

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0023-05

TNF 相关凋亡诱导配体基因治疗小鼠肝细胞肿瘤

杨 燕¹, 冯作化², 张 慧², 李 东², 张桂梅²(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院实验设备中心, 武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学系, 武汉 430030)

[摘 要] 目的: 探讨经化疗药物作用后的 H22 细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性, 观察 TRAIL、纤黏连蛋白及内皮抑素的真核表达质粒 pTRAIL, pCH510, pES 联合化疗抑制小鼠肿瘤生长的作用。方法: pTRAIL 转染 BHK 细胞后, 加入分别经 MMC, ADM, 5-FU 处理的 H22 细胞, MTT 法检测 pTRAIL 对 H22 细胞的生长抑制作用, 流式细胞仪分析 H22 细胞凋亡。在小鼠种植瘤体内注射 MMC 与 pTRAIL, pCH510, pES, 观察其对肿瘤生长的抑制作用。结果: pTRAIL 能抑制 H22 生长并诱导细胞凋亡, 与 MMC, ADM 及 5-FU 联合, H22 的凋亡百分数分别为 28.1% ($P < 0.01$), 22.5% ($P < 0.01$) 及 47% ($P > 0.05$)。体内, MMC + pTRAIL + pES + pCH510 联合能有效抑制肝细胞肿瘤生长, 肿瘤生成率为 37.5%。结论: MMC 或 ADM 作用后的残存 H22 肿瘤细胞对 pTRAIL 敏感, MMC + pTRAIL + pES + pCH510 具有协同抑瘤效应, 能将小鼠肝细胞肿瘤抑制在组织学水平。

[关键词] TNF 相关凋亡诱导配体; ADM; MMC; 5-FU; 肝细胞肿瘤

[中图分类号] Q78; R735.7 [文献标识码] A

Effect of TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand on Hepatocellular Carcinoma in Mice

YANG Yan¹, FENG Zuo-hua², ZHANG Hui², LI Dong², ZHANG Gui-mei²(1. Experimental Instrument Center of Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the sensibility of apoptosis to TRAIL on the residual H22 tumor cells after chemotherapeutic agents treatment and the synergic therapeutic efficiency of pCH510, pTRAIL, and pES in combination with chemotherapeutic agent on mice tumor. **Methods:** Carrying full length of TRAIL gene, the eukaryotic expression plasmid of pTRAIL was transferred into BHK cells. The mouse hepatocellular carcinoma cell line of H22 which had been treated with ADM, MMC, or 5-FU were mixed with BHK cells. The inhibitory effect of pTRAIL in combination with chemotherapeutic agents was detected by MTT method. The percentage of apoptotic cells and cell cycle of residual H22 cells were analyzed by flow cytometry. The tumor model was made by inoculated with H22 hepatocarcinoma cells in mice. After injection of pCH510, pTRAIL, pES or MMC into intratumor, The therapeutic effects on tumor growth were assessed. **Results:** pTRAIL could inhibit the growth of H22 tumor cells and induce them to apoptosis. The percentage of apoptotic cells of TRAIL in combination with ADM, MMC, or 5-FU on H22 tumor cells was 28.1% ($P < 0.01$), 22.5% ($P < 0.01$), and 47% ($P > 0.05$). The tumor was effectively inhibited by MMC + pCH510 + pTRAIL + pES. And the percentage of tumorigenesis was 37.5%. Residual tumor cells were scattered and mixed with immune cells from histological detection. **Conclusion:** Residual H22 tumor cells after ADM or MMC treatment is apt to be induced to apoptosis by pTRAIL. MMC + pCH510 + pTRAIL + pES is a great powerful modality for tumor synergic treatment.

[Key words] TNF-related apoptosis inducing ligand; ADM; MMC; 5-FU; hepatocellular carcinoma

化疗后残存肿瘤细胞的清除是长期困扰肿瘤治疗的一个难题, 化疗与免疫治疗的结合能在一定程度上清除残存肿瘤细胞^[1-2], 但是化疗损伤机体免疫系统, 化疗后一段时间内免疫因子无法起作用^[3-4]。肿瘤坏

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973)计划(No. 2002CB513100); 国家自然科学基金(No. 39870763)

[作者简介] 杨 燕(1972-), 女, 安徽宿松人, 硕士, 主要从事肿瘤生物治疗与基因治疗研究

死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related Apoptosis Inducing Ligand, TRAIL)是一种Ⅱ型膜蛋白类分子,属于TNF家族^[5]。TRAIL对肿瘤细胞的杀伤无须依赖机体的免疫机制,而是通过与死亡受体结合,启动细胞凋亡信号通路,诱导多种肿瘤细胞与转化细胞发生凋亡,但对正常细胞没有凋亡诱导作用,被认为是一种安全的抗肿瘤因子^[6]。TRAIL的发现及其在肿瘤治疗中的作用为化疗后继续杀伤残存肿瘤细胞提供了一条新途径。但是,不同的化疗药物与TRAIL联合作用效果并不一样。本文将化疗药物与TRAIL联合作用于小鼠肝癌细胞,观察不同药物对TRAIL作用的影响,并将化疗、凋亡疗法、抗血管疗法以及免疫疗法结合治疗肿瘤,观察其对肿瘤的综合疗效。

1 材料与方法

1.1 质粒

小鼠全长TRAIL真核表达质粒mTRAIL-pcDNA3.1(以下简称pTRAIL)^[7]、纤黏连蛋白的Cell I-HepⅡ双功能域重组多肽(CH50)的真核表达载体pCH510质粒^[8]以及LacZ-pcDNA3.1质粒由本室构建,小鼠endostatin-pcDNA3.1质粒(以下简称pES)由意大利Padova大学Stefano Indraccolo博士赠送。

1.2 细胞与动物

Balb/c小鼠来源的肝癌细胞株H22以及BHK细胞购自中国典型培养物保藏中心(武汉),Balb/c小鼠(18 g±0.5 g)购自湖北省医学实验动物中心。

1.3 试剂

小鼠TRAIL特异性引物由上海博亚生物公司合成。引物1:5'-GGCACTTAAGCTTTGCTGGGCTGCAAGTCTG-3';引物2:5'-GCGCGCCGAATTCTAGTAGGTGAGA TATTCTG-3'。随机引物、MMLV逆转录酶、dNTPs、Taq酶为Takara公司产品,丝裂霉素C(MMC)、盐酸阿霉素(ADM)、5-氟尿嘧啶(5-FU)为浙江海正药业有限公司产品,脂质体Lipofectin购自Boehringer Mannheim公司,TRIzol购自Gibco公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)购自Sigma公司。

1.4 pTRAIL转染BHK细胞及基因表达检测

采用Lipofectin脂质体介导,将pTRAIL、lacZ-pcDNA3.1及对照空载体pcDNA3.1分别转染体外培养的BHK细胞。转染后24 h,染色观察lacZ基因的表达,同时RT-PCR检测pTRAIL在BHK细胞中的表达。

1.5 pTRAIL与药物联合对H22细胞的生长代谢抑制试验及细胞凋亡与细胞周期检测

采用Lipofectin脂质体介导,将pTRAIL及对照空载体pcDNA3.1分别转染体外贴壁生长的BHK细胞,

其中pTRAIL转染组分设为1,2组;空载体组分设为3,4组。在进行转染试验的同一天,分别以0.05 μg/ml的ADM,0.5 μg/ml的MMC,0.5 μg/ml的5-FU处理悬浮生长的H22细胞,平行做两组,分设为5,6组,同时作不加药物对照,分设为7,8组。24 h后,将5组加入1组、6组加入3组、7组加入2组、8组加入4组,分别在2种细胞混合后的第1,2,3天收集各孔H22细胞,MTT法检测细胞的生长代谢抑制情况,抑制率(%)=(A_{对照孔}-A_{试验孔})/A_{对照孔}×100%。同时取部分H22细胞,用80%冰乙醇固定,PI染色后,流式细胞仪检测凋亡细胞百分比及残存细胞周期分布。

1.6 pTRAIL与pES,pCH510及药物联合抑制小鼠肿瘤试验

将Balb/c小鼠分为A,B,C,D4组,全部按10⁵H22瘤细胞量在每只小鼠右后腿肌肉接种,于第2天A组小鼠在接种部位注射生理盐水作为对照,B,D组小鼠注射MMC,每只50 μg,C组小鼠注射pTRAIL+pES+pCH510混合质粒,每天1次,隔天注射,每次每种质粒50 μg,于第3天给D组小鼠注射pTRAIL+pES+pCH510混合质粒,每天1次,隔天注射,每次每种质粒50 μg,于第21天解剖小鼠,称瘤重。同时,取小鼠后腿注射部位的肌肉组织,经甲醛固定,石蜡包埋后,切成5 μm厚组织切片,行HE染色,观察治疗后肿瘤细胞的分布情况。

1.7 统计学分析采用X²检验及单因素方差分析,P<0.05为有显著性差异。

2 结果

2.1 lacZ-pcDNA3.1与pTRAIL基因的表达

转染后24 h,细胞固定,染色,观察lacZ基因的表达。转染lacZ-pcDNA3.1的BHK细胞组中,出现大量蓝染细胞,而转染空载体组无蓝染细胞出现(图1)。

转染后24 h,提取细胞总RNA,经无RNase的DNase I消化后,做RT-PCR,在转染pTRAIL的BHK细胞中出现1.3 kb的TRAIL的cDNA条带,而转染空载体的BHK细胞中无特异条带出现(图2)。

2.2 pTRAIL、化疗药物以及pTRAIL与化疗药物联合对H22细胞的生长代谢抑制作用

H22细胞受ADM,MMC,5-FU单一因素作用时,其生长代谢抑制率分别是:55.9%,57.1%及66.9%,受pTRAIL单一因素作用时,其生长代谢抑制率为45.3%。当pTRAIL与ADM,MMC,5-FU联合应用时,H22细胞的生长抑制率分别为:62.34%,79.59%和60.64%,与单独TRAIL作用相比,差异均有显著性(P<0.01)。也就是说,pTRAIL与药物联合与单独

TRAIL 相比均能增强对 H22 细胞的生长抑制作用。同时, pTRAIL 与 ADM 或 MMC 联合与单独 ADM 或 MMC 作用相比, 差异亦有显著性($P < 0.05$), 但 pTRAIL 与 5-FU 联合应用与单独 5-FU 作用比较, 没有显著性差异($P > 0.05$)(图 3)。

分比有明显不同, 分别为: 28.1% ($P < 0.01$), 22.5% ($P < 0.01$) 与 47% (图 4)。

2.4 pTRAIL、化疗药物以及 pTRAIL 与化疗药物联合作用 H22 细胞后残存细胞的周期分布

ADM 作用 H22 细胞后, 残存细胞各周期分布比较平均, MMC 作用 H22 后, 残存细胞中 G0/G1 期细胞很少, 5-FU 作用 H22 后, 残留细胞以 G0/G1 期细胞为主。将经过上述 3 种药物分别处理过的 H22 细胞再用 pTRAIL 作用, 相同的结果是, 残存细胞中 S 期细胞均减少。不同的是, 对于 ADM + pTRAIL 组与 MMC + pTRAIL 组, 残存细胞中 G0/G1 期细胞增多, 而 5-FU + pTRAIL 组, 残存细胞中 G0/G1 期细胞减少 (表 1)。

图 1 lacZ 基因的表达 (×400)

Fig. 1 The expression of lacZ gene (×400)

A: Transfection with pcDNA3.1;
B: Transfection with lacZ plasmid

图 3 pTRAIL、药物及 pTRAIL 与药物联合抑制 H22 细胞的生长

Fig. 3 The growth inhibitory effect of pTRAIL, chemotherapeutics, and pTRAIL with chemotherapeutics on H22 cell

图 2 RT-PCR 扩增出的 TRAIL 的 cDNA 条带

Fig. 2 The amplification product of TRAIL by RT-PCR

1: placZ-pcDNA3.1; 2: pTRAIL

2.3 pTRAIL 与化疗药物联合对 H22 细胞的凋亡诱导作用

ADM, MMC, 5-FU 3 种化疗药物单独作用 H22 细胞时, 凋亡细胞百分比分别为: 12.9%, 15.3% 与 51.2%, 与 pTRAIL 联合作用后, 其诱导细胞凋亡的百

图 4 pTRAIL、药物及 pTRAIL 与药物联合诱导 H22 细胞凋亡

Fig. 4 H22 cell apoptosis induced by pTRAIL, chemotherapeutics, and pTRAIL with chemotherapeutics

T stands for pTRAIL; A stands for ADM, A + T stands for ADM + pTRAIL, M stands for MMC; M + T stands for MMC + pTRAIL; F stands for 5-FU; F + T stands for 5-FU + pTRAIL

表 1 pTRAIL 与药物作用 H22 细胞后残存细胞的周期分布
Tab. 1 Cell cycle of residual H22 cell after treatment with pTRAIL and/or chemotherapeutics

Groups	G0/G1(%)	S(%)	G2/M(%)
Control	21.8	62.5	15.7
ADM	25.6	39.4	35.0
ADM + pTRAIL	37	21.9	41.2
MMC	7.8	61.2	31.0
MMC + pTRAIL	45.5	40.4	14.3
5-FU	54.1	33.0	12.9
5-FU + pTRAIL	30.2	20.8	49.1

2.5 pTRAIL + pES + pCH510 联合化疗治疗 1×10^5 接种量肿瘤的疗效

从表 2 可以看出,虽然基因治疗组小鼠的平均瘤重要大于化疗组,但仍有 2 只小鼠未长瘤,而化疗组所有小鼠全部长瘤,也即化疗平均疗效要强于基因治疗,同时小鼠对化疗的个体差异要小于生物治疗,因此基因治疗更应考虑个体化治疗方案。从图(5)可看到:

化疗组小鼠肿瘤细胞成片生长,肆意吞噬肌肉细胞(图 5B),基因治疗组中肿瘤细胞呈实体团块状,其周围免疫细胞分布(图 5C),联合治疗组中仅有很少的残存瘤细胞,且肿瘤细胞与免疫细胞互相渗透(图 5D);生理盐水组组织切片如图(5A)。

表 2 MMC + pCH510 + pTRAIL + pES 对小鼠肿瘤生长的抑制作用

Tab. 2 Inhibitory effect of MMC + pCH510 + pTRAIL + pES on murine tumor growth

Groups	n	Tumor weight (g, $\bar{x} \pm s$)	Tumorigenesis
Saline	8	2.73 ± 1.32	100%
MMC	8	0.71 ± 0.29	100%
pTRAIL + pES + pCH510	8	1.13 ± 1.31	75%(6/8)
MMC + pTRAIL + pES + pCH510	8	0.2 ± 0.06*	37.5%(3/8)

* $P < 0.05$ vs group B

图 5 基因治疗与化疗联合抑制小鼠肿瘤的生长(×400)

Fig. 5 The inhibitory effect of genetherapy and/or chemotherapy on tumor growth by HE staining (×400)

A: Saline; B: Chemotherapy; C: Genetherapy; D: Genetherapy and chemotherapy

3 讨论

在针对小鼠肝细胞肿瘤的免疫治疗研究中发现,由于化疗损伤机体免疫系统在化疗与免疫治疗中间有一个恢复期^[3],如果在此期间只是简单地撤除治疗,等待机体免疫系统恢复,那么残存肿瘤细胞也会借此机会繁殖传播,给以后的治疗带来困难。pTRAIL 杀伤肿瘤细胞的特点之一在于不依赖机体免疫系统,可以在化疗后机体恢复期直接作用瘤细胞,从而提高疗效。但是细胞经化疗药物作用后是否对 pTRAIL 诱导的凋亡敏感,是决定 pTRAIL 能否与化疗药物联合应用的前提。考虑到细胞经药物作用后,转染效率下降,故先将 pTRAIL 转染 BHK 细胞,利用 BHK 细胞表面表达的 TRAIL 分子对 H22 细胞进行杀伤。

目前临床上治疗肝细胞肿瘤的常用药物为 ADM, 5-FU 以及 MMC,3 种药物均能抑制 H22 细胞的生长,其中 5-FU 作用最强,MMC 与 ADM 作用相当。细胞分别经 3 种药物处理后,再加入 pTRAIL,其生长抑制作用的强弱发生了变化:MMC + pTRAIL 的作用最强,ADM + pTRAIL 其次,而 5-FU + pTRAIL 的抑制效果与 5-FU 的作用相当。结合各组治疗因子对 H22 的凋亡诱导效果,可以看出:ADM 或 MMC 与 pTRAIL 联合,都能够有效提高对 H22 的杀伤作用,而 5-FU 尽管杀细胞作用很强,但与 pTRAIL 联合并不能提高疗效。也就是说,H22 细胞分别经 3 种化疗药物作用后,对 pTRAIL 表现出了不同的敏感性,经 ADM 和 MMC 作用后细胞对 pTRAIL 的敏感性要强于 5-FU。从细胞周期角度分析,我们发现药物作用 H22 细胞后,残存细胞的周期分

布有不同:经 5-FU 作用后, G₀/G₁ 期细胞明显增多。这给我们一个提示: G₀/G₁ 期细胞可能对 pTRAIL 诱导的凋亡不敏感。

目前对于肿瘤治疗的研究除了提高机体的免疫力、应用凋亡分子诱导肿瘤细胞凋亡外, 另一个重要途径即抑制肿瘤新生血管, 因为抑制肿瘤血管就切断了肿瘤的营养供应, 导致肿瘤因能量不足而长期处于休眠状态, 且肿瘤血管治疗不会对机体免疫系统产生损伤^[9]。如果在化疗之后能够同时施以抑血管治疗, 抑制肿瘤的生长, 则可为残存肿瘤细胞的免疫清除提供一个良好的条件。Endostatin 是 O'Reilly 等^[10]发现的一种血管内皮抑制剂, 它只抑制新生血管内皮细胞生长, 无副作用, 无耐药性, 可反复给药。我们以重组质粒 pES 在化疗后进行抑血管治疗, 一方面通过 pTRAIL 杀伤瘤细胞, 另一方面通过 pES 抑制肿瘤血管内皮细胞, 这就为如何在免疫系统损伤期继续杀伤肿瘤细胞, 及协同免疫疗法杀伤肿瘤细胞以提高抑瘤效果提供了一个新的手段, 从实验结果看, 以上三因子联合的抑瘤效果的确要强于单因子与双因子(资料未发表)。

从肿瘤的治疗效果看, 化疗的效果要强于基因治疗, 但同时化疗的毒副作用也强于基因治疗, 在化疗药物注射的肌肉组织, 可见黄色粘稠状物质, 有炎症反应发生, 而质粒注射部位与正常组织相比, 没有明显异常。另外, 基因治疗的个体差异要大于化疗的个体差异, 因此在应用生物因子治疗肿瘤时, 必须考虑个体化方案。从结果可知当化疗后残存瘤细胞量太大时, 基因治疗是无法奏效的, MMC + pTRAIL + pES + pCH510 不能完全抑制 1×10^6 接种量肿瘤的生长, 而对于 1×10^5 接种量肿瘤, 这一组合能够有效抑制肿瘤生长, 平均瘤重为 0.2 ± 0.06 g ($P < 0.01$), 在 8 只小鼠中有 5 只完全不长瘤。组织切片显示肌肉组织中仅存很少的瘤细胞, 且免疫细胞与肿瘤细胞互相渗透, 由此可以看出, MMC + pTRAIL + pES + pCH510 的治疗因子组合能够将肿瘤抑制在组织学水平。

总之, 我们的研究结果显示: pTRAIL 能够杀伤化疗

后残存肿瘤细胞, 但不同的化疗药物与 pTRAIL 联合有不同的效果, 而细胞对 pTRAIL 的敏感性似乎与细胞所处周期有关, 处于 G₀/G₁ 期的 H22 细胞对 pTRAIL 诱导的凋亡不敏感。另外, 我们的研究结果也表明: 对于化疗后残存的肿瘤细胞, 将凋亡疗法、血管疗法与免疫疗法综合起来进行治疗, 是一个非常有潜力的治疗方案。

[参考文献]

- [1] Zhou H, Sequeira M, Goad ME, *et al.* Efficacy and mechanisms of action of rmB7.2-Ig as an antitumor agent in combination with adriamycin and cytoxan chemotherapy [J]. *Clin Immunol*, 2001, 101(3): 303-314.
- [2] Kambach C, Daws MR, Niemi EC, *et al.* Immune rejection of a large sarcoma following cyclophosphamide and IL-12 treatment requires both NK and NK T cells and is associated with the induction of a novel NK T cell population [J]. *J Immunol*, 2001, 167(5): 256-2576.
- [3] 黄波, 冯作化, 张桂梅, 等. 重组 FN 多肽真核表达载体 pCH510 衔接化疗治疗小鼠肿瘤的研究 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(3): 168-172.
- [4] Markowicz S, Walewski J, Zajda K, *et al.* Recovery of dendritic cell counts and function in peripheral blood of cancer patients after chemotherapy [J]. *Cytokines Cell Mol Ther*, 2002, 7(1): 15-24.
- [5] Wiley SR, Schooley K, Cmolak PJ, *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induce apoptosis [J]. *Immunity*, 1995, 31: 673-682.
- [6] 杨燕, 冯作化, 张桂梅. TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡机制研究进展 [J]. *国外医学肿瘤学分册*, 2004, 31(2): 83-86.
- [7] 薛胜利, 冯作化, 张桂梅, 等. TRAIL 真核表达治疗肝细胞癌作用的研究 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2002, 9(3): 158-162.
- [8] 叶仕桥, 冯作化, 李东, 等. CH50 多肽真核表达载体 pCH510 的构建、表达及体内趋化和抑瘤作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(1): 23-26.
- [9] Boehm T, Folkman J, Browder T, *et al.* Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [J]. *Nature*, 1997, 390(6658): 404-407.
- [10] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.

[收稿日期] 2004-06-17

[修回日期] 2004-10-10

[本文编辑] 王莹, 韩丹

变更启事

经国家新闻出版总署批准, 2005 年起《白血病·淋巴瘤》杂志、《肿瘤研究与临床》杂志主管部门变更为中华人民共和国卫生部, 第一主办单位变更为中华医学会。两刊同时加入了中华医学会期刊方阵, 成为中华医学会系列杂志的一员。

步入中华医学会系列的两刊, 将与原有“中华”系列杂志一道, 同享中华医学会百年历史底蕴和丰厚的专家资源, 秉承中华医学会“服务医药卫生事业, 促进学术交流”的宗旨, 全方位服务于广大医务工作者, 全面反映我国肿瘤学界学术水平和最新科研成果, 促进学科发展。两刊将以更完善的服务, 更严谨的作风和更科学的态度, 向读者奉献更优质的科技论文和科研信息, 也期待得到广大读者、作者一如既往的支持和厚爱。

《白血病·淋巴瘤》、《肿瘤研究与临床》编辑部