

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0113-04

hTNF- α 重组腺病毒转染人肺腺癌细胞的体外生物学特性及体内抗肿瘤研究

田长富, 李殿俊, 申宝忠, 刘旭, 李天天 (哈尔滨医科大学肿瘤研究所, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:** 研究携带 hTNF- α 基因的第二代重组腺病毒对人肺腺癌细胞系 Anip973 的体外生物学特性的影响, 探讨重组腺病毒在体内抗肿瘤作用。**方法:** 将携带有 hTNF- α 基因的重组腺病毒(rAd-hTNF- α)感染人肺腺癌细胞系, 通过细胞生长实验、克隆形成实验、流式细胞分析、形态学检查等观察其对 Anip973 肿瘤细胞的作用; 利用 PCR 技术对转染后的细胞进行检测并应用 ELISA 试剂盒检测转染后的细胞 TNF- α 的分泌量; 通过肿瘤局部注射 rAd-LacZ, rAd-hTNF- α 的方法观察其在小鼠体内的抗肿瘤作用。**结果:** rAd-hTNF- α 经扩增、纯化后, 滴度可达 10^{10} PFU/ml, 在 30 MOI 时, 对 Anip973 细胞的转染率达 90% 以上。转染的 Anip973 肿瘤细胞除表面结构和超微结构有轻微变化外, 其生长能力、克隆形成率及细胞周期等无明显变化。24 h 细胞培养上清 TNF- α 的分泌量为 20 pg/ml 细胞。体内实验表明注射 rAd-LacZ, rAd-hTNF- α 的小鼠肿瘤生长缓慢, 体积明显小于对照组 ($P < 0.05$), 生存期显著延长。**结论:** 腺病毒介导的细胞因子基因 hTNF- α 转染的 Anip973 肿瘤细胞未见明显变化, 而体内实验则有明显的抗肿瘤作用。

[关键词] 重组腺病毒; 肿瘤; 基因治疗; 细胞因子

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

The Biological Characteristics *in vitro* and Anti-Tumor Effect *in vivo* of Lung Cancer Cells Infected with Recombinant Adenovirus Expressing hTNF- α

TIAN Chang-fu, LI Dian-jun, SHEN Bao-zhong, LIU Xu, LI Tian-tian (Cancer Research Institute, Harbin Medical University, Haerbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the biological characteristics of tumor cells infected with recombinant adenovirus expressing hTNF- α , investigate the antitumor effect of recombinant adenovirus. **Methods:** Human lung adenocarcinoma cell line Anip973 was infected with recombinant adenovirus expressing hTNF- α . Cell growth assay, colone formation test, flowcytometry assay and morphology were used to observe the effects on tumor cells. The hTNF- α gene, which was transduced into cancer cells mediated by recombinant adenovirus, was detected by PCR and agarose gel electrophoresis and its products were detected by ELISA assay. The intratumoral injection of rAd-LacZ and rAd-hTNF- α was carried out to evaluate their antitumor effects. **Results:** The titer of rAd reached 10^{10} PFU/ml and more than 90% Anip973 cells could be infected by 30MOI rAd. Except the surface structure and ultrastructure of tumor cells infected with rAd had a light change, cell growth ability assay, colone formation test, flow cytometry assay showed no significant difference compared with that of the control cells. The TNF- α gene expression at 24 h increased greatly. Antitumor study indicated that on the tumor-bearing mice treated with rAd the tumor grew slowly. Tumor volume was significantly smaller and survive time was prolonged than that of controls. **Conclusion:** There was no significantly changes occurred on tumoral cells after infected with recombinant adenovirus expressing hTNF- α . The intratumoral injection of rAd-LacZ and rAd-hTNF- α could inhibit the growth of solid tumor.

[Key words] recombinant adenovirus; tumor; gene therapy; cytokine

* 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是一种有效的肿瘤杀伤因子^[1]。本研究在构建含 hTNF- α 的

* [基金项目] 本课题受黑龙江省自然科学基金资助(D0122)
[作者简介] 田长富(1965-), 男, 副研究员, 硕士, 主要从事肿瘤免疫的研究。

腺病毒载体 rAd-hTNF- α 的基础上,将人 TNF- α 基因导入人肺腺癌细胞,探讨了转导 TNF- α 基因对肺腺癌细胞体外生物学特性的影响及动物体内抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 病毒及细胞

复制缺陷型人 TNF 重组腺病毒(rAd-hTNF- α)由第二军医大学免疫教研室提供。HEK293 细胞(人胚肾)本所保存。人肺癌细胞 Anip973 由本所建立并保存。C₅₇BL/6 小鼠,5~6 周龄,雌雄兼用,由中国医学科学院动物中心提供。

1.2 主要试剂

X-gal(Promega); MTT, FCS, DMEM 和 RPMI-1640 培养基(Sigma); 病毒 DNA 提取试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒及 hTNF- α 基因 PCR 引物(上海生工公司); PCR 通用试剂盒(华美公司); hTNF- α ELISA 试剂盒(晶美生物工程有限公司)。

1.3 转基因细胞生物学特性的测定

1.3.1 rAd 的扩增、滴度测定及感染率测定按文献[2]进行。

1.3.2 感染 rAd 的 Anip973 肿瘤细胞的 PCR 检测

1.3.2.1 hTNF- α 基因引物的合成(上海生工)

5'端 5'TGAGAGATAACCAGCTGGTG 3'

3'端 5'AAGTAGACCTGCCAGACTC 3'

1.3.2.2 PCR 过程

(1)模板 DNA 提取按试剂盒说明进行。(2)基因扩增在 Eppendorf Mastercycler 5330 型自动基因扩增仪中进行。反应条件:94 $^{\circ}$ C, 1 min; 60 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2 min。共 30 个循环。将其产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3.3 rAd 感染 Anip973 细胞的体外生长曲线

以 30 MOI 的 rAd-hTNF- α 感染 Anip973 细胞,24 h 后收集细胞,重新接种至 96 孔板中,用 MTT 法测生长曲线^[2]。

1.3.4 感染 rAd 的 Anip973 细胞的集落形成能力试验

用 30 MOI 的 rAd-TNF 感染 Anip973 细胞,24 h 后消化细胞,移入 6 孔板,200 个细胞/孔,2 周后观察计算克隆形成率:

$$\text{克隆形成率}(\%) = (\text{各孔平均克隆数} / 200) \times 100\%$$

1.3.5 rAd 感染 Anip973 肿瘤细胞的细胞周期检测

腺病毒感染的 Anip973 肿瘤细胞,经 rypsin/ED-TA-Na₂ 消化,收集细胞,碘化丙啶染色, FACSscan 测细胞 DNA 含量

1.3.6 rAd 感染 Anip973 肿瘤细胞的电镜观察

rAd 感染肿瘤细胞的透射和扫描电镜样品制备及处理按文献[2]方法进行。仪器采用 JEOL JEM-1220 型透射电镜及 HITACHI S-520 扫描电镜。

1.3.7 rAd-hTNF- α 转染肿瘤细胞后 TNF 基因表达的检测

Anip973 细胞接种于 24 孔板,以 30 MOI 的 rAd-hTNF- α 病毒感染细胞,弃病毒液,每孔加入 1 ml 培养液继续培养,分别于 24 h, 48 h 吸取 100 μ l 培养液按试剂盒说明检测 TNF 的表达量。

1.3.8 rAd 在体内的抗肿瘤实验研究

将 40 只小鼠随机分为 4 组,在小鼠侧腹部接种 B16 黑色素瘤组织块 0.2 mm³, 1 周后当肿瘤体积为 0.3 cm³ 左右时分别瘤体内注射生理盐水、1 \times 10⁸ PFU rAd-LacZ, 1 \times 10⁸ PFU rAd-TNF- α , 注射量各 0.1 ml, 每 3 天用卡尺测量肿瘤 1 次,绘制肿瘤生长曲线,记录小鼠的存活期和存活动物数。肿瘤体积计算公式:

$$\text{肿瘤体积} = \text{长径} \times \text{短径}^2 / 2。$$

2 结果

2.1 rAd 的扩增、滴度测定及感染率测定

rAd-hTNF- α 经 HEK293 细胞扩增,氯化铯密度梯度超速离心后,获得高度浓缩的腺病毒带,滴度可达到 7 \times 10¹⁰ PFU/ml。

不同 MOI 的 Adex1-LacZ 对 Anip973 细胞的感染率不同,当病毒为 10 MOI 时,感染率为 50%, 20 MOI 为 70%, 30 MOI 以上时感染率超过 90%。据此,确定 30 MOI 为以下实验的感染剂量。

2.2 rAd 感染 Anip973 肿瘤细胞的 PCR 检测(图 1)。

图 1 Anip973 细胞感染 rAd-TNF- α 的 PCR 产物

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products

PCR 及琼脂糖凝胶电泳结果表明,感染 rAd-hTNF- α 的 Anip973 细胞中确含有相关基因,证明重组腺病毒能将所携带的基因转入 Anip973 肿瘤细胞中。

2.3 感染 rAd 的 Anip973 细胞的生长、克隆形成率及

细胞周期检测

感染及未感染 rAd-TNF 的 Anip973 细胞的生长能力相似, Anip973 的倍增时间约为 2.28 d, Anip973 约为 2.30 d, 两者无明显差别 ($P > 0.05$)。

感染 rAd-TNF- α 的 Anip973 细胞的克隆形成率为 $(31.9 \pm 4.1)\%$, 对照组为 $(32.6 \pm 3.8)\%$, 两组之间集落形成能力无显著差异 ($P > 0.05$)。

经 FACS 分析, 感染 rAd 前后 Anip973 细胞的 DNA 分布相似, 无显著差异。

2.4 rAd 感染 Anip973 细胞的形态学观察(图 2)

Anip973/TNF 细胞内出现大量脂滴, 绒毛变短、数目减少, 呈片状 ($\times 5000$ 倍)。

图 2 rAd-TNF 感染 Anip973 肿瘤细胞的形态学观察

Fig. 2 Observation of Anip973 and Anip973/TNF cells under transmission and scanning electron microscope

A: Anip973 cells; B: Anip973/rAd-TNF cells; C: Anip973 cells; D: Anip973/rAd-TNF cells

2.5 rAd-hTNF- α 转染肿瘤细胞后 TNF 基因的表达

Anip973 细胞检测不出 TNF 表达。rAd 感染 24 h 后 TNF 的表达量明显增加, 且随时间增高。24 h 表达量为 20 pg/ml, 48 h 为 35 pg/ml, 比 24 h 时增加 75%。

2.6 瘤内注射 rAd-hTNF- α , rAd-LacZ 后肿瘤生长情况(图 3)及小鼠生存期(图 4)

注射 rAd 的 2 组小鼠肿瘤生长速度慢于对照组, 其中注射 rAd-TNF- α 组的生长速度最慢; 相对应地注射 rAd-TNF- α 组小鼠的生存期也最长。至 28 d 时对照组全部死亡, 而 rAd-TNF- α 组至 31 d 时仍有 6 只存活。

3 讨论

腺病毒载体为一 DNA 双链无包膜病毒, 基因组为

36 kb, 基因背景比较清楚, 其中, 第 4 型和第 7 型已在美国应用多年, 证实对于人类是无害的; 另外, 腺病毒载体有较大的宿主范围, 可以感染非分裂细胞, 故在转染原代(肿瘤)靶细胞及 *in vivo* 基因转染上有很大的优势; 此外, 由于腺病毒感染靶细胞时其 DNA 不整合到宿主染色体中, 因此没有潜在的致癌危险, 由于具有高感染率、低细胞毒性以及弱免疫原性, 腺病毒在癌基因治疗中的应用迅速开展起来。除用于肿瘤疫苗的免疫刺激基因外, 腺病毒载体介导的肿瘤抑制基因、反义癌基因、自杀/毒素基因和其他效应基因的释放已被成功地证明在不同动物肿瘤模型中有诱导肿瘤消退和抗肿瘤免疫作用^[3-5]。

肿瘤坏死因子是一个多功能细胞因子, 具有广泛

的生物学活性。TNF- α 主要由单核细胞和巨噬细胞产生,人外周血单个核细胞(淋巴细胞、NK 细胞等)在重组白介素 II 和有丝分裂原刺激下,亦可产生 TNF- α ^[6]。有关 TNF- α 的抗肿瘤活性,早已受到充分重视,故人们常将 TNF- α 与抗肿瘤联系在一起。TNF- α 基因转染的肿瘤细胞主要激活局部炎症反应,将 TNF- α 基因转入黑色素瘤细胞,然后再将这些转染的瘤细胞注入病人皮下,3 周后摘取引流区的淋巴结,发现其内有大量肿瘤特异性淋巴细胞增生,表明这些转入 TNF- α 基因的肿瘤细胞亦能起肿瘤疫苗的作用。TNF- α 基因转染的细胞所建立的特异性免疫反应,能被抗 TNF- α 的抗体中和,故 TNF- α 是激活机体抗肿瘤免疫反应的基础,在此基础上与其他免疫调节因子协同作用,建立和维持肿瘤免疫力^[7-8]。

图 3 瘤内注射 rAd 后肿瘤生长情况

Fig. 3 Tumor growth ability after rAd injection

图 4 瘤内注射 rAd 后小鼠生存期

Fig. 4 Survival time of mice after rAd injection

本研究选用腺病毒为载体,构建出表达 TNF- α 基因的重组腺病毒载体,在体外直接高效转染肿瘤细胞。将 TNF 基因转入肿瘤细胞,进而制备成新型肿瘤疫

苗,这种免疫基因疗法具有一定的临床应用前景。本实验用含有 TNF- α 基因的重组腺病毒感染肺癌细胞并探讨其体外生物学特性的变化,为进一步的临床基因治疗提供科学依据。试验结果表明,rAd-hTNF- α 扩增、纯化后滴度可达 10^{10} PFU/ml;30 MOI 的 rAd 可使 90% 以上的 Anip973 细胞被感染。同时还进一步证明,rAd-hTNF- α 进入肿瘤细胞后,对细胞的生长能力、集落形成能力、细胞周期均无明显影响;但形态学观察表明,细胞的表面形态及超微结构有轻微改变,其机理和对肿瘤细胞体内成瘤及转移可能产生的影响需进一步探讨。荷瘤小鼠注射重组腺病毒后,肿瘤生长速度明显慢于对照组。

荷瘤小鼠注射重组腺病毒后,小鼠的生存期明显高于对照组,至第 31 天时仍有 6 只存活,而对照组在第 28 天时即已全部死亡,转基因肿瘤细胞可持续分泌相应的细胞因子,且分泌量随时间增加,48 h 的分泌量达 24 h 的 1.5 倍以上。

寻求高效而安全的病毒载体一直是人们追求的目标。本研究通过多种手段研究了腺病毒载体对肿瘤细胞的影响,为实际应用进行了基础性探索。

[参 考 文 献]

- [1] Philip R, Epstein LB. Tumor necrosis factor as an immunodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma interferon and interleukine I [J]. Nature, 1986, 323: 86-89.
- [2] 田长富,李殿俊,刘旭,等. hB7-1 重组腺病毒感染的肿瘤细胞的生物学特性. 哈尔滨医科大学学报, 2001, 35(3): 157-160.
- [3] Lee SH, Kim MS, Kwon HC, *et al.* Growth inhibitory effect on glioma cells of adenovirus-mediated p16/INK4a gene transfer *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Mol Med, 2000, 6(5): 559-563.
- [4] Steiner MS, Zhang X, Wang Y, *et al.* Growth inhibition of prostate cancer by an adenovirus expressing a novel tumor suppressor gene, pHyde [J]. Cancer Res, 2000, 60(16): 4419-4425.
- [5] Griffith TS, Anderson RD, Davidson BL, *et al.* Adenoviral-mediated transfer of the TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand gene induces tumor cell apoptosis [J]. J Immunol, 2000, 165(5): 2886-2894.
- [6] 金伯泉,主编,细胞和分子免疫学 [M], 第 1 版,西安:世界图书出版公司,1995: 130.
- [7] Stoppacciaro A, Melani C, Parenza M, *et al.* Regression of an established tumor genetically modified to release granulocyte colony-stimulating factor requires granulocyte-T cell cooperation and T cell-produced interferon gamma [J]. J Exp Med, 1993, 178(1): 151-161.
- [8] Chung TD, Mauceri HJ, Hallahan DE, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha-based gene therapy enhances radiation cytotoxicity in human prostate cancer [J]. Cancer Gene Ther, 1998, 5(6): 344-349.