

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2004.01.02

· 基础研究 ·

# 转染人肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白介素-2 基因对肺癌细胞耐药基因MDR1、LRP 表达的影响

苏雷 李泽坚 丁芳 张恒 张志庸 戈烽 骆爱萍 王秀琴 刘芝华 吴旻

**【摘要】** 目的 研究转染人体肿瘤坏死因子- $\alpha$ ( huTNF- $\alpha$  )、白介素-2( hIL-2 )基因对肺癌细胞耐药基因MDR1、LRP 表达的影响,探讨基因治疗逆转肺癌多药耐药的可行性。方法 通过阳离子脂质体将克隆的 huTNF- $\alpha$  和 hIL-2 基因导入肺癌细胞系 A549、GLC-82、H446、H460,经筛选阳性单克隆,用半定量 RT-PCR 方法检测转染目的基因前后肺癌细胞系 MDR1、LRP 基因在 mRNA 水平的表达情况。结果 MDR1 在 A549、GLC-82、H446、H460,LRP 在 A549、GLC-82、H460 中均呈阳性表达,转染 huTNF- $\alpha$  目的基因后各肺癌细胞系 MDR1、LRP 基因的表达无影响,而转染 hIL-2 目的基因能够明显抑制 A549、H446、H460 细胞系 MDR1 的表达。结论 MDR1、LRP 基因在肺癌细胞系中的阳性表达与肺癌的固有耐药性有关,huTNF- $\alpha$ 、hIL-2 目的基因能够在被转染细胞中获得表达,而且转染 hIL-2 目的基因能够明显抑制 MDR1 在 A549、H446、H460 的表达。该结果不仅为探讨肺癌多药耐药性的病理机制提供了一个新的线索,而且为基因治疗逆转肺癌的多药耐药性提供了一个新的实验依据。

**【关键词】** 肺肿瘤 多药耐药性 耐药基因 基因治疗 基因转染

**【中图分类号】** R734.2 Q344+.13

**Effects of huTNF- $\alpha$  and hIL-2 gene transfection on the expression of MDR1 and LRP genes in lung cancer cell lines** SU Lei\*, LI Zejian, DING Fang, ZHANG Heng, ZHANG Zhiyong, GE Feng, LUO Aiping, WANG Xiuqin, LIU Zhihua, WU Min. \* Department of Thoracic Surgery, Peking Union Hospital, Beijing 100730, P. R. China

**【Abstract】 Objective** To study the effects of huTNF- $\alpha$  and hIL-2 gene transfection on the expression of MDR1 and LRP genes in lung cancer cell lines. **Methods** huTNF- $\alpha$  and hIL-2 gene plasmids were constructed and transfected into A549, GLC-82, H446 and H460 cells with lipofectinmin. Positive clones were screened out by G418. The expressions of MDR1 and LRP genes were detected at mRNA level by reverse transcription-polymerase chain reaction( RT-PCR ) in the non-transfected cells and the cloned cells. **Results** MDR1 gene was positive in A549, GLC-82, H446 and H460 cell lines, LRP gene was positive in A549, GLC-82 and H460 cell lines; The transfected cell lines expressed both huTNF- $\alpha$  and hIL-2 gene, and the A549, H446 and H460 cell lines transfected with hIL-2 gene had no MDR1 expression at mRNA level compared with the non-transfected ones. **Conclusion** MDR1 and LRP genes are expressed in lung cancer cell lines, which indicates the presence of intrinsic drug resistance before any form of therapy. MDR1 gene is not expressed in hIL-2 transfected cell lines, which demonstrates that hIL-2 gene modulates the MDR1 gene expression at mRNA level, and may reverse the multidrug resistance of lung cancer.

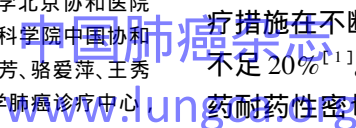
**【Key words】** Lung neoplasms Multidrug resistance Drug-resistance genes Gene therapy Gene transfection

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China ( to LIU Zhihua ) ( No. 30170519 ).

本研究受国家自然科学基金( No. 30170519 )资助

作者单位: 100730 中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院胸外科(苏雷、李泽坚、张恒、张志庸、戈烽),中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室(丁芳、骆爱萍、王秀琴、刘芝华、吴旻) 通讯作者: 苏雷,现在首都医科大学肺癌诊疗中心(宣武医院胸外科)

肺癌是世界上最为常见的恶性肿瘤之一,其发病率有逐年上升的趋势。虽然以手术治疗为主的综合治疗措施在不断地加强,但是肺癌患者的5年生存率仍不足20%<sup>[1]</sup>。这种“治疗性瓶颈”的出现与肺癌的多药耐药性密切相关<sup>[2]</sup>。我们通过检测肺腺癌细胞系



A549、GLC-82、小细胞肺癌细胞系 H446、大细胞肺癌细胞系 H460 细胞膜糖蛋白(P-gp)编码基因 MDR1 和肺耐药相关蛋白(lung resistance related protein, LRP) 基因的表达, 并采用细胞转染技术, 研究人体肿瘤坏死因子- $\alpha$  (huTNF- $\alpha$ ) 及白介素-2(hIL-2) 基因对肺癌细胞系 MDR1、LRP 基因表达的影响。

## 1 材料及方法

**1.1 肺癌细胞系** 肺癌细胞系 A549、GLC-82 由中科院肿瘤研究所细胞生物室林晨教授惠赠。小细胞肺癌细胞系 H446、大细胞肺癌细胞系 H460 购自上海生化所细胞室。

**1.2 HuTNF- $\alpha$ 、hIL-2 基因** HuTNF- $\alpha$ 、hIL-2 基因由中科院肿瘤研究所细胞生物室刘芝华教授惠赠。转化感受态细胞, 提取 huTNF- $\alpha$ 、hIL-2 质粒 DNA, 存于 -20℃ 冰箱。测定 huTNF- $\alpha$ 、hIL-2 质粒 DNA 的浓度分别为 3 414.6 mg/L 和 3 228.0 mg/L。

**1.3 肺癌细胞系细胞总 RNA 的提取** 用 Trizol 试剂提取肺癌细胞系细胞的总 RNA, 用紫外分光光度仪测定 RNA 浓度, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> > 1.8, 将 RNA 冻存于 -80℃ 冰箱。分别取总 RNA 各 5  $\mu$ g, 行逆转录, 合成对应的互补 DNA(cDNA), -20℃ 保存。

**1.4 目的引物的设计** 用 Primer3 软件设计 huTNF- $\alpha$ 、hIL-2 及 MDR1、LRP 基因的目的引物, 内对照引物 GAPDH、 $\beta$ -actin 由上海生工公司合成。

huTNF- $\alpha$	Forward 5' -CCTGAAAGGATCCCATGAGC-3', Reverse 5' -GGAAAGTCTAGATGTCGTCC-3', 702 bp 温度 52℃
hIL-2	Forward 5' -CAAGTACTCGGCCAAAGAGG-3', Reverse 5' -CTTCTGGGCTGCTTATCTG-3', 250 bp 温度 55℃
MDR1	Forward 5' -ACTGAGCCTGGAGGTGAAGA-3', Reverse 5' -CCACCAGAGAGCTGAGTTC-3', 396 bp 温度 58℃
LRP	Forward 5' -CATCAATCGCACTGCTGTCT-3', Reverse 5' -TTTCTGGGCTTCTGACTGGT-3', 257 bp 温度 58℃
GAPDH	Forward 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', Reverse 5' -TCCACCACCCTGTGTCTGA-3', 500 bp
$\beta$ -actin	Forward 5' -ACACTGTGCCATCTACGACC-3', Reverse 5' -AGGGGCGGACTCGTCATAGA-3', 242 bp

**1.5 检测 MDR1、LRP、huTNF- $\alpha$ 、hIL-2 基因的表达**  
PCR 反应体系: 10  $\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ l, 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 0.75  $\mu$ l, 2.5 mmol/L dNTP 2  $\mu$ l, 2  $\mu$ mol/L GAPDH 1  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L 目的引物 2  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l, Tag 酶 (5 U/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 15.5  $\mu$ l, 总体积 25  $\mu$ l。在 PCR 仪预变性 94℃ 2 min, 进入循环: 变性 94℃ 30 s, 退火 (huTNF- $\alpha$  52℃, hIL-2 55℃, MDR1、LRP 58℃), 30 s, 延伸 72℃, 1 min, 共 30 个循环, 最后延伸 72℃, 10 min, 获取 MDR1、LRP 基因的目的片段。将扩增产物在 1.5% (含 0.5% EB) 的琼脂糖凝胶电泳, 用 Multi-Analyst 显像系统进行定量测定并分析 PCR 结果。

**1.6 细胞转染** 参照 Invitrogen 公司 LIPOFECTIN

Reagent 阳性脂质体转染细胞的操作程序。

**1.6.1 细胞培养** 复苏肺癌细胞系 A549、GLC-82、H446、H460, 次日更换培养液。分别用 M199、RPMI-1640 + 10% 胎牛血清 + 100 U/ml 青霉素、0.1 g/L 链霉素培养液, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 恒温箱内培养, 4 ~ 6 天传代一次, 进入对数生长期后, 分别接种于 24 孔板, 细胞数 3  $\times$  10<sup>5</sup>/孔。在细胞融合程度为 40% ~ 60% 时, 进行细胞转染。

**1.6.2 溶液配置** 无菌条件下配置不含血清的质粒 DNA 溶液(A 溶液)和不含血清的脂质体 Lipofectinmin 溶液(B 溶液)。静置 30 min 后, 将 A、B 两种溶液轻轻混匀, 静置 15 min。设置 pcDNA3.1 空白对照。

**1.6.3 细胞转染** 将配置好的 A、B 溶液移入接种细胞的 24 孔板中, 每孔加入不含血清和抗菌素的培养液 1 ml。继续培养 48 ~ 72 h。

**1.6.4 G418 (GIBCOBRL 公司提供) 筛选** 在 24 孔板中加入浓度为 800 mg/L 的 G418, 留置对照, 调整 G418 的浓度。8 周后调至 400 mg/L, 维持该浓度继续培养。

**1.6.5 单克隆细胞的挑选和冻存** 挑选白色点状细胞克隆(约 200 个细胞), 局部消化, 吹打均匀后移入无菌培养瓶中培养。3 ~ 4 周后, 克隆形成, 传代后置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 恒温箱内培养, 6 ~ 8 天传代, G418 保持在 400 mg/L。提取挑选细胞的 RNA, RT-PCR 验证转染效果, 准备下一步实验。

**1.7 转染 huTNF- $\alpha$  及 hIL-2 基因的验证** 按照 1.3 步骤提取转染目的基因后 A549、GLC-82、H446、H460 细胞的总 RNA, 分别用 huTNF- $\alpha$  及 hIL-2 基因的目的引物行 RT-PCR 验证目的基因的转染结果。

**1.8 检测转染目的基因后肺癌细胞系 MDR1、LRP 基因的表达** 按照 1.3 步骤提取转染目的基因后 A549、GLC-82、H446、H460 细胞的总 RNA, 分别用 MDR1、LRP 基因的目的引物行 RT-PCR, 检测 MDR1、LRP 基因的表达情况。

## 2 结果

**2.1 MDR1、LRP 基因在肺癌细胞系中的表达情况**  
MDR1 在 A549、GLC-82、H446、H460 四个肺癌细胞系中均有不同程度的阳性表达, 其中在 H446 中表达最强, 在 GLC-82 呈弱阳性表达(图 1)。

LRP 基因在 A549、GLC-82、H460 三个肺癌细胞系中呈现阳性表达, 在小细胞肺癌细胞系 H446 中无表达(图 2)。

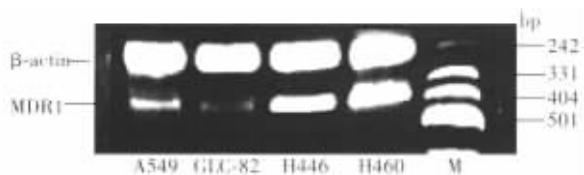


图 1 MDR1 基因在肺癌细胞系中的表达(琼脂糖凝胶电泳结果)

Fig 1 MDR1 gene expression in lung cancer cell lines( Agar glucose electrophoresis )

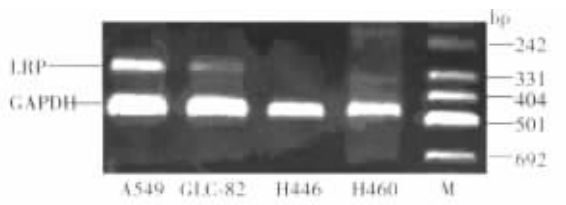


图 2 LRP 基因在肺癌细胞系中的表达

Fig 2 LRP gene expression in lung cancer cell lines

2.2 转染 huTNF- $\alpha$  及 hIL-2 基因的验证 验证和筛选转染目的基因后的四个肺癌细胞系 A549、GLC-82、H446、H460 中均呈现 huTNF- $\alpha$  及 hIL-2 的阳性表达的克隆(图 3、4)。

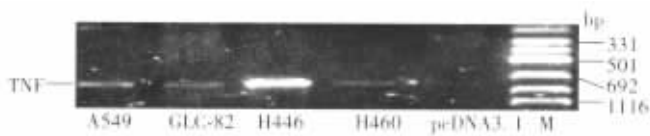


图 3 转染目的基因后肺癌细胞系中 huTNF- $\alpha$  的阳性表达

Fig 3 hu-TNF gene expression in the transfected lung cancer cell lines

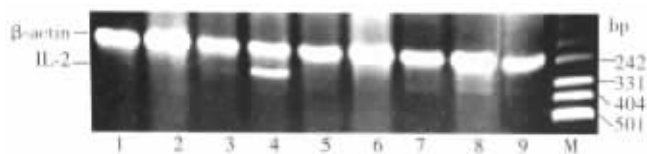


图 4 转染目的基因后肺癌细胞系 hIL-2 的阳性克隆表达

1~9 分别为 :A549、A549/IL-2、A549/pcDNA3.1、GLC-82/IL-2、GLC-82/pcDNA3.1、H446/IL-2、H446/pcDNA3.1、H460/IL-2、H460/pcDNA3.1。1~3、5~7 为阴性克隆、8 为阳性克隆。M : PUC Marker 8

Fig 4 hIL-2 gene expression in the transfected lung cancer cell lines

2.3 PCR 检测转染目的基因后肺癌细胞系 MDR1、LRP 基因的表达 提取转染目的基因后肺癌细胞系细胞的 RNA,行 RT-PCR,huTNF- $\alpha$  基因对所研究的肺癌细胞系中 MDR1、LRP 基因的表达未见明显影响,hIL-2 基因对肺癌细胞系中 LRP 基因的表达也无影响(图 5),但 hIL-2 基因能够明显抑制 MDR1 基因在肺癌细

胞系 A549、H446、H460 的表达(图 6)。

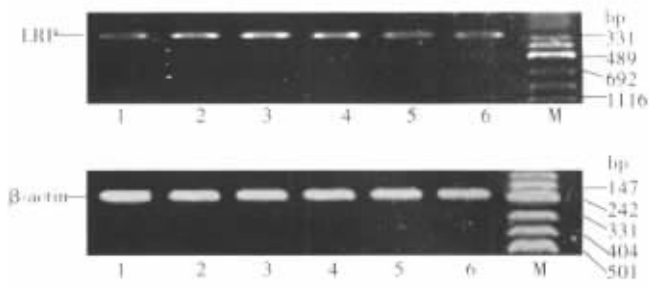


图 5 转染 hIL-2 基因前后对肺癌细胞系 LRP 基因表达无明显影响

1~6 分别为 :A549/pcDNA3.1、GLC-82/pcDNA3.1、H460/pcDNA3.1、A549/IL-2、GLC-82/IL-2、H460/IL-2。M : PUC Marker 8

Fig 5 LRP gene expression in the IL-2 transfected lung cancer cell lines

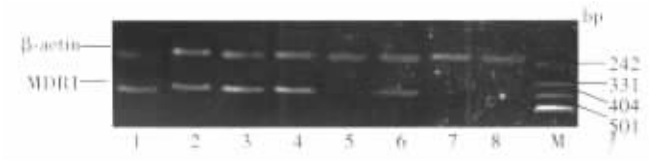


图 6 转染 hIL-2 基因前后对肺癌细胞系 MDR1 基因表达的影响

1~8 分别为 :A549/pcDNA3.1、GLC-82/pcDNA3.1、H460/pcDNA3.1、H460/pcDNA3.1、A549/IL-2、GLC-82/IL-2、H446/IL-2、H460/IL-2。M : PUC Marker 8

Fig 6 MDR1 gene expression in the IL-2 transfected lung cancer cell lines

### 3 讨论

随着卫生宣教工作和临床诊断手段(如螺旋 CT、MRI、PET、肿瘤标记物等)的不断加强与改善,肺癌患者的“三早率”(早发现、早诊断、早治疗)有明显的提高,新型化疗药物的出现使得以手术治疗为主的综合治疗措施不断地加强。但令人遗憾的是,肺癌患者总的 5 年生存率仍徘徊在 20% 左右,死亡原因主要是肺癌的局部复发和远处转移<sup>[1]</sup>。肺癌多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是阻碍提高肺癌患者综合治疗有效率、导致目前肺癌“治疗性瓶颈”的主要原因<sup>[2~5]</sup>。

在肺癌的多药耐药机制中,不仅表现为接受化疗之后产生的获得性耐药(acquired drug resistance),而且某些肺癌细胞本身就存在固有性耐药(intrinsic drug resistance)<sup>[5]</sup>。相关研究表明,膜糖蛋白(P-gp)的编码基因 MDR1 和肺耐药相关蛋白的编码基因 LRP 基因,分别定位于人体第 7 号和 16 号染色体,并且在肺组织、支气管上皮等组织有较高程度的表达。MDR1 主要参与对亲脂性抗肿瘤药物如阿霉素、长春新碱等的耐药,LRP 主要介导铂类、烷化剂等药物的耐药<sup>[2,5~7]</sup>。由此可见,MDR1、LRP 基因的表达是肺癌



患者多药耐药性的基础,对 MDR1、LRP 基因的研究有着重要的临床意义。

我们用 RT-PCR 技术检测了四个肺癌细胞系,MDR1 基因在肺癌细胞系 A549、GLC-82、H446、H460,LRP 在 A549、GLC-82、H460 呈阳性表达。研究文献报告,MDR1、LRP 基因不仅介导肺癌细胞的固有性耐药,而且通过对化疗前后耐药指数测定结果比较,发现在接受化疗以后的肺癌患者,其耐药指数明显增高,同时检测肺癌患者 MDR1、LRP 基因的阳性表达率成倍上升<sup>[2,5,6,8]</sup>,提示 MDR1、LRP 基因还与肺癌的获得性耐药有关,说明 MDR1、LRP 基因在肺癌的多药耐药机制中发挥着重要作用。

有作者提出,针对化疗药物不同的作用机制和药物代谢特点选择最佳组合的联合化疗,可以提高化疗疗效,并成功应用多西紫杉醇+双氟去氧胞苷+顺铂治疗了一位由于对卡铂+足叶乙甙耐药而复发的非小细胞肺癌患者<sup>[9]</sup>。这种联合化疗在理论上可以最大限度地减少由于化疗而产生的获得性耐药,但缺乏针对性,而且对肺癌本身的固有性耐药无能为力。

我们通过基因工程技术构建人体肿瘤坏死因子- $\alpha$  (huTNF- $\alpha$ )、白介素-2(hIL-2)质粒,用基因转染技术将目的基因成功转染肺癌细胞系 A549、GLC-82、H446、H460。转染 huTNF- $\alpha$  基因后对肺癌细胞 MDR1、LRP 基因的表达无明显影响,转染 hIL-2 基因后肺癌细胞系其 LRP 基因的表达也无明显改变,但 MDR1 基因在 A549、H446、H460 细胞系中的表达受到明显抑制。说明转染 hIL-2 基因能够抑制 MDR1 基因在这三种肺癌细胞系 mRNA 水平的表达。虽然肺癌多药耐药性是多基因、多因素相互作用的结果,但 MDR1 基因已经被认定是与肺癌耐药密切相关的重要基因之一,而且已有研究报告显示,用反义基因逆转 MDR1 的表达,可以降低耐药细胞的耐药指数,并提高肿瘤细胞对长春新碱的敏感性<sup>[4,5]</sup>。

huTNF- $\alpha$  和 hIL-2 作为机体体液免疫和细胞免疫的有效激活剂,在机体的免疫功能中发挥着多种生物学功能,也是机体肿瘤免疫机制中重要的细胞因子。但在临床应用时几乎很难观察到令人满意的疗效,而且会引发机体出现高热、寒战、肺水肿、低血压、体液潴留、肾功能损害等严重不良反应,从而限制了 hIL-2 的应用<sup>[10,11]</sup>。转基因技术为 huTNF- $\alpha$ 、hIL-2 的免疫抗肿瘤应用开辟了一条新的途径<sup>[5,9]</sup>。转染的 huTNF- $\alpha$ 、hIL-2 目的基因可以在宿主细胞中随着细胞的分

裂、传代而获得稳定性表达,通过细胞局部分泌释放 huTNF- $\alpha$ 、hIL-2 而发挥其抗肿瘤作用。

总之,MDR1、LRP 基因在肺癌细胞系中的表达,说明肺癌自身(无论是鳞癌、腺癌)都存在着对化疗的固有性耐药,并具有一定的普遍性;转染 huTNF- $\alpha$ 、hIL-2 目的基因能够在被转染的肺癌细胞中成功表达,并且 hIL-2 目的基因能够明显抑制 MDR1 在肺癌细胞系 A549、H446、H460 中的表达,为逆转肺癌的多药耐药性开辟了一条新的途径,有助于突破肺癌的“治疗性瓶颈”,延长肺癌患者的生存期。

## 参 考 文 献

- Morimoto E, Naohiko Inase, Shuji Mlyake, et al. Adenovirus-mediated suicide gene transfer to small cell lung carcinoma using a tumor-specific promoter. *Anticancer Res* 2001 21(1A): 329-332.
- Kawai H, Kiura K, Tabata M, et al. Characterization of non-small-cell lung cancer cell lines established before and after chemotherapy. *Lung Cancer* 2002 35(3): 305-314.
- Monzo M, Rosell R, Taron M. Drug resistance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001 34(Suppl 2): S91-S94.
- Sorenson S, Glimelius B, Nygren P. A systematic overview of chemotherapy effects in non-small cell lung cancer. *Acta Oncol*, 2001 40(2-3): 327-339.
- Su L, Li ZJ, Wei XQ. Advances in the study of multidrug resistance and gene therapy in lung cancer. *For Med Sci Cancer Sect* 2002 29(6): 429-432. [苏雷,李泽坚,魏秀芹.肺癌多药耐药性研究进展及基因治疗. *国外医学肿瘤学分册* 2002 29(6): 429-432.]
- Wang J, Liu XY, Jiang W, et al. Expression of LRP, MRP and MDR1 in non-small-cell lung cancer and its clinical significance. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2000 22(4): 304-307. [王洁,刘叙仪,蒋薇,等. LRP、MRP、MDR1 基因在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义. *中华肿瘤杂志* 2000 22(4): 304-307.]
- Zhang YH, Wang C, Pang BS, et al. Relationship between expression of lung resistance protein gene and clinical pathophysiological characteristics of lung cancer. *Chin J Lung Cancer* 2000 3(6): 452-455. [张予辉,王辰,庞宝森,等.肺耐药蛋白基因表达与肺癌临床病理生理特征的关系. *中国肺癌杂志* 2000 3(6): 452-455.]
- Berger W, Elbling L, Micksche M. Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-term exposure to antineoplastic drugs. *Int J Cancer* 2000 88(2): 293-300.
- Zhou CZ, Xu J. Advances in the study of lung cancer multidrug resistance gene and the strategy in multidrug reverse. *For Med Sci Sect Respir Syst* 2002 22(1): 30-32. [周承志,徐军.肺癌耐药相关基因及逆转耐药策略的研究进展. *国外医学呼吸系统分册* 2002 22(1): 30-32.]
- Curiel DT, Gerritsen W, Krul MRL. Progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*, 2000 7(8): 1197-1199.
- Higashiyama M, Miyoshi Y, Kodama K, et al. P53-regulated GML gene expression in non-small cell lung cancer. A promising relationship to cisplatin chemosensitivity. *Eur J Cancer*, 2000, 36(4): 488-495.

(收稿 2003-01-10 修回 2003-07-12)

(本文编辑 张世雯)