

白细胞介素 2 基因转染对裸鼠乳腺癌肺转移的影响

赵广峰¹ 朱易凡²

【摘要】目的 观察白细胞介素 2 (IL-2) 基因转染治疗裸鼠乳腺癌肺转移的疗效。**方法** 在乳腺癌细胞株 MD231 和 BT474 中转染 pORF-hIL-2 质粒,检测对迁移和侵袭能力的影响,同时制作裸鼠乳腺癌肺转移模型 30 只,随机分为 pORF-hIL-2 质粒转染实验组和对照组,以瘤内注射的方式将脂质体和 pORF-hIL-2 质粒混合液注入皮下瘤体内,观察肿瘤体积变化以及肺部转移病灶。**结果** pORF-hIL-2 质粒转入乳腺癌细胞株后,两组细胞均出现迁移和侵袭能力的下降;经治疗后对比,实验组模型的皮下结节肿瘤体积增长明显受抑制,差异有统计学意义($t=-8.214, P<0.001$);两组观察期实验后肺部转移灶的数目差异亦有统计学意义($t=3.854, P=0.007$)。**结论** 应用 IL-2 基因质粒瘤内注射方法治疗乳腺癌伴肺转移的裸鼠模型可以产生抗癌效应,而且能有效抑制肺部的转移病灶。

【关键词】 乳腺肿瘤;基因疗法;转染

Effect of interleukin-2 gene transfection on pulmonary metastasis of breast cancer in nude mice Zhao Guangfeng¹, Zhu Yifan². ¹Department of General Surgery, Liwan Hospital of The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510170, China; ²Department of Thyroid and Breast Surgery, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China
Corresponding author: Zhu Yifan, Email: zyf0924@126.com

【Abstract】Objective To evaluate the effect of interleukin-2 (IL-2) gene transfection on treating pulmonary metastasis of breast cancer in nude mice. **Methods** Breast cancer lines MD231 and BT474 were first transfected with pORF-hIL-2 plasmid, then cell invasiveness and migration capability were tested. Thirty nude mice with pulmonary metastasis of breast cancer were randomly divided into pORF-hIL-2 plasmid transfection group and the control group, then the mixture of liposome and pORF-hIL-2 plasmid was injected into their tumors subcutaneously, and finally the volumetric change of the tumors and the lung metastatic lesions was observed. **Results** The cell invasiveness and migration capability diminished in MD231 and BT474 after transfected with pORF-hIL-2 plasmid. Compared with the control group, the volumetric growth of the subcutaneous nodular tumors in the experiment group were inhibited obviously, and the difference was statistically significant ($t=-8.214, P<0.001$); after the study period, the difference of the number of the lung metastatic lesions in the two groups were statistically significant ($t=3.854, P=0.007$). **Conclusion** IL-2 gene plasmid intratumoral injection has shown to improve anti-tumor effects significantly to treat pulmonary metastasis of breast cancer in nude mice, and to inhibit lung metastatic lesions effectively.

【Key words】 Breast neoplasms; Gene therapy; Transfection

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤,占每年新发恶性肿瘤病例的首位。得益于分子生物学的

进展,乳腺癌的治疗水平得到了很大的提高,但目前对伴有肺转移的乳腺癌治疗上依旧缺乏有效的手段^[1-2]。随着转基因技术不断取得新的进展,免疫基因治疗逐渐成为研究热点^[3]。之前我们曾成功使用白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 基因转染技术瘤内注射方式治疗裸鼠皮下接种的肝癌,取得了满意的效果^[4-5],但这种方式 and 效果能否在乳腺癌肺

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0793.2017.03.005

作者单位: 510170 广州医科大学附属第三医院荔湾医院普通外科¹; 510080 广州, 中山大学附属第一医院甲状腺乳腺外科²

通信作者: 朱易凡, Email: zyf0924@126.com

转移模型上复制,我们进行了尝试,结果如下。

材料与方 法

一、材料与试剂

人乳腺癌 MDA231 和 BT474 细胞株购自中山大学附属第一医院; BALB/c 裸鼠, 雌性, 8 周龄, 体质量 17~21 g; DMEM 培养液; 胎牛血清; 携带 pORF-hIL-2 质粒的 GT100 E.coli 大肠杆菌和多聚阳离子脂质体(LipoGen)以及 FastMedia Amp 固体培养基和培养液; PBS 缓冲液; 质粒纯化 E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit 试剂盒等。

二、pORF-hIL-2 质粒的抽提、纯化

采用 FastMedia Amp 培养基(液)扩增培养携带 pORF-hIL-2 质粒的 GT100 E.coli 大肠杆菌。再用 E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit 试剂盒抽提、纯化 pORF-hIL-2 质粒。

体外脂质体转染 MDA231 和 BT474 细胞株: 分别以空白质粒 pORF 和 pORF-hIL-2 质粒, 和脂质体以 1:5 的比例, 分别稀释在 100 μ l 的无血清、无双抗 DMEM 培养液中, 室温混合 15 min, 再加入此培养液至 10 ml 加入 70% 融合的 MDA231 和 BT474 细胞中。24 h 后更换 G418 筛选培养液(浓度为 200 μ g/ml), 继续培养稳定转染的细胞株。

三、细胞的迁移和侵袭实验

待测细胞培养至对数生长期时消化细胞, 用 PBS 和无血清培养基先后洗涤一次, 用无血清培养基悬浮细胞, 计数, 调整浓度为 1×10^5 /ml; 在下室 24 孔板底部加入 600~800 μ l 含 10% 血清的培养基, 迁移实验直接在 transwell 上室加入 150 μ l 细胞悬液, 侵袭实验则在 transwell 上室底部中央垂直加入 100 μ l 稀释后的 Matrigel, 37 $^{\circ}$ C 温育 4~5 h 使其干成胶状后再加入细胞悬液; 继续在孵箱培养, 迁移实验 48 h, 侵袭实验 72 h; 之后用镊子小心取出 transwell, 吸干上室液体, 移到预先加入约 800 μ l 甲醇的孔中, 室温固定 30 min; 吸干上室固定液, 移到预先加入约 800 μ l Giemsa 染液的孔中, 室温染色 15~30 min 清水冲洗浸泡后, 擦去上室底部膜表面上的细胞; 光学显微镜下取 9 个随机视野计数, 统计结果。

四、皮下乳腺癌伴肺转移裸鼠动物模型的建立

通过同时在皮下及尾静脉注射肿瘤细胞的方式创建乳腺癌肺转移的模型。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 MDA231 细胞, 收集对数生长期的 MDA231 细胞, 调整细胞浓度为 2.5×10^7 /ml。

以 0.2 ml Matrigel 和无血清培养液 1:3 混合的细胞悬液接种于裸鼠后肢背部皮下, 同时调整细胞密度为 1×10^7 /ml, 以 0.2 ml Matrigel 和无血清培养液 1:5 混合的细胞悬液对如上法皮下注射后的裸鼠做尾静脉注射, 2 周后裸鼠皮下乳腺癌伴肺转移模型建立。

五、乳腺癌伴肺转移裸鼠的治疗对比实验

根据之前研究的成果, 以瘤内注射脂质体和质粒的混合液作为治疗的手段, 取模型裸鼠 30 只, 随机分为 2 组: ①空白对照组: 每只裸鼠瘤内注射浓度为 500 mg/L 的 LipoGen 脂质体悬液 0.2 ml; 每 7 天重复注射 1 次; ② IL-2 基因转染治疗组: 每只裸鼠瘤内注射脂质体转染液 0.2 ml (LipoGen 多聚阳离子脂质体和 pORF-hIL-2 质粒的 GT100 E.coli 大肠杆菌按 5:1 比例混匀); 每 7 天重复注射一次。每 4 天分别测量所有裸鼠肿瘤的长(a)、短(b)半径, 按公式 $\text{mm}^3 = a \times b^2/2$ 计算瘤体体积; 持续 4 周后处死所有裸鼠, 解剖肺部, 记录各组肺转移灶。

六、统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 动物分组采用完全随机对照设计, 配对 *t* 检验比较两组间裸鼠皮下接种体积大小以及肺转移灶数目。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、pORF-hIL-2 质粒转染 MD231 和 BT474 细胞株后对迁移和侵袭性的影响

肿瘤细胞的迁移和侵袭能力是乳腺癌转移的重要因素, 将 pORF-hIL-2 质粒转入 MD231 和 BT474 细胞株后, 两种不同的乳腺癌细胞株均出现了迁移和侵袭能力的下降(图 1)。说明 pORF-hIL-2 质粒确可通过肿瘤细胞分泌 IL-2 起到抑制肿瘤细胞迁移和侵袭能力的作用。

二、皮下乳腺癌伴肺转移模型经瘤内注射治疗后肿瘤体积变化

注射后肿瘤体积与治疗前比较, 空白对照组肿瘤体积随时间增加体积增大越明显, 而 IL-2 基因转染实验组移植瘤体积增大不明显, 甚至有缩小的表现, 且两组间的瘤体大小随时间增加体积差异越明显。在 IL-2 治疗后 28 d, 两组间瘤体大小差异最明显(图 2), IL-2 基因转染实验组平均体积为 $(102.2 \pm 18.01) \text{mm}^3$, 而对照组为 $(640.3 \pm 87.14) \text{mm}^3$ ($t = -8.214, P = 0.0003$), 提示 IL-2 能显著性抑制乳腺癌细胞的生长。

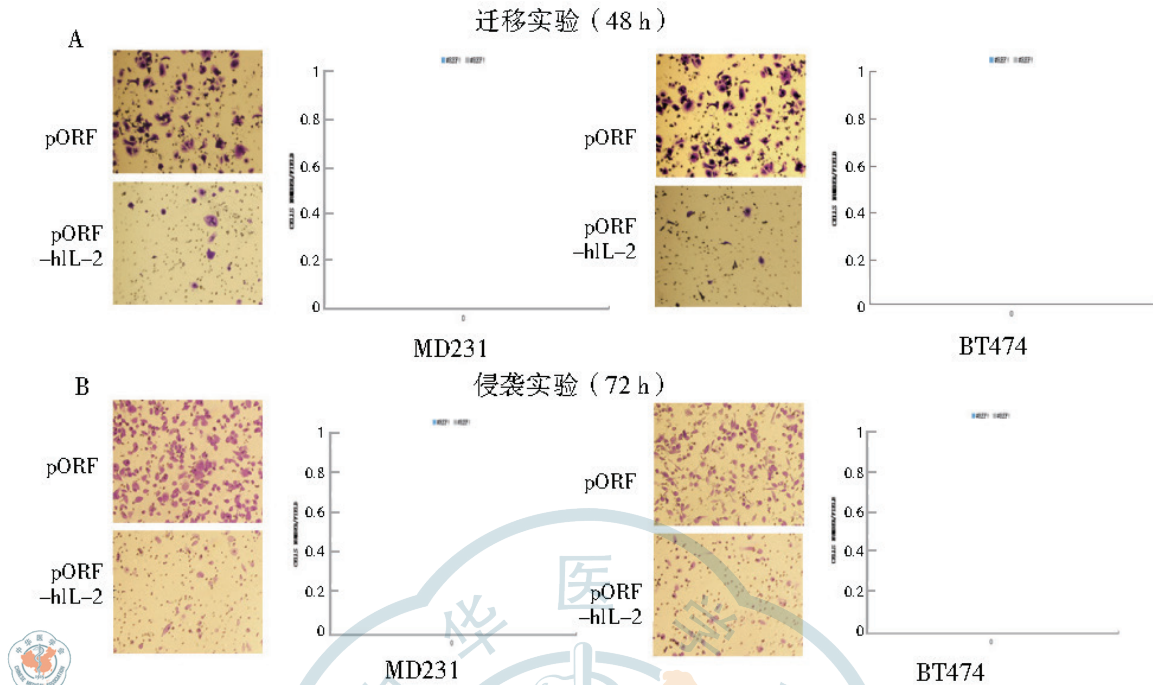


图1 pORF-hIL-2质粒转入MD231和BT474细胞株后,两种细胞株出现的迁移和侵袭能力的下降

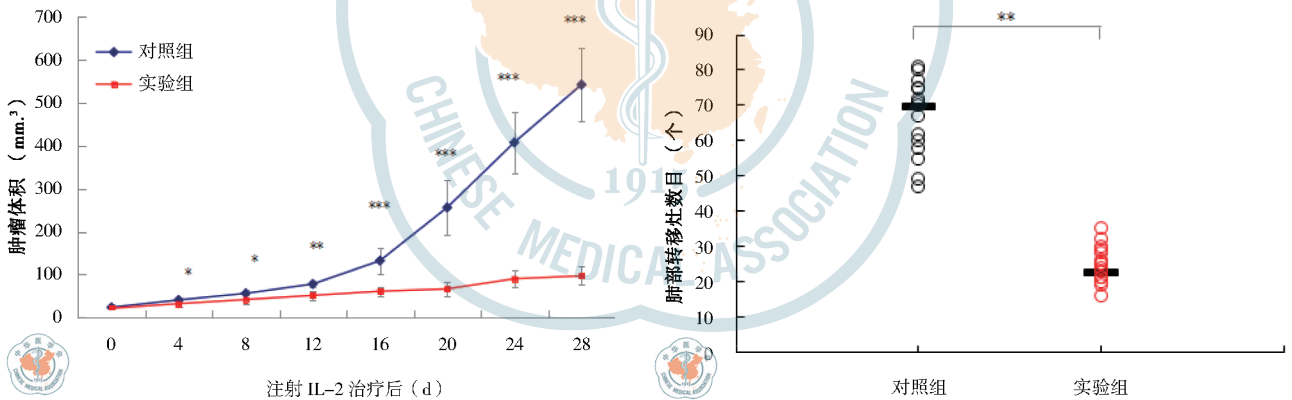


图2 pORF-hIL-2质粒转染组与空白对照组裸鼠肿瘤体积对照 *P<0.05,**P<0.01,***P<0.001

图3 pORF-hIL-2质粒转染组与空白对照组裸鼠肺转移瘤数目对照 **P=0.007

三、两组裸鼠模型经治疗后肺部转移灶的数目

虽然受条件所限未能以胸部的X光照片来对比肺部转移灶的情况,但通过解剖的对比和转移灶数目的计量发现,同空白对照组相比,IL-2基因转染实验组肺部转移灶的数目显著性减少(图3),实验组均值为(24.8±6.11)个,对照组为(68.4±16.01)个($t=3.854, P=0.007$),显示两组间疗效差异有统计学意义,提示IL-2基因转染治疗组治疗有效,表明IL-2能显著性抑制乳腺癌的肺部转移。

讨论

乳腺癌极大地危害人类健康^[6],尽管目前可以

通过手术、化疗、内分泌治疗、生物靶向治疗等综合治疗手段,但对于发现时已有肺部转移的患者目前依然缺乏长期有效的治疗手段^[7]。随着现代分子生物学和基因工程技术的发展,以免疫治疗为原理发展起来的免疫基因治疗日益受到重视,IL-2基因治疗通过转染肿瘤细胞,不但致瘤性下降^[8],而且可在肿瘤局部产生高浓度的IL-2,一方面可以增强肿瘤的免疫原性,另一方面能加强巨噬细胞等抗原提呈细胞的抗原提呈功能,从而激活特异性抗肿瘤免疫^[9-10]。该治疗虽然尚未应用于临床,但我们曾用此法在肝癌的裸鼠模型上取得了明显的抑制肿瘤的作用,提示该治疗方法在抑制恶性肿瘤方面具有确切的效果^[5]。

在本研究中,我们将 pORF-hIL-2 质粒转染乳腺癌不同的细胞株后观察到迁移和侵袭能力均明显下降,推测其原因为转入肿瘤细胞后在局部产生高浓度的 IL-2,并达到了抑制细胞恶性行为的效果。在体内实验中,我们将 pORF-hIL-2 质粒和脂质体的混合液注入瘤体中,发现皮下瘤体的生长出现了明显的抑制。然而,本研究最大的收获在于经过皮下肿瘤内的转染,肺部的转移病灶也有明显的抑制作用,说明转染后的肿瘤细胞分泌的 IL-2 可以通过血液循环抑制远处的转移灶,这比抑制肿瘤本身的结果意义更大。共识认为在乳腺癌发展的早期全身血液中就存在癌细胞,也正因为这样,乳腺癌的治疗是一个综合治疗,而非单纯的外科手术治疗,其中肺部的转移是乳腺癌最常见的,而且在治疗上也是最为棘手的。IL-2 基因能够对肺部的癌细胞起到抑制作用,也就提示我们如果在乳腺癌早期进行介入的话,可以大大降低乳腺癌术后肺部复发转移的机会,这将是具有非常具有临床意义的。

综上所述,尽管本实验应用的裸鼠模型数量因为制作困难例数尚少,每组仅 15 只,且未能动态观察肺部转移灶的情况,试验总观察天数为 28 d,但结果依旧提示应用 IL-2 基因质粒瘤内注射方法治疗乳腺癌伴肺转移的裸鼠模型表现出明显的抗癌效应,且可有效抑制肺部的转移病灶。更多的研究将集中在对该抑瘤作用,特别是对肺部转移灶作用的机制方面,进一步探讨该治疗激活的特异性抗肿瘤免疫反应,以期为乳腺癌的治疗提供一条新的思路 and 选择。

参 考 文 献

- [1] Li S, Xu X, Jiang M, et al. Lipopolysaccharide induces inflammation and facilitates lung metastasis in a breast cancer model via the prostaglandin E2-EP2 pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6): 4454-4462.
- [2] Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2015, 522(7556): 345-348.
- [3] Bonini C, Parmiani G. When transgenes shape immunity: cancer immune-gene therapy[J]. *J Gene Med*, 2012, 14(6): 384-385.
- [4] 叶小鸣,左继东,朱易凡. IL-2 基因转染联合 CTL 杀伤肝癌细胞的体外试验研究 [J]. *中国实用外科杂志*, 2006, 26(9): 689-690.
- [5] 朱易凡,叶小鸣,左继东,等. 白细胞介素-2 基因转染联合特异性细胞毒性 T 淋巴细胞对裸鼠肝癌的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(12): 1508-1509.
- [6] Harbeck N, Gnant M. Breast cancer[J]. *Lancet*, 2016, S0140-6736(16): 31891-31898.
- [7] Nagata C, Wada K, Tsuji M, et al. Plasma amino acid profiles are associated with biomarkers of breast cancer risk in premenopausal Japanese women[J]. *Cancer Causes Control*, 2014, 25(2): 143-149.
- [8] 李雯雯,赵广银,张兆,等. ^{18}F -FDG PET/CT 成像观察西妥昔单抗对结直肠癌裸鼠移植肿瘤影响的实验研究 [J/CD]. *中华普通外科学文献(电子版)*, 2015, 9(3): 188-192.
- [9] 曹大勇,杨静悦,窦科峰. 白细胞介素-2 基因修饰树突状细胞体外增强其诱导的抗肝癌免疫反应 [J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(3): 285-287.
- [10] Kaufman HL, Flanagan K, Lee CS, et al. Insertion of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes into vaccinia virus results in effective anti-tumor responses without toxicity[J]. *Vaccine*, 2002, 20(13-14): 1862-1869.

(收稿日期:2016-11-04)

(本文编辑:丁文珠)

赵广峰,朱易凡. 白细胞介素 2 基因转染对裸鼠乳腺癌肺转移的影响 [J/CD]. *中华普通外科学文献(电子版)*, 2017, 11(3): 164-167.