

[文章编号 1000-1182(2005)02-0170-03

# 人肿瘤坏死因子- $\alpha$ 基因转染人胚成肌细胞的表达和分泌研究

高振南, 高家让, 田卫东, 李声伟, 刘 磊, 付春华

(口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 应用人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ ) 基因转染人胚成肌细胞, 观察转染 hTNF- $\alpha$  基因后人胚成肌细胞表达和分泌 hTNF- $\alpha$  的水平。方法 用阳离子脂质体 DOSPER 介导含 hTNF- $\alpha$  基因的穿梭质粒 pSV23SHTNF 转染人胚成肌细胞; 对照组只给予等量的脂质体, 不加入质粒。转染基因后 24、48、72、96 h 用免疫组织化学染色观察 hTNF- $\alpha$  基因在人胚成肌细胞细胞浆和细胞膜的表达水平, 并用 ELISA 法检测人胚成肌细胞培养上清液中 hTNF- $\alpha$  的浓度。结果 免疫组织化学染色发现实验组人胚成肌细胞在转染 hTNF- $\alpha$  基因后 24、48、72、96 h 均见细胞浆和细胞膜 hTNF- $\alpha$  呈强阳性表达, 而对照组均呈弱阳性; ELISA 检测发现实验组人胚成肌细胞培养上清液中 hTNF- $\alpha$  平均浓度在各时期均高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 尤以转染 72 h 后最高, 达 401.0 pg/ml。结论 hTNF- $\alpha$  基因转染成肌细胞, 可使成肌细胞持续高表达和高浓度分泌 hTNF- $\alpha$ , 提示可以用 hTNF- $\alpha$  基因转染舌癌周围肌细胞, 使癌周微环境肌细胞持续表达和分泌高浓度 hTNF- $\alpha$  来抑制舌癌向肌深层浸润。

**[关键词]** 人肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 基因转染; 人胚成肌细胞; 基因表达

**[中图分类号]** R 739.8 **[文献标识码]** A

**Expression and Secretion of Human Tumor Necrosis Factor Gene Transfected on Human Embryo Myoblasts** GAO Zhen-nan, GAO Jia-rang, TIAN Wei-dong, LI Sheng-wei, LIU Lei, FU Chun-hua. (Key Lab. of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract Objective** To observe human tumor necrosis factor- $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ ) expression and secreting level of human embryo myoblasts transfected by hTNF- $\alpha$  gene. **Methods** Human embryo myoblasts were transfected with shuttle plasmid pSV23SHTNF containing hTNF- $\alpha$  gene by cationic liposomes DOSPER. The control group was only given equivalent liposomes except plasmid. After culturing for 24, 48, 72 and 96 hours, hTNF- $\alpha$  expression level of human embryo myoblasts was observed with immunocytochemistry staining, and hTNF- $\alpha$  secreting of human embryo myoblasts was analyzed by ELISA. **Results** After transfected by hTNF- $\alpha$  gene for 24, 48, 72 and 96 hours, the human embryo myoblasts displayed significant secretion of hTNF- $\alpha$  in the cultural supernatant ( $P < 0.05$ ), and overexpression in cytoplasm and cell membrane. **Conclusion** Transfection of hTNF- $\alpha$  gene to human myoblasts made myoblasts secrete high concentration of hTNF- $\alpha$ , implying it is feasible that transfecting muscle cells surrounding tongue carcinoma lesion with hTNF- $\alpha$  gene can prevent tongue carcinoma from intruding into deeper muscle tissue.

**Key words** human tumor necrosis factor- $\alpha$ ; gene transfection; human embryo myoblasts; gene expression

舌体肌组织较为疏松且血运丰富, 因此舌癌极易向深部肌层浸润发展。本文应用含人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (human tumor necrosis factor- $\alpha$ , hTNF- $\alpha$ ) 基因的穿梭质粒 pSV23SHTNF 转染人胚成肌细胞, 观察转染 hTNF- $\alpha$  基因后的成肌细胞表达和分泌 hTNF- $\alpha$  水平。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料、试剂和设备

含 hTNF- $\alpha$  基因的穿梭质粒 pSV23SHTNF 转化的

*E. coli* K12MC1061 大肠杆菌株 (比利时根特大学分子生物学系 W. Fiers 惠赠); 冻存人胚成肌细胞 (四川大学华西医院移植工程与移植免疫实验室细胞库提供); RPMI 1640 培养基 (GIBCO BRL 公司, 美国); 阳离子脂质体转染试剂 DOSPER 即 1,3-二油酰氧基-2-(6-羰基精胺) 丙胺 (Boehringer Mannheim 公司, 德国); 山羊抗人 TNF- $\alpha$  多克隆抗体 (Santa Cruz 公司, 美国); SANYO MCO-17AI 型自控式 CO<sub>2</sub> 孵箱 (Sanyo 公司, 日本); 超净工作台 (Nuair 公司, 美国); 倒置相差显微镜 (Olympus 公司, 日本)。

### 1.2 质粒的制备和纯化方法

采用碱裂解法提取大肠杆菌中含 hTNF- $\alpha$  基因的穿梭质粒 pSV23SHTNF, 用聚乙二醇沉淀法进行纯化。

[收稿日期 2004-07-05; 修回日期 2005-01-15]

[基金项目] 四川省卫生厅科研基金资助项目 (1999 年)

[作者简介] 高振南 (1969-), 男, 云南人, 副教授, 博士, 现在山东大学口腔医院口腔颌面外科工作

[通讯作者] 高振南, Tel: 0531-8382595

### 1.3 实验分组及分期

本实验设立 hTNF- $\alpha$  基因转染实验组和脂质体对照组 2 组, 各组又设转染基因 24、48、72、96 h 后 4 个时期进行观察。各个时期均设立 3 个样本。为保证实验的均衡性, 同一时期的实验组与对照组分布在同一培养板中。

### 1.4 细胞培养

人胚成肌细胞解冻复苏。于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基、37 $^{\circ}$ C、含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中密闭培养, 取对数生长期的细胞, 调整细胞浓度为 3  $\times 10^5$  个/毫升, 按上述实验分组, 分别接种于 6 孔培养板中, 培养至细胞贴壁长满底面积的 60% ~ 80% 时进行转染实验。

### 1.5 hTNF- $\alpha$ 基因转染

所有细胞均在 6 孔培养板中培养、转染, 实验组按照 DOSPER 脂质体转染试剂说明书贴壁细胞转染法, 用 4  $\mu$ l DOSPER 与 1.5  $\mu$ g DNA 的脂质体/DNA 复合物比例转染 Tca8113 舌癌细胞, 对照组只加入等量的脂质体 DCSPER, 不加入质粒。

### 1.6 免疫组织化学染色观察 hTNF- $\alpha$ 基因表达

将细胞接种到 6 孔培养板, 每孔都预先放置了一张 7 mm  $\times$  22 mm 盖玻片的培养孔中, 取出盖玻片, 用丙酮固定 10 min, 用山羊抗人 TNF- $\alpha$  多克隆抗体 (稀释度为 1:1000) 作为一抗, 按照 LsAB 免疫组织化学染色法染色后, 在显微镜下进行观察并照相记录, 以细胞浆和细胞膜棕黄色着色为阳性染色。

### 1.7 ELISA 法测定细胞培养上清液中 hTNF- $\alpha$ 浓度

于转染基因后 24、48、72、96 h 分别收集实验组和对照组的细胞培养上清液各 100 微升/孔, 过夜冻干, 参照 hTNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒说明书, 用 ELISA 一步法测定 hTNF- $\alpha$  浓度。

### 1.8 统计学分析

对各时期 hTNF- $\alpha$  基因转染实验组和对照组细胞培养上清液中 hTNF- $\alpha$  浓度差异采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 人胚成肌细胞 hTNF- $\alpha$ 基因表达

实验组人胚成肌细胞转染 hTNF- $\alpha$  基因后各时期均见肌细胞浆内和肌细胞膜上有棕黄色物质, 分布较为均匀, 转染后 72 h 胞浆内棕黄色物质较多, 说明 hTNF- $\alpha$  呈强阳性表达 (图 1)。对照组人胚成肌细胞各时期的细胞浆中和细胞膜上 hTNF- $\alpha$  均呈弱阳性 (图 2)。



图 1 转染 hTNF- $\alpha$  基因后 72 h 人胚成肌细胞阳性染色 LsAB  $\times 100$

Fig 1 Positive staining of human embryo myoblasts 72 hours after transfected with hTNF- $\alpha$  genes LsAB  $\times 100$



图 2 单纯脂质体处理后 72 h 人胚成肌细胞呈弱阳性 LsAB  $\times 100$

Fig 2 Incompetent positive staining of human embryo myoblasts 72 hours after treated with liposomes alone LsAB  $\times 100$

### 2.2 人胚成肌细胞培养上清液中 hTNF- $\alpha$ 浓度

ELISA 法检测 hTNF- $\alpha$  浓度的标准曲线见图 3。ELISA 法测定各时期实验组和对照组人胚成肌细胞培养上清液中 hTNF- $\alpha$  浓度见表 1。从表 1 可见 hTNF- $\alpha$  基因转染后 24、48、72、96 h 实验组与对照组人胚成肌细胞培养上清液中 hTNF- $\alpha$  平均浓度之间均具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 转染组各时期细胞培养上清液 hTNF- $\alpha$  平均浓度均高于对照组, 尤以转染基因 72 h 后最高, 达 401.0 pg/ml。

## 3 讨论

本实验采用脂质体介导含 hTNF- $\alpha$  基因的穿梭质粒 pSV23SHIN 转染人胚成肌细胞, 观察转染 hTNF- $\alpha$  基因后 24、48、72、96 h 成肌细胞 hTNF- $\alpha$  的表达水平, 结果实验组肌细胞浆内和肌细胞膜上均有 hTNF- $\alpha$  强阳性表达, 对照组肌细胞经单纯脂质体处理后各时期的细胞浆中和细胞膜上 hTNF- $\alpha$  均呈弱阳性表达, 实验组各时期细胞培养上清液 hTNF- $\alpha$  平均浓度均高于

对照组,提示用 hTNF- $\alpha$  基因转染舌癌周围肌细胞,可使癌周微环境肌细胞较长时间持续分泌高浓度 hTNF- $\alpha$ ,并杀伤舌癌细胞、抑制舌癌向肌深层浸润。

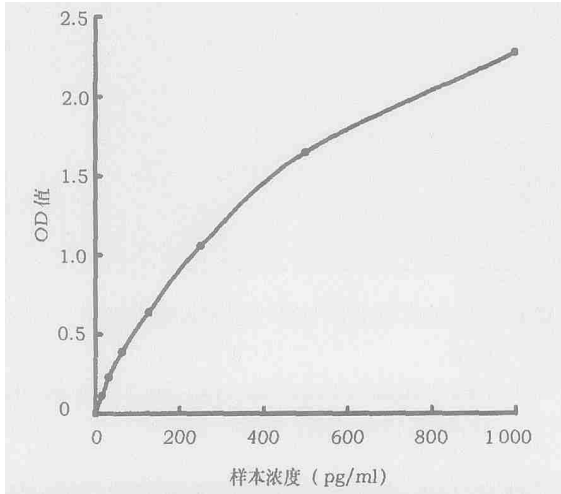


图3 ELISA法测定hTNF- $\alpha$ 浓度的标准曲线

Fig 3 Standard curve of determining hTNF- $\alpha$  concentration by ELISA

表1 转染hTNF- $\alpha$ 基因后各时期人胚成肌细胞培养上清液中hTNF- $\alpha$ 浓度(pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Concentrations of hTNF- $\alpha$  in cultural supernatants of human embryo myoblasts transfected with hTNF- $\alpha$  gene after indicated times(pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

检测时期(h)	实验组	对照组	P值
24	121.5 $\pm$ 14.7	19.5 $\pm$ 1.2	0.012
48	322.1 $\pm$ 11.0	21.7 $\pm$ 1.0	0.017
72	401.0 $\pm$ 11.5	17.8 $\pm$ 1.0	0.016
96	367.4 $\pm$ 8.0	23.7 $\pm$ 0.9	0.025

使用肌组织可避免脂质体介导带来的费用问题和病毒载体带来的不安全问题。Wolff等<sup>1</sup>将RNA及质粒DNA直接注射小鼠骨骼肌,结果表明肌肉细胞高度表达氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyl transferase, CAT)、荧光素酶、-半乳糖苷酶等报道基因,其表达水平与在最佳状况下体外转染成纤维细胞相当,并在至少2个月内都有报道基因的明显表达。肌肉组织的高表达水平可能因为肌细胞有丰富的肌浆网和横管系统,它们包裹了大量的细胞外液,从而使肌细胞易于从横管系统和肌浆网摄取外源基因并在其中表达。Zhang等<sup>2</sup>发现DNA进入肌细胞后可以存留较长的时间,这是因为肌细胞中溶酶体酶的活性很低,同时外源基因不会整合染色体,所以很安全。因此,推测在今后实验中,或许可以采用直接注射含hTNF- $\alpha$ 基因的穿梭质粒pSV23SHTNF进入小鼠股四头肌中,而不需用阳离子脂质体介导。

在TNF- $\alpha$ 对肿瘤周围血管影响的研究中, Mauceri

等<sup>3</sup>发现TNF- $\alpha$ 的基因治疗可以选择性地损伤肿瘤血管并导致血栓形成,而对正常组织血管无影响。Staba等<sup>4</sup>也发现TNF- $\alpha$ 的基因治疗合并放射治疗可以损伤异种移植的人恶性胶质瘤血管。Mauceri等<sup>5</sup>研究认为TNF- $\alpha$ 可诱导肿瘤细胞生成血管抑素(angiotatin),从而对肿瘤微血管产生抗血管生成作用。Kuroda等<sup>6</sup>研究还发现TNF- $\alpha$ 对肿瘤衍生内皮样细胞(tumor-derived endothelial-like cells, tEC)有选择性杀伤作用,并且TNF- $\alpha$ 的突变蛋白RGD-V29选择性比野生型TNF- $\alpha$ 更强,因为RGD-V29选择性地与p55TNF受体(TNF-RI)结合。由此可见,TNF对肿瘤微血管的损伤作用也是其抗癌机制之一。

在TNF- $\alpha$ 对骨骼肌影响的研究中,由于发现TNF- $\alpha$ 与骨骼肌的降解代谢有关,TNF- $\alpha$ 还被称为恶液质素(cachectin)。内源性的TNF- $\alpha$ (如败血症或肿瘤)和用TNF- $\alpha$ 处理实验动物均会使实验动物出现骨骼肌的消耗、损失。Alvarez等<sup>7</sup>用TNF- $\alpha$ 培养小鼠C2C12肌管细胞,结果发现低浓度的TNF- $\alpha$ (不高于1 U/ml)使骨骼肌细胞的总蛋白含量及肌原纤维蛋白含量都减少,但高浓度的TNF- $\alpha$ (不低于100 U/ml)却相反使骨骼肌细胞的总蛋白含量及肌原纤维蛋白含量都增加。因此,局部应用是TNF- $\alpha$ 治疗肿瘤避免发生明显并发症的关键。此外,如何调控TNF- $\alpha$ 基因转染剂量,使其有很好的抗肿瘤效果又不对周围肌细胞造成过大的影响,仍值得进一步研究。

### [参考文献]

- 1] Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse *in vivo* J. Science, 1990, 247(49): 1465-1468.
- 2] Zhang WW, Fujiwara T, Grimm EA, et al. Advances in cancer gene therapy J. Adv Pharmacol, 1995, 32(1): 289-341.
- 3] Mauceri HJ, Hanna NN, Wayne JD, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene therapy targeted by ionizing radiation selectively damages tumor vasculature J. Cancer Res, 1996, 56(19): 4311-4314.
- 4] Staba MJ, Mauceri HJ, Kufe DW, et al. Adenoviral TNF-alpha gene therapy and radiation damage tumor vasculature in a human malignant glioma xenograft J. Gene Ther, 1998, 5(3): 293-300.
- 5] Mauceri HJ, Seetharam S, Beckett MA, et al. Tumor production of angiotatin is enhanced after exposure to TNF-alpha J. Int J Cancer, 2002, 97(4): 410-415.
- 6] Kuroda K, Miyata K, Tsutsumi Y, et al. Preferential activity of wild-type and mutant tumor necrosis factor-alpha against tumor-derived endothelial-like cells J. Jpn J Cancer Res, 2000, 91(1): 59-67.
- 7] Alvarez B, Quinn LS, Busquets S, et al. Direct effects of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) on murine skeletal muscle cell lines. Bimodal effects on protein metabolism J. Eur Cytokine Netw, 2001, 12(3): 399-410.