淋巴细胞的克隆删除、免疫耐受的建立、活化的 T 细胞凋亡、免疫反应的终止等密切相关,也是介导 CTL 细胞识别和杀死肿瘤细胞的主要途径之一^[9]。

本实验利用脂质体包埋法将 IFN- γ 基因的真核表达载体 pSV2IFN- γ 注入裸鼠皮下 SHG44 脑胶质瘤,观察肿瘤生长情况并计算肿瘤体积,结果显示 A 组胶质瘤生长受到明显抑制,与 B 或 C 组肿瘤体积相比差异有显著性意义。免疫组化证明人 IFN- γ 基因在 SHG44 胶质瘤中得到表达。TUNEL 试验显示转染了人干扰素基因的 SHG44 胶质瘤细胞发生明显的凋亡。干扰素对胶质瘤细胞有抑制增殖和促凋亡作用,可能是干扰素开放信号传导通路以及引起细胞周期调节相关基因表达所造成的。实验提示 A 组肿瘤切片中有较高的 Fas 蛋白表达,A 与 B 或 C 组肿瘤 Fas 蛋白表达相比差异显著 ($P < 0.01$),说明 IFN- γ 基因可能诱导裸鼠 SHG44 胶质瘤 Fas 表达上调,调节 Fas/ FasL 信号系统诱导裸鼠 SHG44 胶质瘤细胞发生凋亡。关于干扰素对 Fas/ FasL 信号系统的具体作用机制还需进一步的研究。

(本文图见封 2)

参考文献:

- [1] Nakahara N, Pollack IF, Storkus WJ, et al. Effective induction of antiglioma cytotoxic T cells by coadministration of interferon-beta gene vector and dendritic cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(7):549-558.
- [2] Natsume A, Tsujimura K, Mizuno M, et al. IFN-beta gene therapy induces systemic antitumor immunity against malignant glioma[J]. *J Neurooncol*, 2000, 47(2):117-124.
- [3] Natsume A, Mizuno M, Ryuke Y, et al. Antitumor effect and cellular immunity activation by murine interferon-beta gene transfer against intracerebral glioma in mouse[J]. *Gene Ther*, 1999, 6(9):1626-1633.
- [4] Zhang Y, Khoo HE, Esuvaranathan K. Effects of bacillus Calmette-Guerin and interferon alpha-2B on cytokine production in human bladder cancer cell lines[J]. *J Urol*, 1999, 161(3):977-983.
- [5] Camero AM, Larner AC. Vanadate facilitates interferon alpha-mediated apoptosis that is dependent on the Jak/ Stat pathway[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(17):13547-13553.
- [6] Wakabayashi T, Hatano N, Kajita Y, et al. Initial and maintenance combination treatment with interferon-beta, MCNU (Ranimustine), and radiotherapy for patients with previously untreated malignant glioma[J]. *J Neurooncol*, 2000, 49(1):57-62.
- [7] Wakabayashi T, Kajita Y, Hatano N, et al. Clinicopathological study of oligodendroglial tumors: the effectiveness of interferon beta, ACNU/MCNU, and radiation (IAR/IMR) for anaplastic tumors[J]. *Brain Tumor Pathol*, 2000, 17(1):29-33.
- [8] Tohma Y, Gratas C, Van Meir EG, et al. Necrogenesis and Fas/ AP0-1 (CD95) expression in primary (denovo) and secondary glioblastomas[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998, 57(3):239-245.
- [9] Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, et al. Melanoma cell expression of Fas ligand: implications for tumor immune escape [J]. *Science*, 1996, 274(5291):1363-1366.

[编辑:周永红;校对:安凤]

IFN- β 基因诱导裸鼠胶质瘤 Fas 表达上调及细胞凋亡的实验研究

(正文见 196 页)

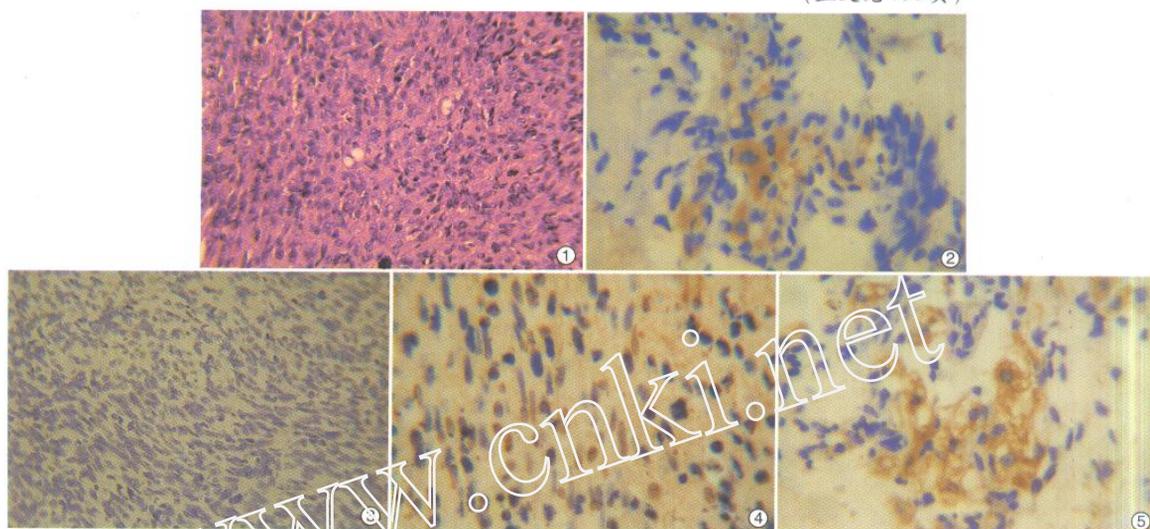


图 1 裸鼠 SHG44 胶质瘤 HE 染色 ($\times 200$)

图 2 裸鼠 SHG44 胶质瘤 IFN- β 免疫组化, 胞浆为阳性 ($\times 400$)

图 3 对照组裸鼠 SHG44 胶质瘤 IFN- β 免疫组化染色, 胞浆为阴性 ($\times 200$)

图 4 TUNEL 染色, 细胞核内呈棕黄色 ($\times 200$)

图 5 裸鼠 SHG44 胶质瘤 Fas 免疫组化, 胞浆为阳性 ($\times 200$)

环氧合酶-2 在肝细胞癌中的表达及其对肿瘤血管生成的影响

(正文见 199 页)

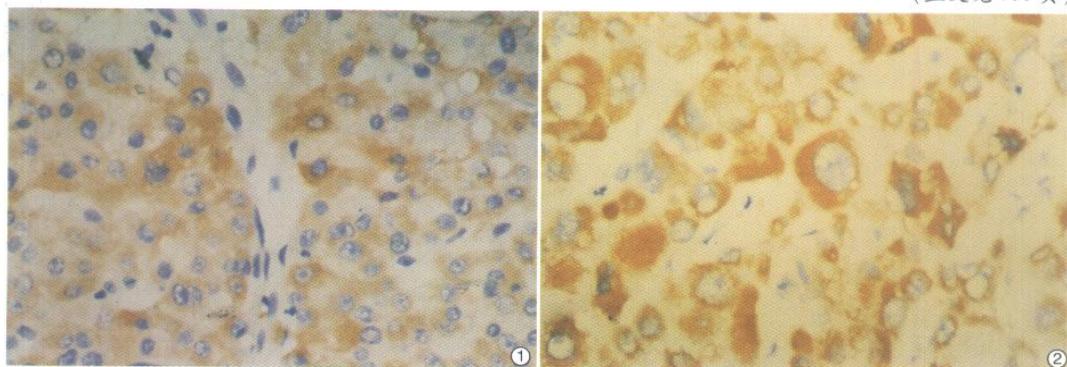


图 1 肝细胞癌组织中 COX-2 的 SP 免疫组织化学染色 ($\times 400$)

图 2 肝细胞癌组织中 VEGF 的 SP 免疫组织化学染色 ($\times 400$)