DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.01.009

重组人肿瘤坏死因子对人结肠癌SW-480细胞在体外的杀伤作用研究*

张胜本 周晓武 张连阳 黄显凯 (第三军医大学大坪医院普通外科) 630042

提 要 文中报道了重组人肿瘤坏死因子(rhTNF)对人结肠癌细胞株SW-480的克隆抑制和细胞毒作用。改良噻唑兰(MTT)法表明TNF在60 000 u/ml时才有明显的细胞毒作用说明SW-480对TNF低度敏感,而且无剂量依赖关系。但克隆抑制试验表明10 u/ml就可明显抑制SW-480集落的生长,并有剂量依赖性,且在剂量150 u/ml以上时抑制作用随时间而增强。^{3}H-TdR掺入测定的TNF抑制SW-480细胞DNA合成和MTT法测定的细胞毒曲线一致说明TNF对SW-480的主要作用是抑制DNA合成。TNF对SW-480抑制后超微结构变化:最初是胞膜出现微孔,然后细胞内线粒体变性,溶解,核固缩,溶解,最后细胞溶解。这些结果与MTT法细胞毒试验及^{3}H-TdR掺入试验相结合说明TNF对SW-480杀伤作用主要针对细胞核内外染色体的DNA合成上。

关键词 肿瘤坏死因子;结肠肿瘤;SW-480细胞
中图法分类号 R730.51

肿瘤坏死因子具有杀伤多种肿瘤细胞而不损伤正常细胞的特性[1~3],为肿瘤治疗提供了新手段。通过生物工程方法生产了重组人肿瘤坏死因子(recombinant human tumor necrosis factor,rhTNF)[3~6]。本文研究rhTNF对SW-480结肠癌细胞株的体外作用并探讨作用机制。

1 材料和方法

1.1 癌细胞株

引进美国凯特林癌症中心结肠癌SW-480细胞。

1.2 主要试剂

1.2.1 重组肿瘤坏死因子(rhTNF):由本院野战外科研究所二室提供。比活性2.5×10^7/mg(L_{929}靶细胞法),纯度>95%(SDS-PAGE)。

1.2.2 RPMI1640培养液。以RPMI,Hepes(美国)及$NaHCO_3$配成。用前加入青、链霉素各100 u/ml及10%小牛血清。

1.2.3 0.25%胰蛋白酶(Sigma)。

1.2.4 0.01 mol/L磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)[7]。以NaH_2PO_4及Na_2HPO_4配成。

1.2.5 噻唑蓝(MTT,美国)。MTT 5 mg溶于0.01 mol/L PBS 10 ml配成0.5 mg/ml浓度。

1.2.6 十二烷基硫酸钠(SDS)。SDS 20 g溶于50%二甲基甲酰胺,总量100 ml,用1 nmol/L HCl,80%醋酸调pH至4.7。

1.2.7 氚-胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)。配成放射性浓度1 mci/ml。用时随需要稀释。

1.2.8 闪烁液(PPO及POPOP)。PPO 5.0 g,POPOP 0.5 g加入二甲苯1 000 ml,分装备用。

1.3 方法

1.3.1 rhTNF细胞克隆抑制试验[8]:将SW-480细胞置37℃二氧化碳孵箱过夜,细胞贴壁后更换培养液,再培养24~48 h,细胞呈指数生长旺盛期,吸去上清,加胰蛋白酶消化5 min后弃去,用培养液将SW-480吹打为单细胞悬液,离心,再用培养液将细胞悬液浓度调至1×10^4个/ml。

将上述悬液加入24孔培养板1 ml/孔,孵箱培养24 h,细胞贴壁后吸去上清,加培养液1 ml。第二孔加TNF 4 800 u/ml 1 ml。混合后吸出1 ml加入第二孔,依次倍比稀释到5 u/ml。设对照组8个孔。稀释完成后置二氧化碳孵箱,于24、48、72、96 h取出在倒置显微镜下计算集落数。大于5个细胞为一集落。每孔集落数为上下左右及中心五个视野集落的均数。计算:

$$克隆抑制率(\%)=(1-\frac{实验组集落数}{对照组集落数})\times100\%$$

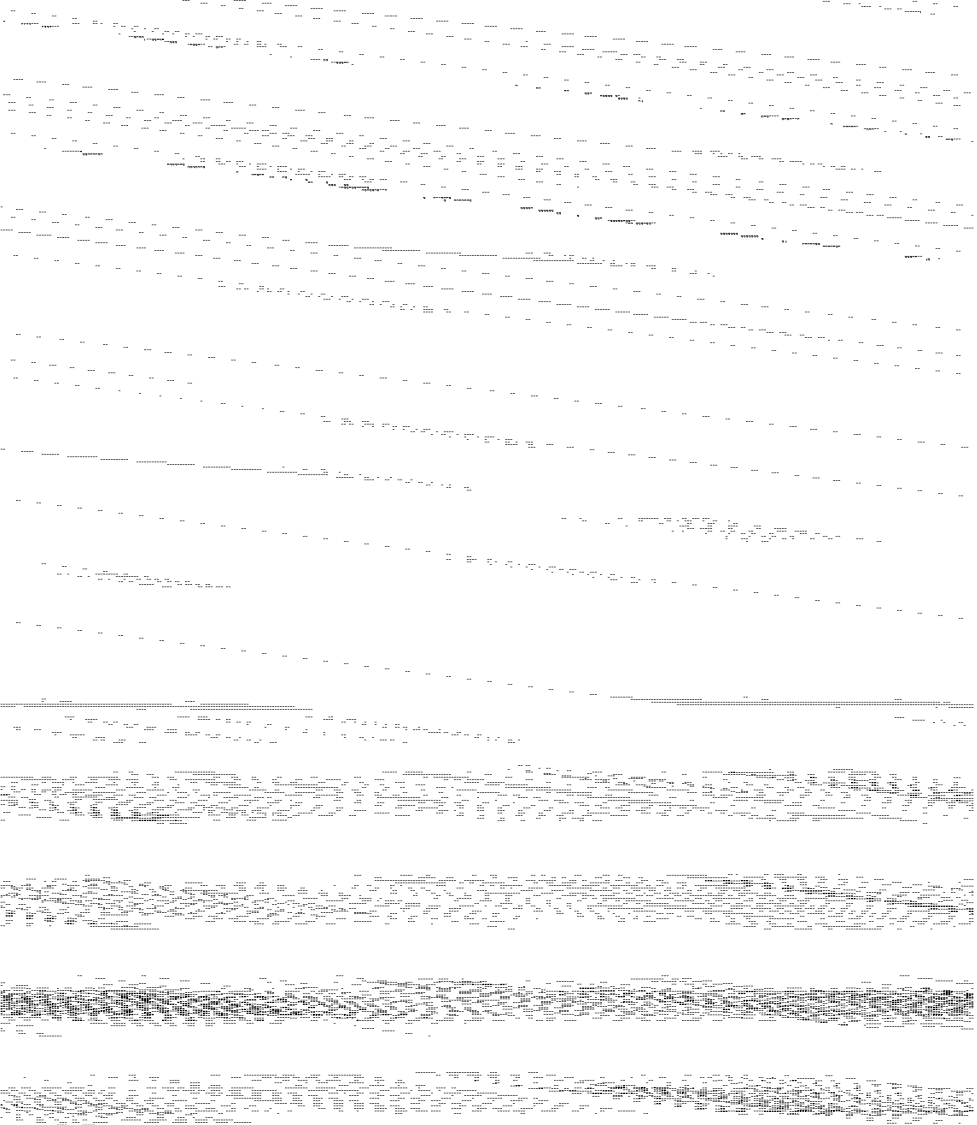
1.3.2 rhTNF细胞毒性试验[9]:SW-480 1×10^5个/ml接种在40孔板上每行第二孔起,100 μl/孔。第一孔以培养液作对照,第二孔为细胞对照。第三孔始加TNF 480 000 u/ml 100 μl/孔,混匀后吸100 μl入第4孔,依次倍比稀释到TNF 1 875 u/ml,于孵箱内培养4 d。结束前2 h加MTT 10 μl/孔,结束时加入SDS 100 μl/孔,培养过夜。次日在酶标仪上选590 nm波长处测每孔光密度(OD)。算出:

$$杀伤率(\%)=(1-\frac{实验组\ OD}{对照组\ OD})\times100\%$$

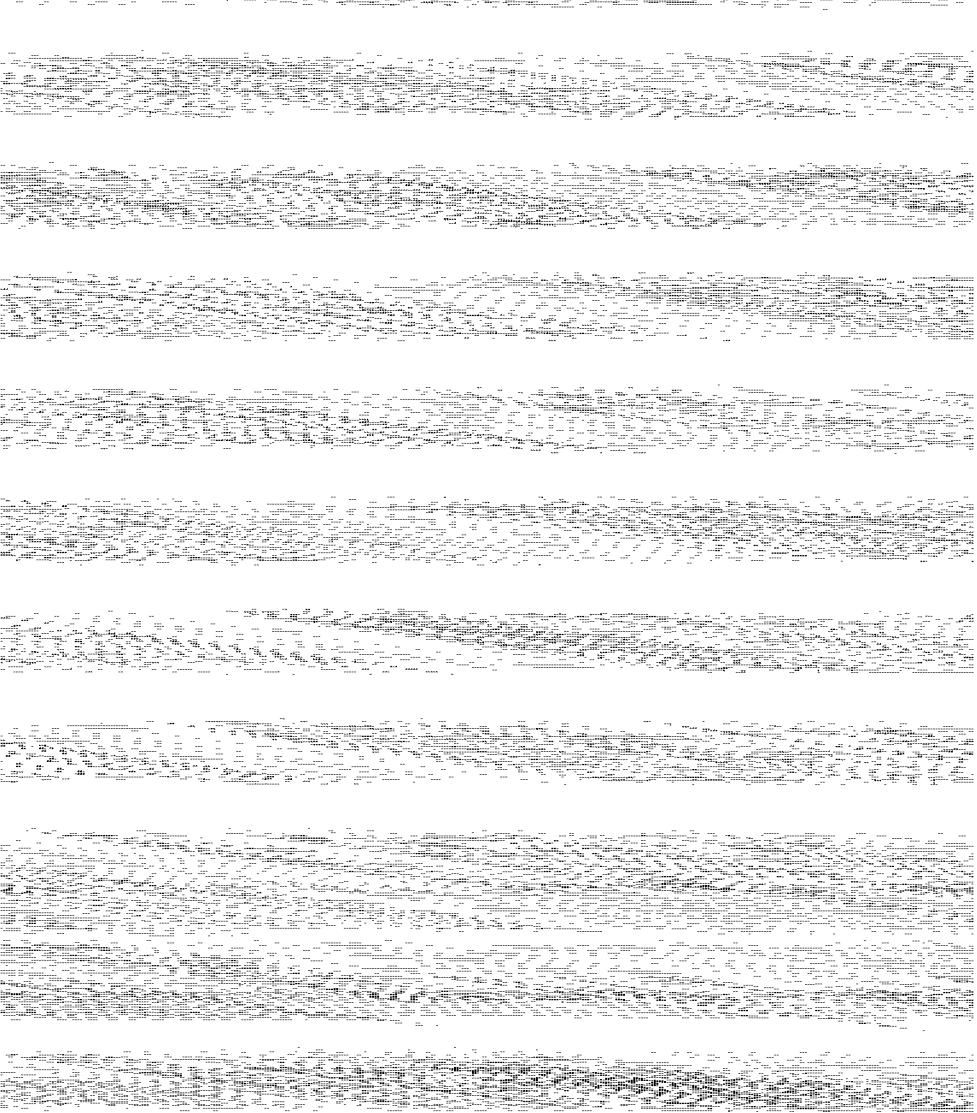
1.3.3 ^{3}H-TdR掺入率测定[10]:SW-480 1×10^5个/ml接种在40孔板上,100 μl/孔。培养24 h后吸去上清,加培养液100 μl/孔。每行第一孔为对照。二孔起加TNF 480 000 u/ml 100 μl/

* 国家自然科学基金资助项目,No.39270656

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



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



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

代谢成蓝紫色的甲臜，沉积于细胞周围，它可被20% SDS完全溶解。故甲臜的量和活细胞成正比，被TNF杀死的细胞则无此作用。故可用酶标仪测定光密度(OD)判定活细胞量决定TNF杀伤力。本实验发现TNF杀死SW-480的浓度到6×10^4 u/ml才明显增加，并且无剂量依赖(图2)。

以上结果说明：(1)SW-480细胞对TNF属于低敏感细胞，较之乳癌、黑色素瘤、宫颈癌的敏感性为差[15]。(2)TNF对S-480杀伤力虽较差，但对该细胞集落生长抑制作用却很强，TNF 10 u/ml就有显著的抑制作用。实验证明在2 400 u/ml浓度时SW-480杀伤率在5%以下(图2)，但对细胞克隆的抑制作用则非常显著(图1)。故在SW-480被TNF杀死前有一细胞生长被抑制过程，该过程与TNF剂量有关，可能是TNF被降解消耗的过程，只有达到一定浓度(150 u/ml)才能对SW-480细胞10^4个/ml有持续的抑制作用(图1)。(3)利用TNF细胞毒性作用治疗癌肿，需用大剂量，大剂量除价格昂贵外，还有较多副作用，故利用其克隆抑制作用与其它化疗药配伍应是今后的方向。

3.2 rhTNF杀伤作用与DNA抑制作用的关系

胸腺嘧啶核苷(TdR)，是合成DNA的前体。利用同位素^{3}H-TdR掺入可反映DNA合成受抑制情况。^{3}H-TdR掺入可得到定量的概念，药物对核酸前体掺入的程度可定量地反映肿瘤细胞对所测药物的敏感性[10]。本组所测结果与MTT法所测杀伤力一致。这说明DNA合成障碍是TNF杀伤SW-480细胞主要环节。

3.3 rhTNF在体外对SW-480细胞作用机理推测

3.3.1 受体问题：国外不少学者做了很多工作，他们证明不通过胞膜把TNF注入胞浆无杀伤作用；蛋白酶破坏和TNF抗体阻断受体也使TNF无杀伤作用[1,4]。扫描电镜发现12 h TNF使SW-480胞膜出现微孔后，以后外表变化不大；后期在两种电镜照片中都可见细胞裂解。扫描电镜所见胞膜微孔是否为受体与TNF结合后进入细胞部位还有待进一步证明。本实验说明抑制过程为TNF消耗过程，但也还需其它实验进一步证实。

3.3.2 关于rhTNF导致的胞内变化。以上已证明DNA合成障碍是TNF杀伤SW-480细胞的主要环节。在扫描电镜下未见变化时，透射电镜下可见胞内细胞器一系列变化，直到两种镜下都见到细胞裂解；这与^{3}H-TdR掺入试验和MTT法试验的结果一致，都证明TNF是在核内染色体和核外染色体(如线粒体)的DNA上影响SW-480细胞生存与代谢的。但试验发现对SW-480细胞杀伤和DNA抑制在1.2×10^5 u/ml时达到顶峰，浓度增加作用反而下降。Ruggiero[3]认为是"保护因子"与杀伤作用同时存在的双向性，但还有等进一步的证明。

参考文献

1 Wang AM, Ccreasey AA, Ladner MB, et al. Moleuclar cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. Science, 1985, 228: 149

2 Iwasaka T, Hara K, Hayashi Y, et al. Antitumor effects of Human recombinant interferon-γ and tumor mecrosis factor on Gynecologic. Oncology, 1991, 42: 39

3 Ruggiero V, Latham K, Baglioni C. Cytostatic and cytotoxic of tumor necrosis factor on human cancer cells. The Journal of Immunology, 1987, 138: 1711

4 Marmenout A, Fransen L, Taverner J, et al. Molecular cloning and expression of human tumor necrosis facctor and comparison with mouse tumor necrosis factor. Eur J Biochem, 1985, 152: 515

5 Beardsley T. Drug agency jump TNF gun. Nature, 1985, 315: 145

6 Shirai T, Yamaguchi H, Ito H, et al. Cloning and expression in Escherichia coli of the geng for human tumor neccrosis factor. Nature, 1985, 313: 803

7 蔡文琴，王伯云. 实用免疫细胞化学. 成都：四川科学技术出版社，1988：437～438

8 徐 迈，董 明，王 兰，等. 大肠癌NSX 42129肺高转移株建立及其生物特性. 中国医科大学学报，1992，21(1)：21

9 Tada H, Shiho O, Kuroshima K, et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. Journal of Immunological Methods, 1986, 93: 157

10 许德凤，赵慧君，杨 洁，等. 人癌细胞短期培养——抗癌药物试验及其临床应用. 肿瘤，1988，8(5)：252～254

11 Tsujimoto M, Yip YK, Vilcek J. Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 7626

12 Tsujimoto M, Teinman R, Vilcek J. Differential effects of type 1 IFN and IFN-γ on the binding of tumor necrosis factor to receptors in two human cell lines. The Journal of Immunology, 1986, 137: 2272

13 谢克平，姚立人. 肿瘤坏死因子的抗肿瘤作用机理. 国外医学：肿瘤分册，1988，137：200

14 Baglioni C, Ruggiero V, Lathan K, et al. cytoccidal activity of tumor necrosis facctor; protection by protease inhibitors. Ciba Foundation Symposium, 1987, 131: 52

15. 贾凤兰，Pichuangkul S, Khan A. 肿瘤坏死因子(TNF)的细胞毒作用. 中华微生物学和免疫学杂志，1988，8(1)：25

(收稿：1994-05-19；修回：1994-12-06)

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

Studies of the effects of recombinant human tumor necrosis factor on human colon carcinoma cell line SW-480 in vitro

Zhang Shengben, Zhou Xiaowu, Zhang Lianyang, Huang Xiankai (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract The cytotoxic and colony inhibiting effects of recombinant human tumor necrosis factor (rhTNF) on human colon carcinoma cell line SW-480 were observed in vitro with modified MTT and ^{3}H-TdR incorporation. It was found that rhTNF 60 000 u/ml exerted obvious cytotoxic effect on SW-480 cells and the effect was not dosage-dependent. The SW-480 cells seemed to be low sensitive to rhTNF. However, the colony inhibiting test revealed that rhTNF 10 u/ml was capable of inhibiting the growth of SW-480 cell colonies in a dosage=dependent manner. When the dosage of rhTNF was larger than 150 u/ml, the inhibition was increased with the prolongation of time.

The ultrastructural changes of SW-480 cells after rhTNF treatment were small holes on the cell membrane in the initial stage, then degeneration and lysis of the mitochondria, pyknosis, karyolysis and eventually cytolysis.

On the basis of the fact that the curve of the cytotoxic effect of rhTNF determined with MTT and that of the colony inhibiting effect determined with ^{3}H-TdR incorporation were consistent, it is believed that the lethal effects of rhTNF on the SW-480 cells were mainly on the inhibition of the DNA synthesis of intra- and extranuclear chromosomes of the cells.

Key words tumor necrosis factor; colonic neoplasms; SW-480 cells

原发性肝癌 P^{53} 基因249编码区点突变的研究

Study of the P^{53} gene mutation at codon 249 in primary hepatocellular carcinoma

肖文华 刘为纹 罗元辉 鲁 荣 (第三军医大学西南医院消化内科) 630038

本文采用 PCR－RFLP 法对原发性肝细胞癌 P^{53} 基因第249编码区的点突变进行分析，探讨其在肝癌发生中的作用。

1 材料和方法

25例肝癌组织为我院手术切除标本，均经病理证实。手术切下肿瘤后立即收集癌组织，剔除出血坏死部分后置液氮中，－70℃贮存。按文献提取基因组 DNA[1]。

PCR 引物由中国科学院上海细胞生物所合成，上游引物序列：5′－CACAGTCTTTATTCTTCAGCG－3′；下游引物序列：5′－CGAAGAGTGAAGTGCACAGG－3′。取约1 μg 组织 DNA 溶于40 μl PCR 缓冲液中(10 mmol/L Tris－HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 200 μmol/L dNTP, 1 μmol/L 引物，2～3u Taq DNA 多聚酶)，PCR 扩增仪(Perkin Elmer Cetus)上操作：93℃变性35 s，55℃退火40 s，72℃延伸1 min。循环35次后，72℃延伸10 min。取7 μl 扩增产物在2%琼脂糖凝胶电泳上确定扩增效果。

PCR 扩增产物用酚/氯仿抽提，乙醇沉淀，真空抽干，去离子水溶解，加 Hae Ⅲ 消化，37℃过夜。酶解产物8%聚丙烯酰胺电泳分离，EB 染色，紫外光下观察并照像。

结果判定：DNA 经 PCR 扩增后，扩增片段长164 bp，用 Hae Ⅲ 酶切后野生型被切为90，46和27 bp 三个片段，突变型则为136，27 bp 两个片段[1]。

2 结果

在25例肝癌中有5例出现136 bp带，即249位密码子发生突变。

3 讨论

抗癌基因 P^{53} 与细胞增殖分化的调节有关，因其蛋白产物对几种细胞生长负调控基因有调节作用，它的失活将导致细胞的异常增殖。而 P^{53} 基因突变是其失活的主要途径之一，也是许多肿瘤发生的一个共同现象[2]。尤其是位于高度保守区的249位密码子突变是当今肝癌 P^{53} 基因突变研究的热点所在。在黄曲霉毒素 B_1 (AFB_1) 污染严重的地区，如我国的启东以及南非地区，该位点在肝细胞癌的突变率可高达50%，并认为 P^{53} 基因第249位密码子为 AFB_1 作用的靶位点[3,4]。最近 Aguilar[5] 在体外实验也证实 AFB_1 作用的特异位点为 P^{53} 基因第249位密码子。然而，肝癌的发生是受多因素影响的，不同地区的肝癌因病

(下转 60 页)

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