

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2012.05.007

## 胸腺素原体内抑制小鼠肝癌细胞 H22 的研究<sup>①</sup>

蔡报伟<sup>②</sup> 栗华<sup>②</sup> 韩伟 王世媛<sup>③</sup> 张亭 刘升发 周克夫

(厦门大学生命科学学院环境与生态学院细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

中国图书分类号 R392-33 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2012)05-0412-03

根据 Parkin 等<sup>[1]</sup>报道 2000 年全球新发癌症病例为 1 010 万例,死亡 620 万。在 Ferlay 等<sup>[2]</sup>报道中最常见的癌症中致死率排列第三是肝癌。在我国肝癌的死亡率占全部恶性肿瘤死亡的 18.8%,仅次于胃癌<sup>[3]</sup>。因此,寻找和筛选有效的抗肝癌药物是目前医学界研究的热点。

胸腺素  $\alpha$  原(Prothymosin $\alpha$ , ProT $\alpha$ )是胸腺素  $\alpha 1$  (T $\alpha 1$ )的前体蛋白,在哺乳动物细胞中广泛分布,在淋巴组织及非淋巴组织均可找到。在细胞外,ProT $\alpha$ 通过潜在的膜受体调节免疫应答,促进 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 等细胞因子的产生,进而增强细胞和体液免疫应答。研究表明,ProT $\alpha$ 能够有效抑制肿瘤的生长,延长荷瘤小鼠的寿命<sup>[4]</sup>。本研究开展从中国健康人外周血淋巴细胞克隆表达的重组人 ProT $\alpha$ 对抑制小鼠肝癌细胞株 H22 的体内研究,为今后开展肿瘤药物的研究和应用提供科学依据。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** H22 肿瘤株(小鼠肝癌)由厦门大学医学院实验动物中心保种。实验动物为雄性昆明小鼠,SPF 级,购自厦门大学医学院实验动物中心。重组人前胸腺  $\alpha$  原由本实验室和厦门伯赛基因转录技术有限公司共同制备。

### 1.2 方法

**1.2.1 重组 ProT $\alpha$  干预** 将小鼠随机分为 A、B、C、D、E 组,每组各 5 只。A 组预先腹腔注射等体积的生理盐水作为空白对照组, B 组预先腹腔注射 ProT $\alpha$  7.5

ng/g; C 组预先腹腔注射 ProT $\alpha$  12.5 ng/g; D 组预先腹腔注射 ProT $\alpha$  25 ng/g; E 组预先腹腔注射 ProT $\alpha$  50 ng/g。共预先腹腔注射 9 次,隔一天注射一次。

**1.2.2 H22 腹水型荷瘤小鼠模型制备** 无菌条件下将购买的 H22 腹水肿瘤按 1:8 稀释计数,然后调整浓度为  $3 \times 10^7$  ml<sup>-1</sup>,以 100  $\mu$ l/只,每只接种 H22 的细胞数为  $3 \times 10^6$  个/只,接种于小鼠的腹腔,观察并记录小鼠的存活情况,隔天记录小鼠体重。

**1.3 统计学处理** 记录各组死亡时间、数量,根据数据,采用 GraphPad Prism5 软件进行统计分析。 $P < 0.05$  为显著差异,  $P < 0.01$  为极显著差异。

### 2 结果

**2.1 预先用药组和对照组小鼠的存活情况差异比较** 经过观察记录, A 对照组小鼠在腹腔注射 H22 后第 13 天开始出现死亡,第 22 天全部死亡,而用药组 B 组,第 20 天才开始出现死亡,到第 34 天才最后全部死亡; C、D、E 组分别是 30、31、34 天全部死亡。结果说明 ProT $\alpha$  对 H22 肿瘤具有明显抑制效果。

图 1 可以看出 A 组和 B 组平均生存时间有显著性差异( $P < 0.05$ )。相对于 A 组, B 组小鼠平均生命明显延长, C 组、D 组、E 组的平均生存时间也较 A 组要长,但延长时间没有明显的差异( $P > 0.05$ )。所以我们可以得出 ProT $\alpha$  用药量为 7.5 ng/g 时效果最明显。

**2.2 预先用药各组 and 对照组小鼠的体重变化比较** 各组小鼠接种 H22 后,体重随时间变化情况见表 1。从表 1 中我们可以看出用药组 B 体重在第 5~7 天开始明显比对照组 A 小,差异显著( $P < 0.05$ )。第 9 天后, B、C、D 组和对照组出现了极显著性差异( $P < 0.01$ )。而 E 组和对照组比较没有显著性差异( $P > 0.05$ )。此外,我们发现 ProT $\alpha$  的用量在 7.5~12.5 ng/g 时,对本实验小鼠腹水抑制作用效果更明显。

①本文为厦门市科技项目(3502Z20083004)、国家“973”项目(2007CB513103)及福建省医药卫生创新项目(2009-CXB-51)资助

②厦门市第一医院, 厦门 361005

③厦门伯赛基因转录技术有限公司, 厦门 361000

作者简介:蔡报伟(1987年-),男,在读硕士,主要从事免疫学及基因工程药物研究, E-mail: ncuskaibaowei@163.com;

通讯作者及指导教师:周克夫(1966年-),男,博士,副教授,主要从事免疫学及基因工程药物研究, E-mail: zhkefu@xmu.edu.cn。

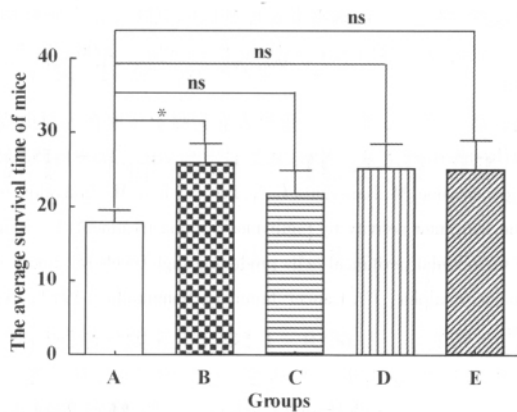


图 1 各组小鼠平均存活天数

Fig. 1 The average survival time of mice in each group

Note: A. Inoculated intraperitoneally H22 and physiological saline as control; B. Pre-injected the ProTα in the dosage of 7.5 ng/g; C. Pre-injected the ProTα in the dosage of 12.5 ng/g; D. Pre-injected the ProTα in the dosage of 25 ng/g; E. Pre-injected the ProTα in the dosage of 50 ng/g. \* P < 0.05.

表 1 不同时间各组小鼠平均体重差异情况

Tab. 1 The average body weight of mice in each group at different times

Days	Groups	Average body weight(g)	Days	Groups	Average body weight(g)
The 3rd day	A: Control	44.24 ± 1.02	The 7th day	A: Control	51.68 ± 0.86
	B	43.94 ± 1.28		B	45.99 ± 0.72 <sup>3)</sup>
	C	42.29 ± 1.89		C	45.85 ± 2.09 <sup>1)</sup>
	D	44.51 ± 1.38		D	47.79 ± 1.61
	E	44.87 ± 0.89		E	48.39 ± 2.23
The 5th day	A: Control	49.74 ± 0.85	The 9th day	A: Control	53.26 ± 0.92
	B	45.98 ± 1.03 <sup>1)</sup>		B	46.01 ± 1.06 <sup>3)</sup>
	C	46.08 ± 1.09		C	44.35 ± 2.44 <sup>2)</sup>
	D	47.09 ± 1.50		D	47.08 ± 0.94 <sup>2)</sup>
	E	48.47 ± 1.54		E	47.88 ± 2.44

Note: A. Inoculated intraperitoneally H22 and physiological saline as control; B. Preinjected the ProTα in the dosage of 7.5 ng/g; C. Preinjected the ProTα in the dosage of 12.5 ng/g; D. Preinjected the ProTα in the dosage of 25 ng/g; E. Preinjected the ProTα in the dosage of 50 ng/g. 1) P < 0.05; 2) P < 0.01; 3) P < 0.001.

### 3 讨论

有研究报道外源注射重组 ProTα 可以有效提高免疫系统的免疫能力<sup>[5]</sup>。注射 ProTα 会增强小鼠体液免疫和细胞免疫<sup>[6]</sup>。已经被证明大鼠的 ProTα 在小鼠感染 *Candida albicans* 后具有免疫保护作用<sup>[7]</sup>。Pan 等<sup>[8]</sup>认为这种免疫保护作用 and 生物体释放迁移

抑制因子(MIF)有关,ProTα 能刺激单核细胞释放转移抑制因子(MIF)其作用比 Thymosinα1 强 10~20 倍。胸腺素 α 原可以明显延长大部分白血病模型 DBA/2 小鼠的存活期,对小鼠进行腹腔注射胸腺素 α 原后,具有能够增强腹膜内巨噬细胞的杀瘤作用,提高 NK 细胞、LAK 细胞的活性,并诱导 IL-2 和 TNF-α 的产生,因此能够在免疫防御反应中起关键性的作用<sup>[9]</sup>;同时胸腺素 α 原激活肿瘤特异性细胞毒 T 细胞(CD8<sup>+</sup>)和辅助性 T 细胞(CD4<sup>+</sup>)的特异性抗肿瘤作用,有利于延长患有肿瘤的小鼠寿命<sup>[10,11]</sup>。Skopeliti 等<sup>[12]</sup>最近发现,在凋亡细胞中,胸腺素 α 原被 caspases 切割产生的多个 C 末端的片段,具有刺激外周血单核细胞增殖、自体混合淋巴细胞反应、自然杀伤(NK)淋巴因子激活的杀伤细胞活性,促使胞内穿孔素产生,上调粘附分子和 CD25 的表达以及淋巴细胞活化等免疫调节活性。

我们通过原核表达获得高纯度的重组 ProTα,经过体内实验证明具备天然 ProTα 的生物活性<sup>[13,14]</sup>。本研究以小鼠肝癌细胞株为对象,研究该重组 ProTα 对腹水型 H22 的抑制效果。通过体内抑制肿瘤实验,证明该重组蛋白能够有效抑制小鼠 H22 细胞在体内繁殖,减少腹水含量,降低小鼠症状,明显延长小鼠生存时间,其中重组蛋白剂量在 7.5 ng/g 时效果最明显。这个结果与文献报道的结果一致<sup>[15]</sup>。通过探究该重组蛋白的体内生物活性,为今后开展抗肿瘤药物筛选提供新的途径。有关该重组 ProTα 的抑制肿瘤生长的生物活性机理目前正在研究中。

### 4 参考文献

- 1 Parkin D M, Bray F, Ferlay J *et al.* Estimating the world cancer burden: Globocan 2000 [J]. *Intern J Cancer* 2001; 94: 153-156.
- 2 Ferlay J, Shin H R, Bray F *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer* ,2010; 127: 2893-2917.
- 3 Jemal A, Siegel R, Xu J *et al.* Cancer statistics 2010 [J]. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300.
- 4 Pineiro A, Cordero O J, Nogueira M. Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons [J]. *Peptides* ,2000; 21: 1433-1446.
- 5 Maric D, Jankovic B D, Veljic J. Immunostimulatory activity of prothymosin-alpha in senescence [J]. *Ann NY Acad Sci* ,1991; 621: 148-158.
- 6 Maric D, Veljic J, Ranin J *et al.* In vivo effect of prothymosin-alpha 1 on humoral and cell-mediated immune responses in the young rat [J]. *Int J Neurosci* ,1991; 59: 135-142.
- 7 Haritos A, Salvin S, Blacher R *et al.* Parathymosin alpha: a peptide from rat tissues with structural homology to prothymosin alpha [J].

Proc Natl Acad Sci USA ,1985; 82: 1050-1053.

8 Pan L X ,Haritos A A ,Wideman J *et al.* Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties [J]. Arch Biochem Biophys ,1986; 250: 197-201 ,1050-1053.

9 Yang C H ,Murti A ,Baker S J *et al.* Interferon induces the interaction of prothymosin-alpha with STAT3 and results in the nuclear translocation of the complex[J]. Exp Cell Res 2004; 298: 197-206.

10 Baxevanis C N ,Gritzapis A D ,Spanakos G *et al.* Induction of tumor-specific T lymphocyte responses in vivo by prothymosin alpha [J]. Cancer Immunol Immunother ,1995; 40: 410-418.

11 Baxevanis C N ,Gritzapis A D ,Dedoussis G V *et al.* Induction of lymphokine-activated killer activity in mice by prothymosin alpha [J]. Cancer Immunol Immunother ,1994; 38: 281-286.

12 Skopeliti M ,Voutsas I F ,Klimentzou P *et al.* The immunologically active site of prothymosin  $\alpha$  is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its in vitro effects in cancer patients [J].

Cancer Immunol Immunother 2006; 55: 1247-1257.

13 李俊燕 ,周克夫 . 前胸腺素  $\alpha$  原基因的克隆及在大肠杆菌中的融合表达 [J]. 厦门大学学报( 自然科学版) 2006; 45( 5) : 722-725.

14 高吉清 ,刘升发 ,周克夫 . 重组人前胸腺素  $\alpha$  原在疟原虫疫苗佐剂中的作用研究 [J]. 中国免疫学杂志 2011; 27( 6) : 552-555.

15 Papanastasiou M ,Baxevanis C N ,Papamichail M. Promotion of murine antitumor activity by prothymosin alpha treatment( I) : Induction of tumoricidal peritoneal cells producing high levels of tumour necrosis factor alpha [J]. Cancer Immunol Immunother ,1992; 35: 145-150.

[收稿 2011-10-11 二次修回 2011-12-22]

( 编辑 许四平)

( 上接第 397 页)

运用 cDNA 全基因芯片 ,Teague 等<sup>[7]</sup> 报道了小鼠 T 细胞体内经超抗原刺激 8 和 48 小时后的基因变化情况; Diehn 等<sup>[8]</sup> 研究了人外周血 T 细胞体外激活过程中基因 1 小时至 48 小时的动态变化; Shu 等<sup>[5]</sup> 也对小鼠 T 细胞经体外刺激 18 和 48 小时的基因变化做了观察。但这些研究都未对信号转导通路中基因的变化情况作专门的描述。另外,全基因芯片包含许多与研究对象无关的基因,其提供的数据会对分析与研究对象有关的基因产生干扰,提供无用( Inconsequential) 或错误( Detrimental) 的信息,而功能分类基因芯片( Real-time PCR 芯片) 可以剔除基因芯片上对研究对象无意义的基因,同时准确检测上百个基因的 mRNA 水平<sup>[9,10]</sup>。本文首次采用功能分类基因芯片——“信号转导通路发现者” PCR 芯片研究了 T 细胞激活信号转导通路中的基因变化情况,该结果有助于进一步认识 T 细胞的激活过程,控制和预防 T 细胞相关的免疫性疾病。

致谢: 感谢上海康成生物工程有限公司在 PCR array 检测中提供技术支持!

#### 4 参考文献

1 Salomon B ,Bluestone J A. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation [J]. Annu Rev Immunol ,2001; 19: 225-252.

2 Lin J ,Weiss A. T cell receptor signaling [J]. J Cell Sci ,2001; 114 ( 2) : 243-244.

3 Chen F Y ,Ni Y ,Ye Y P *et al.* Comparison of immunosuppressive activity of Stephanoside E and its aglycone from *Stephanotis mucronata* in vitro [J]. Int Immunopharmacol ,2010; 10( 10) : 1153-1160.

4 Gunzer M ,Weishaupt C ,Planelles L *et al.* Two-step negative enrichment of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from murine spleen via nylon wool adherence and an optimized antibody cocktail [J]. J Immunol Methods ,2001; 258: 55-63.

5 Shu L ,Yin W ,Zhuang H *et al.* Comparison of gene expression profiles in mouse primary T cells under normal and prolonged activation [J]. Blood Cells Mol Dis ,2006; 37 ( 1) : 64-75.

6 Zhang D ,Al-Hendy M ,Richard-Davis G *et al.* Antiproliferative and proapoptotic effects of epigallocatechin gallate on human leiomyoma cells [J]. Fertil Steril ,2010; 94 ( 5) : 1887-1893.

7 Teague T K ,Hildeman D ,Kedl R M *et al.* Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA ,1999; 96 ( 22) : 12691-12696.

8 Diehn M ,Alizadeh A A ,Rando O J *et al.* Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation [J]. Proc Natl Acad Sci USA ,2002; 99 ( 18) : 11796-11801.

9 Wooster R. Cancer classification with DNA microarrays: is less more [J]. Trends Genet ,2000; 16( 8) : 327-329.

10 Draghici S ,Khatri P ,Bhavsar P *et al.* Onto-Tools ,the toolkit of the modern biologist: Onto-Express ,Onto-Compare ,Onto-Design and Onto-Translate [J]. Nucl Acids Res ,2003; 31 ( 13) : 3775-3781.

[收稿 2011-12-20 修回 2012-01-18]

( 编辑 倪 鹏)