DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.04.007

人 IL4基因转染胃癌细胞及其表达

周志强* 刘为纹 陈文生 孙贵银 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆, 630038

提 要 目的: 评价人 IL4 cDNA转染胃癌细胞株分泌 IL4的可行性和γ射线照射的安全性。方法: 用脂质体转染法将人 IL4 cDNA转入 SGC-7910人胃癌细胞株,并检测细胞分泌的 IL4和 50Gyγ射线照射对肿瘤细胞分泌的影响。结果: 人 IL4cDNA可以转染入人胃癌细胞,并表达有活性 IL4。基因转染可以明显增强 IL2激活的 LAK细胞的肿瘤杀伤作用。用大剂量的γ射线照射后,转染细胞仍可以持续分泌 IL4 3-4周。结论: 人 IL4cDNA转染不改变胃癌细胞的体外生长特性,但可以明显增强抗肿瘤免疫反应。大剂量γ射线照射可能是 IL4基因治疗的安全措施。

关键词 胃肿瘤;基因治疗;细胞因子
中图法分类号 R735.2

局部给予 IL4可以产生有效的抗肿瘤免疫反应,将 IL4基因转染到肿瘤细胞,可以避免全身应用 IL4所产生的副作用,并诱导产生抗肿瘤免疫反应。这些研究结果,使人们想到将 IL4基因转染到人肿瘤细胞,免疫治疗人类肿瘤,并寻找可靠的安全措施,以保证将基因修饰的肿瘤细胞回输给病人时的安全性[1]。我们研究了将人 IL4cDNA转染到人胃癌细胞的可行性,并观察了大剂量γ射线照射的安全作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养

SGC-7910胃癌细胞株,由第四军医大学樊代明教授惠赠,亲本胃癌细胞株及 IL4基因转染的胃癌细胞株均培养于 10% 小牛血清的 RPMI 1640培养基。

1.2 IL4cDNA真核表达载体构建

cDNA真核表达载体 BMGNeo由瑞士巴塞尔免疫研究所 Karasuyama 博士惠赠[2],人 IL4cDNA由美国 Podack 教授惠赠[3]。质粒提取,酶切,连接按《分子克隆》有关章节进行[4]。人 IL4cDNA插入到 BMGNeo的 Xho I位点。提取 BMGNeo-hIL4,酶切后,0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3 IL4 cDNA转染人胃癌细胞株 SGC-7910细胞

应用脂质体转染法(试剂盒购于美国 Life Techologic, Inc),将 BMGNeo-IL4转染入人胃癌细胞株 SGC-7910细胞(操作按试剂盒说明书进行)。以 G_{418} 500μg/ml选择培养后,用有限稀释法进行克隆化培养。

1.4 人 IL4活性测定

随机挑选 8个阳性克隆,用 ELISA检测法测定 IL4含量(人 IL4 ELISA检测试剂盒,购于北京医科大学免疫系,操作按试剂说明书进行)。

1.5 Southern blot

BMGNeo-hIL4扩增提取得到 548bp的人 IL4 cDNA探针。提取细胞 DNA, Hind酶切后,电泳,转膜,预杂交,杂交,放射自显影判断结果。

1.6 细胞 HLA-ABC, HLA-DR抗原表达

应用 SP方法(试剂盒购于福州迈新公司)检测人 HLA-ABC, HLA-DR抗原表达(鼠抗人 HLA-ABC, HLA-DR单抗购于军事医学科学院)。用流式细胞仪定量检测胃癌细胞的 HLA-ABC抗原表达。

1.7 LAK细胞的细胞毒作用

外周血淋巴细胞分离,诱导产生 LAK细胞,按效应细胞和靶细胞比率为 5∶1,加入 LAK细胞和胃癌细胞,以 MTT法测 LAK细胞的肿瘤杀伤作用。

1.8 培养细胞γ射线照射

亲本肿瘤细胞和转染 IL4 cDNA胃癌细胞株,接种于多孔培养板,用 Co^{60}照射 50 Gy,照射后继续培养,每 3 d换液 1次,收集 3、9、15、21 d的培养上清,冻存于 -20℃,用于检测 IL4,以 0.25% 胰酶消化细胞,台盼蓝染色,显微镜下计数活细胞数,计算活细胞百分率。

2 结果

2.1 IL4 cDNA的转染与表达

以脂质体转染法,将人 BMGNeo-hIL4, BMGNeo载体转染入 SGC-7910胃癌细胞株。经 G_{418}选择后,随机挑选 8个阳性克隆,以 ELISA测定法检测各克隆培养 (1×10^6个细胞, 24 h)上清中人 IL4水平为 20.0~60.12μg/L,其中 3G-IL4分泌 IL4水平最高,而 G及 G-Neo胃癌细胞株,均未检测到分泌的 IL4 扩增 3G-IL4克隆,用于进一步实验,见表 1

* 周志强 男, 33岁,博士,现在南京军区总医院消化内科工作 南京, 210000

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

表 1 IL_4 cDNA转染胃癌细胞株表达 IL_4水平

Tab 1 Expression level of IL_4 in gastric cancer cells after transfecting IL_4 cDNA

Gastric cancer cell	IL_4/μg/L
SGC-7901(G)	-
SGC-7901-Neo(G-Neo)	-
1-IL_4(1G-IL_4)	38.85
2-IL_4(2G-IL_4)	20.01
3-IL_4(3G-IL_4)	60.12
4-IL_4(4G-IL_4)	51.52
5-IL_4(5G-IL_4)	20.57
6-IL_4(6G-IL_4)	41.14
7-IL_4(7G-IL_4)	55.2
8-IL_4(8G-IL_4)	28.5

2.2 Southern blot结果

以 P标记的人 IL_4cDNA(548 bp)为探针,进行 Southern blot印迹分析,结果,G,G-Neo在11.5 kb处有一阳性信号。G-IL_4除 11.5 kb处有一阳性信号,在5.0 kb处还有一阳性信号,表明外源性 IL_4cDNA已转入人胃癌细胞株,见图1

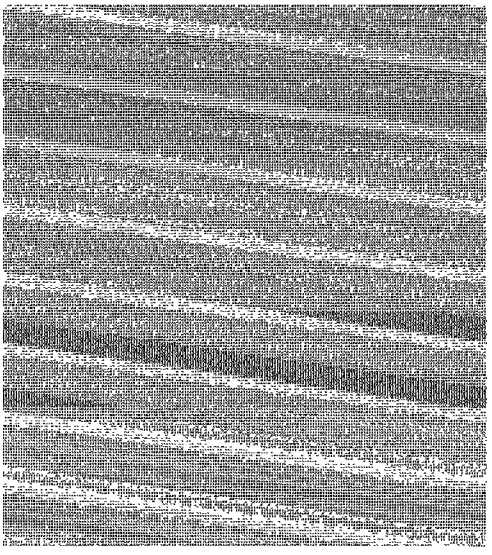


图 1 IL_4 cDNA转染胃癌细胞株 Southern blot印迹分析

Fig 1 Southern blot analysis for gastric cancer cells after transfecting IL_4 cDNA

Note: Using a probe of human IL_4 cDNA
a: G-IL_{2-4} b: G-IL_{2-4} c: G-Neo d: G

2.3 胃癌细胞体外生长情况

显微镜下观察细胞体外生长情况,G-IL4和 G-Neo胃癌细胞株的生长形态无明显差异。以 MTT法测细胞增殖能力,结果 G,G-Neo和 G-IL4细胞的增殖能力均无明显差异。表明载体及 IL_4cDNA转染,并不影响胃癌细胞的体外生长特性。

2.4 细胞 HLA-ABC,HLA-DR抗原表达

应用 SP免疫组织化学方法和流式细胞仪检测胃癌细胞株表面 HLA-ABC和 HLA-DR抗原表达,结果表明,IL_4cDNA转染胃癌细胞株,并不改变胃癌细胞表面 HLA-ABC和 HLA-DR抗原表达,见表2

表 2 IL_4 cDNA转染胃癌细胞株的 HLA-ABC,HLA-DR抗原表达

Tab 2 Expression of HLA-ABC and HLA-DR antigen in gastric cancer cells after transfecting IL_4 cDNA

Cancer	Cell	HLA-ABC	HLA-DR
G	a	++	-
	b	76.3±21.8	
G-Neo	a	++	-
	b	72.8±22.5	
G-IL_4	a	++	-
	b	71.6±22.3	

a. Immunohistochemical analysis b. Mean fluorescence

2.5 LAK细胞肿瘤杀伤作用

以 MTT比色法测 LAK细胞的肿瘤杀伤作用,结果 G-IL_4组 LAK细胞的杀伤率为 57.33%±6.5%,G-Neo组为 33.86%±3.5%,G组为 34.30%±3.65%,说明 IL_4cDNA转染人胃癌细胞株后,分泌的 IL_4可以明显增强 LAK细胞的肿瘤杀伤作用。

2.6 γ射线照射培养细胞

我们观察了γ射线照射作为安全措施,对胃癌细胞株生长能力和分泌细胞因子的影响,结果表明,照射 50 Gy的γ射线后,基因转染胃癌细胞仍可持续分泌 IL_4,照射后3~15 d,IL_4分泌增加,随后减少直至21 d培养过程中活细胞数减少,照射后21 d,仅有10%的细胞存活,表明胃癌细胞株已经失去生长能力,见图2,3

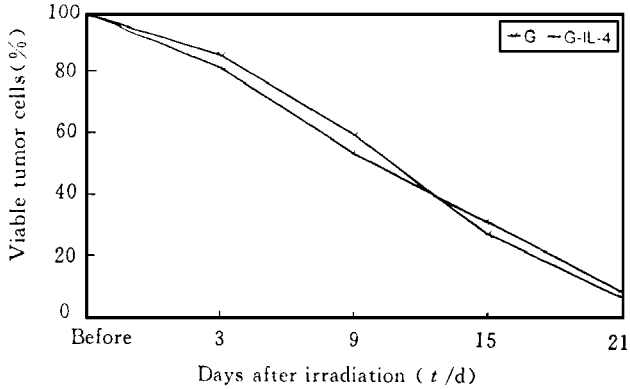


图 2 γ射线照射后存活的 IL_4基因转染细胞

Fig 2 Survival of G-IL_4 cells following gamma-irradiation with 50 Gy

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

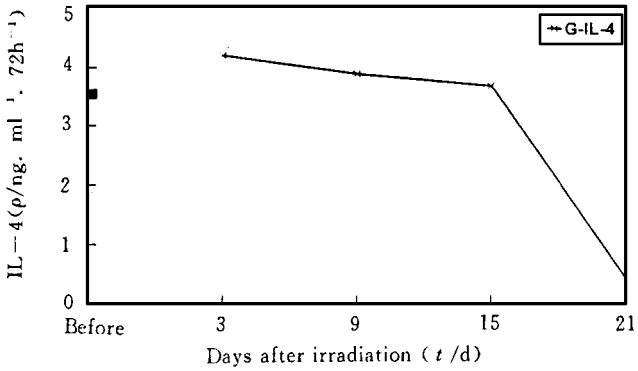


图 3　γ 射线照射后胃癌细胞株的 IL_4表达水平

Fig 3　Effect of gamma-irradiation on the release of IL_4 from G-IL_4 cells

3　讨论

细胞因子在抗肿瘤免疫反应中具有重要作用.但是全身给予细胞因子不符合细胞因子的作用机理,由于它们在远离肿瘤的血管中常为高浓度,且表现为严重的毒副作用,而在肿瘤局部,则达不到有效的治疗浓度,无明显的治疗作用.细胞因子在肿瘤局部与抗原递呈信号一起才能诱导产生强烈的抗肿瘤免疫反应[5].一些实验已表明,在肿瘤局部注射细胞因子可产生明显的抗肿瘤作用,将细胞因子基因转染到肿瘤细胞,可以持续在肿瘤局部表达细胞因子,直到肿瘤被排斥,而全身血液中的细胞因子浓度低于作用于受体的有效浓度,因而可以避免产生严重的毒副作用[6].这些实验结果促使人们研究将细胞因子基因转染到人类肿瘤细胞,治疗人类肿瘤的可行性.

我们应用脂质体转染法,将人 IL_4cDNA转染到人胃癌细胞株 SGC-7910,结果表明,转染细胞可以表达有活性的 IL_4 基因转染与表达并不改变胃癌细胞的体外生长特性和表面抗原表达,但可以明显增强免疫效应细胞,如 IL_2激活的 LAK细胞的肿瘤杀伤作用.在人体内进行转细胞因子基因免疫治疗肿瘤时,应该完全消除转基因细胞的致瘤性,以保证临床应用的安全性,同时所用的方法,不能消除细胞分泌 IL_4的能力和它的免疫原性.大剂量的 γ 射线照射转基因细胞是安全有效、简单易行的方法[7].体外以 50 Gyγ 射线照射 G-IL_4细胞后,失去增殖能力的存活细胞,仍保持一定的代谢能力,并持续分泌 IL_4 2~ 3周.这对于避免将有致瘤能力的细胞输入病人体内和在肿瘤局部持续分泌细胞因子有重要意义.

本实验结果表明,人 IL_4cDNA可以转入人胃癌细胞株,并表达有活性 IL_4;大剂量 γ 射线照射可能是消除转基因细胞致癌性,并维持其分泌作用的可行方法.

参考文献

1 Whartenby K A, Abboud C N, Marrogi A J *et al*. Biology of disease: the biology of cancer gene therapy. Lab Invest, 1995, 72: 131

2 Karasuyama H, Melchers F. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4, or 5, using modified cDNA expression vectors. Eur J Immunol, 1988, 18: 97

3 Lichtenheld M, Olsen K J, P Lu *et al*. Structure and function of human perforin. Nature, 1988, 335: 448

4 金冬雁,黎孟枫等译.分子克隆.第二版.北京:科学出版社, 1993. 456~ 491

5 Plautz G, Yang Z Y, Wu B Y *et al*. Immunotherapy of malignancy by *in vivo* gene transfer into tumors. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 4645

6 Pardoll D M: Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. Ann Rev Immunol, 1995, 13: 399

7 Bannerji R, Arroyo C D, Cordin-Cordo C *et al*. The role of IL-2 secreted from genetically modified tumor cells in the establishment of antitumor immunity. J Immunol, 1994, 152: 2324

(收稿: 1996-10-31;修回: 1997-07-10)

(编辑　仇玉福)

Human IL_4 gene transfers into gastric cancer cells and its expression *in vitro*

Zhou Zhiqiang, Liu Weiwen, Chen Wensheng, Sun Guiying (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To evaluate the possibility of continuous production of IL_4 by a human IL_4 gene-transfected human gastric cancer cell line (GCC) and the safety of γ-ray irradiation. Methods: After the human IL_4cDNA was transfected into the SGC-7901 line with the plasmid vector, the effects of IL_4 secreted by the cells and γ-ray irradiation on the secreting function of the cancer cells were detected. Results: The pro-

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

ductive insertion of IL_4 gene was achieved. Gene transfection markedly enhanced the tumor-killing effects of LAK cells activated by IL_4. After γ-ray irradiation, the transfected cells continued to secrete IL_4 for about 3 to 4 weeks. **Conclusion:** Transfection of human IL_4 cDNA can not change the *in vitro* growth characteristics of cancer cells, but it can significantly enhance antitumor immune response. γ-ray irradiation might be a safe measure in the treatment of gastric cancer with IL_4 gene.

Key words gastric neoplasm; gene therapy; cytokine

脑创伤早期炎性损伤机理与继发性脑肺损伤关系的实验研究*

Experimental studies on the relationship between the mechanism of inflammatory injury and secondary injury of the brain and lung in the early stage of cerebral trauma

朱 刚** 王宪荣 (第三军医大学附属西南医院神经外科) 重庆, 630038
王正国 朱佩芳 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室) 重庆, 630042

白细胞介素-1(IL-1)是炎性细胞因子中的关键因子之一,在炎症反应调节中起重要作用。近年的研究发现在正常情况下,脑组织中 IL-1的表达分泌很少,但在多种病理条件下,脑内 IL-1的表达分泌可大量增加,提示 IL-1在原发脑损伤后脑细胞继发性损伤中可能起重要作用。细胞间粘附分子-1(ICAM-1),血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)是粘附分子超家族的重要成员和炎症反应调节的重要因子。近年来发现脑组织细胞,尤其是组成血脑屏障(BBB)的细胞,如脑血管内皮细胞、星形胶质细胞上也有 ICAM-1, VCAM-1分布。目前,对 IL-1及 ICAM-1, VCAM-1在脑内分布的病理生理意义尚认识不足。有关脑创伤后伤侧脑组织内 IL-1及 ICAM-1, VCAM-1的变化及其介导的炎性损伤在继发性脑损伤(SBI)发病机理中的作用还不够了解。

急性肺损伤(ALI)是严重颅脑外伤常见的并发症和增加伤员死残率的重要原因。ALI的发病原因较多且复杂,有关机理仍不清楚。近年,炎性细胞因子、粘附分子介导的炎性损伤在 ALI发病过程中的作用越来越受到重视。在多种病理生理情况下,细胞大量表达分泌炎性细胞因子,并上调粘附分子的表达分泌,进而引发一系列瀑布样炎症反应过程可能是 ALI发生发展的重要机理之一。目前,有关颅脑外伤后肺内 IL-1β、ICAM-1和 VCAM-1变化及其意义的研究较少。

本研究通过大鼠脑撞击伤模型,观察了脑创伤早期,伤侧脑组织含水量及 IL-1β、ICAM-1、VCAM-1、髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)和超氧歧化酶(SOD)的含量及活性变化;以及 rh IL-1β、IL-1β多克隆抗体和 N乙酰半胱氨酸(NAC)对上述指标的影响。用原位杂交、免疫细胞化学和病理学方法观察了脑创伤后 IL-1β、ICAM-1、VCAM-1在伤侧脑组织内和肺内的表达分泌及分布情况,以及 rh IL-1β、IL-1β多克隆抗体和粘附分子抑制剂 NAC的影响。结果显示,脑创伤后伤侧脑组织出现以 IL-1β、ICAM-1、VCAM-1表达分必增加、BBB通透性增加及多形核粒细胞(PMN)侵入、聚集伤侧脑组织为特征的急性炎症反应。IL-1β多克隆抗体和 NAC显著抑制脑创伤后脑组织 IL-1、ICAM-1、VCAM-1的表达分泌、减轻脑水肿和 PMN在脑组织内侵入和聚集。研究发现 IL-1可显著上调 ICAM-1、VCAM-1的表达分泌;引起脑内胶质细胞及炎性细胞释放各种自由基引起炎症反应和脑损伤。侵入并聚集脑组织中的 PMN可引起脑微血管"无灌流"现象,加重脑组织缺血缺氧;同时,PMN释放大量炎性介质和自由基,导致脑组织瀑布样炎性损伤。脑创伤后,肺组织 IL-1β、及 ICAM-1和 VCAM-1表达分泌增加可能与脑创伤后肺损伤机理有关。因此,脑创伤后脑肺组织 IL-1β、ICAM-1、VCAM-1的表达分泌增加,以及 PMN入侵并滞留于伤侧脑实质是脑创伤后脑、肺组织炎性损伤的基础和继发性脑、肺损伤发病的重要原因之一。抗炎治疗是颅脑外伤及其肺部并发症治疗的有益途径。

关键词 脑损伤;白细胞介素-1;细胞间粘附分子-1;血管粘附分子-1;血脑屏障;急性肺损伤
中图法分类号 R651.15
(收稿: 1997-06-30;修回: 1997-07-18)
(编辑 冷怀明)

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39630330
** 朱 刚,男,36岁,讲师,主治医师,博士研究生

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