构建 hTNF-α/293 基因细胞对人结肠癌细胞增殖影响的实验研究

高宇红[1],薛毅珑[2],潘静坤[1] (解放军总医院:1. 南楼老年医学研究所;2. 老年医学研究所细胞生物学研究室,北京 100853)

[摘 要] **目的** 通过体外实验研究观察稳定转染 hTNF-α/293 基因细胞对人结肠癌(LOVO)细胞生长增殖影响。**方法** 采用 RT-PCR 和 ELISA 检测稳定转染 hTNF-α/293 基因细胞和 Hek-293 细胞 mRNA 和蛋白表达水平。观察体外培养中,hTNF-α/293 基因细胞与 LOVO 细胞共同培养,于不同的时间点,采用噻唑蓝 MTT 法检测 LOVO 肿瘤细胞增殖的活性。**结果** 重组质粒转染 Hek-293 细胞后,Western blot 检测到了 hTNFα 蛋白体外表达,检测表明 hTNFα/293 细胞组和 hTNFα 阳性组对共培养的 LOVO 细胞的增殖具有明显的抑制作用,且具有良好的量效关系。**结论** 提示稳定转染 hTNF-α/293 对 LOVO 细胞增殖有明显抑制效应,且呈现出良好的数量依赖关系。由于 TNF-α/293 基因细胞可有效分泌 hTNFα 蛋白,并能分泌到细胞外。

[关键词] 人结肠癌细胞 LOVO;人肿瘤坏死因子 α;人胚胎肾细胞 Hek-293

[中图分类号] R318 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)06-0591-03

Effect of human tumor necrosis factor alpha-sercreting on proliferation of LOVO colon cancer cells

GAO Yu-hong, XUE Yi-long, PAN Jing-kun (Department of Gerontology Institute, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract: objective To observe the effects of co-culture of hTNFα-sercreting and human colon cancer cells LOVO on the proliferation of cancer cells. **Methods** The stable transfected hTNF-α/293 , mRNA of Hek-293 cell and protein expression were detected by RT-PCR and ELISA. The positive group was added hTNF-α factor, and MTT assay was applied under the optical density 490 nm. Through human tumor cell proliferation inhibition experiment, the inhibitory effects on colon cancer cells (LOVO) proliferation were observed. **Results** hTNF-α/293 cells and hTNF-α-positive group showed a significant lower A, which suggested that hTNF-α/293 cells and hTNF-α-positive group had significant inhibition on the proliferation of colon cancer cells. **Conclusion** The inhibition of hTNF-α secreted by hTNF-α/293 cells on colon cancer cell proliferation shows significant dose-effect dependency, and hTNF-α expresses a considerable inhibition on the colon cancer cell proliferation as positive drug.

Keyword: LOVO cells; human tumor necrosis factor-α; human embryonic kidney cell

近年来,结肠癌的发病率呈明显上升趋势,全球结肠癌发病率仍呈上升趋势[1-2],我国结肠癌发病率和死亡率分别为 28.08/10 万和 13.4/10 万,占恶性肿瘤发病率和死亡率的第 3 位和第 5 位[3],已成为严重影响人类健康的疾病之一。目前的外科手术及化疗、放疗手段不能有效地治愈结肠癌。因此,随着肿瘤免疫学和分子生物学研究的进展,积极探索结肠癌相关基因及抑癌基因已成为新的研究热点[4-6]。临床实验研究表明人肿瘤坏死因子 α(human tumor necrosis factorα, hTNF-α),作为新一代生物反应调节剂之一的肿瘤坏死因子,由于其在体内外对多种肿瘤均有明显的抑制和杀伤作用,因而日益受到世界各国的重视。本文拟通过体外实验探讨 hTNF-α 对人结肠癌(LOVO)细胞生长增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 细胞培养粉、G418 购自 Gibco 公司;实验用癌细胞株人结肠癌(LOVO)是由北大医学部馈赠;hTNF-α 因子购自美国 Peprotech 公司。RT-PCR 购自 TOYOBO 公司;Erasol 购自北京天来生物医学有限公司;人肿瘤坏死因子 α ELISA 试剂盒购自博士德生物公司,其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 细胞系

Hek-293 细胞由解放军军事医学科学院王嘉宁博士提供;实验用癌细胞株人结肠癌 LOVO 是本实验室传代保存;hTNF-α/293 细胞和 0/293 细胞是本实验室转染构成的;胎牛血清购自 Gibco 公司,加强型小牛血清购自 PAA 公司,酶标仪购自美国伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 hTNF-α/293 细胞和 0/293 细胞株分别添加 15% 的胎牛血清的 DMEM 培养液中生长,置于 37 ℃,5% CO_2 中培养。

1.3.2 RNA 的提取和 RT-PCR 鉴定 收集筛选的 hTNF-α/293细胞,用 Trizol Reagent 提取 hTNF-α/293 细胞总 RNA,吸取培养细胞上清液保存备用。PCR 反应条件为:90 ℃

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201306004

[基金项目] 十二五国家技术研究发展计划(863 计划)基金项目(2012AA020808)(2012-2015)

[通讯作者] 薛毅珑,E-mail:100853:xueyl@plagh.com.cn

[收稿日期] 2013-07-10 [修回日期] 2013-07-25

30 sec 变性,RT 60 ℃ 30 min、然后 94 ℃ 1 min、72 ℃ 30 sec 进行 40 个循环。RT-PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,80 v/cm进行电泳。

1.3.3 hTNF-α/293 单克隆细胞 ELISA 方法检测培养上清中 hTNF-α 含量 试剂准备,取检测板,将 1 000 pg/mL、500 pg/mL、251 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.3 pg/mL、15.6 pg/mL 的标准品各 0.1 mL 1 ~ 7 号标准品加入测定板微孔内,1 孔只加样品稀释液的作为零孔。取每一待测样品 100 μl 加入测定板中。每孔做一复孔,37 ℃ 反应 90 min。吸弃溶液,用 0.01MPBS 洗涤液 300 μl,洗脱 3 次。每孔加入 100 μl 准备好的工作液,37 ℃ 反应 30 min。吸弃溶液,0.01MPBS 洗涤液 300 μl,洗脱 3 次。每孔加入 90 μl TMB 显色液,37 ℃ 避光反应 25 min,每孔加入 100 μl TMB 终止液,迅速在酶标仪 450 nm 测定 OD 值,计算 hTNF-α 浓度。取生长状态良好的待测细胞 LOVO 细胞,0.25% 胰酶消化,PBS 清洗 2 次,显微镜下计数。接种 96 孔板(2×10^3 个细胞/孔),每种肿瘤细胞接种 4 块板,培养 24 h 后,吸弃培养上清,分别加入 hTNFα/293 细胞、hTNF-α 因子阳性对照组、0/293 细胞和 Hek - 293 细胞浓缩培养上清 100 μl,37 ℃ 5% CO_2 培养箱培养 2 h。取出培养板,吸弃上清,加入正常培养液。立即取出一板做 MTT,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μl,温育 4 h 后弃上清液,加入 DMSO 150 μl,振荡 10 min 溶解结晶沉淀。于不同时间各取出一板做 MTT。于酶标仪上 490 nm 处测定吸光度(*A*)值。

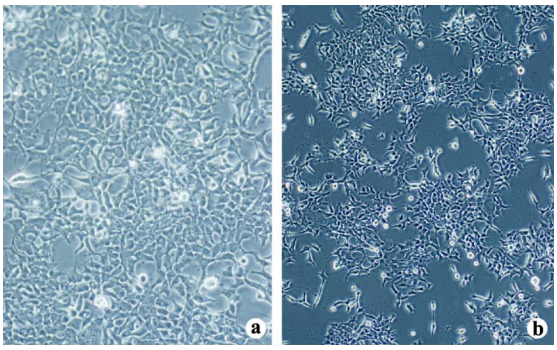
1.4 统计学分析

所有数据均以均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计处理采用统计软件 SPSS 17.0,组间比较用单因素方差分析,$P < 0.05$ 表示组间差别具有显著的统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养下 hTNF/293 细胞的形态特征

倒置荧光生物显微镜下观察,hTNF/293 细胞为贴壁生长细胞,细胞形态和正常 Hek-293 细胞相似,细胞贴壁,透光性好。细胞贴壁培养 3 d 以后,细胞体变为梭形,伪足伸展,细胞浆内颗粒少,见图 1。



a:Hek/293 细胞;b:hTNF/293 细胞

图 1 hTNF/293 和 Hek/293 细胞形态(0/293)(倒置荧光生物显微镜 ×200)

2.2 hTNF-α/293 细胞的 RT-PCR 鉴定

收集 hTNF-α/293 细胞,提取 RNA 后 RT-PCR 鉴定,结果可以扩增出约 477 bp 左右大小的片段(图 2),表明hTNF-α/293 细胞中 hTNF-α 基因已被成功转染,并在 RNA 水平表达。

2.3 hTNF-α/293 单克隆细胞的 ELISA 结果

筛选出分泌活性最高的一株 1×10^6 个细胞分泌 hTNF 蛋白量为 5.29 ng/mL/72 h,将其命名为 hTNF-α/293 细胞。

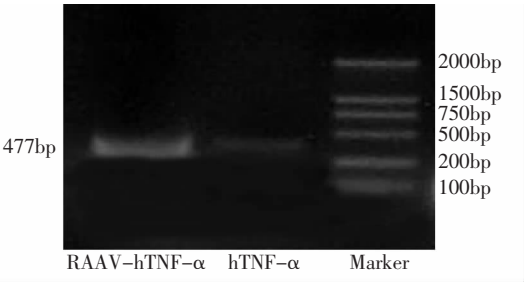


图 2 RAAV-hTNF-α 转染 Hek-293 细胞后 hTNF-α mRNA RT-PCR 扩增结果

2.4 hTNF-α/293 细胞对人结肠癌细胞增殖的抑制

0/293 细胞组、Hek293 细胞组和 hTNF-α/293 细胞组培养液经过浓缩处理后,加入 LOVO 细胞培养板中,于不同时间点用 MTT 法检测 490 nm 处的吸光度(*A*)值。结果从表 1 可以看出体外培养的 Hek-293 细胞组和 0/293 细胞组(阴性组)对 LOVO 细胞增殖无抑制作用,两组之间差异无显著性;hTNF-α/293 细胞和 hTNF-α 因子(阳性组)对照不同时间点吸光度值低于 0/293 细胞组和 Hek-293 细胞组,差异有显著性,说明 hTNF-α/293细胞组对 LOVO 细胞的增殖有显著的抑制作用。

表 1 在不同的时间点 MTT 检测 490 nm 下的吸光度值($\bar{x} \pm s$,*A*)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.051 ±0.012	0.056 ±0.010 *	0.120 ±0.048#	0.137 ±0.017#
0/293 组	0.051 ±0.012	0.074 ±0.023	0.198 ±0.067	0.485 ±0.086
Hek293 组	0.045 ±0.024	0.076 ±0.010	0.246 ±0.041	0.464 ±0.069
TNF/293 组	0.038 ±0.020	0.045 ±0.015 *	0.185 ±0.027 *	0.178 ±0.011#

*:与 0/293 组比较,$P < 0.05$;#:与 0/293 组比较,$P < 0.01$

3 讨论

结肠癌是消化道系统较为常见的恶性肿瘤之一,其并发症多以肠梗阻常见,表现为不全性或完全性低位肠梗阻症状[7-8],结肠癌治疗遵循早期诊断明确,选择手术方案要合理,手术当中严格遵循无瘤原则,这对于减少并发症是非常重要的。当然,治疗结肠癌最终须通过手术、放疗、化疗以及生物靶向治疗等多种治疗方法,方可提高疗效[9-10]。本研究结果表明,基因工程细胞治疗恶性肿瘤的实验已经取得一些进展。选择有肯定疗效并且对人体毒副作用小的抗肿瘤活性因子;hTNF-α 因能引起肿瘤组织出血坏死、诱导敏感细胞凋

亡及抑制肿瘤细胞生长,从而用于抗肿瘤治疗[11-12],hTNF-α 具有广泛的生物学作用,包括细胞的增殖、分化、凋亡以及介导免疫反应,在肿瘤的发生与发展过程中起重要作用。许多具有抗瘤活性的生物制剂与 TNF-α 合用也产生协同作用,如白细胞介素Ⅱ与 TNF-α合用,对杀伤肿瘤细胞起相辅相成的作用。鉴于肿瘤坏死因子在体内外对多种肿瘤有明显的抑制和杀伤作用,国内外学者通过大量的实验和临床研究证明,应用 hTNF-α 治疗肿瘤是对临床手术和化疗等常规治疗手段的有效补充[13]。综上所述 hTNF-α 细胞能抑制结肠癌细胞的增殖,为结肠癌基因治疗和化学药物联合治疗提供了理论基础,从而对结肠癌在临床上生物治疗具有潜在的应用价值。

[参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cance rstatistics[J]. CA Cancer J Clin ,2011,61(2):69 - 90.

[2] Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD)[J]. Lancet Oncol,2008,9(8):730 - 756.

[3] Chen Q, Liu ZC, Cheng LP, et al. An analysis of incidence and mortality of color ectal cancer in China, 2003-2007[J]. China Cancer, 2012, 21(3):179 - 182.

[4] Houghton AN. LIGHTing the way for tumor immunity[J]. Nat Immunol, 2004,5(2):123 - 124.

[5] Thomas, Kilibanov AM. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2003,62(1):27 - 34.

[6] Asensio AC, Rodríguez-Ferrer CR, Oaknin S, et al. Biochemical and immunochemical characterisation of human diadenosine triphosphatase provides evidence for its identification with the tumour suppressor Fhit protein[J]. Biochimie,2006,88(5):461 - 471.

[7] 谢光军,郭云虎,张 励,等. 结肠癌并急性肠梗阻的诊断与治疗[J]. 内蒙古中医药,2010,12(5):94 - 95.

[8] 毛大力,刘明强. 结肠癌并急性肠梗阻的诊断与治疗体会[J]. 局解手术学杂志,2009,18(5):362 - 363.

[9] Assämäki R, Sarlomo-Rikala M, Lopez-Guerrero JA, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of chromosomal imbalances and their target genes in gastrointestinal stromal tumors[J]. Genes Chromosomes Cancer,2007,46(6):564 - 576.

[10] 顾 晋,李 明. 我国直肠癌诊断和治疗的现状[J]. 中华消化外科杂志,2007,8(5):321 - 322.

[11] Campochiaro PA. Gene therapy for ocular neovascularization[J]. Curr Gene Ther,2007,7(1):25 - 33.

[12] Xu Z, Vu T, Lee H, et al. Population pharmacokinetics of golimumab, an anti-tumor necrosis factor-alpha human monoclonal antibody, in patients with psoriatic arthritis[J]. J Clin Pharmacol,2009,49(9):1056 - 1070 .

[13] Vandenbroucke K, de Haard H, Beirnaert E, et al. Orally administered L. lactis secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis[J]. Mucosal Immunol,2010,3(1):49 - 56.

(编辑:杨 颖)

(上接第 590 页)

步研究。本研究结果能为植物黄酮类抗氧化性肝损伤药物的开发提供有效数据和理论依据。

[参考文献]

[1] 林 萍,易宏伟,张 斐. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. 中国现代中药,2012,14(10):23 - 26.

[2] Li FR, Yu FX, Yao ST, et al. Hyperin extracted from Manchurian rhododendron leaf induces apoptosis in human endometrial cancer cells through a mitochondrial pathway[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2012,13(8):3653 - 3656.

[3] Xing HY, Liu Y, Chen JH, et al. Hyperoside attenuates hydrogen peroxide-induced L02 cell damage via MAPK-dependent $Keap_1$-Nrf_2-ARE signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2011,410(4):759 - 765.

[4] Wu S, Yue Y, Tian H, et al. Carthamus red from Carthamus tinctorius L. exerts antioxidant and hepatoprotective effect against CCl_4-induced liver damage in rats via the Nrf_2 pathway[J]. J Ethnopharmacol,2013,148(2):570 - 578.

[5] Nurrochmad A, Margono SA, Sardjiman, et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of pentagamavunon-0 against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats[J]. Asian Pac J Trop Med,2013,6(6):438 - 442.

[6] Ai G, Liu Q, Hua W, et al. Hepatoprotective evaluation of the total flavonoids extracted from flowers of Abelmoschus manihot (L.) Medic: In vitro and in vivo studies[J]. J Ethnopharmacol,2013,146(3):794 - 802.

[7] 田冬冬,任 艳,郑素军. 急性肝损伤动物模型的研究动态[J]. 北京医学,2012,34(3):211 - 214.

[8] 刘赴平,师玲玲. 四氯化碳造成急性肝损伤大鼠模型的实验研究[J]. 中国输血杂志,2012,25(5):446 - 448.

[9] Lin X, Huang R, Zhang S, et al. Methyl helicterate protects against CCl_4-induced liver injury in rats by inhibiting oxidative stress, NF-κB activation, Fas/FasL pathway and cytochrome P4502E1 level[J]. Food Chem Toxicol,2012,50(10):3413 - 3420.

[10] Pinto C, Duque AL, Rodríguez-Galdón B, et al. Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats[J]. Food Chem Toxicol,2012,50(10):3405 - 3412.

[11] 郭又嘉,文 坎,张士军,等. 玉郎伞皂苷对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的影响[J]. 中国药理学通报,2012,28(4):554 - 558.

[12] Anand KV, Anandhi R, Pakkiyaraj M, et al. Protective effect of chrysin on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced tissue injury in male Wistar rats[J]. Toxicol Ind Health,2011,27(10):923 - 933.

[13] 孙雅煊,刘 婷,戴雪伶,等. 高山离子芥水提物对四氯化碳诱导的急性肝损伤的影响[J]. 时珍国医国药,2011,22(4):864 - 866.

(编辑:余汇洋)