论著

文章编号:1000-5404(2005)24-2422-03

导入 hLIGHT-Fc 基因对人乳腺癌细胞体外增值的影响

熊 刚[1],吴 蔚[1],杨 康[1],白 云[2] (第三军医大学:[1]西南医院胸心外科,[2]基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨 hLIGHT-Fc 基因对人乳腺癌细胞的体外抑制效应。**方法** 以 DOTAP 脂质体介导 hLIGHT-Fc 基因转染人乳腺癌细胞株 MCF-7,通过绘制细胞生长曲线、MTT 比色法以及流式细胞仪检测观察 hLIGHT-Fc 转染对 MCF-7 细胞生长的影响。**结果** hLIGHT-Fc 基因的表达可以抑制 MCF-7 细胞的体外生长。在 5% 血清培养时,MCF-7/LIGHT 细胞的生长曲线较对照组明显降低;MTT 比色显示 MCF-7/LIGHT 的细胞活力与对照组相比有显著性差异($P<0.05$);流式细胞检测显示,在 IFN-γ 协同下基因转染使瘤细胞的生长滞留在 G_0+G_1 期,S 期细胞明显减少,并观察到部分瘤细胞的凋亡。**结论** hLIGHT-Fc 基因转染对 MCF-7 细胞具有体外抑制作用,但全面评价有待进一步的研究。

关键词:hLIGHT-Fc;转染;MCF-7 细胞;基因治疗

中图法分类号:R394-33;R394.2;R737.9 **文献标识码**:A

Effect of hLIGHT-Fc gene transfection into human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 on proliferation *in vitro*

XIONG Gang[1], WU Wei[1], YANG Kang[1], BAI Yun[2] ([1]Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital, [2]Department of Molecular Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the suppressive effect of hLIGHT-Fc on human breast adenocarcinoma cell MCF-7 *in vitro*. Methods hLIGHT-Fc expression vector or pCI-neo blank vector was transfected into human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 and normal MCF-7 cells were used as normal control. The suppressive effects of hLIGHT-Fc gene on cell growth was described by cell growth curve, MTT and flow cytometry (FCM) analysis. Results Expression of hLIGHT-Fc gene strongly inhibited MCF-7 cell proliferation *in vitro*. The growth of MCF-7/LIGHT was significantly lower than that of control. MTT test showed that the difference of cell viability between MCF-7/LIGHT and control cells was also significant ($P<0.05$). FCM showed MCF-7/LIGHT cells on S phase was reduced greatly when treated with 100 μg/ml IFN-γ for 48 h and apoptosis could be observed in some cells. Conclusion The growth of human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 can be suppressed by hLIGHT-Fc gene transfection in vitro, but its completive evaluation still needs to be furthered.

Key words: hLIGHT-Fc; transfection; MCF-7 cell; gene therapy

迄今为止,肿瘤的免疫治疗已经与手术、放疗和化疗一起成为了癌症治疗的几种主要手段。将细胞因子基因导入肿瘤细胞,通过目的基因的表达以抑制和杀伤肿瘤细胞,是肿瘤的基因治疗中一种行之有效的方法。本研究运用真核表达质粒 hLIGHT-Fc-pCI-neo 转染人乳腺癌细胞株 MCF-7,初步研究人重组 LIGHT-Fc 基因对人乳腺癌细胞的体外抑制效应。

作者简介:熊 刚(1969-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤的免疫治疗方面的研究,发表论文 11 篇。电话:(023)68753705

通讯作者:廖克龙,电话:(023)68765329

收稿日期:2005-10-25;修回日期:2005-11-21

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

hLIGHT-Fc 基因的真核表达载体 hLIGHT-Fc-pCI-neo 由第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室黄钢[1]构建;高纯度质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司(美国);G418 及脂质体 DOTAP 购自 Roche 公司(德国);RPMI1640 培养基及新生牛血清(FCS)购自 GIBCO 公司(美国);MTT 购自 Sigma 公司(美国);人重组 IFN-γ(商品名:上生雷素)购自上海生物制品研究所;24、96 孔细胞培养板购自 Costar 公司(美国);Model 550 自动酶联检测仪 BIO-RAD(美国);FACS Calibur 流式细胞仪(美国)。

1.2　细胞株与细胞培养

人乳腺癌细胞株 MCF-7 由第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室提供。细胞贴壁生长在含 10% 灭活 FCS、2 mmol/L 谷氨酰胺及 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基中，置孵箱内培养，每 3 天传代 1 次。本研究的细胞培养及体外实验均在 5% CO_2 浓度、饱和湿度及 37 ℃ 培养条件下进行。

1.3　基因转染及抗性克隆的筛选

未转染的野生型 MCF-7 为对照组（称为 MCF-7/Wt），转染空载体的为 pCI-neo 组（称为 MCF-7/neo）和转染真核表达载体的为 hLIGHT-Fc-pCI-neo 组（称为 MCF-7/LIGHT）。转染按照 Roche 公司的 DOTAP 脂质体转染试剂说明书进行。转染 48 h 后，在培养基中加入初始浓度为 300 μg/ml 的 G418 进行筛选，转染后第 3 天 G418 加大到 400 μg/ml，第 5 天加大到 800 μg/ml。筛选出的 MCF-7/LIGHT 细胞以夹心 ELISA 法检测无血清培养上清中 hLIGHT-Fc 的表达来进行鉴定。

1.4　细胞生长曲线的绘制

将 MCF-7/Wt、MCF-7/neo 和 MCF-7/LIGHT 3 种细胞分别培养在 24 孔细胞培养板中，每孔接种 2.0×10^4 个细胞，培养基中含 5% FCS，隔天取 3 孔行细胞计数，计数至第 7 天，以每天的平均细胞数绘制细胞生长曲线。

1.5　MTT 法检测细胞生长抑制率

本实验以只加培养基的为空白组（Blank），以 MCF-7/Wt 组为对照组，以 MCF-7/neo 组为实验组 1，以 MCF-7/LIGHT 组为实验组 2。收集处于对数生长期的 3 种细胞，按每孔 0.5×10^4 个接种于 96 孔细胞培养板，每孔作 8 个复孔。第 2 天更换 200 μl 含 5% FCS 的 RPMI1640 培养基，培养 72 h。离心，加入终浓度为 0.5 mg/ml 的 MTT 20 μl，继续培养 4 h。吸出培养基，加入等体积 DMSO，振荡后在酶联免疫检测仪上测定波长 490 nm 处吸光度值。计算方法：细胞生长抑制率 =［对照组 D(490) 值 − 实验组 D(490) 值］/对照组 D(490) 值 ×100%。

1.6　流式细胞仪检测

将 MCF-7/Wt、MCF-7/neo 和 MCF-7/LIGHT 细胞分别接种于 10% FCS 的 RPMI1640 培养基内，均加入 100 U/ml 人重组 IFN-γ，培养 48 h。用 0.25% 胰酶消化成细胞悬液，PBS 清洗后 70% 乙醇固定 12 h；而后用含 50 μg/ml Rnase、0.5% TritonX-100 和 0.1% 柠檬酸三钠的碘化丙啶（PI，50 μg/ml）避光染色 30 min，用流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率。

1.7　统计学处理

运用 SPSS 10.0 进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　MCF-7/LIGHT 细胞的筛选和鉴定

以终浓度为 800 μg/ml 的 G418 培养 12 d 后，对照组细胞全部死亡，继续筛压培养到 25 d，得到抗性细胞克隆 MCF-7/LIGHT。运用夹心 ELISA 法检测 MCF-7/LIGHT 培养上清的 D(490) 为对照组的 3.2 倍（>2.1），有阳性意义，可证明 MCF-7/LIGHT 的培养上清中有融合蛋白的表达，亦即 MCF-7/LIGHT 细胞中带有目的基因 hLIGHT-Fc。

2.2　细胞生长曲线

在使用含 5% FCS 的培养基时，MCF-7/LIGHT 的生长明显受到抑制，其细胞数于第 6 天出现负增长，与 MCF-7/Wt 和 MCF-7/neo 相比差异明显（图 1）。

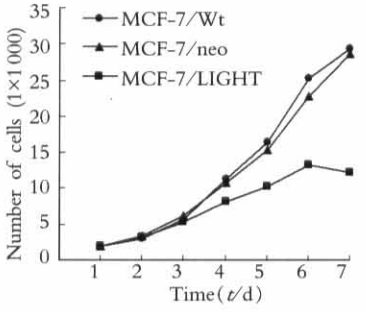


图 1　用含 5%FCS 培养基培养时的细胞生长曲线

Fig 1　The cell growth curve of MCF-7 with the culture medium containing 5% FCS

2.3　MTT 比色试验

MTT 比色实验显示，向 MCF-7 细胞中导入 hLIGHT-Fc 基因后，肿瘤细胞的生长受到了抑制。转染 hLIGHT-Fc 基因的细胞的肿瘤抑制率为 55.92%，转染空质粒的细胞的肿瘤抑制率为 15.31%，两者相比差异显著（$P<0.05$）。如表 1 所示。

表 1　hLIGHT-Fc 基因转染对 MCF-7 细胞生长的影响

Tab 1　Suppressive effect of hLIGHT-Fc gene transfection on cell line MCF-7

Group	D(490)	Inhibition ratio (%)
Blank	0.0331 ± 0.0042	-
MCF-7/Wt	0.2305 ± 0.0417	-
MCF-7/neo	0.1952 ± 0.0638	15.31
MCF-7/LIGHT	0.1016 ± 0.0324	55.92 *

*：$P<0.05$，*vs* MCF-7/neo

2.4　流式细胞仪观察

流式细胞仪检测结果显示在 IFN-γ 的协同作用下，向 MCF-7 细胞内导入 hLIGHT-Fc 基因，能明显改变 MCF-7 细胞的生长周期，使瘤细胞更多地停留在 $G_0\sim G_1$ 期，同时其细胞的凋亡率也明显高于对照。对照组中，MCF-7/Wt 和 MCF-7/neo 中 S 期细胞较多，反映了瘤细胞旺盛生长的特性（表 2）。

表 2　导入 hLIGHT-Fc 基因后 MCF-7 细胞生长周期和凋亡率的变化

Tab 2　Changes of cell cycle and apoptosis of cell line MCF-7 after gene transfection

Group	S phase (%)	G_2-M phase (%)	G_0-G_1 phase (%)	Apoptosis ratio (%)
MCF-7/Wt	41.32	8.76	49.08	5.47
MCF-7/neo	46.75	14.29	38.96	7.54
MCF-7/LIGHT	9.72	35.02	55.26	21.79

3 讨论

LIGHT是肿瘤坏死因子超家族(TNFSF)的第14个成员,它是一种在T细胞的活化和增殖过程中有重要的共刺激作用并兼具诱导肿瘤细胞凋亡及细胞毒作用的多功能细胞因子。LIGHT的抗肿瘤作用是其最早被揭示的生物学效应之一。既往的研究显示[2-6],LIGHT对包括人乳腺癌细胞株MDA-MB-231在内的许多肿瘤细胞具有较强的抑制效应。hLIGHT-Fc-pCI-neo是用hLIGHT的胞外区和hIgG1的Fc段定向克隆构建的真核表达载体。实验显示,在培养基中加入纯化的hLIGHT-Fc融合蛋白,可导致体外培养的MCF-7细胞的生长受到抑制[1]。本实验通过脂质体介导的基因转染将hLIGHT-Fc基因导入MCF-7细胞中,进一步考察了LIGHT的体外抑瘤效应。

在本研究中,通过绘制细胞生长曲线、MTT比色以及流式细胞仪检测观察到向MCF-7细胞中导入hLIGHT-Fc基因明显抑制了瘤细胞的体外生长。Zhai等[2]报道,LIGHT只有通过与肿瘤细胞表面同时表达的HVEM和LTβR结合,才能介导对肿瘤的细胞毒效应。LIGHT的抗肿瘤效应主要表现在以下两个方面:与受体HVEM结合,提供共刺激信号以激活肿瘤特异的CTL反应;与受体LTβR结合,募集活化的TRAF3,发挥直接的细胞毒作用并激活caspase诱导肿瘤细胞凋亡。在既往的研究中,我们已经证实在MCF-7细胞的表面存在LIGHT的受体HVEM和LTβR的表达[6],这给本研究的开展提供了直接的理论依据。在流式细胞仪的检测实验中,我们可以发现hLIGHT-Fc基因转染的体外抑瘤效应可能部分是通过诱导瘤细胞的凋亡来实现的。我们之所以在实验中要同时应用IFN-γ,是因为文献报道LIGHT与IFN-γ在多个方面存在协同抗瘤效应:首先,向细胞中导入LIGHT基因可促进瘤细胞上IFN-γ的分泌而间接发挥抑瘤效应,而同时IFN-γ也可明显增强LIGHT对肿瘤细胞的凋亡诱导[2];其次,LIGHT可依照计量依从关系增强IFN-γ对瘤细胞表达ICAM-1的刺激,而ICAM-1表达的上调促进了淋巴细胞与肿瘤细胞的黏附,并在激活NK细胞的同时增强肿瘤特异性的CTL的活性[7,8];再次,在LIGHT与IFN-γ的协同作用下,下调了瘤细胞表面抗凋亡的Bcl-2家族成员Bcl-2、Bcl-X_L、Bag-1和Mcl-1的表达,而上调了促凋亡的Bcl-2家族成员Bak和Ser(112)-phosphor-Bad的表达[9]。因此,在研究hLIGHT-Fc基因对瘤细胞的生物学行为的影响时,联合应用IFN-γ乃明智之举。

总之,导入hLIGHT-Fc基因对人乳腺癌细胞株MCF-7具有明确的体外抑瘤效应,但其各个效应阶段的信号转导和分子机制尚未阐明。作为肿瘤免疫治疗的重要组成部分,肿瘤细胞靶向的细胞因子基因治疗的临床应用前景还有待于更加深入全面的研究。

参考文献:

[1] 黄 钢,白 云,姜 曼,等. 人重组LIGHT-Fc分子的真核表达及其抗肿瘤活性研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2003,19(5):499-502.

[2] Zhai Y, Guo R, Hsu T L, *et al*. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses *in vivo* tumor formation *via* gene transfer[J]. J Clin Invest, 1998, 102(6): 1142-1151.

[3] Rooney I A, Butrovich K D, Glass A A, *et al*. The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19): 14307-14315.

[4] Chen M C, Hsu T L, Luh T Y, *et al*. Overexpression of bcl-2 enhances LIGHT- and interferon-gamma -mediated apoptosis in Hep3BT2 cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(49): 38794-38801.

[5] Hehlgans T, Mannel D N. Recombinant, soluble LIGHT (HVEM ligand) induces increased IL-8 secretion and growth arrest in A375 melanoma cells[J]. J Interferon Cytokine Res, 2001, 21(5): 333-338.

[6] 熊 刚,杨 康,白 云. LIGHT-Fc基因转染对食管癌细胞株Eca109抑制作用的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2004,26(8):686-689.

[7] Zhang M, Guo R, Zhai Y, *et al*. Light stimulates IFNγ-Mediated intercellular adhesion molecule-1 upregulation of cancer cells[J]. Human Immunol, 2003, 64(4): 416-426.

[8] 熊 刚,杨 康,白 云. LIGHT-Fc基因转染上调食管癌细胞ICAM-1的表达[J]. 重庆医学,2004,33(12):1800-1801.

[9] Zhang M, Guo R, Zhai Y, *et al*. LIGHT sensitizes IFNγ-mediated apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells leading to down-regulation of anti-apoptosis Bcl-2 family members[J]. Cancer Lett, 2003, 195(2): 201-210.

(编辑 王 红)

更 正

因发排、校对错误,本刊2005年27卷14期1500页《深低温停循环下颅内巨大基底动脉瘤手术的麻醉处理》一文中,原"氟哌利多1~2 mg/kg"有误,应为"氟哌利多1~2 mg"。特此更正。编辑部对此给读者和作者带来的阅读和使用不便深表歉意。

(本刊编辑部)