

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2008·04·013

rmhTNF- α 协同顺铂对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的抑制

魏素菊*, 张楠 (河北医科大学 附属第四医院 肿瘤内科, 石家庄 050011)

[摘要] 目的: 观察重组改构人肿瘤坏死因子(rmhTNF- α)协同顺铂(cisplatin, DDP)对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的抑制作用,并探讨其可能的作用机制。方法: 将 Lewis 肺癌细胞接种于 C57BL/6 小鼠右腋皮下,随机分为 4 组:生理盐水组(对照组)、DDP 组(3 mg/kg)、rmhTNF- α 组(150×10^4 U/kg)、rmhTNF- α (150×10^4 U/kg) + DDP(3 mg/kg)组。于细胞接种的第 7 天,肿瘤直径约 0.6 cm 时,瘤内注射给药,连续 3 d,停药 1 d 后处死小鼠,剥离并称取瘤重,计算抑瘤率。流式细胞术测定移植瘤细胞凋亡率及细胞周期,RT-PCR 检测移植瘤组织 Survivin 的表达。结果:(1)rmhTNF- α + DDP 组治疗的抑瘤率(36.61%)明显高于 DDP 组(17.12%)或 rmhTNF- α 组(15.83%)单药治疗($P < 0.05$)。两药联合使用的 $q = 1.2$,具有良好的协同作用。(2)联合用药治疗后移植瘤细胞的凋亡率($28.2 \pm 1.8\%$)显著高于 DDP($21.6 \pm 1.0\%$)和 rmhTNF- α ($19.3 \pm 2.0\%$)单药治疗($P < 0.05$);前者的细胞周期明显阻滞于 G_2 期。(3)3 个治疗组移植瘤细胞 Survivin 基因的表达受到明显抑制($P < 0.01$),联合用药组的抑制程度较单药组更明显($P < 0.05$)。结论:rmhTNF- α 与 DDP 联合应用具有协同抗 Lewis 肺癌移植瘤的作用,其机制可能与抑制 Survivin 基因表达、诱导肿瘤细胞凋亡有关。

[关键词] 重组改构人肿瘤坏死因子;顺铂;Lewis 肺癌;细胞凋亡

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)04-0361-04

Inhibitory effect of recombinant mutant human tumor necrosis factor combined with cisplatin on transplanted Lewis lung carcinoma in mice

WEI Su-ju*, ZHANG Nan (Department of Oncology, the Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of recombinant mutant human tumor necrosis factor (rmhTNF- α) combined with cisplatin (DDP) against transplanted Lewis lung carcinoma (LLC) in mice, and to explore the related mechanism. **Methods:** LLC cells were subcutaneously inoculated into C57BL/6 mice at the right axilla and the mice were randomly divided into 4 groups: sodium chloride (control group), DDP group, rmhTNF- α group, rmhTNF- α plus DDP group. On the 7th day after inoculation the diameter of the tumor reached 0.6 cm; the corresponding agents were intratumorally injected for 3 d. All mice were sacrificed 1 d later and the tumors were obtained, weighed, and the tumor inhibitory rate was calculated. Flow cytometric analysis was used to examine cells apoptosis and cell cycle. Expression of survivin mRNA was examined by RT-PCR. **Results:** (1) The tumor inhibitory rates of the DDP plus rmhTNF- α group (36.61%) was significantly higher than those of the DDP group (17.12%) and rmhTNF- α group (15.83%, $P < 0.05$). The q value of Jin's formula was 1.2, indicating a good synergistic effect between rmhTNF- α and DDP. (2) The cell apoptotic rate of the rmhTNF- α plus DDP group ($28.2 \pm 1.8\%$) was significantly higher than those of the DDP group ($21.6 \pm 1.0\%$) and rmhTNF- α group ($19.3 \pm 2.0\%$, $P < 0.05$); the cells were arrested G_2 phase in the DDP plus rmhTNF- α group. (3) RT-PCR showed that the expression of survivin gene was significantly inhibited in all the 3 groups, with the inhibition in the DDP plus rmhTNF- α group more potent than that in the other 2 groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** The combination of rmhTNF- α and DDP has synergic effect in treatment of transplanted Lewis lung cancer, which might be related to the inhibition of survivin gene expression and induction of tumor cell apoptosis

[Key words] recombinant mutant human tumor necrosis factor; cisplatin; Lewis lung carcinoma; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(4): 361-364]

[基金项目] 河北省科技攻关计划(No.072761147). Supported by the Science and Technology Program of Hebei Province (No.072761147)

[作者简介] 魏素菊(1963-),女,河北省唐山市人,硕士,主任医师,主要从事肿瘤综合治疗方面的研究

* Corresponding author. E-mail: weisuj@126.com

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)为内源性免疫调节因子,对多种肿瘤细胞有直接细胞毒作用,是迄今为止发现的抗肿瘤效应最强的生物因子,但因其用量大和毒性强在临床应用受到限制。因此,国内外学者均广泛应用基因或蛋白工程技术,对 nTNF 进行改造,以期降低其不良反应,增加临床疗效^[1]。重组改造人肿瘤坏死因子(rmhTNF- α)是应用蛋白质工程技术改造天然 TNF- α 而制成的高活性、低毒性的突变体,它可以在基因、蛋白质以及细胞水平上增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。本实验以荷有 Lewis 肺癌的 C57BL/6 小鼠为模型,予以瘤体内给药,观察 rmhTNF- α 与顺铂(Cisplatin, DDP)联合用药对肿瘤的抑制作用,探讨 rmhTNF- α 在肿瘤治疗中与化疗药物的协同作用。

1 材料与方法

1.1 主要药物、试剂与仪器设备

rmhTNF- α 为上海赛达生物股份有限公司。顺铂为山东齐鲁制药公司生产,20 mg/支,批号 5100222DC。Trizol 为 Invitrogen 公司产品,DEPC 购自美国 Sigma 公司,RNase、oligo 和 M-MLV 反转录酶为 Invitrogen 公司产品,Taq DNA 聚合酶、DNA Marker 为日本 TaKaRa 公司产品。PCR 与 GAPDH 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。GAPDH:上游,5'-GCCAAACGGGTCATCATCTC-3';下游,5'-GACACATTGGGGGTAGGAAC-3';扩增产物为 379 bp。Survivin:上游,5'-ATCCACTGCCCTACCGAGAAC-3';下游,5'-TGCTCCTCTATCGGGTTGTCAT-3';扩增产物为 110 bp。

Epics-XL 型流式细胞仪为美国 BC 公司。PE9600 型 PCR 扩增仪购自美国 PE 公司。电泳仪及电泳槽购自北京六一公司。凝胶图像分析系统购自法国 VL 公司。紫外透射仪购自北京鼎国公司。高速冷冻离心机购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞株与动物

鼠源性 Lewis 肺癌细胞(LLC)购自中科院上海细胞库。清洁级 C57BL/6 小鼠,雌雄各半,40 只,6~8 周龄,体重(20 \pm 2)g,购自军事医学科学院实验动物中心[动物合格证号:SCXK-(军)2002-001]。

1.3 体内抑瘤实验检测 rmhTNF- α 与 DDP 协同对 Lewis 肺癌移植瘤的抑制

将 Lewis 肺癌细胞密度调整为 1 \times 10⁷/ml,于 C57BL/6 小鼠右腋皮下接种,每只小鼠接种 0.2 ml,细胞数为 2 \times 10⁶ 个。接种后将 40 只小鼠随机分 4 组(每组 10 只),即生理盐水组、DDP 组(3 mg/kg)、

rmhTNF- α 组(150 \times 10⁴ U/kg)以及 rmhTNF- α (150 \times 10⁴ U/kg)+DDP(3 mg/kg)组。接种后第 7 天可测得肿瘤直径约 0.6 cm 时,瘤内注射相应药物 0.2 ml,每天 1 次,连续 3 d。停药 1 d 后颈椎脱臼处死小鼠,剥瘤称重,计算肿瘤抑制率。抑瘤率(%)=(对照组瘤重-治疗组瘤重)/对照组瘤重 \times 100%。联合用药效应用金氏公式^[2]计算 q 值, q 值 = $Ea + b / (Ea + Eb - Ea \times Eb)$, $Ea + b$ 为两药合用抑制率, Ea 和 Eb 为各药单用抑制率; $q < 1$ 说明两药有拮抗作用, $q \geq 1$ 说明两药有协同作用。

1.4 流式细胞仪检测 rmhTNF- α 协同 DDP 对肿瘤细胞凋亡的影响

75% 乙醇固定瘤组织,研磨、过铜网后制成单细胞悬液,调整细胞密度为 1 \times 10⁶/ml。加入碘化丙啶 4 $^{\circ}$ C 冰箱染色 30 min,过滤后上机检测。

1.5 RT-PCR 检测 Lewis 肺癌移植瘤组织中 survivin 的表达

取组织 50~100 mg 放入匀浆器,加入适量 Trizol,匀浆,提取总 RNA,紫外分光光度计检测浓度。逆转录合成 cDNA 作为模板,RT-PCR 分别扩增 survivin(110 bp)和内参 GAPDH(379 bp)。反应条件:survivin:94 $^{\circ}$ C 40 s,55 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环;GAPDH:94 $^{\circ}$ C 40 s,50 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环。取扩增产物 6 μ l 做琼脂糖凝胶电泳,用 BIO-PROFIF 凝胶图像分析系统对目的条带进行分析,表达强度用 survivin 产物光密度与内参 GAPDH 光密度比值表示。计算 survivin 基因表达抑制率:抑制率(%)=(1-观察组 survivin 表达强度/对照组 survivin 强度) \times 100%。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计学软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 rmhTNF- α 协同 DDP 对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的抑制

DDP 组、rmhTNF- α 组以及 rmhTNF- α + DDP 组小鼠肿瘤的平均重量均较对照组减轻,而 rmhTNF- α + DDP 组小鼠肿瘤的平均重量减轻尤为明显。DDP 组与 rmhTNF- α 组的抑瘤率分别为 17.12% 和 15.83%,rmhTNF- α + DDP 组的抑瘤率为 36.61%,rmhTNF- α + DDP 组的抑瘤率显著高于单药 DDP 组和 rmhTNF- α 组($P < 0.05$)。联合用药的 q 值等于 1.2,表明 rmhTNF- α 具有增强 DDP 抑制小鼠 Lewis 肺癌移植瘤生长的作用(表 1)。

表1 rmhTNF- α 与 DDP 对 Lewis 肺癌移植瘤生长的抑制($n=10, \bar{x} \pm s$)Tab. 1 Inhibitory effect of rmhTNF- α and DDP on growth of transplanted Lewis lung cancer ($n=10, \bar{x} \pm s$)

| Group | Dose | Tumor mass (m/g) | Inhibitory rate(%) |
|------------------------|---|--------------------------------|----------------------|
| PBS | 0.2 ml | 3.58 \pm 0.13 | |
| DDP | 3 mg/kg | 2.97 \pm 0.91 * | 17.12 |
| rmhTNF- α | 150 \times 10 ⁴ U/kg | 3.01 \pm 0.89 * | 15.83 |
| rmhTNF- α + DDP | 150 \times 10 ⁴ U/kg + 3 mg/kg | 2.27 \pm 0.50 * [△] | 36.61 |

* $P < 0.05$ vs PBS, [△] $P < 0.05$ vs DDP or rmhTNF- α 2.2 rmhTNF- α 协同 DDP 对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤细胞凋亡及周期的影响

流式细胞术检测结果显示, rmhTNF- α + DDP 组肿瘤细胞凋亡率为 28.18%, 显著高于单药 DDP 组

和 rmhTNF- α 组($P < 0.05$)。rmhTNF- α + DDP 组与单药 DDP 组和 rmhTNF- α 组的 G₁、G₂、S 期肿瘤细胞差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 2)。

表2 rmhTNF- α 与 DDP 对小鼠移植瘤组织中细胞凋亡及细胞周期的影响Tab. 2 Synergistic effect between DDP and rmhTNF- α on cell apoptosis and cell cycle in transplanted tumor in mice

| Group | Apoptosis rate (%) | Cell cycle (%) | | |
|------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | | G ₁ | G ₂ | S |
| PBS | 16.10 \pm 0.60 | 32.64 \pm 1.59 | 8.92 \pm 0.40 | 59.33 \pm 0.97 |
| DDP | 21.60 \pm 1.01 | 40.14 \pm 1.23 | 17.11 \pm 0.43 | 42.80 \pm 0.75 |
| rmhTNF- α | 19.27 \pm 1.96 | 40.63 \pm 0.90 | 5.76 \pm 0.26 | 52.49 \pm 0.80 |
| rmhTNF- α + DDP | 28.18 \pm 1.80 * | 50.05 \pm 1.51 * | 49.55 \pm 0.52 ** | 0.31 \pm 0.46 ** |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DDP or rmhTNF- α

2.3 小鼠 Lewis 肺癌移植瘤组织中的 survivin mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果显示, rmhTNF- α + DDP 组小鼠 Lewis 肺癌移植瘤组织中的 survivin mRNA 表达(0.07 \pm 0.11)较对照组(0.11 \pm 0.06)明显下降($P < 0.01$), 较单药 DDP 组(0.09 \pm 0.01)和 rmhTNF- α 组(0.09 \pm 0.02)也有所下降($P < 0.05$, 表 3, 图 1)。

表3 rmhTNF- α 与 DDP 对小鼠移植瘤组织 survivin mRNA 表达的影响Tab. 3 Expression of survivin mRNA in the transplanted tumor tissue after treatment with rmhTNF- α and DDP

| Group | Survivin/GAPDH | Inhibitory rate(%) |
|------------------------|---------------------------------|----------------------|
| PBS | 0.11 \pm 0.06 | |
| DDP | 0.09 \pm 0.01 | 21.24 |
| rmhTNF- α | 0.09 \pm 0.02 | 22.12 |
| rmhTNF- α + DDP | 0.07 \pm 0.01 ** [△] | 35.40 |

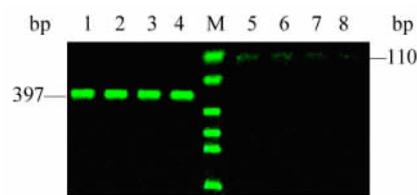
** $P < 0.01$ vs PBS, [△] $P < 0.05$ vs DDP or rmhTNF- α 

图1 小鼠移植瘤组织中 survivin mRNA 的表达

Fig. 1 Expression of survivin mRNA in the transplanted tumor tissues in mice

1, 2, 3, 4: GAPDH; M: Marker; 5: Control; 6: rmhTNF- α ; 7: DDP; 8: rmhTNF- α + DDP

3 讨论

细胞凋亡又称为程序化细胞死亡, 是细胞在严密调控下发生的基因介导的主动自杀过程, 在肿瘤的发生、发展过程中主要起负性调控作用, 可以阻止肿瘤细胞迅速生长。研究表明, 许多抗癌药物都可以通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抑瘤效应。

DDP 是一类周期非特异性药物, 广泛用于肺癌化学治疗的一线药物, 可诱导细胞凋亡。TNF- α 是迄今为止所发现的抗肿瘤活性最强的细胞因子之一, 但是天然的 TNF- α 全身用药不良作用严重, 临床应用受到极大限制。重组改构肿瘤坏死因子(rm-hTNF- α)是天然 TNF- α 结构改造之后的衍生物, 生产的 TNF 突变体可以提高抗肿瘤活性, 又能降低其毒副作用^[2-3]。rmhTNF- α 受体通过调节与细胞相关基因的表达, 引发细胞凋亡^[4]。临床研究^[5-8]发现, rmhTNF- α 治疗肺癌、胸腹腔积液、心包积液等有一定疗效。研究发现^[9-10] rmhTNF- α 与 DDP 联合应用于非小细胞肺癌细胞、脑胶质瘤细胞, rmhTNF- α 能增强 DDP 对细胞的杀伤效应, 具有化疗增敏作用。本实验结果表明, rmhTNF- α 局部用药具有抑制肺移植瘤生长的作用, 与 DDP 联合应用可明显抑制肺移植瘤的生长。联合用药组中小鼠 Lewis 肺癌移植瘤细胞凋亡率明显增高。由此可见, rmhTNF- α 与 DDP 联合局部用药对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的抑制作用并非简单的叠加作用而呈明显协同抗癌效应。

Survivin 是近年来发现的一种凋亡抑制因子, 是凋亡蛋白抑制家族成员之一; 主要分布于胚胎及分化未成熟的组织, 在正常分化成熟组织中不表达, 病理情况下其表达于大多数恶性肿瘤, 提示 survivin 在肿瘤的发生中可能具有重要作用^[11-12]。Survivin 主要通过抑制 Caspase-3, Caspase-7 而阻断细胞凋亡过程, 一方面可以与有活性的 Caspase-3 和 Caspase-7 特异性结合, 当 Caspase-3 与 survivin 结合后, 即在细胞内失活; 另一方面 survivin 也能阻止 Caspase-3 和 Caspase-7 的自发激活, 从而抑制细胞凋亡, 在细胞凋亡中起重要作用^[13]。研究表明, Survivin 的高表达可抑制多种因素诱导的细胞凋亡, 如抑制 Fas (CD95)、Bax、Caspase、抗癌药物诱导的细胞凋亡^[14], 是一个有潜在价值的肿瘤标志物, 与肿瘤预后密切相关, 也可作为肿瘤治疗的新靶点。研究^[15-16]发现 Survivin 与 NSCLC 生物学行为有关, 因其表达的不同, NSCLC 的治疗效果及预后存在很大差异。本研究显示, 重组改构人肿瘤坏死因子协同顺铂在抑制小鼠 Lewis 肺癌移植瘤生长的同时, 下调了 Survivin 的表达水平, 从而使 Caspase 介导的凋亡信号传导途径激活, 最终达到促凋亡的作用, 进而抑制细胞的生长。

本研究显示, rmhTNF- α 与 DDP 联合应用后产生显著协同抗癌效应, rmhTNF- α 能明显增强化疗药的抗癌作用, 联合应用 rmhTNF- α 与 DDP 的综合治疗方式对临床肺癌的治疗具有一定指导意义。

[参考文献]

- [1] 魏素菊, 尤江莲, 韩文峰, 等. rmh-TNF 协同顺铂抗小鼠 Lewis 肺癌血管生成的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(3): 264-268.
- [2] 张志红, 庄英帆, 曹建国. 甲基莲心碱增强顺氯铂对 Lewis 肺癌的化疗作用[J]. 肿瘤学杂志, 2004, 10(10): 17-19.
- [3] 陆琰君, 曹玮. 肿瘤坏死因子在肿瘤研究和治疗领域中的新进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9(4): 297-299.
- [4] 周清华, 侯梅. 新型重组人肿瘤坏死因子治疗非小细胞肺癌的多中心 II 期临床随机试验[J]. 中国肺癌杂志, 2003, 6(1): 42-45.
- [5] Lee KY, Chang W, Qiu D, et al. PG490 (triptolide) cooperates with tumor necrosis factor-alpha to induce apoptosis in tumor cells[J]. J Biol Chem, 1999, 274(19): 13451-13455.
- [6] 金阳, 熊先智, 陶晓南, 等. 重组改构人肿瘤坏死因子对小细胞肺癌化疗的干预[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(3): 270-272.
- [7] 刘永梅, 王梅, 顾军, 等. 重组改构的人肿瘤坏死因子治疗恶性胸腔积液[J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(10): 870-871.
- [8] 阿依夏木古丽, 柳江, 韩忠诚. 重组改构人肿瘤坏死因子治疗恶性腹腔积液[J]. 现代肿瘤学, 2007, 15(2): 224-224.
- [9] 雷开健, 贾钰铭, 裴玲, 等. 置管注入重组改构人肿瘤坏死因子治疗恶性心包积液的临床观察[J]. 四川肿瘤防治, 2006, 19(4): 276-277.
- [10] 周翔, 张沂平, 冯建国, 等. 重组改构 TNF- α 与顺铂、吉西他滨联合对 H1299 细胞系杀伤作用[J]. 临床医学, 2005, 25(12): 1-4.
- [11] 周伟, 栗超越, 张建国. 重组改构人 TNF- α 联合顺铂对人胶质瘤 U251 细胞的生长抑制作用[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41(5): 904-906.
- [12] Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, et al. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa[J]. Hum Pathol, 2001, 32(1): 119-125.
- [13] Ikehara M, Oshita F, Kameda Y, et al. Expression of surviving correlated with vessel invasion is a marker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung[J]. Oncol Rep, 2002, 9(4): 835-838.
- [14] Shinozawa I, Inokuchi K, Wakabayashi I, et al. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, survivin, and EPR-1 in hematological malignancies[J]. Leuk Res, 2000, 24(11): 965-970.
- [15] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human-survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7[J]. Biochemistry, 2001, 40(4): 1117-1123.
- [16] Ulukus EC, Kargi HA, Sis B, et al. Survivin expression in non-small-cell lung carcinomas: correlation with apoptosis and other apoptosis-related proteins, clinicopathologic prognostic factors and prognosis[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007, 15(1): 31-37.

[收稿日期] 2008-05-14

[修回日期] 2008-07-05

[本文编辑] 韩丹