doi:10.11659/jjssx.01E016024

hTNFα/CHO 基因工程细胞的构建及其分泌蛋白功能的检定

田 磊[1,2],潘静坤[2],施 明[1],薛毅珑[2] (1.军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850;2.解放军总医院老年医学研究所病理科,北京 100853)

[摘 要] **目的** 构建能够持续分泌人肿瘤坏死因子(hTNFα)的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)基因工程细胞 hTNFα/CHO 细胞系,并且观察其分泌功能的变化。**方法** 应用载体 GV141 构建携带 hTNF 基因表达的质粒;采用脂质体转染法,经 G418 筛选稳定转染细胞株;通过 Real-Time PCR 鉴定其基因表达,采用 ELIAS 法鉴定其蛋白分泌情况。**结果** 经序列比对,证明 GV141-hTNFα 表达载体构建成功,Real-Time PCR 证明转染细胞系包含 hTNFα 目的基因,ELIAS 鉴定结果证明该细胞系可以在一定代数稳定持续内分泌 hTNFα。**结论** 构建的 hTNFα/CHO 细胞系可以在一定代数内稳定持续地分泌人肿瘤坏死因子。

[关键词] 基因工程细胞;人肿瘤坏死因子;转染;蛋白分泌

[中图分类号] R34;R73-3 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-02-29

Construction of hTNFα/CHO genetic engineered cell and verification of its protein secretion function

TIAN Lei[1,2],PAN Jing-kun[2],SHI Ming[1],XUE Yi-long[2] (1. Institute of Basic Medical Science,Academy of Military Medical Sciences,Beijing 100850,China;2. Department of Pathology, Institute of Geriatrics,General Hospital of PLA,Beijing 100853,China)

Abstract: Objective To construct the genetic engineered cell line which can continuously secrete human tumor necrosis factor (hTNFα) in Chinese Hamster Ovary cells(CHO cells),and observe the change of its protein secretion function. **Methods** Constructed plasmid which carries hTNFα gene expression through vector GV141. Selected stable transfection cell lines by G418 and transfection with lipofectamine. Identified its gene expression with Real-Time PCR,and identified its protein secretion by ELISA. **Results** GV141-hTNFα expression vectors were constructed successfully which were proved by sequence alignment. Real-Time PCR proved that it contained hTNFα gene in hTNFα/CHO cell line. ELIAS identification results showed that the cell lines can continuously secrete hTNFα within a certain cell propagation. **Conclusion** The hTNFα/CHO cell line can continuously secrete human tumor necrosis factor within a certain cell propagation.

Keywords: genetic engineered cell;human tumor necrosis factor;transfection;protein secretion

恶性肿瘤已经成为严重威胁人们生命和健康的常见病、多发病。近年的研究已证明,一些细胞因子具有明确的抗肿瘤作用,通过直接杀伤或者调解机体免疫功能来达到杀死某些肿瘤细胞,或抑制其增殖作用。人肿瘤坏死因子(human tumor necrosis factora,hTNFα)就是其中的一种,它在体内外可以对多种肿瘤细胞有明确的杀伤或者抑制作用[1-5],体内的异常表达又与多种疾病的发生发展密切相关[6-7]。目前在临床使用 hTNFα 多是进行抗肿瘤辅助治疗。由于全身给药存在剂量大、局部作用剂量小和副作用大等缺点,目前多用于局部灌注或注射用药,局部浓度高且副作用也较小[8-11]。但因其半衰期短,仍存在作用时间短,需要反复给药的缺点。本研究拟应用基因工程技术构建一种可持续分泌 hTNFα 的细胞系,应用本组前期的微囊化免疫隔离技术包裹基因工程细胞注射入肿瘤组织周围或内部,持续局部高剂量释放 hTNFα,减轻全身毒副作用,以期待其发挥抑制肿瘤细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

GV141 载体(图 1),XhoI/KpnI 酶切,购自上海吉凯基因化学技术有限公司;中国仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary,CHO)购自协和细胞库;脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;G418 购自 Amresco 公司;hTNFαELISA 试剂盒购自博士德生物工程有限公司,胎牛血清及 DMEM-H 培养基购自 Gibco 公司。

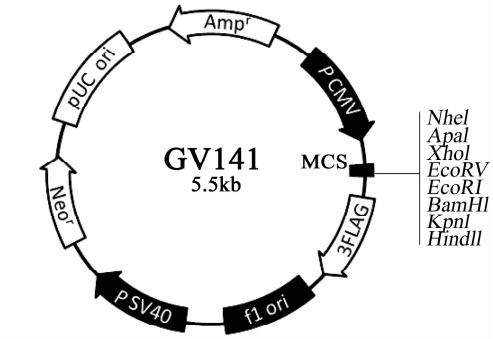


图 1 G141 载体示意图

[基金项目] 国家"863"计划(2012AA020808)

[通信作者] 施 明,E-mail:sm200@sohu.com;薛毅珑,E-mail:xueyilong1029@126.com

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的制备 hTNFα 基因获取,hTNFα 上游引物 ACGGGCCCTCTAGACTCGAGATGAGCACTGAAAGCATG、下游引物 AGTCACTTAAGCTTGGTACCGACAGGGCAATGATCCCAAAG,扩增片段大小为 741 bp,PCR 扩增后鉴定目的基因。将目的基因接入酶切载体获得重组质粒,经 PCR 鉴定和阳性克隆测序。PCR 鉴定上游引物 CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG、下游引物 TTATTAGGAAAGGACAGTGGG。片段大小为1 071 bp,将所得产物回收纯化后送上海吉凯基因化学技术有限公司测序。用氯化钙制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞,进行重组质粒扩增并回收。

1.2.2 细胞转染及稳定株筛选 CHO 细胞置于 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度的培养箱中,以含 10% 胎牛血清的 DMEM-H 培养于 T25 培养瓶中,用 0.25% 的含 EDTA 胰酶 1 mL 消化传代。取对数生长期的细胞进行实验,以每孔 2×10^4 种于 24 孔板中,培养 24 h 后分别加入 300、400、500、600、800、1 000 μg/mL等不同质量浓度的 G418,以筛选 14 d 内能够杀死所有细胞的最小 G418 质量浓度为最佳质量浓度。选用对数增长期 CHO 细胞每孔 5×10^4 种于 6 孔板中,用无血清 DMEM-H 中稀释 10 μg 重组质粒至 100 μl,再加入等体积脂质体 Lipofectamine 2000 悬液(阴性对照组选用 GV141 载体质粒),室温下放置 5 min,使 DNA 结合在脂质体上。弃去细胞中的培养液,PBS 清洗后加入 2 mL无血清 DMEM-H 培养液,向每孔中直接加入 200 μl DNA/脂质体复合物,37 ℃ 培养 24 h。吸出 DMEM-H/重组质粒/脂质体混合物加入新鲜 10% FCS 的 DMEM-H 培养液,每孔 2 mL,再培养 24 h。按照 CHO 细胞 G418 浓度筛选结果,选用 600 μg/mL 的浓度,加入含 G418 的 DMEM-H 培养液继续培养。14 d 后,挑选存活的有抗性的单克隆制备细胞悬液,细胞计数,用培养基稀释细胞到每 10 μl 1 个。在 96 孔板中加入培养基每孔 150 μl,再加入细胞悬液每孔 10 μl,进行细胞扩增,获得 hTNFα/CHO 细胞株。

1.2.3 细胞稳定株的鉴定 细胞大量扩增后,提取总 RNA,做 RT-PCR 检测目的基因。引物:上游引物 CGAGTGACAAGCCTGTAGC、下游引物 GGTGTGGGTGAGGAGCACAT,片段大小为 215 bp;阳性对照 GAPDH,片段大小为 191 kb。选取基因鉴定较好的细胞株传代培养,保留各代细胞的培养液上清,4 000 r/min 离心后,留上清于 -80 ℃ 低温冰箱内保存,按照 ELISA 试剂盒操作步骤,设置 DMEM-H 培养液为空白组,转染空载体的 0/CHO 细胞培养上清为阴性对照组以及不同代数的 hTNFα/CHO 细胞株培养上清为检测组,对上清的 hTNFα 进行 ELISA 检测。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 19.0 软件,对数据进行两两之组间的 t 检验,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义;$P<0.01$ 为差异具有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 hTNFα 基因 PCR 鉴定

hTNFα 基因扩增后进行凝胶电泳鉴定,所得 PCR 产物片段约为 741 bp,与预期的 hTNFα 基因 ORF 长度一致(图 2),表明 hTNFα 基因被成功获取。

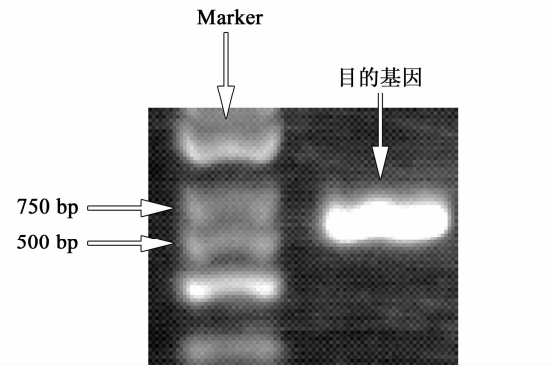
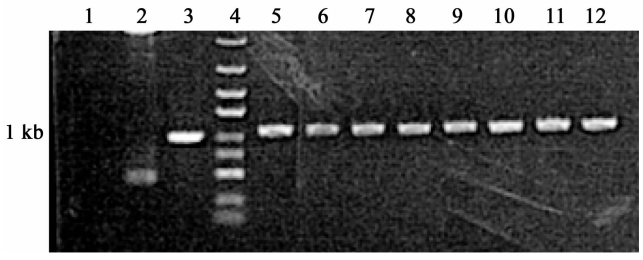


图 2 hTNFα 基因 PCR 产物电泳图

2.2 重组质粒 PCR 产物鉴定和阳性克隆测序

如图 3 所示,电泳显示阳性转化子 PCR 产物大小约 1 071 bp,阴性转化子 PCR 产物大小约 434 bp。证明重组质粒整合入外源基因片段,成功获得重组质粒 1 ~ 8 号。阳性克隆测序比对显示序列均无改变,测序通过,证实 hTNF 基因被成功转入载体。



1:ddH_2O;2:阴性对照(空载自连对照组)3:阳性对照(GAPDH);4:Marker;5 ~ 12:hTNFα 1 ~ 8 号转化子

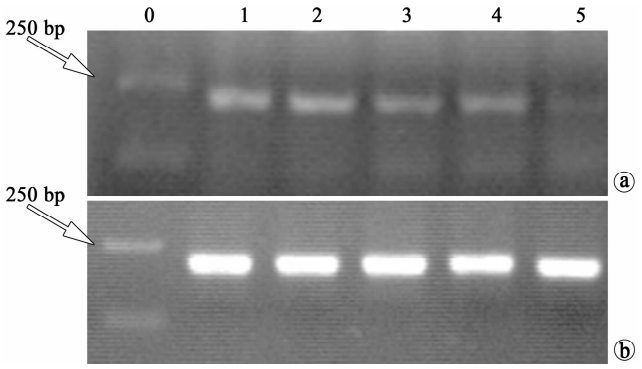
图 3 重组质粒 PCR 产物电泳图

2.3 G418 浓度筛选

G418 浓度筛选结果显示,14 d 后 600 μg/mL 的浓度的 G418 刚好杀死所有细胞,可作为筛选稳定株的最终浓度。

2.4 hTNFα/CHO 稳定转染细胞系的鉴定

2.4.1 基因检测 如图 4 所示,转染细胞基因 PCR 扩增产物,电泳形成 1 条约 215 kb 的条带,阳性对照



a:转染筛选后细胞株基因电泳图;b:阳性对照(GAPDH);0:Marker;1~5:转染细胞株1~5号

图4 转染细胞PCR产物电泳图

GAPDH形成1条约191 kb的条带,证实除hTNFα/CHO细胞株5以外,其他细胞株均包含hTNFα基因组,其中以细胞株1、2号最佳。

2.4.2 分泌蛋白检测 如表1所示,转染空载体的0/CHO细胞株不分泌hTNFα;转染重组载体的hTNFα/CHO组分泌hTNFα,且随着细胞株传代数的增加,分泌量随之减少,在10代之内,分泌量变化不大,至20代分泌量减少,提示可能存在基因丢失的情况发生。

3 讨论

近年,肿瘤治疗中细胞疗法成为了新的医学支柱性学科[12],该疗法应用基因工程的方法修饰不同的免疫细胞,加强免疫细胞的杀伤作用、延迟免疫抗性,从而达到杀伤肿瘤细胞的作用[13]。基因修饰中细胞转染成为了必不可少的方法,不同的转染试剂对于不同的细胞存在不同的转染效果,在临床应用方面也存在不同的缺点及可能的风险[14-16]。应用病毒及逆转录病毒转染方法虽然效率高,且外源基因易整合到宿主细胞中,但是在临床上可能存在病毒感染人体的风险。本研究应用脂质体转染的方法[17],转染效率高,方法简单,无免疫原性,不存在病毒感染的风险,规避了病毒转染的风险,为临床应用提供一种更安全的解决途径。但是脂质体转染仍存在基因整合筛选周期长、稳定性欠佳等因素[18]。实验结果显示,稳定转染后的第10代细胞分泌的TNFα蛋白量与转染的第1代细胞无明显下降,提示外源性基因可较好地整合入宿主细胞。随着细胞传代的次数增多,转染细胞还是不可避免地出现了蛋白分泌量的降低,水平只有稳定筛选初期的一半左右,提示有外源基因稳定性降低的情况,这对于脂质体转染的分泌型基因工程细胞在临床应用中的最佳使用期限提供了借鉴。而对于稳定性降低的问题,可以尝试对多代数的细胞再次进行G418筛选,效果有待进一步研究hTNFα。

表1 不同组细胞培养上清hTNFα分泌量

组别		OD值	hTNFα浓度(ng/mL)	细胞数($\times10^7$个)	单位细胞分泌hTNFα浓度(ng/mL)	单位细胞分泌量占1代细胞分泌量百分比(%)
空白对照组		0.074±0.008	-	-	-	-
阴性对照组		0.077±0.010	-	2.25	-	-
培养上清组	第1代	1.822±0.008*	35.68	2.30	15.51	100
	第10代	1.701±0.025*	33.13	2.18	15.20	97.99
	第20代	1.002±0.015*	17.67	2.03	8.70	56.11

*:与空白对照组比较,$P<0.01$

TNFα主要是由脂多糖刺激巨噬细胞而分泌的一种蛋白质,是具有多种生物活性的炎性细胞因子,与其他细胞因子共同作用参与激活免疫反应,介导全身炎症,并可致肿瘤坏死[19]。hTNFα被认为与调节致病性休克、组织损伤和内毒素血症等相关;是所发现的抗肿瘤活性较强的炎性细胞因子,在炎症与肿瘤的发生发展中具有重要作用。近年来又发现肿瘤组织转移可能与高水平的hTNFα有关[20]。本研究应用基因工程细胞,使hTNFα的分泌量可以维持在一个相对稳定的水平,对于使用剂量可以达到较好的控制,避免出现高水平hTNFα导致的炎症反应和可能的肿瘤组织转移,以及免疫细胞治疗中尤其是嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T)中细胞因子释放综合征的情况[21]。而用量和不良反应之间的平衡点有待进一步研究。

部分癌症患者通过外科手术治疗有效,但仅仅进行外科手术是不够的,还需要在手术治疗的基础上联合应用化疗、放疗、靶向治疗、生物免疫治疗等多种治疗方式[22]。应用hTNFα可以作为对临床常规治疗肿瘤手段的有效补充[23-24],若与TNF联合使用可产生协同作用,从而降低各自的用药剂量,并能明显增强抗瘤效应[25-27]。本研究选用基因工程细胞分泌的hTNFα作为术后辅助治疗细胞因子,结合本组在前期研究中建立的微囊化细胞制备及移植技术[28-31],可以有效地阻止移植发生的免疫反应,靶向性植入实体瘤组织周围或内部,为接下来微囊包裹hTNFα/CHO细胞在体

内和体外抑制肿瘤生长的观察奠定了基础。

[参考文献]

[1] Balkwill FR, Naylor MS, Malik S. Tumour necrosis factor as an anticancer agent[J]. Eur J Cancer, 1990, 26(5): 641 – 644.

[2] Roberts NJ, Zhou S, Diaz LA Jr, et al. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent[J]. Oncotarget, 2011, 2(10): 739 – 751.

[3] Ohri CM, Shikotra A, Green RH, et al. Tumour necrosis factor-alpha expression in tumour islets confers a survival advantage in non-small cell lung cancer[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 323. doi: 10.1186/1471-2407-10-323.

[4] Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship (s)[J]. Microsc Res Tech, 2000, 50(3): 184 – 195.

[5] Westbrook AM, Wei B, Hacke K, et al. The role of tumour necrosis factor-a and tumour necrosis factor receptor signalling in inflammation-associated systemic genotoxicity[J]. Mutagenesis, 2012, 27(1): 77 – 86. doi: 10.1093/mutage/ger063.

[6] 王 伟,肖颖彬,王学锋,等. 紫绀型先心病围体外循环期血清 EPO 与 TNF-α 水平的观察[J]. 局解手术学杂志, 2011, 20(5): 473 – 476. doi: 10.3969/j.issn.1672 – 5042.2011.05.002.

[7] 谢刚银,李 强,余 琳. 危重患者血清中 TNF-α 和甲状腺激素水平的变化及临床意义[J]. 局解手术学杂志, 2015, 24(2): 146 – 149. doi: 10.11659/jjssx.09E014021.

[8] Andreou D, Boldt H, Pink D, et al. Prognostic relevance of ^{18}F-FDG PET uptake in patients with locally advanced, extremity soft tissue sarcomas undergoing neoadjuvant isolated limb perfusion with TNF-α and melphalan[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2014, 41(6): 1076 – 1083. doi: 10.1007/s00259 – 013 – 2680 – 8.

[9] Papadia F, Basso V, Patuzzo R, et al. Isolated limb perfusion with the tumor-targeting human monoclonal antibody-cytokine fusion protein L19-TNF plus melphalan and mild hyperthermia in patients with locally advanced extremity melanoma[J]. J Surg Oncol, 2013, 107(2): 173 – 179. doi: 10.1002/jso.23168.

[10] Grabellus F, Kraft C, Sheu-Grabellus SY, et al. Tumor vascularization and histopathologic regression of soft tissue sarcomas treated with isolated limb perfusion with TNF-α and melphalan[J]. J Surg Oncol, 2011, 103(5): 371 – 379. doi: 10.1002/jso.21724.

[11] Rossi CR, Foletto M, Mocellin S, et al. TNF-based limb perfusion for cutaneous melanoma in transit metastases: suggestions for modification of the perfusional schedule[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2003, 22(4): 103 – 107.

[12] Fischbach MA, Bluestone JA, Lim WA. Cell-based therapeutics the next pillar of medicine[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(179): 179. doi: 10.1126/scitranslmed.3005568.

[13] 陈 杰,王宇环,罗成林,等. 嵌合抗原受体 T 细胞介绍及抗肿瘤临床应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(2): 228 – 235.

[14] Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(8): 3173 – 3178. doi: 10.1007/s00216 – 010 – 3821 – 6.

[15] Norstedt G, Enberg B, Francis S, et al. Cell transfection as a tool to study growth hormone action[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1994, 206(3): 181 – 184.

[16] 芦小燕,解慧琪,李 莉,等. 人成纤维细胞稳定转染的方法比较[J]. 四川大学学报(医学版), 2008, 39(4): 654 – 657.

[17] Tarahovsky YS. Cell transfection by DNA-lipid complexes-lipoplexes[J]. Biochemistry (Mosc), 2009, 74(12): 1293 – 1304.

[18] 余祖华,丁 轲,程相朝,等. 外源基因转染真核细胞技术的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(21): 8954 – 8955.

[19] 赵 玮,徐景杰. 肿瘤坏死因子-α 在炎症与肿瘤中的作用[J]. 中国疗养医学, 2012, 21(7): 607 – 609.

[20] Xia P, Zhang R, Ge G. C/EBPβ mediates TNF-α-induced cancer cell migration by inducing MMP expression dependent on p38 MAPK[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(12): 2766 – 2777. doi: 10.1002/jcb.25219.

[21] 钱 军,周俊东,邹志宏. 细胞因子释放综合征的发生机制和防治策略[J]. 肿瘤研究与临床, 2015, 27(2): 135 – 138. doi: 10.3760/cma.j.issn.1006 – 9801.2015.02.021

[22] Ferrari SM, Fallahi P, Politti U, et al. Molecular targeted therapies of aggressive thyroid cancer[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2015, 20(6): 176. doi: 10.3389/fendo.2015.00176.

[23] 粟 毅,吴亚梅. 肿瘤坏死因子与白细胞介素 2 协同抑制肺腺癌细胞的研究[J]. 癌症, 2000, 19(8): 779 – 781.

[24] Elkayam O, Caspi D, Reitblatt T, et al. The effect of tumor necrosis factor blockade on the response to pneumococcal vaccination in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis[J]. Semin Arthritis Rheum, 2004, 33(4): 283 – 288.

[25] Zheng F, Gong FL, Li ZY, et al. Mutational analysis of regioncytotoxicity relationship in human transmembrane tumor necrosis factor-alpha[J]. Chinese-German J Clin Oncol, 2002, 1(1): 38 – 41.

[26] Koulentaki M, Notas G, Petinaki E, et al. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines in acute hepatitis B[J]. Eur J Intern Med, 2004, 15(1): 35 – 38.

[27] Zhang YQ, Zhao N, Li B, et al. Preparation of a novel recombinant human tumor necrosis factor-α by gene engineering technology[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2002, 18(4): 402 – 405. doi: 10.3321/j.issn: 1007 – 8738.2002.04.029

[28] 薛毅珑,罗 芸,徐龙河,等. APA-BCC 微胶囊蛛网膜下植入对癌痛病人的镇痛效应[J]. 中国疼痛医学杂志, 2005, 11(4): 231 – 235.

[29] 罗 芸,李雁凌,薛毅珑,等. APA-BCC 镇痛微囊在癌痛患者脑脊液中的生物学变化[J]. 标记免疫分析与临床, 2005, 12(2): 97 – 99.

[30] 薛毅珑,肖秀斌,张伟京,等. 海藻酸钙 – 聚赖氨酸 – 海藻酸钙微囊化牛肾上腺嗜铬细胞植入镇痛治疗中人体的免疫反应[J]. 中国临床康复, 2004, 8(35): 7998 – 7999.

[31] 高宇红,田 磊,崔 忻,等. 海藻酸钙微球与海藻酸钙 – 聚赖氨酸 – 海藻酸钙微囊包裹对不同种类细胞生长的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10(9): 51 – 53.

(编辑:魏 源)