

# 过表达IL-12调节单核系肿瘤细胞向巨噬细胞分化

马婷婷 熊海玉 王 秦 成 凤 李紫薇 吴碧涛 林 艳 涂植光\*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 构建过表达白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)的THP-1单核系肿瘤细胞模型, 从形态学、巨噬细胞表面标志表达水平及吞噬功能3方面探究过表达IL-12能否调节单核系肿瘤细胞向巨噬细胞分化。结果发现, 与空白和空载组相比, IL-12组的THP-1细胞界限不明显, 散在细胞增多; 呈圆形或不规则圆形, 偶见毛刺状突起; 核仁模糊或消失, 核染色质条索状浓集; CD68 mRNA和蛋白表达量均升高( $P<0.05$ )。与空白组相比, CD11b mRNA和蛋白表达量升高不明显( $P>0.05$ ), 但72 h CD11b蛋白表达量明显高于相同培养条件下的空载组( $P<0.05$ )。培养72 h后各组细胞吞噬能力比较, IL-12组吞噬率( $36.7\pm 1.2\%$ )高于空白组( $15.7\pm 3.1\%$ )和空载组( $28.0\pm 1.5\%$ ), 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。上述结果提示, 过表达IL-12可以促进单核系肿瘤细胞向巨噬细胞分化。

**关键词** 白细胞介素-12(IL-12); 过表达; 单核系肿瘤细胞; 巨噬细胞; 分化

## IL-12 Overexpression Regulate the Differentiation of Monocytic Tumor Cell to Macrophagocyte

Ma Tingting, Xiong Haiyu, Wang Qin, Cheng Feng, Li Ziwei, Wu Bitao, Lin Yan, Tu Zhiguang\*

(College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Education Ministry, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** In this study, whether IL-12 overexpression could regulate differentiation of monocytic tumor cell to macrophagocyte was investigated. Firstly, a monocytic tumor THP-1 cell model overexpressing IL-12 was established. Furthermore, the change of cell morphology, matured macrophagocyte marker expressions and phagocytosis were detected. Morphologically, the experimental group cells were round or irregular round shape, and some cell membrane processes were observed; cell nucleolus became fuzzy or completely disappeared; the nuclear chromatins appeared to be dense and cordlike. Compared with the control group and empty vector group, CD68 mRNA and protein expressions were up-regulated ( $P<0.05$ ). However, compared with blank group, CD11b mRNA and protein expressions had no remarkable change in the IL-12 overexpression group ( $P>0.05$ ), whereas CD11b protein expression in experimental group was significantly higher than that in empty vector group ( $P<0.05$ ). Moreover, phagocytosis of the experimental group was significantly better than that of the control group and empty vector group ( $P<0.05$ ). In conclusion, IL-12 overexpression could promote the differentiation of monocytic tumor cell to macrophagocyte.

**Key words** interleukin-12 (IL-12); overexpression; monocytic tumor cell; macrophagocyte; differentiation

机体的免疫应答是个复杂的过程, 许多细胞和细胞因子参与其中。单核细胞作为其中的主要成

员, 在一定条件的刺激下, 具有向巨噬细胞、DC细胞分化的潜能。目前, 较为公认的刺激因素包括佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)<sup>[1]</sup>、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)<sup>[2-3]</sup>等。同为白介素家族成员, 白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)参与了体内多种免疫应答反应, 特别是作为抗肿瘤免疫的重要细胞因子<sup>[4-5]</sup>, 被人们广泛熟知。IL-12是否也像IL-6一样参与了单核巨噬细胞的分化调节, 未见相关报道。

收稿日期: 2013-10-25 接受日期: 2013-12-23

国家自然科学基金(批准号: 81172016)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485759, E-mail: tuzhiguang@aliyun.com

Received: October 25, 2013 Accepted: December 23, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172016)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485759, E-mail: tuzhiguang@aliyun.com

网络出版时间: 2014-03-26 16:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0345.html>

为此,本研究拟建立过表达IL-12的THP-1单核肿瘤细胞株模型,探讨过表达IL-12能否促进单核肿瘤细胞向巨噬细胞分化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株和病毒 人急性单核细胞白血病细胞株THP-1(中国科学院上海生命研究科学院细胞资源中心);课题组前期研究已成功构建了人IL-12基因重组腺病毒(Ad-IL-12)和空载体腺病毒(Ad-GFP),并对其感染效率进行了初步的生物学分析<sup>[6]</sup>。

1.1.2 主要试剂及仪器 RNAiso plus(TaKaRa公司); RT-PCR逆转录试剂盒(TaKaRa公司);实时定量PCR酶SYBR GREEN II(TaKaRa公司); FITC-葡聚糖40000试剂和PMA试剂(Sigma公司);人IL-12 p70 ELISA试剂盒(R&D公司);抗CD11b抗体(Abcam公司),抗CD68抗体、抗 $\beta$ -actin抗体(Santa Cruz公司);吉姆萨染色液(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);PCR引物由美国Invitrogen公司合成。正置、倒置荧光显微镜(Olympas公司);CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 用含10%胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司)的1640培养基(GIBCO公司),在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养THP-1细胞。

1.2.2 实验分组 依据处理因素的不同分成4组:空白组(THP-1细胞组);空载组(携带空载体腺病毒Ad-GFP的THP-1细胞),作为空白载体对照;IL-12组(携带人IL-12基因重组腺病毒Ad-IL-12的THP-1细胞);PMA阳性对照组(320 nmol/L PMA诱导24 h的THP-1细胞),作为阳性对照。

1.2.3 细胞形态学检测 将空白组、空载组、IL-12组和PMA阳性对照组细胞以 $1 \times 10^6$ /孔的浓度接种于6孔板,培养72 h(PMA组细胞培养24 h)。(1)倒置显微镜下观察其生长状态,并拍照记录;(2)吉姆萨染色:离心收集各组细胞, PBS(pH7.4)清洗2次后,加入1 mL PBS重悬细胞,吹散混匀。取一滴重悬细胞滴在干净载玻片上并轻轻涂匀,待干燥后按吉姆萨染色液说明书给细胞染色。在正置显微镜下观察其形态变化,并拍照记录。

1.2.4 实时定量PCR检测 将处理后的THP-1细胞以 $1 \times 10^6$ /孔的浓度接种于6孔板,分别提取24 h空白组、空载组、IL-12组和PMA组细胞的总RNA,并逆转为cDNA。以逆转的cDNA为模板,进行如下分析:(1)检测上述4组中IL-12 p35和p40亚基的mRNA表达量;(2)检测4组中巨噬细胞表面分化标志CD11b和CD68的mRNA表达量变化情况。相关基因PCR引物序列见表1。

1.2.5 人IL-12 p70 ELISA检测 收集处理72 h后的空白组、空载组和IL-12组以及PMA阳性对照组(培养24 h)的培养上清, 10 000 r/min离心5 min,吸取上清。按照人IL-12 p70 ELISA试剂盒说明书操作,在波长450 nm处比色测定各样品的吸光度值(D值)。以标准品的浓度为纵坐标(Y轴)、D值为横坐标(X轴)绘制标准曲线,并计算相应上清中IL-12的含量。每个样品设两个复孔,实验重复3次。

1.2.6 Western blot 将处理后的THP-1细胞以 $1 \times 10^6$ /孔的浓度接种于6孔板,分别提取72 h空白组、空载组、IL-12组和PMA阳性对照组细胞(培养24 h)的总蛋白,以 $\beta$ -actin为内参,相对定量4组中巨噬细胞表面分化标志CD11b和CD68蛋白表达量变化情

表1 PCR引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers

编码基因 Genes	正、反义链 Orientation	引物序列(5'→3') Sequence (5'→3')	产物长度(bp) Amplification size (bp)
<i><math>\beta</math>-actin</i> (NM_001101.3)	Sense	CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA	564
	Anti-sense	AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC	
<i>p40</i> (NM_002187.2)	Sense	GTG GAG TGC CAG GAG GAC A	148
	Anti-sense	TCT TGG GTG GGT CAG GTT T	
<i>p35</i> (NM_000882.3)	Sense	CTG GAC CAC CTC AGT TTG G	155
	Anti-sense	TCA GAA GTG CAA GGG TAA AA	
<i>CD68</i> (NM_001040059.1)	Sense	CGC AGC ACA GTG GAC ATT	246
	Anti-sense	AGG CCA AGA AGG ATC AGG	
<i>CD11b</i> (NM_001145808.1)	Sense	GCT GCC GCC ATC ATC TTA C	108
	Anti-sense	CCA CAT GCC AGT GTT CTG C	

况。

**1.2.7 细胞吞噬实验** FITC-葡聚糖法是鉴别细胞吞噬功能的一种简便方法。FITC-葡聚糖40000是分子量为40 000、带FITC标签的大分子物质。吞噬细胞可在一定条件下吞噬该异物,在490 nm波长激发光刺激下产生绿色荧光。4 °C培养条件下,吞噬细胞不具有生物活性,不能吞噬异物;而37 °C培养条件下,细胞正常生长,具有吞噬功能。根据不同的荧光型可区分非特异性荧光(多为均质型)和特异性荧光(多为颗粒型)。

离心收集处理72 h的空白组、空载组和IL-12组细胞, PBS(pH7.4)清洗3次, 残留300 μL清洗液重悬细胞, 吹散混匀; 每组取2份100 μL重悬液, 按1:1比例加入等量的FITC-葡聚糖40000工作液(1 mg/mL), 轻轻吹打混匀, 分别在4 °C、5% CO<sub>2</sub>和37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养条件下孵育1 h; 之后1 000 r/min离心5 min, PBS清洗细胞4次, 用100 μL PBS重悬细胞, 吹散混匀; 取一滴重悬液(约50 μL)滴在干净载玻片上, 盖上盖玻片, 避免产生气泡; 在正置荧光显微镜下观察细胞吞噬葡聚糖的情况, 计数200个细胞, 计算吞噬效率, 比较各组细胞吞噬能力。计算公式如下:

$$\text{吞噬效率(\%)} = \frac{37\text{ }^{\circ}\text{C处理组特异性荧光细胞数}}{200} \times 100\%$$

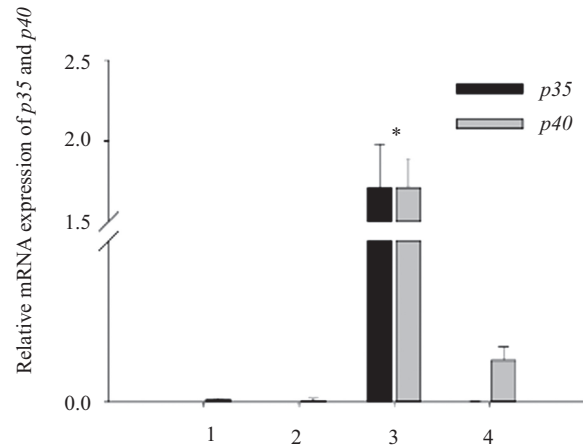
### 1.3 统计学方法

利用SPSS 17.0统计学软件, 多组间比较用单变量方差分析,  $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 mRNA和蛋白水平检测IL-12的表达量

mRNA水平上, 感染过表达IL-12病毒的THP-1细胞高表达*p35*和*p40*基因, 与其他3组相比,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义(图1、表2); 在波长450 nm处检测一系列已知浓度的人IL-12 p70标准品的吸光



1: 空白组; 2: 空载组; 3: IL-12组; 4: PMA阳性对照组。\* $P < 0.05$ , 分别与空白组、空载组和PMA阳性对照组比较。

1: blank control group; 2: empty vector group; 3: experimental group; 4: positive control group. \* $P < 0.05$  compared with the blank control group, empty vector group and positive control group, respectively.

图1 各组24 h IL-12 *p35*和*p40*亚基的mRNA表达水平

Fig.1 mRNA expression of IL-12 *p35* and *p40* in each group after incubating 24 h

度, 将浓度与吸光度值线性拟合制作标准曲线, 得到:  $y = 488.31x - 58.253 (r = 0.9989)$ 。利用标准曲线间接计算出空白组、空载组、IL-12组和PMA阳性对照组上清液中的IL-12 p70含量(表2): 空白、空载和阳性对照组均未检测到IL-12 p70, IL-12组高表达( $558.808 \pm 0.003$  pg/mL), 证明过表达IL-12 THP-1细胞模型构建成功。

### 2.2 细胞形态学检测

与空白和空载组细胞(图2A和图2B)相比, IL-12组的THP-1细胞团块间细胞界限不明显, 散在细胞数量明显增加; 细胞边缘不光滑, 偶见毛刺状突起(图2C); 可观察到附壁现象(散在细胞贴于6孔板底部, 轻轻吹打即可重悬, 无需胰酶消化)。而与PMA阳性对照组(图2D)相比, IL-12组THP-1细胞附壁较不牢靠且突起较少、较短, 散在细胞数目也较少。

表2 mRNA和蛋白水平检测各处理组IL-12表达量的统计数据

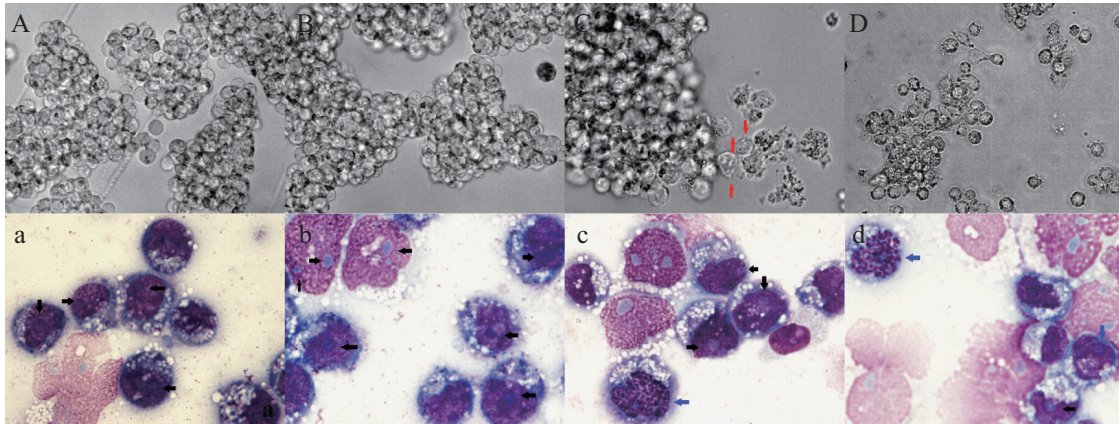
Table 2 Statistics of IL-12 mRNA and protein expressions in each group

检测指标	空白组	空载组	IL-12组	PMA阳性对照组
Examination index	Blank control group	Empty vector group	Experimental group	Positive control group
IL-12 <i>p35</i> mRNA expression at 24 h	Undetected	Undetected	1.710±0.269*	Undetected
IL-12 <i>p40</i> mRNA expression at 24 h	Undetected	Undetected	1.710±0.182*	0.026±0.008
IL-12 p70 protein expression at 72 h	Undetected	Undetected	558.808±0.003*	Undetected

\* $P < 0.05$ , 分别与空白组、空载组和PMA阳性对照组比较。

\* $P < 0.05$  compared with the blank control group, empty vector group and positive control group, respectively.

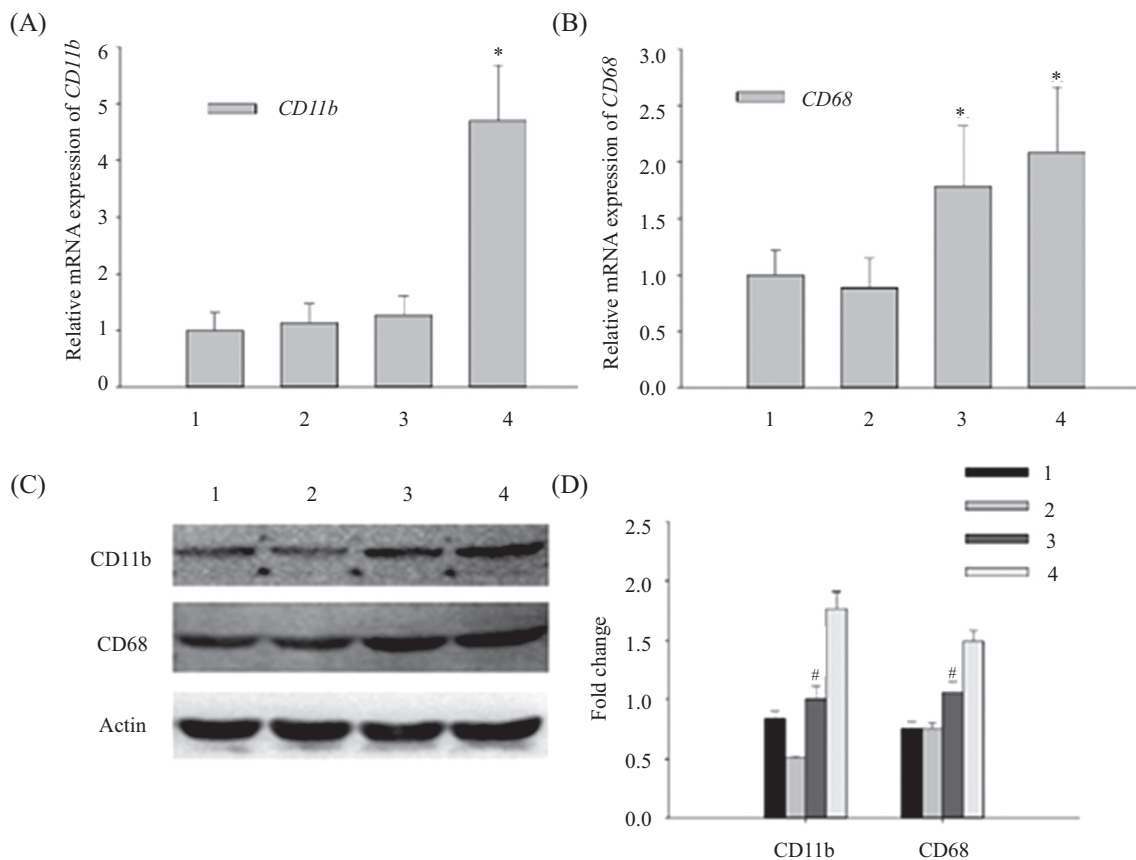




A、a: 空白组; B、b: 空载组; C、c: IL-12组; D、d: PMA阳性对照组。A、B、C、D: 各处理组未染色细胞的形态变化(200×); a、b、c、d: 各处理组细胞吉姆萨染色后的形态变化(1 000×); 红色箭头所指可见细胞突起, 黑色箭头所指可见核仁, 蓝色箭头所指可见核染色质浓集呈条索状。  
A,a: blank control group; B,b: empty vector group; C,c: experimental group; D,d: positive control group. A,B,C,D: morphologic change of unstained cells in each group (200×); a,b,c,d: morphologic change of cells stained by Giemsa's staining in each group (1 000×); The red arrows indicated cell processes; The blank arrows indicated cell nucleolus; The blue arrows indicated that the nuclear chromatin appeared to be dense and cordlike.

图2 各处理组THP-1细胞形态学变化

Fig.2 Morphologic change of THP-1 cells in each group

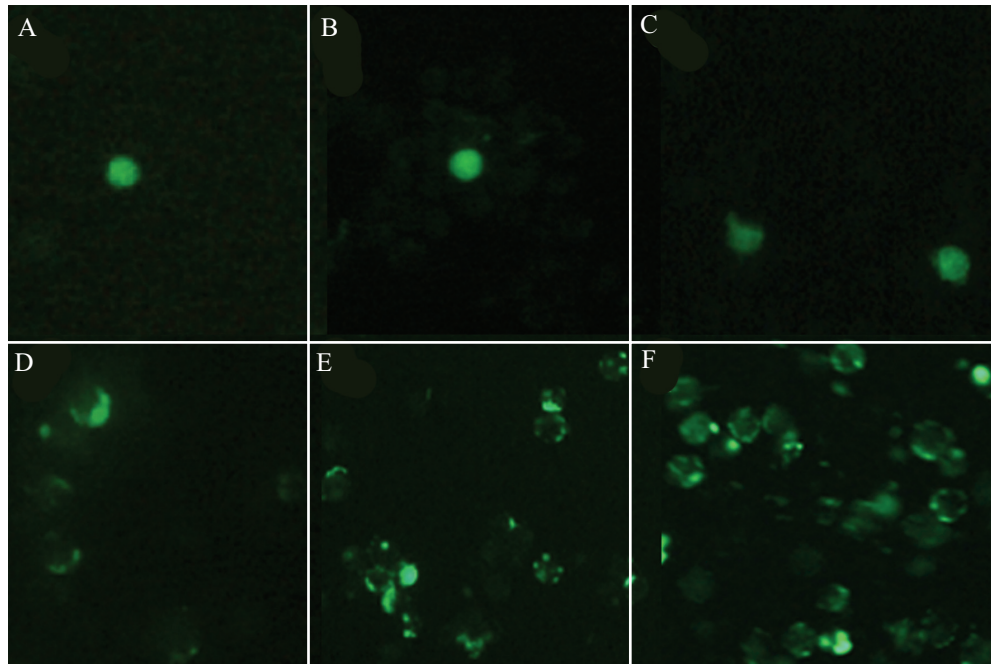


A: 各处理组细胞24 h *CD11b*的mRNA表达情况; B: 各处理组细胞24 h *CD68*的mRNA表达情况; C、D: 各处理组*CD11b*和*CD68*蛋白的Western blot结果。1: 空白组; 2: 空载组; 3: IL-12组; 4: PMA阳性对照组。\* $P < 0.05$ , 分别与空白和空载组比较; # $P < 0.05$ , 与空载组比较。

A: 24 h *CD11b* mRNA expression in each group; B: 24 h *CD68* mRNA expression in each group; C,D: *CD11b* and *CD68* protein expressions in each group. 1: blank control group; 2: empty vector group; 3: experimental group; 4: positive control group. \* $P < 0.05$  compared with the control group and empty vector group respectively; # $P < 0.05$  compared with the empty vector group.

图3 巨噬细胞分化标志的mRNA和蛋白表达水平检测

Fig.3 Relative mRNA and protein expressions of macrophage differentiation markers



A: 4 °C空白组; B: 4 °C空载组; C: 4 °C IL-12组; D: 37 °C空白组; E: 37 °C空载组; F: 37 °C IL-12组。

A: blank control group at 4 °C; B: empty vector group at 4 °C; C: experimental group at 4 °C; D: blank control group at 37 °C; E: empty vector group at 37 °C; F: experimental group at 37 °C.

图4 各处理组THP-1细胞吞噬能力比较(200×)

Fig.4 A comparison of THP-1 cells phagocytosis in each group (200×)

油镜下观察染色后IL-12组和PMA阳性对照组细胞: 细胞核仁模糊, 有的甚至完全消失; 核染色质浓集, 呈条索状(图2c和图2d)。

### 2.3 检测巨噬细胞分化标志

如图3所示, 与空白和空载组相比, IL-12组 *CD11b*和*CD68* 24 h mRNA表达量有不同程度的升高, 但*CD11b*变化不明显( $P>0.05$ ); 而PMA阳性对照组上述两指标表达量均显著升高( $P<0.05$ )(图3A和图3B)。IL-12组72 h *CD11b*和*CD68*蛋白表达量明显高于空载组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )(图3C和图3D)。

### 2.4 细胞吞噬功能检测

孵育72 h的空白组、空载组和IL-12组THP-1细胞, 加入FITC-葡聚糖后继续培养1 h, 检测各组细胞的吞噬能力, 其原理和具体操作步骤见1.2.7。荧光显微镜下观察发现: 4 °C培养条件下, 各组可见少量非特异性荧光, 多为均质型(均匀覆盖细胞表面, 见完整细胞形态)(200×, 图4); 而在37 °C孵育条件下, 各组荧光细胞均明显增多, 多为颗粒型, 吞噬效率分别是, 空白组(15.7±3.1)%、空载组(28.0±1.5)%、IL-12组(36.7±1.2)%; 与空白和空载组比较, IL-12组THP-1细胞吞噬能力明显增加( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

人白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12), 是由单核-巨噬细胞、淋巴细胞和树突状细胞等抗原提呈细胞分泌, 并由P35、P40两个亚基所组成的异源二聚体分子, 在体内发挥着十分重要的免疫调节作用。它可以刺激NK细胞和T细胞并产生IFN- $\gamma$ , 促进黏附分子表达; 诱导初始CD4<sup>+</sup>T细胞分化为Th1细胞, 同时刺激Th2细胞产生细胞因子IL-4、IL-13等<sup>[7]</sup>。大量实验研究证明, IL-12能够抑制肿瘤增殖, 延长荷瘤动物的生存时间, 具有一定的抗肿瘤作用<sup>[8-10]</sup>。然而, 对于IL-12的具体抗肿瘤机制尚未完全明了, 且由于直接应用的副作用较大, 限制了其在临床抗肿瘤领域中的应用。

本实验采用过表达人源性IL-12腺病毒载体感染THP-1细胞, 构建过表达IL-12的单核系肿瘤细胞模型, 探讨IL-12有无促进单核肿瘤细胞分化的作用。感染过表达IL-12腺病毒后, 在mRNA和蛋白水平检测巨噬细胞相关分化标志发现, 作为成熟巨噬细胞表面标志, CD68在IL-12和PMA阳性对照组明显升高, 但后者升幅更大; CD11b为黏附分子的一种, 在PMA阳性对照组高表达, 而在IL-12组小幅度升

高, 72 h蛋白表达量明显高于空载组, 与空白组比较差异无统计学意义。推断过表达IL-12可促进单核肿瘤细胞向巨噬细胞分化, 但其促分化能力较弱, 与PMA诱导24 h后细胞的分化程度相比有一定差距。

从形态学和吞噬功能两方面分析, 培养72 h的IL-12组THP-1细胞不仅吞噬能力逐渐增强, 也开始逐渐出现PMA诱导的巨噬细胞分化形态: 细胞散在生长, 呈圆形或不规则圆形, 边缘不平滑, 偶见毛刺状突起; 吉姆萨染色后进一步观察细胞胞浆与核的变化, 发现细胞核仁模糊, 有的甚至完全消失; 核染色质浓集, 呈条索状<sup>[11]</sup>。进一步实验证明过表达IL-12能够促进单核系肿瘤细胞向巨噬细胞分化。

与正常细胞相比, 肿瘤细胞分化程度低, 而且分化程度与其恶性程度呈负相关。IL-12作用于单核系肿瘤细胞, 促进细胞向较成熟的方向分化, 增强其吞噬能力, 一定程度上降低了肿瘤细胞的恶性程度, 为临床治疗单核细胞白血病提供了新思路。综上所述, 过表达IL-12能够促进单核肿瘤细胞向巨噬细胞分化。但是, IL-12到底是直接激活分化信号通路还是通过诱导其他分化相关细胞因子间接起作用, 还需要进一步研究证实。

### 参考文献 (References)

- Meinhardt G, Roth J, Hass R. Activation of protein kinase C relays distinct signaling pathways in the same cell type: Differentiation and caspase-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 2000; 7(9): 795-803.
- Hass R, Bartels H, Topley N, Hadam M, Köhler L, Goppeltstrübe M, *et al.* TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: Changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of cell surface antigens. *Eur J Cell Biol* 1989; 48(2): 282-93.
- Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 2007; 110(13): 4319-30.
- Portielje, JE, Gratama JW, van Ojik HH, Stoter G, Kruit WH. IL-12: A promising adjuvant for cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52(3): 133-44.
- Nair RE, Jong YS, Jones SA, Sharma A, Mathiowitz E, Egilmez NK. IL-12+ GM-CSF microsphere therapy induces eradication of advanced spontaneous tumors in HER-2/neu transgenic mice but fails to achieve long-term cure due to the inability to maintain effector T-cell activity. *J Immunother* 2006; 29(1): 10-20.
- 成凤, 匡文斌, 王秦, 秦晓林, 范晓脚, 董晋豫, 等. 携人IL-12基因腺病毒载体的构建及其对Hep3B细胞增殖及TGF- $\beta$ 表达的影响. *中国免疫学杂志*(Cheng Feng, Kuang Wenbin, Wang Qin, Qin Xiaolin, Fan Xiaoqing, Dong Jinyu, *et al.* Construction of adenovirus vector containing hIL-12 gene and its effects on the proliferation and TGF- $\beta$  expression of Hep3B cells. *Chinese Journal of Immunology*) 2012; 28(5): 402-6.
- Hamza T, Barnett JB, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 789-806.
- 张卓, 李玉红, 许倩. 重组IL-12对体外培养的绒癌细胞活性的影响. *河北医学*(Zhang Zhuo, Li Yuhong, Xu Qian. The effect of recombinant human IL-12 on cytoactive *in vitro* choriocarcinoma cell. *Hebei Medicine*) 2011; 17(5): 572-4.
- Marchi LH, Paschoalin T, Travassos LR, Rodrigues EG. Gene therapy with interleukin-10 receptor and interleukin-12 induces a protective interferon- $\gamma$ -dependent response against B16F10-Nex2 melanoma. *Cancer Gene Ther* 2011; 18(2): 110-22.
- Liang Wen, Wang Xuefeng. *In vitro* induction of specific anti-tumoral immunity against laryngeal carcinoma by using human interleukin-12 gene-transfected dendritic cells. *Chinese Medical Journal* 2011; 124(9): 1357-61.
- Hosoya H, Marunouchi T. Differentiation and dedifferentiation of human monocytic leukemia cell line, U937. *Cell Struct Funct* 1992; 17(5): 263-9.