

特异性提高 TNFR55 在内皮细胞中的表达量的研究

孙晓文¹, 胡晓旻², 刘丽³

(1. 山东大学第二附属医院泌尿外科 济南 250033)

(2. 南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所 南京 210097)

(3. 空军总医院分子生物学研究中心 北京 100036)

[摘要] 以 KDR_p 为启动子, 实现 TNFR55 基因在内皮细胞中的特异表达, 提高其表达量. 构建特异表达 TNFR55 的逆转录病毒载体 pLXN-D299-KDR_p-TNFR55, 将编码 TNFR55 的 cDNA 转入内皮细胞中, 检测感染后的内皮细胞中 TNFR55 表达量的变化及其对 TNF 细胞毒作用的影响. 结果显示, TNFR55 在内皮细胞中的表达量有显著提高 ($P < 0.01$), TNF 对内皮细胞的细胞毒作用增强. 而同样经病毒感染的 NIH3T3 细胞表面 TNFR 的表达量无明显变化. 编码 TNFR55 的 cDNA 能够在 KDR_p 指导下实现在内皮细胞中的特异表达, 内皮细胞表面 TNFR 数量提高后能加强 TNF 对其的细胞毒作用.

[关键词] 肿瘤坏死因子受体; 表达; 基因治疗

[中图分类号] R730.5; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)02-0058-05

肿瘤的增长必须依靠血管的增生, 而正常组织中的血管处于稳定状态, 因此新生血管便成为基因治疗中很好的靶组织. 肿瘤组织中的血管内皮细胞不断分裂, 进而形成大量新生血管, 肿瘤坏死因子(TNF)通过破坏肿瘤组织中的血管内皮细胞, 使血管破坏、血栓形成, 起到抑制肿瘤的作用. 有体外实验表明, 提高肿瘤细胞表达 TNFR 的表达量可以加强 TNF 对肿瘤细胞的杀伤作用^[1, 2]. 我们以血管内皮细胞特异性启动子 KDR_p 取代逆转录病毒载体 pLXSN 自身的启动子, 从而启动 TNFR55 在血管内皮细胞 ECV304 中的特异性、高效性表达, 并观察了其对 TNF 细胞毒作用的影响, 为 TNFR55 用于基因治疗肿瘤奠定了实验基础.

1 实验材料

1.1 质粒和菌种

利用 RT-PCR 从 U937 细胞中获得了编码 pTNFR55 的 cDNA, 将它连于 pUC18 质粒, 备用. pLXSN-D299 为通过套式 PCR 技术去除 pLXSN 真核表达载体自身启动子的逆转录病毒表达质粒. KDR_p(the promotor of kinase domain receptor)为血管内皮细胞特异性启动子; 质粒 pLXSN-D299-KDR_p-TNF 为已构建成功的 KDR_p 为启动子的连有 TNF 基因的逆转录病毒表达载体; PA317 细胞系为逆转录病毒包装细胞系, ECV304 内皮细胞系为表达细胞, NIH3T3 鼠成纤维细胞系为表达对照细胞系. E. coli DH5 α 菌种为空军总医院分子生物学研究中心保存.

1.2 酶和主要试剂

限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、Polybrene、G418、Hyclone 胎牛血清购自 Promega 公司.

收稿日期 2001-02-01

作者简介: 孙晓文, 1973—, 山东大学第二附属医院泌尿外科专业博士研究生, 从事泌尿外科专业的学习与研究.

Lipofect^{AMINE}、DMEM、RPMI1640 细胞培养基均购自 GIBCO 公司.标准相对分子量 λ DNA/Hind III + EcoRI 购于华美公司,标准相对分子量 DL2000 购自大连宝生物技术工程公司.重组人肿瘤坏死因子(rhTNF α)购自北京华美公司,¹²⁵I 标记的肿瘤坏死因子(¹²⁵I -TNF α ,比活度为 259×10^{10} Bq/g)购自北京原子能研究院.其它化学试剂均为国产或进口分析纯.

2 实验方法

2.1 质粒提取、基因的克隆和操作

质粒的提取按 WIZARDTM DNA 纯化试剂盒进行.酶切、DNA 片段的回收、连接和转化等方法参照《分子克隆实验指南》第二版稍做修改进行.

2.2 脂质体介导的质粒转染及阳性克隆的筛选

逆转录病毒表达载体质粒转染包装细胞 PA317 参照 Lipofectin 试剂盒说明书进行.转染后将细胞继续培养 1 d,然后将细胞消化,1:10 传代于另一新 6 孔板中,加抗生素 G418(600 μ g/mL)进行筛选.待有细胞单克隆生成,挑取细胞单克隆依次在 96 孔、6 孔培养板和 10 mL 培养瓶中扩大培养.扩大培养过程中,继续加 G418(600 μ g/mL)维持筛选.当 10 mL 培养瓶中细胞生长至 50% ~ 80% 汇片时,换半量新鲜培养液,不加 G418,培养 24 h,收集培养液上清,用 0.45 μ m 孔径的滤膜过滤,分装入 Eppendorf 管中,置于 -70℃ 保存备用.

2.3 病毒滴度测定

病毒滴度测定根据《精编分子生物学实验指南》方法进行.选用含高滴度病毒颗粒的病毒上清(病毒滴度 $> 1 \times 10^5$ cfu/mL)备用.

2.4 病毒感染 ECV304 细胞、NIH3T3 细胞及细胞株的筛选

将 ECV304 细胞以 1×10^5 /孔接种于六孔板中,加含 10% 小牛血清的 M199 培养基至每孔 2 mL.于 5% CO₂、37℃ 培养条件下培养.待细胞生长至 50% ~ 80% 汇片,弃去原培养基,用含 10% 小牛血清的 M199 培养基清洗 1 次,然后加含 0.5 mL 病毒上清(病毒滴度为 2×10^5 cfu/mL)的 10% 小牛血清 M199 培养基,同时加入 Polybrene 至 8 μ g/mL,37℃ 温育 4 h,然后再加入新鲜培养液,使培养液中 Polybrene 的终浓度至 2 μ g/mL.继续培养 48 h 后,将细胞按 1:20 传代于新的六孔板中,加 G418(400 μ g/mL)筛选,每 4 d 换液 1 次.待有细胞克隆生成时,挑取细胞克隆扩大培养.NIH3T3 细胞的处理条件同上,培养基为含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基.

2.5 ECV304 细胞和 NIH3T3 细胞表面 TNFR 的测定

分别取经病毒感染和未经病毒感染的 ECV304 细胞和 NIH3T3 细胞,调整细胞浓度,取 1×10^6 细胞于反应管中,加入终末浓度依次递增的缓冲液(含 0.1% BSA 的 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液)稀释的¹²⁵I-hTNF α .总反应体积为 0.5 mL,每个浓度设 3 个重复管,于 4℃ 反应 2 h,7000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,沉淀后用缓冲液洗 2 遍,然后用 γ 计数器测放射强度,得到总结合 cpm 值.实验同时设置含过量 1000 倍的非标记的 hTNF α 样品孔,测得非特异性结合的 cpm 值.

2.6 TNF 对 ECV304 细胞的作用

取经病毒感染的 ECV304 细胞,用 M199 培养液将细胞稀释至 1×10^5 /mL,同时设未经病毒感染的 ECV304 细胞作为对照.取 96 孔细胞培养板,每孔中加入 100 μ L 稀释的 ECV304 细胞,于 5% CO₂、37℃ 培养条件下过夜培养,去掉原有培养基,用新鲜培养基制备含 rhTNF α 的药物溶液(1×10^4 u/mL),每孔加 100 μ L,5% CO₂、37℃ 培养 48 h;在每孔中加入 10 mg/mL 的 MTT 20 μ L,在同样条件下培养 4 h;从细胞培养箱中取出九十六孔板,每孔中加入 200 μ L 二甲亚砜,混

匀 ,在酶标仪上测定 570 nm 的 OD 吸收值 .

3 实验结果

3.1 逆转录病毒载体的构建和鉴定

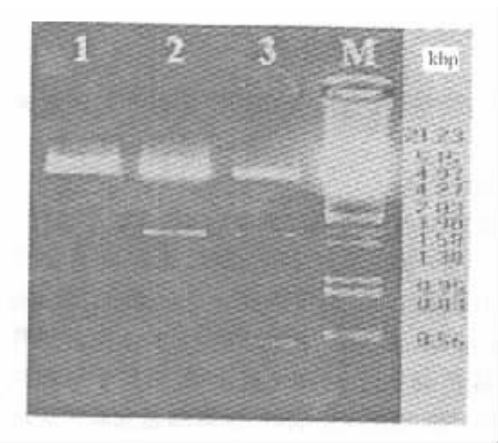
载体的构建图略 ,鉴定结果见图 1 .

3.2 经病毒感染的 ECV304 细胞和 NIH3T3 细胞的筛选及鉴定

病毒感染 ECV304 细胞和 NIH3T3 细胞后 ,经 G418 筛选 ,均有数十个细胞克隆生成 .随机分别挑取 4 个克隆进行鉴定和后续实验 .病毒载体 pLXSN 中含有 NEO^R 基因序列 ,通过扩增 NEO^R 基因序列 ,可以检测病毒基因组是否整合到细胞染色体上 .根据 NEO^R 基因序列设计 2 条引物 ,引物序列如下 :

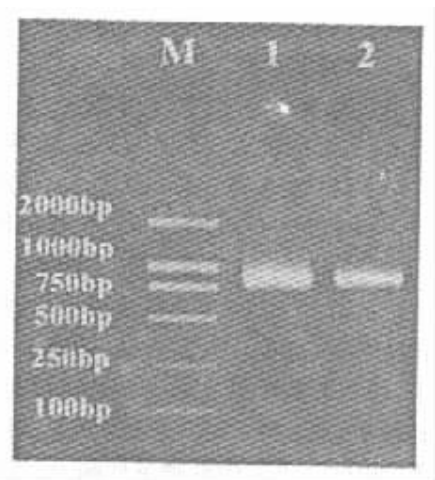
- 引物 1 5' - CAAGATGGATTGCACCGCAGG - 3' ;
- 引物 2 5' - CCCGCTCAGAAGAACTCGTC - 3' .

将经病毒感染的 ECV304 细胞和 NIH3T3 细胞扩大培养 ,收集细胞后 ,提取细胞 DNA ,用上述引物进行 PCR 扩增 ,结果见图 2 .说明病毒基因组已整合到细胞染色体上 .



1. HpaI 酶切后的 pLXSN-D₂₉₉质粒 2. Hpa I 和 BamH I 双酶切后的 pLXSN-D₂₉₉-TNF55 质粒 ;3. Hpa I 和 BamH I 双酶切后的 pLXSN-D₂₉₉-KDRp-TNF55 质粒 ;
M.λ DNA-HindⅢ /EcoR Ⅰ 标准相对分子量

图 1 载体构建的酶切鉴定结果



M. DL-2000 标准相对分子量 ;1. 从感染后的 ECV304 细胞中扩增出的 NEO^R 基因 2. 从感染后的 NIH3T3 细胞中扩增出的 NEO^R 基因

图 2 从感染后的细胞中扩增 NEO^R 基因的结果

3.3 ECV304 细胞和 NIH3T3 细胞表面 TNFR 数量的检测

经病毒感染后 ,ECV304 细胞表面 TNFR 的数量有显著提高($P < 0.01$) ,而 NIH3T3 细胞表面 TNFR 的数量在感染前后无显著变化($P > 0.05$) .见图 3 .

3.4 TNF 对 ECV304 细胞的作用

经病毒感染后的 ECV304 细胞对 TNF 的敏感性提高 ,同样条件下 ,感染后的 ECV304 细胞在经 TNF 作用后死亡率增加 .见图 4 .

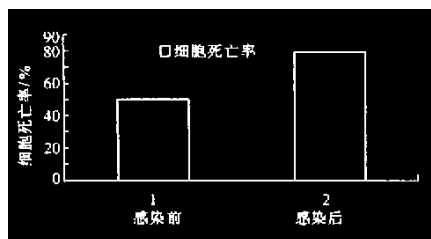


图3 感染前后细胞表面 TNFR 表达量的变化

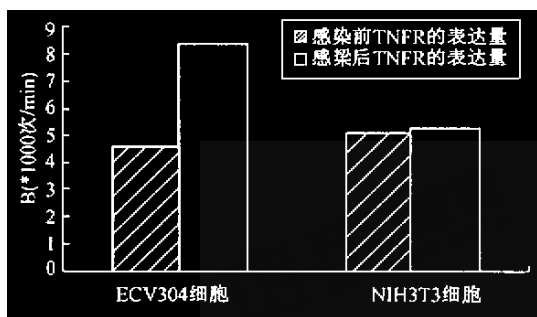


图4 TNF 对感染前后的 ECV304 细胞杀伤率的比较

4 讨论

肿瘤坏死因子(TNF)是一种由激活的巨噬细胞分泌,能使肿瘤发生出血性坏死,而对正常组织无明显毒性作用的蛋白质,是迄今发现的细胞因子中唯一对肿瘤细胞具有直接杀伤作用的因子。它除具有直接杀伤抑制肿瘤细胞和通过激活体内免疫系统的抗肿瘤作用外,还可作用于肿瘤的血循环,通过激活凝血机制和抑制纤溶造成肿瘤血管内凝血,同时还直接损伤肿瘤血管内皮细胞和抑制血管的迁移,使肿瘤出血坏死^[3]。因此,自TNF被发现后,即引起了医学工作者的重视,被认为是一种很有潜力的抗癌药物。但在实际应用过程中,发现rhTNF α 具有十分明显的毒副作用,包括引起寒战、发热、体重下降、低血压,个别病人甚至发生严重的副作用,许多研究者对此进行了大量的研究。一方面,研究者通过了解TNF的分子结构和表达调控,利用分子生物学和基因工程技术对人原型TNF进行改造,获得了多种作用增强而副作用较小的rhTNF的衍生物^[4]。另一方面,通过对TNF作用机制的研究发现,TNF生物学作用的发挥是通过其受体实现的。

TNF受体分为两类:一类称I型TNFR,相对分子量为55000;另一类称II型TNFR,相对分子量为75000。TNFR55主要介导细胞毒作用^[5]。体外实验表明,提高肿瘤细胞表面TNFR的表达量,可以加强TNF对肿瘤细胞的杀伤作用^[1,2]。我们设想,进一步提高内皮细胞这一TNF靶细胞表面的TNFR55的数量,可能会起到加强TNF作用从而减少其用量的目的。

实验结果表明,以逆转录病毒将编码TNFR55的cDNA转移入ECV304细胞后,细胞膜上表达的TNFR的数量显著提高,使细胞对TNF的敏感性增强。经同样浓度的TNF作用,表达较多受体的内皮细胞死亡率增加。这说明,通过提高内皮细胞表面TNFR的数量可以达到增强TNF作用的目的。由于肿瘤在生长过程中有大量血管生成,其内皮细胞处于活跃增殖状态,而正常组织中的血管较少增生,其内皮细胞也较少增殖。逆转录病毒的特点就是只感染活跃增殖的细胞,这样以逆转录病毒为载体可以将TNFR55基因转肿瘤组织中的内皮细胞,再加上KDRp这一血管内皮特异性启动子^[6]的控制,可以实现TNFR55在肿瘤内皮细胞中的特异表达,从而特异地提高其表面TNFR的数量。这样较少的TNF用量就可以起到破坏肿瘤组织中血管的作用,我们希望在下一步的体内实验中得到验证。

[参考文献]

- [1] Tsutomu S, Yamauchi N, Sasaki N, *et al.* An apoptosis-inducing gene therapy for pancreatic cancer with a combination of 55-kDa tumor necrosis factor(TNF) receptor gene transfection and mutein TNF administration[J]. Cancer Res, 1998, 58: 1677—1983.
- [2] Isobe K, Fan Z H, Emi N, *et al.* Gene transfer of TNF receptor for treatment of cancer by TNF[J]. Biochem and Biophys Res Commun, 1994, 202: 1538—1542.
- [3] 余伟民, 焦炳华. 肿瘤坏死因子及相关细胞毒酶[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 170—171.
- [4] 刘丽, 田生礼, 冯彪, 等. 一种高活性人新型 TNF α 的研制[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1996, 16(4): 254—258.
- [5] Soma G I, Kitakara N, Tsuji Y, *et al.* Improvement of cytotoxicity of tumor necrosis factor(TNF) by increase in basicity of its N-terminal region[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 148: 629—635.
- [6] Patterson C, Perrella M A, Hsieh C M, *et al.* Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 23111—23118.

Research on Specifically Enhancing the Expression of TNFR55 in Endothelial Cells

Sun Xiaowen¹, Hu Xiaomin², Liu Li³

(1. Department of Urology, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, PRC)

(2. Institute of Genetic Resources, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, PRC)

(3. Institute of Medical Molecular Biology, Airforce General Hospital, Beijing, 100036, PRC)

Abstract: Using KDRp as promotor to realise the specific expression of TNFR55 in endothelial cells and upregulate the number of TNFR55 on the membrane of endothelial cells. Construct target-expressing retroviral expression vector containing cDNA of TNFR55 and use it to transfer endothelial cells and then explore the changes of TNFR number on endothelial cells and its influence on cell toxicity of TNF. TNFR number on membrane of endothelial cells was highly upregulated ($p < 0.01$) and the cell toxicity of TNF was enhanced. The TNFR number on membrane of NIH3T3 had no different changes after gene transfer ($p > 0.05$). TNFR55 could be specifically expressed in endothelial cells under the instruction of KDRp and the cell toxicity of TNF to endothelial cells was enhanced after the TNFR55 had been upregulated.

Key words: tumor necrosis factor receptor(TNFR); expression; gene therapy

[责任编辑 孙德泉]