DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.011
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
686 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0686-04

LIGHT-Fc基因转染对食管癌细胞株Eca109抑制作用的初步研究

熊 刚[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LIGHT对人食管癌细胞的体外抑制效应。方法 以DOTAP脂质体介导LIGHT-Fc基因转染人食管癌细胞株Eca109,通过绘制细胞生长曲线及MTT比色法观察LIGHT-Fc转染对Eca109细胞生长的影响,用RT-PCR法检测LIGHT受体在Eca109细胞上的表达。结果 LIGHT-Fc基因的表达可以抑制Eca109细胞的生长。在低血清培养时,Eca109/LIGHT细胞的生长曲线较对照组明显降低;MTT比色显示Eca109/LIGHT的细胞活力与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。结论 LIGHT-Fc基因转染对人食管癌Eca109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:LIGHT;转染;Eca109细胞;基因治疗
中图法分类号:R329.28;R394.2;R735.1 文献标识码:A

Inhibitory effect of LIGHT-Fc gene transfection on human esophageal squamous carcinoma cell line Eca109

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

Abstract: **Objective** To investigate the *in vitro* inhibitory effect of LIGHT on human esophageal carcinoma cells. **Methods** LIGHT-Fc expression vector was transfected into human esophageal squamous carcinoma cell line, Eca109. The inhibitory effect of LIGHT gene on cell growth was detected by MTT and cell growth curve. The expressions of LTβR and HVEM were detected by RT-PCR. **Results** Expression of LIGHT-Fc gene could inhibit Eca109 cell proliferation. The growth curve of Eca109/LIGHT was significantly lower than that of the control group in the culture medium containing 1% FCS. MTT test showed that there was significant difference in cell viability between Eca109/LIGHT and the control group ($P<0.05$). **Conclusion** LIGHT-Fc gene transfection can inhibit the growth of esophageal squamous carcinoma cell line Eca109 *in vitro*, but further studies should be conducted for the comprehensive evaluation.

Key words: LIGHT; transfection; Eca109 cell line; gene therapy

LIGHT是一种新近被发现的肿瘤坏死因子超家族(Tumor necrosis factor super-family, TNFSF)的成员,一种主要表达在活化的T细胞和幼稚的树突状细胞上的Ⅱ型跨膜糖蛋白。研究显示,LIGHT在T细胞的活化、增殖和效应过程中有重要的共刺激作用,并且具有较强的肿瘤抑制效应[1~6]。本研究以LIGHT-Fc融合蛋白基因转染人食管鳞癌细胞株Eca109,观察其对食管癌细胞生长的影响,并探讨用LIGHT对食管癌进行基因治疗的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

LIGHT-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教研室黄钢博士构建;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培养液及新生牛血清购自GIBCO公司(美国);MTT购自Sigma公司(美国);两步法RT-PCR试剂盒购自上海生工(Sangon);24孔、96孔细胞培养板购自Costar公司(美国)。

1.2 细胞株与细胞培养

人食管鳞癌细胞株Eca109购自中国科学院上海生物所细胞库(编号:TRL1-TCHu11)。细胞贴壁生长在含10%的新生牛血清(FCS)及青霉素、链霉素双抗的RPMI1640培养基中。本研究的扩大培养、抗性克隆的筛选以及细胞生长速度和MTT试验均在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Eca109为对照组(称为Eca109/Wt),转染空载体的为pCI-neo组(称为Eca109/neo)和转染真核表达载体的为hLIGHT-Fc-pCI-neo组(称为Eca109/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

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6篇。电话:(023)68753705

收稿日期:2003-09-29;修回日期:2004-02-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

养基中加入初始浓度为 200 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, 4 周后筛出抗性克隆并扩大培养。

1.4　夹心 ELISA 法检测 LIGHT-Fc 的表达

本实验针对融合蛋白 hLIGHT-Fc 中 Fc 段的表位, 以夹心 ELISA 法检测 Eca109/LIGHT 细胞无血清培养时上清中 hLIGHT-Fc 的表达。以未转染的 Eca109/Wt 细胞培养上清为阴性对照, 以纯化的人 IgG 为阳性对照。测 490 nm 处的 D_{490}, 以大于阴性对照 D_{490} 值的 2.1 倍为阳性。

1.5　细胞生长曲线的绘制

将 Eca109/Wt、Eca109/neo 和 Eca109/LIGHT 3 种细胞分别培养在 24 孔细胞培养板中, 每孔接种 2×10^4 个细胞, 并分成两组, 一组培养基中含 10% FCS, 一组培养基中含 1% 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。

1.6　MTT 法检测细胞生长活力

收集处于对数生长期的 Eca109/Wt、Eca109/neo 和 Eca109/LIGHT 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 3 个复孔。第 2 天更换 200 μl 含不同浓度新生牛血清的 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。吸出培养液, 加入等体积的 DMSO, 震荡后比色, 测 D_{490} 来表示细胞的代谢水平。

1.7　RT-PCR 法检测 LIGHT 受体在 Eca109 细胞上的表达

在 GenBank 上查出 LIGHT 受体的序列全长: LTβR (NM002342)和 HVEM(NM003820), 用 Primer Premier5.00 软件根据引物设计原则设计引物如下: LTβR 上游引物: 5′-GCCGAGAATTCCTACAACGAGC-3′, 下游引物: 5′-ACATCTCCAGAAATGGGTAGCAG-3′, 产物长度 653 bp; HVEM 上游引物: 5′-GGAGATCCACCCCCAGAACCGAC-3′, 下游引物: 5′-AGCAAACAATGACGATGACGAGG-3′, 产物长度 615 bp。所设计的引物交上海生工(Sangon)合成。培养、收集 Eca109 细胞, 按照 RT-PCR 试剂盒说明书行 RT-PCR 检测 LTβR 和 HVEM 的表达。(以既表达 LTβR 又表达 HVEM 的人乳腺癌细胞株 MCF-7 为阳性参照) PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳。

1.8　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件包中方差分析进行数据分析。

2　结果

2.1　夹心 ELISA 检测融合蛋白的表达

运用夹心 ELISA 法检测两次收集的 Eca109/LIGHT 培养上清的 D_{490} 为 1.382 和 1.267, Eca109/neo 培养上清的 D_{490} 为 0.551, 空白对照为 0.063, 阳性对照为 2.879。Eca109/LIGHT 培养上清的 D_{490} 约为 Eca109/neo 的 2.4 倍(>2.1), 有阳性意义, 可证明转染 LIGHT-Fc 基因后, Eca109/LIGHT 的培养上清中有融合蛋白的表达, 说明所筛选的抗性细胞克隆带有目的基因。

2.2　细胞生长曲线

当使用含 10% FCS 的培养基时, Eca109/LIGHT 的生长较 Eca109/Wt 和 Eca109/neo 慢(图 1)。而当使用含 1% FCS 的培养基时, Eca109/LIGHT 的生长明显受到抑制, 于培养的第 5 天起出现负增长, 与 Eca109/Wt 和 Eca109/neo 相比有一定差异(图 2)。

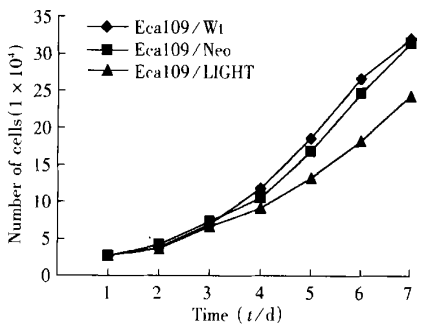


图 1　用含 10% FCS 培养基培养时的细胞生长曲线

Fig 1　Cell growth curve in culture medium containing 10% FCS

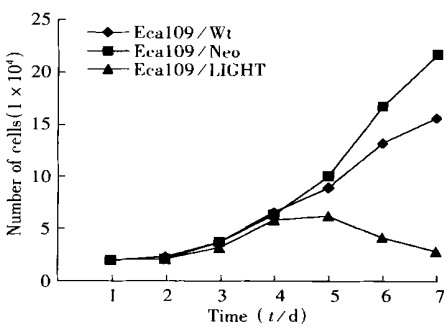


图 2　用含 1% FCS 培养基培养时的细胞生长曲线

Fig 2　Cell growth curve in medium containing 1% FCS

2.3　MTT 比色试验

MTT 比色实验显示, LIGHT 基因转染对 Eca109 的生长有明显的抑制作用, 方差分析表明 Eca109/LIGHT 与 Eca109/Wt 和 Eca109/neo 相比, 差异显著($P<0.05$)。同时不同培养条件下(培养基中血清浓度不同), 细胞生长的差异也是显著的($P<0.05$)。测得的 D_{490} 如表 1 所示。

表 1　LIGHT 基因转染对 Eca109 细胞生长的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Inhibitory effect of LIGHT gene transfection on cell line Eca109 ($\bar{x}\pm s$)

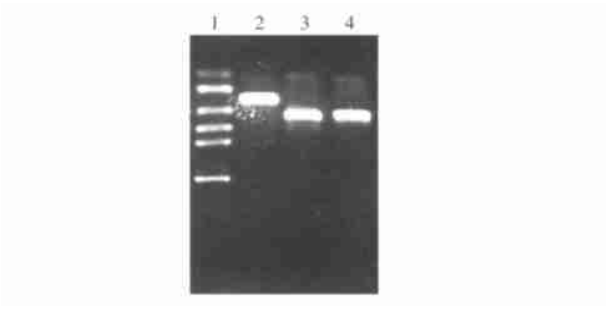
Condition	n	D_{490}			Total
		Eca109/Wt	Eca109/neo	Eca109/LIGHT	
10%FCS	3	0.95±0.081	0.89±0.141	0.73±0.105	0.86±0.138
1%FCS	3	0.69±0.041	0.74±0.244	0.50±0.046 *	0.64±0.168 **

*: $P<0.05$, *vs* Eca109/Wt and Eca109/neo; **: $P<0.05$, *vs* 10% FCS

2.4　RT-PCR 检测

经 RT-PCR 检测证实在 Eca109 细胞上有 LTβR 和 HVEM 的表达(图 3、4)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



1: DL-2000 Markers; 2: β-action; 3: LTβR expression on Eca109 cells; 4: LTβR expression on MCF-7 cells

图3 RT-PCR检测Eca109上LTβR基因的表达

Fig 3 RT-PCR analysis of LTβR expression on Eca109 cells



1: DL-2 000 Markers; 2: HVEM expression on MCF-7 cells; 3: HVEM expression on Eca109 cells; 4: β-action

图4 RT-PCR检测Eca109上HVEM基因的表达

Fig 4 RT-PCR analysis of HVEM expression on Eca109 cells

3 讨论

食管癌是一种长期困扰临床医务工作者的顽症,它的确切病因和发病机制尚不清楚,发病率与死亡率却居高不下,严重威胁人民的健康。目前,针对恶性肿瘤的生物治疗已经成为继手术、放疗和化疗之后的又一种主要的治疗手段。这种治疗的理想机制主要包括:①诱导肿瘤细胞自身生长停滞或凋亡;②提高肿瘤的免疫原性,诱导机体产生肿瘤特异性的CTL反应。基因转移利用分子生物学技术,把目的基因导入肿瘤细胞,通过目的基因的表达以抑制肿瘤细胞的生长或增强其免疫原性,是肿瘤的基因治疗中一种行之有效的方法。

LIGHT是一个多功能、多效应的免疫分子,它的抗肿瘤作用是其最早被揭示的生物效应之一。Zhai等[1]首先报道了LIGHT基因转染对人乳腺癌细胞株MDA-MB-231的抑制作用。此外,更多的研究还显示,LIGHT对人结肠腺癌HT29细胞[1~3]、鼠肥大细胞瘤P815细胞[4]、人肝癌Hep3BT2细胞[5]、人黑色素瘤A375细胞[6]都有明显的抑制作用。LIGHT的抗肿瘤效应主要表现在以下几个方面:与静止T细胞上的受体HVEM结合,为T细胞的活化和增殖提供一个非CD28依赖的共刺激信号,激活肿瘤特异的CTL反应;在T细胞活化和增殖阶段,诱导分泌IFN-γ、GM-CSF等Th1型细胞因子;与受体LTβR结合,通过募集活化TRAF3,传递死亡信号,发挥直接的细胞毒作用并激活caspase诱导肿瘤细胞凋亡。因此,本研究选择LIGHT作为目的基因,通过用重组的hLIGHT的胞外区和hIgG1Fc定向克隆构建的真核表达载体转染食管鳞癌细胞株Eca109,以观察其对食管癌细胞生长的影响。

本实验结果显示,通过基因转染,Eca109/LIGHT细胞可以表达hLIGHT-Fc融合蛋白,并对肿瘤细胞的生长产生抑制作用。在实验中我们通过RT-PCR首次证实了Eca109细胞上存在LIGHT的受体LTβR和HVEM的表达,并由此推断LIGHT基因转染的体外抑瘤效应可能主要经由LIGHT-LTβR信号途径,通过细胞毒作用和诱导肿瘤细胞凋亡来实现的。文献[1, 3]报道,LIGHT对细胞表面同时表达其膜受体HVEM和LTβR的肿瘤细胞有明显的细胞毒效应,而这些肿瘤多为上皮来源。在本实验中,培养基的血清浓度对Eca109/LIGHT细胞的生长抑制有很大的影响,这与Zhai等[1]的研究相一致。此外,从细胞的生长曲线可以看出,LIGHT基因转染的抑瘤作用需要一个较长的时间来发挥(约5 d以上),这说明LIGHT通过其下游分子以实现其生物学效应需要一个时间过程。从另外一个角度来看,单独转染LIGHT基因来对肿瘤进行免疫治疗的效果可能是有限的,最好采用与IFN-γ联合治疗的方案。因为作为配伍剂,IFNγ可能是一个最佳的候选者。研究发现,LIGHT与IFN-γ在抗肿瘤方面有明显的协同作用,一方面IFNγ可以明显增强LIGHT对肿瘤细胞的凋亡诱导,另一方面LIGHT基因的表达也可以促进IFNγ的分泌[1]。LIGHT与IFN-γ协同可通过caspases依赖和非依赖两种方式来诱导细胞凋亡[5]。新近的研究还显示,LIGHT基因转染可以上调肿瘤细胞上ICAM-1的表达水平,而且LIGHT可依照一个计量依从关系增强IFN-γ对肿瘤细胞表达ICAM-1的刺激[7];同时,研究还表明由LIGHT致敏的、IFNγ介导的、对肿瘤细胞的凋亡诱导可能是通过下调抗凋亡的Bcl-2家族成员的表达来实现的[8]。

总之,要全面评价LIGHT基因转染对Eca109的抑瘤效应,尚需对其效应阶段与其受体间的信号转导进行深入的研究,考察它在肿瘤模型中的共刺激T细胞活化并激活肿瘤特异性的CTL反应以及细胞毒效应,并进一步探索其用于临床基因治疗的可能性。

参考文献:

[1] Zhai Y, Guo R, Hsu T L, *et al*. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

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.

[2] Harrop J A, McDonnell P C, Brigham-Burke M, *et al*. Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth[J]. J Biol Chem, 1998, 273(42): 27548—27556.

[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] Tamada K, Shimozaki K, Chapoval A I, *et al*. Modulation of T-cell-mediated immunity in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway[J]. Nat Med, 2000, 6(3): 283—289.

[5] 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.

[6] 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.

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

[8] 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　陈聪连）

文章编号：1000-5404(2004)08-0689-01

个案与短篇

上颌㖞垫式矫治器中㖞堤的制作体会

A new method to make upper removable appliance for anterior cross bite

李雨轩，周继祥，冉光亮，汪　欣　　（第三军医大学西南医院口腔科，重庆 400038）

乳牙列期和混合牙列早期的前牙反㖞对青少年正常的颅颌面部生长发育危害较大，因而需要尽早矫治[1]。上颌㖞垫式活动矫治器是临床上最为常用的治疗手段，适合多数前牙反㖞病例的矫治。其基本的工作原理为：矫治器以固位体的作用而相对固定在上颌牙弓；㖞堤的作用是使反㖞的前牙脱离咬合锁结；然后逐步调节加力弹簧缓慢地推上前牙向唇侧移动，最终解除上颌前牙的反㖞[2]。

实际工作中我们发现，上颌㖞垫式矫治器中㖞提的制作具有一定的难度，特别是㖞堤的双侧均衡和戴入后的完善咬合接触方面，常常需要耗费较多的临床调磨时间。为此，我们对常规的㖞堤制作规程进行了一些调整，取得了良好的临床效果，现报告如下：

我们将矫治器的制作分为矫治器部分制作和㖞堤制作两个部分，亦即是通常所说的两步法。

1　矫治器部分的制作

①制矫治器的固位体和加力弹簧，仔细封蜡将其固定在工作模型上；②调和适量的自凝塑料，进行常规的基托铺塑，各部分的边缘伸展一定要彻底；③用蘸水玻璃纸仔细摩擦基托表面，用于调节基托厚度并使其表面光滑；④用雕刻刀修整基托边缘，并切除多余的自凝塑料；⑤静置至自凝塑料完全固化，基本完成矫治器部分的制作。

2　㖞堤的制作

①待基托完全固化之后，先用甲基丙烯酸甲酯单体溶涨基托之㖞堤部位的表面；②调和适量的自凝塑料至丝状期，并以二长条状铺塑于㖞堤部位；③用甲基丙烯酸甲酯单体棉签修饰基托与㖞堤的内外连接缝处，使之浑然一体；④迅速将工作模翻转，放置于光滑的玻璃板上；⑤充分利用丝状期自凝塑料的可塑性，以前高后低的方式轻轻挤压工作模，用以调节㖞堤的高度和斜度，并保持左右两侧均衡一致；⑥㖞堤前段近尖牙处的高度约为患者反覆㖞的深度再加 2 mm，以利解除前牙锁结，便于推上前牙唇向，纠正前牙反㖞；⑦后段磨牙处的㖞堤高度约为前段的 1/3，这样能基本保证咬合时下颌后牙均与㖞垫有咬合接触；⑧待㖞堤完全固化之后，从玻璃板上取下模型，分离矫治器，磨出颊侧和腭侧多余的自凝胶，彻底打磨抛光，完成矫治器的最后制作。

经此法制作完成的上颌㖞垫式矫治器，㖞堤高度合适并且双侧易于达到平衡与稳定，因而大大节省了临床的椅旁工作时间，提高了临床工作效率，这是本方法最大的长处和优势。另外，经此法制作的矫治器还完全可以在早期就进行非常仔细的精加工处理，以至在给患者戴用时，矫治器的外观已经非常精美，有利于正畸临床服务水平的提高，值得推广和介绍。

关键词：反㖞；矫治器；㖞堤
中图法分类号：R783.2　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 林　珠，段银钟，丁　寅. 口腔正畸治疗学[M]. 北京：世界图书出版公司，1997. 396—403.

[2] 岸本正. 著，姚　森译. 图解活动矫治器[M]. 北京：世界图书出版公司，1992. 37.

（编辑　张大春）

作者简介：李雨轩(1975—)，女，天津市人，医师，主要从事口腔正畸修复方面的研究。电话：(023)68754439

收稿日期：2003-08-27；修回日期：2003-11-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net