

# 人肿瘤坏死因子- $\alpha$ 基因转染与干扰素- $\alpha$ 联合应用对舌癌细胞生长的影响

高振南 李声伟 高家让 田卫东 刘磊

**摘要** 目的:探讨干扰素- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )与人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ )基因转染联合应用对舌癌细胞生长的影响。方法:将培养细胞分为2组,其中一组转染hTNF- $\alpha$ 基因,另一组不转染;再将每一组又分为5个小组,每一小组分别加入IFN- $\alpha$ ,使其终浓度分别为0、1、10、100、1000 U/ml,培养48 h后,用MTT法测定Tca8113细胞的存活率,用免疫细胞化学染色法观察hTNF- $\alpha$ 的表达。结果:单纯加入IFN- $\alpha$ 对舌癌细胞的活性无影响;hTNF- $\alpha$ 基因转染与IFN- $\alpha$ 联合应用时,不同浓度的IFN- $\alpha$ 均有协同hTNF- $\alpha$ 基因转染杀伤舌癌细胞的作用,而且其抑瘤效应与IFN- $\alpha$ 的浓度呈正相关( $r=0.867, P<0.01$ );与未转染组相比,转染组细胞hTNF- $\alpha$ 呈明显的高表达。结论:联合应用IFN- $\alpha$ 能增强hTNF- $\alpha$ 基因转染对Tca8113舌癌细胞的抑制作用。

**关键词** 人肿瘤坏死因子- $\alpha$  干扰素- $\alpha$  基因转染 舌癌

## Synergistic Effects of Human Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Gene Transfection and Interferon- $\alpha$ on the Growth of 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 purpose of this study is to investigate the synergistic effects of human tumor necrosis factor- $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ ) transfection and interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) on the growth of tongue carcinoma cells. **Methods:** The cultured Tca8113 tongue carcinoma cells was divided into 2 groups, one group was transferred with hTNF- $\alpha$  gene. Each of the 2 groups was then divided into 5 subgroups, and the subgroups were added IFN- $\alpha$  until the final IFN- $\alpha$  concentrations respectively were 0, 10, 100, and 1000 U/ml. After culturing for 48 hours, the survival rates of the all groups of cells were assayed by MTT enzymatic labeling technique, and the expression of hTNF- $\alpha$  in Tca8113 cells was observed with immunocytochemistry. **Results:** IFN- $\alpha$  did not affect the growth of Tca8113 cells without hTNF- $\alpha$ , however, the transfection of hTNF- $\alpha$  with the above different concentrations of IFN- $\alpha$  synergistically inhibited the growth of Tca8113 cells, the concentrations of IFN- $\alpha$  were positively correlated with the inhibition effects ( $r=0.733, P<0.01$ ), the transferred Tca8113 cells displayed remarkable overexpression of hTNF- $\alpha$ , compared with the non-transferred. **Conclusion:** IFN- $\alpha$  can enhance the inhibition effects of hTNF- $\alpha$  transfection on the tongue carcinoma cells.

**Key words:** human tumor necrosis factor- $\alpha$  interferon- $\alpha$  gene transfection tongue carcinoma

肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是由激活的单核细胞和巨噬细胞产生的一种细胞因子,在体内和体外均能有效地杀伤多种肿瘤细胞<sup>[1,2]</sup>。作者前期的体外实验研究已证明阳离子脂

质体介导的人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ )基因转染可诱导Tca8113舌癌细胞的凋亡,并具有毒副作用少、安全、转染效率高、作用持久的特点。干扰素(interferon, IFN)是由多种细胞分泌的一种糖蛋白,目前已分离鉴定的有二十余种。一些学者<sup>[4-8]</sup>的研究证实IFN- $\alpha$ 有协同促进TNF- $\alpha$ 杀伤肿瘤细胞的功能,本研究拟对hTNF- $\alpha$ 的基因转染与IFN- $\alpha$ 的联合应用对舌癌细胞生物学活性的影响作一探讨。

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

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要试剂和仪器

主要试剂和仪器的来源均见参考文献[9]。

#### 1.2 实验方法

质粒的制备和纯化、细胞培养、质粒转染、MTT细胞活性测定的方法均见参考文献[9]。

1.2.1 实验分组 采用组内分组设计。先将培养细胞分为2组,其中一组转染 hTNF- 基因,另一组不转染;再将转染组和不转染组每一组又分为5个小组,每一小组分别加入 IFN- ,使其终浓度分别为 0、1、10、100、1000 U/ml,每一浓度重复3个孔。加入 IFN- 继续培养48 h后,用 MTT法测定细胞活性,并用免疫细胞化学染色观察 hTNF- 基因表达。

1.2.2 免疫细胞化学染色 预先放置一张盖玻片于6孔板中,接种细胞制成细胞爬片,转染基因并加入 IFN- 48 h后,取出盖玻片,用丙酮固定10 min,用 LsAB 免疫组织化学染色法染色,第一抗体为 hTNF- 羊抗人多克隆抗体,第二抗体为生物素标记兔抗羊抗体,在显微镜下进行观察并照相记录,染色阳性细胞中有棕黄色物质。

#### 1.3 统计学分析处理

组间差异分析采用 t 检验,相关分析采用直线相关分析,计算相关系数 r。

### 2 结 果

#### 2.1 IFN- 对 Tca8113 舌癌细胞活性的影响

单纯加入 IFN- ,继续培养48 h后,MTT法检测 Tca8113 舌癌细胞活性所得 OD 值见表1,与 IFN- 浓度为 0 U/ml 的对照组比较均无显著性差异 (P>0.05),说明单纯加入 IFN- 对舌癌细胞无直接杀伤抑制作用。

表1 单纯使用 IFN- 对 Tca8113 舌癌细胞活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

IFN- 浓度(U/ml)	OD 值	P 值
0(对照组)	1.278 ±0.113	
1	1.263 ±0.054	0.844
10	1.262 ±0.058	0.833
100	1.245 ±0.178	0.799
1000	1.216 ±0.124	0.559

#### 2.2 hTNF- 基因转染与 IFN- 联合应用对舌癌细胞活性的影响

hTNF- 基因转染与 IFN- 联合应用48 h后,MTT法检测舌癌细胞活性所得 OD 值见表2。与单

纯脂质体对照组比较,不同浓度的 IFN- 均有协同 hTNF- 基因转染杀伤 Tca8113 细胞的作用 (P<0.01);与 IFN- 浓度为 0 U/ml 组比较,各组细胞存活率随 IFN- 浓度的升高依次降低,说明 hTNF- 基因转染与 IFN- 联合应用后其杀伤舌癌细胞的作用得到了增强。用 IFN- 浓度与舌癌细胞存活率进行相关分析,相关系数 r = -0.867, P<0.01,说明 IFN- 的浓度与舌癌细胞活性呈负相关关系,与抑制效率呈正相关关系。

表2 hTNF- 基因转染与 IFN- 联合应用对舌癌细胞活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

IFN- 浓度(U/ml)	OD 值	P 值	存活率(%)
单纯脂质体(对照组)	1.174 ±0.062		
0	0.685 ±0.022	0.0017	58.3
1	0.666 ±0.103	0.0019	56.7
10	0.595 ±0.026	0.0001	50.6
100	0.542 ±0.096	0.0007	46.2
1000	0.438 ±0.086	0.0003	37.2

#### 2.3 hTNF- 基因表达

免疫细胞化学染色观察,未转染组的细胞胞浆和胞膜均未见棕黄色产物(图1)。转染组见被转染细胞胞浆和胞膜出现了棕黄色产物,转染成功细胞分布较为广泛、均匀;与未转染组相比,hTNF- 呈明显的高表达(图2)。

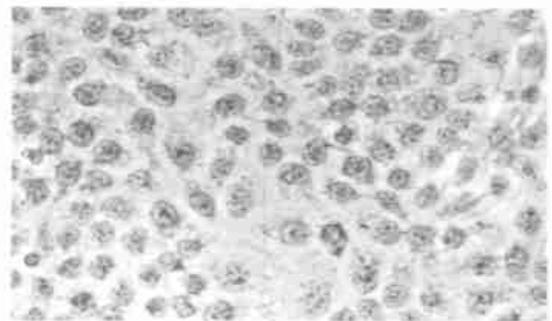


图1 Tca8113 细胞经单纯脂质体处理72 h后,细胞胞浆和胞膜均未见棕黄色产物 LsAB 法 ×30

### 3 讨 论

舌癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,其发病率占口腔癌的首位,因其涉及语言、吞咽功能,且易发生早期转移,给临床治疗带来很大困难,虽经严格的放疗、化疗和严密的手术设计,其五年生存率和生存质量都远未达到满意的效果。TNF- 可诱导

小鼠体内肿瘤细胞明显的凋亡,而不影响正常细胞的生长,但由于严重的毒副作用无法用于人体肿瘤的治疗<sup>[3]</sup>;为避免全身的毒副作用,采用局部注射或气雾剂喷射的方法转染 hTNF- $\alpha$  基因的方法可在癌瘤局灶持续产生高浓度的 hTNF- $\alpha$ ,从而达到诱导舌癌细胞的凋亡的目的。

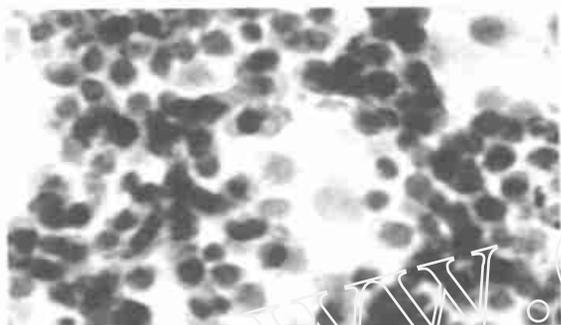


图2 Tca8113 细胞转染 hTNF- $\alpha$  基因 72 h 后,可见被转染细胞胞浆和胞膜出现了棕黄色产物,分布较为广泛、均匀 L&AB 法  $\times 30$

一些学者<sup>[4~7]</sup>的研究证实 IFN- $\gamma$  与 TNF 有较明显的协同抗肿瘤作用。为进一步增强 hTNF- $\alpha$  基因转染杀伤肿瘤细胞的效果,在本实验中作者又联合应用 IFN- $\gamma$ 。关于 IFN- $\gamma$  协同 TNF- $\alpha$  对肿瘤的杀伤效应的机理,目前有研究认为 IFN- $\gamma$  能上行性调节靶细胞表面的 TNF 受体的数量,使靶细胞对 TNF 的敏感性增加<sup>[8]</sup>。TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  所作用细胞周期不同也增强了对靶细胞的杀伤<sup>[10]</sup>。还有研究<sup>[11]</sup>发现肿瘤衍生识别因子(tumor-derived recognition factor, TDRF)与 IFN- $\gamma$  协同诱导小鼠巨噬细胞产生 TNF- $\alpha$ ,并与白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)联合诱导小鼠巨噬细胞产生一氧化氮合成酶,再由一氧化氮来介导对肿瘤的细胞毒作用。近年来又有学者<sup>[12]</sup>报道 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  联合应用诱导肿瘤细胞凋亡的作用依赖于 c-myc 癌基因的表达,而 p53 基因的表达高低对其作用无影响。

本实验研究结果显示:单独应用 IFN- $\gamma$  对舌癌细胞生物学活性无影响;hTNF- $\alpha$  基因转染与 IFN- $\gamma$  联合应用时,不同浓度的 IFN- $\gamma$  均可协同 hTNF- $\alpha$  基因转染增强杀伤舌癌细胞的效果,且抑瘤效应与 IFN- $\gamma$  的浓度呈正相关。提示联合应用 IFN- $\gamma$  能增强 hTNF- $\alpha$  基因转染对舌癌细胞的生长抑制作用,提高了 hTNF- $\alpha$  基因转染的抗癌疗效。但其作用机制还有待今后进一步研究探讨。

## 参考文献

- 1 Asher A, Mule JJ, Reichert CM, et al. Studies on the anti-tumor efficacy of systemically administered recombinant tumor necrosis factor against several murine tumors in vivo. *J Immunol*, 1987, 138(3):963~974
- 2 Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*, 1985, 230(4728):943~945
- 3 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
- 4 Agah R, Malloy B, Sherrod A, et al. Successful therapy of natural killer-resistant pulmonary metastases by the synergism of gamma-interferon with tumor necrosis factor and interleukin-2 in mice. *Cancer Res*, 1988, 48(8):2245
- 5 Rubin SC, Hoskins WJ, Markman M, et al. Synergistic activity of tumor necrosis factor and interferon in a nude mouse model of human ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 1989, 34(3):353
- 6 Suk K, Chang I, Kim YH, et al. Interferon gamma (IFN gamma) and tumor necrosis factor alpha synergism in ME-180 cervical cancer cell apoptosis and necrosis. *J Biol Chem*, 2001, 276(16):13153~13159
- 7 Lewis GD, Aggarwal BB, Eessalu TE, et al. Modulation of the growth of transformed cells by human tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Cancer Res*, 1987, 47(20):5382~5385
- 8 Balkwill FR, Lee A, Aldam G, et al. Human tumor xenografts treated with recombined human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons. *Cancer Res*, 1986, 46(8):3990
- 9 高振南,李声伟,高家让,等.人肿瘤坏死因子- $\alpha$  基因转染对舌癌细胞的抑制作用. *华西口腔医学杂志*, 2002, 20(1):52~54
- 10 Creaney AA, Bartholomew JC, Merigan IC. The importance of  $G_0$ , in the site of action of interferon in the cell cycle. *Exp Cell Res*, 1981, 134(1):155~160
- 11 Jiang H, Stewart CA, Fast DJ, et al. Tumor-derived recognition factor (TDRF) induces production of TNF-alpha by murine macrophages, but requires synergy with IFN-gamma alone or in combination with IL-2 to induce nitric oxide synthase. *Int J Immunopharmacol*, 1996, 18(8-9):479~490
- 12 Yasuoka Y, Naomoto Y, Yamatsuji T, et al. Combination of tumor necrosis factor alpha and interferon alpha induces apoptotic cell death through a c-myc-dependent pathway in p53 mutant H226br non-small-cell lung cancer cell line. *Exp Cell Res*, 2001, 271(2):214~222

(2001-08-27 收稿, 2001-11-26 修回)

(本文编辑 刘 怡)