

# 细胞因子基因修饰人口腔鳞癌 细胞株的建立及鉴定<sup>①</sup>

张 谦<sup>②</sup> 张志光

(中山医科大学孙逸仙纪念医院口腔颌面外科; 广州, 510120)

张腾飞 胡 亮 陈诗书

(上海第二医科大学人类基因治疗研究中心; 上海, 200025)

**摘 要** 用 PA317包装的携带人 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  或 IL-2 cDNA 3种逆转录病毒载体用来转染人口腔鳞癌细胞株 Tca-8113 经新霉素衍生物 G418筛选出抗性克隆并扩增产生子代株。PCR和细胞因子生物活性测定证实细胞因子基因整合入基因修饰细胞并通过细胞分泌相应活性蛋白产物。本研究显示对口腔鳞癌细胞的逆转录病毒介导细胞因子的基因转移方法切实、可靠。基因修饰细胞株的建立为研究其生物学行为提供了实验对象。

**主题词** 口腔肿瘤 遗传学; 癌,鳞状细胞 遗传学; 细胞活素类 遗传学; 基因转染

**中图分类号** R 739.8

细胞因子基因修饰肿瘤疫苗是当前颇具希望的肿瘤基因治疗方法。它作为一种新型瘤苗,通过局部分泌细胞因子,模拟细胞因子生理作用形式,增强肿瘤疫苗免疫原性,达到提高宿主全身抗肿瘤免疫力的目的<sup>[1]</sup>。为便于开展口腔肿瘤领域细胞因子基因修饰瘤苗的研究,我们利用逆转录病毒载体分别介导 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-2基因转导口腔鳞癌细胞株 Tca-8113,建立相应基因修饰子株并通过鉴定。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

新霉素衍生物 G418和 RPMI-1640培养基购自 GIBCO公司;耐热 DNA Taq聚合酶及 PCR缓冲液购自复华公司。

### 1.2 细胞株及培养

口腔鳞癌细胞株 Tca-8113(上海第二医科大学生化教研室提供),培养液为 RPMI-1640培养基含 15% 热灭活小牛血清、100 kU/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素,在 37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养。

### 1.3 逆转录病毒载体

PA 317分泌各含重组复制缺陷病毒 L(IFN- $\gamma$ ) SN L(TNF- $\alpha$ ) SN 和 L(IL-2) SN 及空白病毒 L(XSN) 上清液由上海第二医科大学人类基因治疗研究中心

提供(LXSN中,E LTR长末段重复序列,X目的基因,S SV40即早启动子,N: NeoR新霉素磷酸转移酶基因),病毒滴度约为 10<sup>7</sup>~ 10<sup>9</sup> CFU/L。

### 1.4 基因转染及筛选

取近 80% 融合贴壁 Tca-8113细胞,各加入上述病毒上清 0.5~ 3 mL(感染指数 MOI 约为 0.5)和 polybrene 8 mg/L 次日换液消化,分瓶。第 3天加 0.4% G418筛选。随机挑取抗性克隆入 24孔板扩增培养(其中空白病毒感染细胞取混合克隆培养)。

### 1.5 PCR检测目的基因和标记基因

上述转染细胞及野生 Tca-8113细胞消化、离心沉淀后,加 STE裂解液,蛋白酶 K及 20% SDS,37°C 过夜后,以酚-氯抽提 DNA,经酒精沉淀后,溶于 TE。

PCR反应体积为 30  $\mu$ L,含上述待测 DNA 1  $\mu$ L (约为 1  $\mu$ g), 10 $\times$  PCR缓冲液 3 mL 特异引物各 2  $\mu$ L, 1.25 mmol dNTP 2  $\mu$ L 97°C 变性后,加 Taq酶 1  $\mu$ L,石蜡油 30  $\mu$ L覆盖。在 94°C 下置 5 min,再在 60°C 5 min后,经 35个循环(72°C 1 min 30s; 94°C 45s; 60°C 45s)最后在 72°C 下置 10 min 反应产物经 6% PAGE垂直凝胶电泳鉴定。

### 1.6 分泌细胞因子活性测定

接种  $\times 10^6$ 细胞,24h后收集培养上清液,参照

<sup>①</sup> 香港杨震基金资助课题,于上海第二医科大学人类基因治疗研究中心开放分子生物学实验室客座完成; <sup>②</sup> 第一作者,1970年出生,男,在读硕士生。

文献<sup>[2-4]</sup>分别测定 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-2 的活性。

## 2 结 果

### 2.1 建立基因修饰细胞株

选取各种病毒感染 Tca-8113 抗性筛选单克隆细胞株各一株定为研究鉴定对象,相应命名为 Tca-TNF、Tca-IFN 和 Tca-IL-2, 空白病毒感染细胞则为 Tca-LXSN。

### 2.2 基因修饰细胞基因组存在标记基因和相应目的基因

各基因修饰细胞 DNA 中均能扩增出外源目的基因和标记基因相应特异片段,而 Tca-8113 DNA 中未能扩增出 3 种外源细胞因子基因片段及本身不存在的 NeoR 标记基因片段。

### 2.3 细胞分泌相应活性蛋白产物

细胞常规培养,传代 2 个月间,定期测定 Tca-TNF、Tca-IFN 和 Tca-IL-2 分泌的相应细胞因子活性水平,依次为  $(100 \sim 150) \times 10^3$  U/L,  $(20 \sim 30) \times 10^3$  U/L,  $(20 \sim 40) \times 10^3$  U/L, 而 Tca-8113 和 Tca-LXSN 培养上清液中未测及上述细胞因子。

## 3 讨 论

### 3.1 选择载体

LN 载体是目前被改造较为先进的逆转录病毒载体,已被批准用作人类基因转移载体<sup>[5]</sup>。本研究利用其分别介导细胞因子基因转导 Tca-8113, 获得持续、稳定分泌一定生物活性细胞因子的 Tca-8113 衍生细胞株,经过 PCR 鉴定证实外源目的基因整合入宿主基因组,反映出该基因转移方法成功、可靠并且容易掌握。

### 3.2 转移效率和表达水平

研究中我们发现细胞因子基因重组病毒感染抗性克隆形成数目远低于感染指数相近的空白病毒感染克隆数,有似国内张腾飞等利用相同载体转导人肝癌、胃癌细胞的研究报告。作者认为部分转导的细胞特别是高分泌活性转导细胞在筛选中死亡而造成整体感染效率低下。本文报道的分泌细胞因子活性水平均不高,与一些类似报道相吻合<sup>[6,7]</sup>,可能是由于该类型表达载体在人癌细胞中本身受调控水平普

遍不高,同时也存在分泌活性较低的癌细胞易于存活的因素。一般认为,低分泌活性的细胞因子基因修饰肿瘤细胞作为疫苗,在体内不会被很快破坏,更有利于抗原提呈细胞 (APC) 对癌细胞表达抗原的加工和提呈,以及避免了高分泌活性细胞因子对机体产生的毒、副作用<sup>[8]</sup>。

### 3.3 应用前景

Tca-8113 是国内为数不多的一株体外长期建株口腔鳞癌细胞株。本研究选其作为靶细胞掌握逆转录病毒介导基因转移方法,目的在于进一步研究细胞因子基因修饰后口腔鳞癌细胞生物学行为是否改变,以明确细胞因子对口腔肿瘤的作用机制。同时为临床制备自身或异体基因修饰口腔肿瘤疫苗打下技术基础。

## 参 考 文 献

- 1 Padoll D M. Cancer vaccines. *Immunol Today*, 1993, 14(6): 310
- 2 Pestka S, McInnes J, Havell EA, *et al.* Cell-free synthesis of human interferon. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72(10): 3898
- 3 Aggarwal B B. Human tumor necrosis factor. In Disabatato G, ed. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1985. 441~ 448
- 4 Gillis S, Ferm M M, Ou W, *et al.* T-cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol*, 1978, 120(6): 2027
- 5 陈诗书, 汤雪明. *医学细胞与分子生物学*. 上海: 上海医科大学出版社, 1995, 555~ 570
- 6 Gansbacher B, Zier K, Cronin K, *et al.* Retroviral gene transfer induced constitutive expression of interleukin-2 or interferon $\gamma$  in irradiated human melanoma cells. *Blood*, 1992, 80(11): 2817
- 7 Gastl G, Finstad C L, Guarnini A, *et al.* Retroviral vector mediated lymphokine gene transfer into human renal cancer cells. *Cancer Res*, 1992, 52(22): 6229
- 8 Colombo M P, Forni G. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now? *Immunol Today*, 1994, 15(2): 48

(1996-11-15收稿 1997-02-28修回)

# ESTABLISHMENT AND IDENTIFICATION OF CYTOKINE GENE MODIFIED ORAL SQUAMOUS CARCINOMA CELL LINES

Zhang Qian      Zhang Zhiguang

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital,  
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

Zhang Tengfei      Hu Liang      Chen Shishu

(Research Center of Human Gene Therapy, Shanghai Second Medical University, Shanghai, 200025)

Retroviral vectors carrying human IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , or IL-2 cDNA respectively, packaged by PA317, were used to transfect a human oral squamous carcinoma cell line (Tca-8113). After transfection, resistant clones were selected by G418 and expanded into derivative cell lines. PCR and cytokine bioassays verified the integration of cytokines into the modified cells and the secretion of relative protein products with activity by these cells. These results suggested that oral squamous carcinoma cells can be successfully and stably transduced by retroviral vectors. The establishment of the genemodified cell lines provides objects for studies on their biological behaviour.

**Subject headings**      mouth neoplasms/genetics; carcinoma, squamous cell/genetics; cytokines/genetics; transfection

(上接第 129 页)

# ACTIVATION OF COMPLEMENT IN RENAL TUBULOINTERSTITIAL DAMAGE

Jiang Tang      Guan Weiming      Li Youji

(Department of Nephrology, First Affiliated Hospital,  
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

In 1994, 84 Kidney biopsy tissues were studied. Deposition of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) and various complement proteins (C1q, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 and terminal complement complex neoantigens) in tubular cells, tubular basement membrane and tubulointerstitial blood vessels were studied in serial sections by immunofluorescence microscopy in order to study the significance and effect of complement activation on tubulointerstitial damage. The results showed the normal kidney tissue appeared scattered C5, C6, C7-9, TCC neo-antigen deposition. In patients without tubulointerstitial lesion, there was no early complement protein deposition and weak-positive deposition of terminal complement complex neo-antigen. In patients with significant tubulointerstitial lesion, it showed persisting deposition of all complements, including early complements, media complements and terminal complements. Complement deposition was also accompanied with one or more kinds of immunoglobulin deposition at the same time. The complements and immunoglobulins often deposit at the same segment of tubular basement membrane. The finding suggested that there was close relationship between complements and immunoglobulins in tubulointerstitial damage. In lupus nephritis, mesangial proliferative glomerulonephritis and IgA nephropathy, early complement activation often appeared. Also, there was a relationship between TCC deposition and the degree of renal tubular cells damage. Therefore, it can be concluded that complements may be an important pathogenetic factor in tubulointerstitial damage.

**Subject headings**      nephritis, interstitial/immunology; complement activation/immunology