

[文章编号] 1000-1182(2010)01-0025-04

# 转肿瘤坏死因子- $\alpha$ 基因的肿瘤引流淋巴结细胞 对人舌鳞癌SCID鼠移植瘤的生长抑制作用

孟箭<sup>1</sup> 郭伟<sup>2</sup> 张志愿<sup>2</sup> 任国新<sup>2</sup> 竺涵光<sup>2</sup> 何悦<sup>2</sup> 周晓健<sup>2</sup>

(1.东南大学医学院附属徐州市中心医院 口腔科, 江苏 徐州 221009;

2.上海交通大学医学院附属第九人民医院 口腔颌面外科, 上海 200011)

**[摘要]** 目的 探讨在体外具有强大抗瘤活性的经肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )基因转导的肿瘤引流淋巴结细胞(DNL)在体内的抑瘤效果以及与平阳星(PYC)联合应用的可行性。方法 将舌鳞癌细胞系Tca8113细胞注入SCID鼠背部皮下建立移植瘤模型, 取经TNF- $\alpha$ 基因转导的DNL细胞在肿瘤区局部注射, 联合应用低剂量PYC, 观察肿瘤生长情况。至第8周以瘤重计算抑瘤率, 并取瘤体标本经处理后作电镜和TUNEL检查, 观察细胞凋亡情况。结果 TNF/DNL加重组白介素-2(rIL-2)组和TNF/DNL+rIL-2+PYC组抑瘤率均较高, 2组间差异有统计学意义( $P<0.05$ ); TNF/DNL+rIL-2组超微电镜及TUNEL检测均见凋亡细胞, 与对照组相比, 凋亡指数(AI)较高( $P<0.05$ )。结论 经TNF- $\alpha$ 基因转导的DNL局部应用具有明显的抑瘤效果, 与PYC联合应用抑瘤效果更大。诱导肿瘤细胞凋亡可能是TNF/DNL抗人舌鳞癌的重要机制之一。

**[关键词]** 鳞状细胞癌; 淋巴细胞; 肿瘤坏死因子

**[中图分类号]** R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.01.007

## Inhibition effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ gene transduced tumor drainage node of lymphocytes from tongue cancer on SCID mice transplanted tumor established with human tongue carcinoma cell lines

MENG Jian<sup>1</sup>, GUO Wei<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-yuan<sup>2</sup>, REN Guo-xin<sup>2</sup>, ZHU Han-guang<sup>2</sup>, HE Yue<sup>2</sup>, ZHOU Xiao-jian<sup>2</sup>. (1. Dept. of Stomatology, The Affiliated Xuzhou Hospital of Medical College, Dongnan University, Xuzhou 221009, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the *in vivo* inhibition effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) gene transduced tumor drainage node of lymphocytes(DNL) from tongue cancer on SCID mice transplanted tumor. **Methods** 15 human tongue carcinoma models were established in SCID mice by subcutaneously injection of squamous cell carcinoma line Tca8113. TNF- $\alpha$  gene introduced DNL, combined with low dose Pinyancin(PYC), were locally injected into tumor site. The inhibition rate was determined by the weights at the 8th week after tumor dissection and fresh specimens were prepared and subject to histopathologic examination under transmission electron microscope, and *in situ* TUNEL was used to detect apoptosis. **Results** The TNF/DNL and rIL-2 group, and the TNF/DNL and rIL-2 and PYC group both exerted a strong inhibition effect on the implanted tumor. Treated tumors of the TNF/DNL and rIL-2 and PYC group were significantly reduced in comparison with those of the TNF/DNL and rIL-2 group( $P<0.05$ ). The apoptosis of tumor in the TNF/DNL and rIL-2 group was evidenced based on transmission electron microscope and TUNEL analysis, and the apoptosis index was higher than that of control group( $P<0.05$ ). **Conclusion** Local injection of DNL modified with TNF- $\alpha$  gene, combined with low dose PYC, exert a synergistic antitumor effect. Apoptosis may be an important mechanism of squamous cell carcinoma killed by TNF/DNL.

**[Key words]** squamous cell carcinoma; lymphocytes; tumor necrosis factor

肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF-

$\alpha$ )基因转导肿瘤引流淋巴结细胞(drainage node of lymphocytes, DNL)后发现其外缘性基因能够表达, 分泌高活性的TNF, 在体外具有强大的抗肿瘤活性<sup>[1]</sup>。TNF- $\alpha$ 基因转导的舌鳞癌DNL瘤周注射比静脉输注到达瘤体的浓度高<sup>[2-3]</sup>。但体内是一个复杂的环境,

[收稿日期] 2009-07-13; [修回日期] 2009-11-19

[基金项目] 徐州市社会发展科技基金资助项目(XM08C045)

[作者简介] 孟箭(1966—), 男, 江苏人, 主任医师, 硕士

[通讯作者] 孟箭, Tel: 0516-83956487

体内抑瘤效果尚不清楚。本实验在建立人舌鳞癌SCID鼠移植瘤模型的基础上,观察局部应用TNF- $\alpha$ 基因转导的DNL以及联合应用低剂量平阳星(Pinyancin, PYC)对人舌鳞癌的抑瘤效果,并对其机制进行探讨,以期临床免疫化疗提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

选取由上海市肿瘤研究所动物房提供的SCID鼠15只,4~6周龄,体重18~24 g,在SPF条件下饲养。

### 1.2 制备舌鳞癌TNF/DNL

制备舌鳞癌TNF/DNL的方法见参考文献[1]。

### 1.3 荷瘤SCID鼠模型的建立

人舌鳞癌Tca8113细胞株(上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面外科)解冻复苏,37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下于含10%小牛血清的RPMI1640培养基中培养。取对数生长期贴壁生长的细胞,经0.25%胰蛋白酶消化后,用PBS缓冲液洗涤3次,计数后配成浓度为每升 $1 \times 10^{10}$ 个的肿瘤细胞悬液,给SCID鼠皮下注射0.2 mL。

### 1.4 实验分组

将15只实验动物随机分为3组,即对照组、TNF/DNL加重组白细胞介素-2(recombinant interleukin-2, rIL-2)组和TNF/DNL加rIL-2加PYC组,每组5只。对照组在SCID鼠皮下注射等量生理盐水。TNF/DNL加rIL-2组:在肿瘤接种12 h后于肿瘤部位注射浓度为每升 $5 \times 10^{10}$ 个的TNF/DNL 0.2 mL,腹腔注射 $1 \times 10^4$  U·mL<sup>-1</sup> rIL-2 0.2 mL。TNF/DNL加rIL-2加PYC组:肿瘤接种12 h后腹腔注射 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的PYC 0.2 mL,12 h后接种部位注射浓度为每升 $5 \times 10^{10}$ 个的TNF/DNL 0.2 mL,腹腔注射 $1 \times 10^4$  U·mL<sup>-1</sup> rIL-2 0.2 mL。

### 1.5 移植瘤生长情况及抑瘤作用评价

荷瘤SCID鼠饲养在SPF环境中,每周观测瘤体大小,第8周测量体积后处死,解剖称重,按下列公式计算抑瘤率:抑瘤率(%)=(1-实验组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%。

### 1.6 细胞凋亡超微结构的观察

1.6.1 电镜检查 TNF/DNL加rIL-2组移植瘤在4℃条件下将标本置于3%戊二醛固定液中浸泡24 h,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二甲砷酸钠缓冲液漂洗72 h后用1%四氧化锇固定2 h,乙醇逐级脱水后用环氧树脂618定向包埋,切 $0.5 \mu\text{m}$ 的中薄片,甲苯胺蓝染色后作光镜定位观察,根据光镜定位制备 $70 \mu\text{m}$ 超薄切片,经醋酸双氧锂及柠檬酸铅双重电子染色后,用Hitachi-600透射电镜观察。

1.6.2 TUNEL法凋亡细胞原位标记 切片常规脱蜡

至水,室温下 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白酶K消化25 min;置0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>甲醇溶液处理1 h;0.1% TritonX-100溶液4℃ 2 min;加5  $\mu\text{L}$ 平衡液和45  $\mu\text{L}$ 含TDT酶的反应液共50  $\mu\text{L}$ (TUNEL试剂盒)37℃反应1 h;滴加抗生素碱性磷酸酶抗体置于湿盒中37℃孵育30 min;DAB显色,苏木苏复染,梯度乙醇脱水、二甲苯透明,封蜡。未加脱氧核糖转移酶TdT的dUTP作阴性对照。结果判定标准:细胞核深棕褐色者为凋亡阳性细胞,计算凋亡细胞占总计数的百分比为凋亡指数(apoptosis index, AI),每份标本于 $40 \times 10$ 视野下随机检测10个视野。

### 1.7 统计学处理

采用SAS 10.0软件包对每组的抑瘤率作两两比较;各组的AI用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对组间均数进行t检验比较组间差异。统计的显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 各组肿瘤的生长情况

对照组接种后第2周移植瘤体积开始增大,第3周体积增大迅速,第8周平均体积已达 $3.771 \text{ cm}^3$ ;TNF/DNL加rIL-2组、TNF/DNL加rIL-2加PYC组接种后肿瘤体积增长缓慢,第8周时二者瘤体平均体积分别为 $1.422$ 、 $0.334 \text{ cm}^3$ 。对照组、TNF/DNL加rIL-2组和TNF/DNL加rIL-2加PYC组肿瘤重量分别为 $(2.988 \pm 0.454)$ 、 $(1.086 \pm 0.407)$ 、 $(0.272 \pm 0.097) \text{ g}$ 。第8周末TNF/DNL加rIL-2组和TNF/DNL加rIL-2加PYC组抑瘤率分别为63.65%、90.90%,二者间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 电镜观察结果

TNF/DNL加rIL-2组看到典型的凋亡细胞,表现为胞核染色质固缩,聚集在核的边缘,呈半球状,也可均匀平铺于核膜下形成半月状或块状,并可见凋亡小体,细胞浆内各种细胞器基本正常(图1、2)。

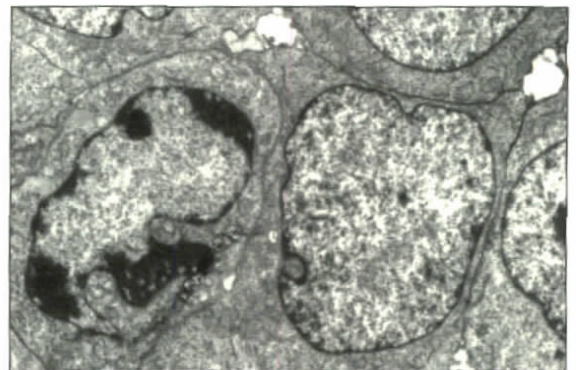


图1 TNF/DNL加rIL-2组凋亡细胞胞核染色质固缩,呈块状 TEM  $\times 4800$

Fig 1 Apoptotic chromatin condensation nuclei into a block in the TNF/DNL and rIL-2 group TEM  $\times 4800$

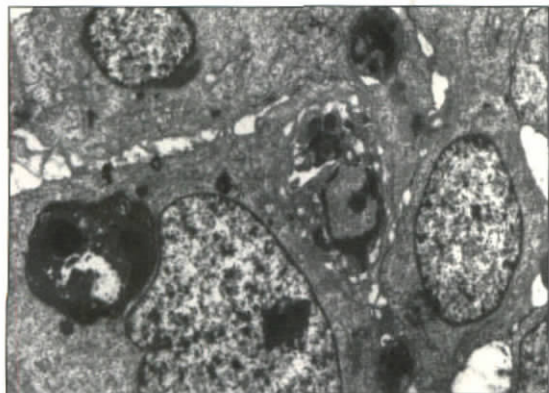


图2 TNF/DNL加rIL-2组凋亡细胞核染色质固缩,并可见凋亡小体 TEM ×3810

Fig 2 Apoptotic chromatin condensation nuclei with apoptotic bodies in the TNF/DNL and rIL-2 group TEM ×3810

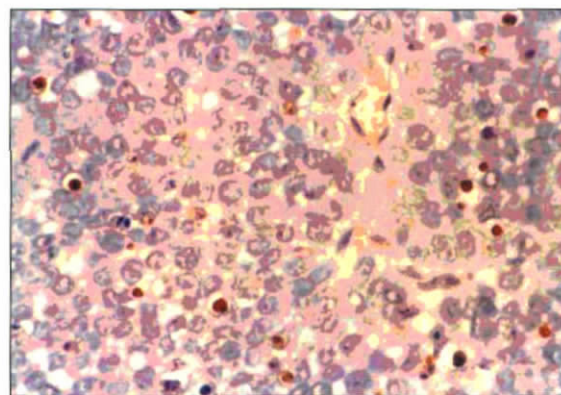


图5 TNF/DNL加rIL-2组凋亡细胞胞体缩小,细胞核深重褐色 TUNEL ×400

Fig 5 Bodies of apoptotic cells shrunk and nucleus were deep brown in the TNF/DNL and rIL-2 group TUNEL ×400

### 2.3 TUNEL法检测结果

TNF/DNL加rIL-2组和对照组的AI(每100个细胞中)分别为(10.06±2.62)、(3.26±1.51)个。TNF/DNL加rIL-2组与对照组相比,细胞核内有明显的标记物出现, AI明显升高,与对照组间差异有统计学意义( $P<0.05$ )(图3~5)。

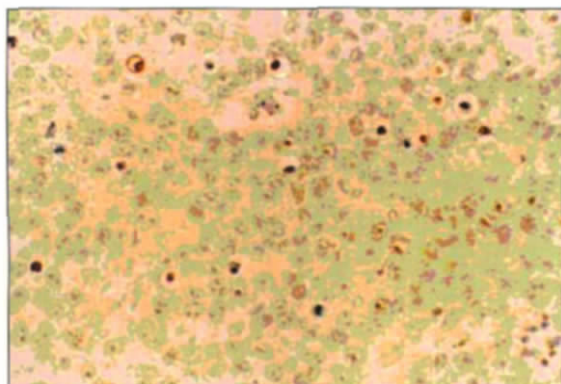


图3 对照组鳞癌组织中有散在的凋亡细胞,胞核染色质固缩积聚在核的边缘,呈半球状 TUNEL ×200

Fig 3 Squamous cell carcinoma with scattered apoptotic cells in control group, and chromatin condensation nuclei in the nuclear accumulation of the edge into a hemispherical shape TUNEL ×200

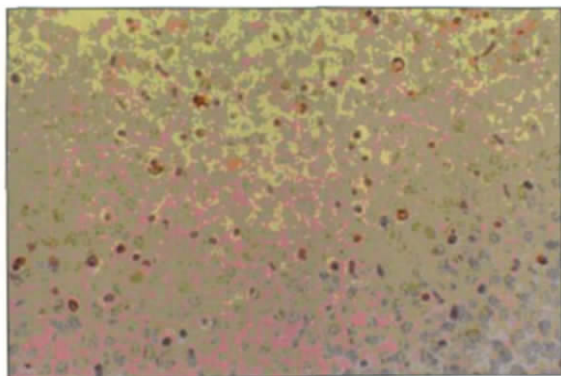


图4 TNF/DNL加rIL-2组凋亡细胞数量较多 TUNEL ×200  
Fig 4 More apoptotic cells in the TNF/DNL and rIL-2 group TUNEL ×200

### 3 讨论

近年来,由于肿瘤免疫学、分子生物学和基因工程的飞速发展,免疫效应细胞和细胞因子在肿瘤治疗中的作用越来越显示出其重要性<sup>[4-6]</sup>。其中, TNF是目前抗肿瘤作用较肯定的细胞因子<sup>[5]</sup>。TNF具有多种免疫生物活性和很强的抗肿瘤作用,但人体因无法耐受常规治疗剂量的TNF而限制其临床应用,利用细胞因子转基因手段可将TNF基因通过TIL细胞的运载而达到肿瘤局部产生高浓度TNF因子,不仅可以解决机体耐受性问题,而且可显著提高疗效。Rosenberg<sup>[7]</sup>从1例恶性黑色素瘤的患者中分离出TIL,利用逆转录病毒载体转染TNF基因,然后回输给患者,这些TIL细胞可以聚集在肿瘤区域,产生TNF,对恶性黑色素瘤有一定的治疗作用。白细胞介素-2激活的DNL细胞已被证实与肿瘤浸润淋巴细胞具有相似的抗癌效应<sup>[8]</sup>。动物实验表明,口腔癌DNL与低剂量的平阳霉素联合应用可增强其抗肿瘤作用<sup>[9]</sup>。TNF- $\alpha$ 基因转导的DNL比未转导组在体外具有更强大的杀瘤活性,研究结果提示TNF- $\alpha$ 基因转导的DNL局部注射比静脉输注到达瘤体的浓度高。基于此,本实验采用肿瘤接种部位注射TNF/DNL,取得了较好的体内抑瘤效果;腹腔应用低剂量的平阳星,12 h后局部应用TNF/DNL抑瘤效果更显著。本实验说明, TNF/DNL与平阳星联合应用在动物体内能够有效抑制舌鳞癌生长,提示TNF/DNL和平阳星联合应用可以对微小的肿瘤灶或残留肿瘤起到有效的杀伤作用。

本实验表明, TNF/DNL与低剂量的平阳星联合应用抗肿瘤作用增强,其主要机制可能是:平阳星为细胞周期非特异性药物,对机体的免疫功能和造血功能无明显影响,抗癌作用较强,不良反应小。

平阳星直接作用于瘤体，杀伤肿瘤细胞，减轻肿瘤负荷，使过继免疫基因治疗对较小肿瘤发挥有效的抗癌作用。化疗药物不仅对肿瘤细胞杀伤，还可能对免疫效应细胞产生杀伤，影响疗效。平阳星经静脉注射半衰期为6~12 h，腹腔应用低剂量的平阳星，12 h后注射TNF/DNL，则平阳星对TNF/DNL的活性较少抑制。提示临床可以采用序贯给药，即先通过肿瘤敏感性化疗药物大量杀伤肿瘤细胞，然后应用免疫基因治疗消灭残存的癌细胞，加强其抑瘤效果。另一方面，某些化疗药物可使免疫效应细胞聚集到肿瘤部位，其机制可能是化疗药物对肿瘤细胞表面抗原进行修饰，使LAK细胞容易攻击<sup>[10]</sup>。

实验证明<sup>[5,8,11]</sup>口腔癌DNL细胞可以诱发Tca8113细胞凋亡，而且TNF本身可以直接杀伤肿瘤细胞，也可诱导肿瘤细胞凋亡。从细胞凋亡角度来分析TNF/DNL的治疗作用，对进一步揭示其作用机制，提高疗效具有重要意义。透射电镜观察显示，TNF/DNL加rIL-2组肿瘤细胞有典型的凋亡细胞出现，其特征是细胞核体积缩小，染色质浓缩致密，并沿核膜分布形成新月体状和块状，细胞膜微绒毛消失，但细胞浆内的各种细胞器基本正常，也可见较多的肿瘤细胞坏死。而且，TUNEL法检测结果显示TNF/DNL加rIL-2组细胞核内有明显的标记产物出现。TNF/DNL组比对照组AI增高(P<0.05)，说明除了通过直接杀伤和介导免疫反应致肿瘤细胞坏死外，诱导肿瘤细胞凋亡可能是TNF/DNL抗肿瘤作用的重要机制之一，但其中的调节机制尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] 李涛, 邱蔚六, 何荣根, 等. 肿瘤坏死因子-α基因修饰口腔鳞癌DNL体外抗肿瘤的实验研究[J]. 中华口腔医学杂志, 1997, 32(5) 262-264.  
LI Tao, QIU Wei-liu, HE Rong-gen, et al. Experimental study on antitumor effect *in vitro* of modified DNL of oral squamous cell carcinoma with TNF-α gene[J]. Chin J Stomatol, 1997, 32(5) 262-264.

[2] 孟箭, 郭伟, 张志愿, 等. 静脉输注转TNF基因的舌癌DNL细胞在动物体内的分布[J]. 实用口腔医学杂志, 2002, 18(5) 398-

399.  
MENG Jian, GUO Wei, ZHANG Zhi-yuan, et al. Distributions of drainage node of lymphocytes obtained from tongue cancer and transduced with TNF gene after intravenous infusion in tumor bearing mice[J]. J Pract Stomatol, 2002, 18(5) 398-399.

[3] 孟箭, 郭伟, 张志愿, 等. 实验动物瘤周注射转TNF-α基因的舌癌DNL在体内分布的研究[J]. 口腔颌面外科杂志, 2002, 12(3) : 223-225.  
MENG Jian, GUO Wei, ZHANG Zhi-yuan, et al. *In vitro* distributions of DNL from tongue cancer transduced with TNF-α gene after local injection in tumor-bearing mice[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2002, 12(3) 223-225.

[4] Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: Friends or foes [J]. Lab Invest, 2006, 86(3) 231-245.

[5] Younes A, Kadin ME. Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligands and receptors in cancer therapy[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(18) 3526-3534.

[6] Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes[J]. Science, 2006, 314(5796) :126-129.

[7] Rosenberg SA. Gene therapy for cancer[J]. JAMA, 1992, 268(17) : 2416-2419.

[8] 郭伟, 邱蔚六, 何荣根. 口腔癌引流区淋巴结细胞对人舌鳞癌细胞的杀伤机理[J]. 中华口腔医学杂志, 1995, 30(3) :143-144.  
GUO Wei, QIU Wei-liu, HE Rong-gen. A preliminary study on the mechanism of against human tongue cancer cell lin[J]. Chin J Stomatol, 1995, 30(3) :143-144.

[9] 郭伟, 何荣根, 邱蔚六, 等. 舌鳞癌引流区淋巴结细胞联合平阳霉素的抑瘤作用[J]. 上海口腔医学杂志, 1992, 1(1) :40-43.  
GUO Wei, HE Rong-gen, QIU Wei-liu, et al. The antitumor effect of DNL/rIL-2 and Pingyangmycin on human tongue carcinoma(Tca8113) transplanted to nude mice[J]. Shanghai J Stomatol, 1992, 1(1) :40-43.

[10] Aoki Y, Takakuwa K, Kodama S, et al. Use of adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes alone or in combination with cisplatin-containing chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Res, 1991, 51(7) :1934-1939.

[11] Skornick Y, Topalian S, Rosenberg SA. Comparative studies of the long-term growth of lymphocytes from tumor infiltrates, tumor-draining lymph nodes, and peripheral blood by repeated *in vitro* stimulation with autologous tumor[J]. J Biol Response Mod, 1990, 9(4) :431-438.

(本文编辑 王晴)

《国际口腔医学杂志》近期被国内外多种数据库收录

《国际口腔医学杂志》(原刊名为《国外医学口腔医学分册》)自变更刊名后，已列入中国科技论文统计源期刊，是中国科技核心期刊。先后被美国《化学文摘》(CA)、波兰《哥白尼索引》(IC)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD)等国内外数据库收录。2010年《国际口腔医学杂志》除继续刊登综述、文摘等，还大量刊登论著、病例报告等原创文章，欢迎踊跃投稿。编辑部地址：四川省成都市人民南路三段14号，邮政编码：610041；电话：028-85502414，传真：028-85503479；E-mail：gwyxkqyxfc@vip.163.com，网址：www.gjkqyxzz.cn。

《国际口腔医学杂志》编辑部