

IL-18 基因转染对大鼠 C6 胶质瘤细胞生长特性的影响

蒋常文 闫蕴力* 马卫东 郑力芬 翟丽东 李文玲 曹翠丽

(河北医科大学基础医学研究所细胞生物学室, 石家庄 050017)

摘要 探讨 IL-18 基因转染对大鼠 C6 胶质瘤细胞生长特性的影响。用 MTT 法和流式细胞术检测 C6/IL-18 细胞和 C6 细胞的增殖特性和细胞周期分布。免疫细胞化学检测 C6/IL-18 细胞和 C6 细胞的增殖细胞核抗原(PCNA)、波形蛋白表达。结果显示, 与 C6 细胞相比 C6/IL-18 细胞的增殖能力降低, G_0/G_1 期细胞增多而 G_2/M 期细胞减少; PCNA、波形蛋白表达降低。研究表明, IL-18 基因具有抑制 C6 胶质瘤细胞增殖、降低其恶性程度的作用。

关键词 C6 胶质瘤细胞; IL-18 基因转染; 细胞增殖

胶质瘤是常见而难治的恶性肿瘤, 虽然采用手术、化疗和放疗等综合性措施, 但肿瘤易复发, 患者 5 年生存率仍然很低。多年来人们一直在探索各种新的治疗方法, 以提高其疗效。近年来, 肿瘤的免疫基因治疗研究方面取得了较大的进步, 其中 IL-18 作为肿瘤免疫治疗的候选基因, 引起普遍关注。研究表明, 将 IL-18 直接进行肿瘤内注射可抑制胶质瘤的生长^[1]; 将 IL-18 基因修饰的肿瘤细胞疫苗接种至裸鼠皮下或直接注射至瘤体内可使致瘤性明显降低。一般来说, IL-18 可以通过调节 T 细胞的功能, 以及诱导机体产生 IFN- γ 的途径抑制肿瘤细胞生长^[2]。但也有研究观察到, IL-18 的抗肿瘤作用也可不依赖细胞毒 T 淋巴细胞和 IFN- γ ^[3], 提示 IL-18 基因转染对肿瘤细胞本身可能有直接作用。最近, 我们利用逆转录病毒载体将 IL-18 基因转至 C6 胶质瘤细胞, 成功建立了能够稳定表达 IL-18 的 C6/IL-18 系, 并观察到 C6/IL-18 细胞的体内致瘤性明显降低^[4]。本实验旨在继续探讨 C6/IL-18 细胞生长特性, 为 IL-18 基因免疫治疗胶质瘤提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠 C6 胶质瘤细胞、C6/IL-18 细胞由本室保存。抗大鼠增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)一抗、波形蛋白一抗、SP 试剂盒购自北京中山生物技术公司; RPMI1640 培养基为

Sigma 公司产品、噻唑蓝(MTT)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)购自华美公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 C6 细胞、C6/IL-18 细胞均以 RPMI1640 培养基培养, 内含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μ g/ml。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养。

1.2.2 MTT 检测 C6/IL-18 细胞体外增殖情况 分别取对数生长期 C6/IL-18 和 C6 细胞, 0.04% EDTA 消化后, 加入培养液吹打混匀, 以 1×10^4 个/ml 细胞浓度接种于 96 孔培养板, 每孔加入 200 μ l 细胞悬液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 6 天。每日检测细胞生长情况。检测之前每孔加入 20 μ l 5 mg/ml MTT, 继续温育 4 h, 离心吸去上清液, 加入 200 μ l 孔 DMSO 终止反应。酶标仪测 570 nm 波长吸光值(A 值), 并绘制细胞生长曲线。本实验重复两次。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期分布 取对数生长期的细胞, 0.04% EDTA 消化、离心, 用冷 PBS 洗两次, 75% 乙醇固定细胞 24 h。上机前离心去乙醇, 用 PBS 洗两次, 加 100 μ g/ml RNase 37 $^{\circ}$ C 消化 30 min。50 μ g/ml PI 染色 30 min, 经尼龙网过滤后, 用 FACSTARCalibur 型流式细胞仪(Becton Dickinson, CA, USA)测定。实验结果经 ModFit LT2.0 软件处理, 计算出细胞周期的分布。

收稿日期: 2004-09-29 接受日期: 2005-01-26

* 通讯作者。Tel: 0311-6265558, E-mail: yanyl@hebmu.edu.cn

1.2.4 免疫细胞化学检测 PCNA 和波形蛋白表达 分别取对数生长期 C6/IL-18 和 C6 细胞, 0.04% EDTA 消化后, 加入培养液吹打混匀。以 1×10^5 个/ml 密度接种于预先置有无菌盖片的 6 孔培养板中, 待细胞爬满盖片后用 4% 多聚甲醛固定 40 min, 3% 过氧化氢处理 10 min。0.3% Triton X-100 处理 10 min、10% 正常羊血清处理 15 min; 小鼠抗大鼠 PCNA 或波形蛋白一抗(1:100)4 °C 温育过夜。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。羊抗鼠生物素标记的二抗 37 °C 温育 40 min; 过氧化物酶标记链霉卵白素 37 °C 温育 40 min, 0.05% DAB 显色、苏木精复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明、封片。在光镜下随机观察 8 个视野, 共计数 300 个细胞, 并计算阳性细胞指数。

1.2.5 计算机图像分析 将 PCNA 与波形蛋白免疫细胞化学染色样片置于显微镜下, 摄像系统选定免疫组化阳性部分, 随机选取 8 个视野进行定量分析, 分别测定 PCNA、波形蛋白阳性细胞的平均光密度值。

1.2.6 统计学方法 实验结果用 SPSS 11.0 统计软件分析, 计量资料作方差分析或 *t* 检验, 计数资料用 χ^2 检验, 取 $P < 0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 MTT 检测 C6/IL-18 细胞体外增殖情况

C6/IL-18 细胞接种培养 1 天后, 其增殖率与亲代 C6 细胞相比无显著性差异($P > 0.05$); 培养第 2 天开始, C6/IL-18 细胞增殖明显下降, 与 C6 细胞相比差异显著($P < 0.05$)(图 1)。

2.2 细胞周期分布

流式细胞仪分析细胞周期可见, C6/IL-18 细胞主要表现为 G_0/G_1 期细胞增多而 G_2/M 期细胞减少(表 1, 图 2)。说明 C6/IL-18 较 C6 细胞增殖降低。

2.3 PCNA 表达

PCNA 免疫阳性颗粒呈棕黄色, 位于细胞核内。C6/IL-18 细胞较 C6 细胞免疫阳性颗粒少而染色浅(图 3A、图 3B), 图像分析表明二者差异显著(表 2)。C6/IL-18 细胞阳性细胞标记指数为 75%, C6 细胞阳性细胞指数为 96%。经卡方检验, 两者有显著差异($P < 0.01$)。

2.4 波形蛋白的表达

波形蛋白免疫阳性颗粒呈棕黄色, 位于细胞质及突起内。C6/IL-18 细胞较 C6 细胞免疫阳性颗粒少

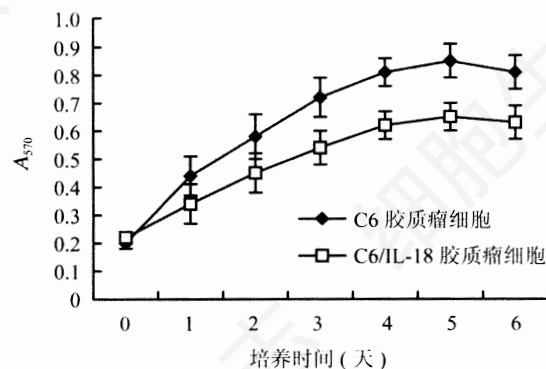


图 1 C6/IL-18 细胞和 C6 细胞的体外生长曲线

表 1 C6/IL-18 细胞和 C6 细胞的细胞周期分布($\bar{x} \pm s$)

细胞	G_0/G_1	S	G_2/M
C6/IL-18	52.82% \pm 3.12**	40.11% \pm 2.23*	7.05% \pm 2.17**
C6	42.81% \pm 2.69	43.25% \pm 2.75	13.92% \pm 2.05

与 C6 细胞相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 2 C6/IL-18 细胞和 C6 细胞 PCNA 与波形蛋白表达图像分析(A 值, $\bar{x} \pm s$)

细胞	PCNA	波形蛋白
C6/IL-18	0.085 \pm 0.026*	0.145 \pm 0.048*
C6	0.102 \pm 0.04	0.203 \pm 0.103

与 C6 细胞相比, * $P < 0.01$ 。

而染色浅(图 4A、图 4B), 图像分析表明二者差异显著(表 2)。C6/IL-18 细胞阳性细胞标记指数为 71%, C6 细胞阳性细胞标记指数为 95%。经卡方检验, 两者差别有高度显著性($P < 0.01$)。

3 讨论

有研究报道表明, 利用 IL-18 基因修饰的肿瘤细胞疫苗, 接种到体内可激发机体的免疫反应, 抑制肿瘤的生长^[5,6]。经 IL-18 基因修饰的肿瘤细胞疫苗自身不但能长期、稳定地分泌细胞因子, 发挥免疫调节和直接抗肿瘤作用, 而且可使其他肿瘤细胞表面的相关抗原被加工或提呈, 从而诱导特异的抗肿瘤免疫, 抑制肿瘤细胞生长。同时, IL-18 基因治疗也可避免长期、大剂量、反复应用细胞因子给机体带来的毒、副作用。一般认为 IL-18 通过活化 NK 细胞、促进 T 淋巴细胞增殖及诱导 NK 细胞、T 淋巴细胞分泌 IFN- γ 来发挥抗肿瘤作用。IL-18 也可激活巨噬细胞, 通过巨噬细胞产生的 NO 而发挥其对肿瘤细胞的毒性作用^[7]。同时, 也有研究发现 IL-18 的抗肿瘤作用不能完全被 IFN- γ 抗体和抗 NK 细胞 asialo GM1 抗体所阻断, 说明 IL-18 的抗肿瘤作

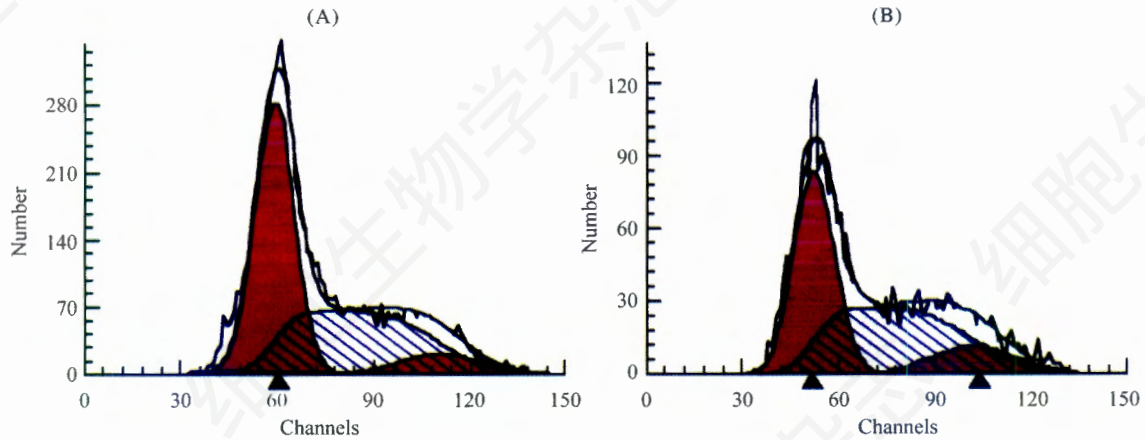


图2 C6/IL-18 细胞和 C6 细胞的细胞周期分布
A: C6/IL-18 细胞; B: C6 细胞。

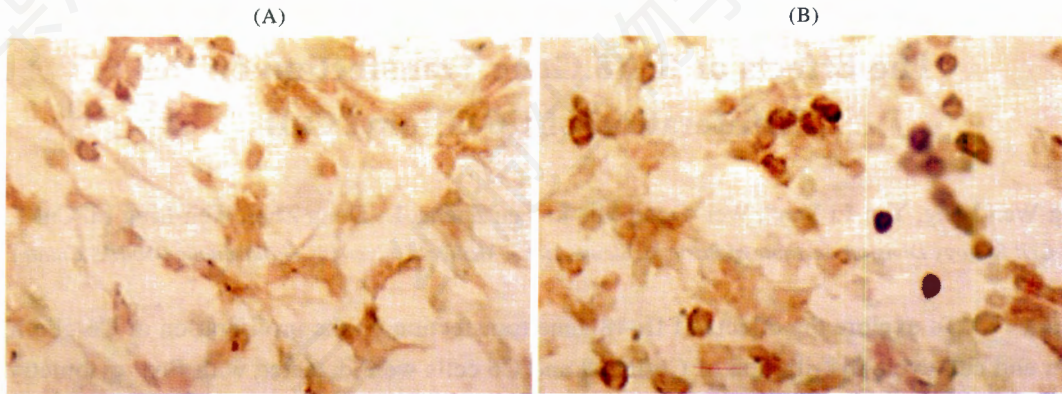


图3 C6/IL-18 细胞和 C6 细胞 PCNA 免疫细胞化学染色(200 ×)
A: C6/IL-18 细胞; B: C6 细胞。

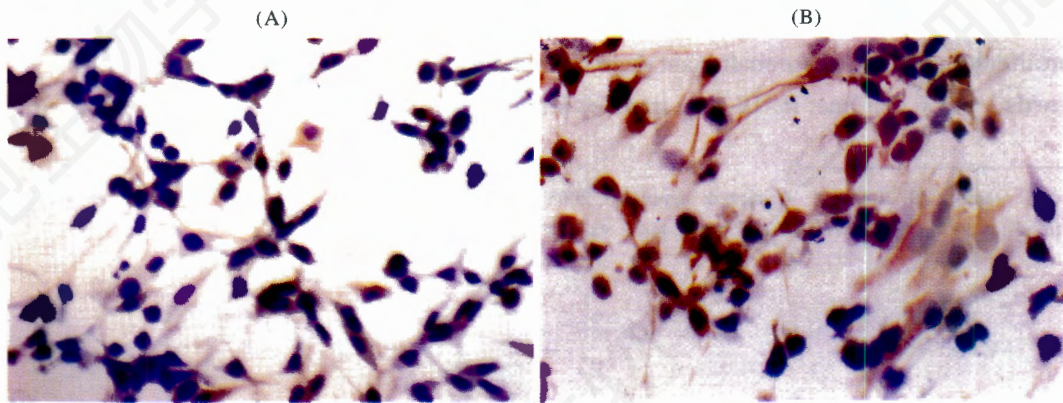


图4 C6/IL-18 细胞和 C6 细胞波形蛋白免疫细胞化学染色(100 ×)
A: C6/IL-18 细胞; B: C6 细胞。

用不单依赖 IFN- γ 和 NK 细胞, 也可通过其他途径而直接杀灭肿瘤细胞^[3]。

迄今, 关于 IL-18 对胶质瘤的作用, 以及 IL-18 基因对其修饰的肿瘤细胞生长特性的影响还缺乏研究。C6/IL-18 细胞为本室用 IL-18 基因经逆转录

病毒介导转染的大鼠 C6 胶质瘤细胞, 具有表达 IL-18 mRNA、分泌 IL-18 蛋白及诱导脾细胞生成 IFN- γ 的能力, 同时体内致瘤性降低^[4]。但对 C6/IL-18 细胞的体外生长特性还需要进一步探讨。对此, 本次实验研究结果表明, C6/IL-18 与亲代 C6 细胞相比

增殖能力降低, G_0/G_1 期细胞增多, 而 G_2/M 期细胞减少。PCNA 是分子量为 36 kDa 与细胞周期有关的核蛋白, G_1/S 期表达最高, 是 DNA 聚合酶的辅助因子。PCNA 作为判断细胞增殖状态的主要指标与胶质瘤恶性程度、以及治疗和预后有关^[8-10]。波形蛋白是一种中间丝蛋白, 发育过程中可一过性地出现于未成熟的胶质细胞中, 其表达量与胶质瘤的恶性和分化程度有关, 恶性程度高、分化程度低的胶质瘤其表达较高^[11]。本实验观察表明, C6/IL-18 细胞中 PCNA 和波形蛋白免疫阳性细胞明显减少, 说明 IL-18 基因导入可降低 C6 细胞恶性程度。

以上研究结果表明, 逆转录病毒介导 IL-18 基

因转染具有抑制大鼠 C6 胶质瘤细胞增殖作用。IL-18 基因可作为胶质瘤免疫基因治疗研究的候选基因。

参考文献 (References)

- [1] Kikuchi T *et al.* *J Immunother*, 2000, **23**: 184
- [2] Hwang KS *et al.* *Cancer Gene Ther*, 2004, **11**: 397
- [3] Okano F *et al.* *Anticancer Res*, 2000, **20**: 3411
- [4] 李文玲等. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, **20**: 522
- [5] Hikosaka S *et al.* *Int J Urol*, 2004, **11**: 647
- [6] Yamanaka R *et al.* *J Neurosurg*, 2003, **99**: 746
- [7] Kito T *et al.* *J Neurosurg*, 2003, **98**: 385
- [8] Sato N *et al.* *Neurosurg Rev*, 1999, **22**: 210
- [9] Kayaselcuk F *et al.* *J Neurooncol*, 2002, **57**: 115
- [10] Nam DH *et al.* *Oncol Rep*, 2004, **11**: 263
- [11] Shiras A *et al.* *Neoplasia*, 2003, **5**: 520

The Effects of IL-18 Gene Transfection on the Proliferation of C6 Glioma Cell

Chang-Wen Jiang, Yun-Li Yan*, Wei -Dong Ma, Li-Fen Zheng, Li-Dong Zhai, Wen-Ling Li, Cui-Li Cao
(Cell Biology Division, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract To explore the effects of IL-18 gene transfection on the proliferation of C6 glioma cell. The proliferation and cell cycle distribution of C6/IL-18 and C6 cells were detected with flow cytometry and MTT methods. The expression of PCNA and vimentin were determined with immunocytochemical assay. It was shown that the proliferation of C6/IL-18 cells was reduced compared with its parent C6 cells. The G_0/G_1 cells were more and G_2/M cells became less about C6/IL-18 cells than those of the C6 cells. The expression of the PCNA and vimentin were lower in C6/IL-18 cells than those in C6 cells. It was suggested that IL-18 gene transfection could inhibit the proliferation and decrease malignant degree of C6 cells.

Key words C6 cell line; IL-18 gene transfection; cell proliferation

Received: September 29, 2004 Accepted: January 6, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-311-6265558, E-mail: yanyl@hebmu.edu.cn