

# 外源性 IL-18 基因对 C6 胶质瘤细胞 体内致瘤抑制作用

李文玲 赵文清<sup>1</sup> 周娜静 韩 硕 王彦玲 蒋常文 闫蕴力\*

(河北医科大学基础医学研究所细胞生物室, 石家庄 050017; <sup>1</sup>河北省人民医院神经外科, 石家庄 050017)

**摘要** 将转 IL-18 基因的 C6/IL-18 细胞接种于 SD 大鼠颅内, 以接种 C6 细胞为对照。致瘤 21 天后磁共振成像下测量肿瘤大小。然后行病理切片, HE 染色观察肿瘤组织形态学变化; 应用免疫组织化学技术检测增殖性细胞核抗原 (proliferation cell nuclear antigen, PCNA)。应用流式细胞 (flow cytometer, FCM) 技术检测细胞周期和细胞凋亡的改变, 以及记忆性 T 淋巴细胞抗原 CD45RO 表达。结果显示, C6/IL-18 细胞成瘤体积为  $(49.3 \pm 11.5) \text{ mm}^3$ ; 亲代 C6 细胞成瘤体积为  $(232.6 \pm 22.3) \text{ mm}^3$ , 二者差异明显。HE 染色观察可见 C6/IL-18 细胞形成的肿瘤区内少见病理性核分裂相; 瘤组织内肿瘤血管较亲代 C6 细胞明显减少。C6/IL-18 肿瘤细胞核 PCNA 表达为 +++; 对照组为 ++。FCM 检测结果表明, C6/IL-18 细胞形成的肿瘤 S 期和 G<sub>2</sub>/M 细胞明显减少, 细胞凋亡程度明显增加; 记忆型 T 淋巴细胞明显增多。表明 IL-18 基因转染后可直接抑制 C6 细胞增殖, 并可能通过分泌 IL-18 激发机体免疫系统应答反应、抑制肿瘤血管生长、降低 C6 胶质瘤细胞的体内致瘤性。

**关键词** 白介素 18 基因; C6 胶质瘤细胞; 致瘤性; 细胞免疫

目前, 肿瘤基因治疗的研究着重于免疫基因治疗, 即将免疫活性物质 (如细胞因子) 的基因导入肿瘤细胞内; 转染了细胞因子基因的肿瘤细胞, 不但能分泌细胞因子发挥免疫调节和直接抗肿瘤作用, 而且该肿瘤细胞的致瘤性降低, 免疫原性增强, 诱导特异的抗肿瘤免疫, 从而对肿瘤进行治疗和预防<sup>[1,2]</sup>。

白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18) 是一种多功能的细胞因子, 具有抗肿瘤、抗病原微生物、抗超敏反应等生物效应。研究表明, IL-18 具有显著的抗肿瘤作用和潜在的临床应用价值, 并作为肿瘤免疫基因治疗的候选基因受到越来越多的关注<sup>[3-6]</sup>。

在以前的研究中, 我们应用逆转录病毒作为载体将 IL-18 基因转入 C6 大鼠胶质瘤细胞, 建立了 C6/IL-18 系<sup>[7]</sup>; 并在后续的研究中观察到, 外源性 IL-18 基因可抑制 C6 胶质瘤细胞增殖和细胞周期相关基因表达, 导致 C6/IL-18 细胞在体外的增殖活性较亲代 C6 胶质瘤细胞明显降低<sup>[8-10]</sup>。本文在以上研究的基础上继续探讨外源性 IL-18 基因对 C6 胶质瘤细胞体内致瘤性的影响, 为 IL-18 基因治疗胶质瘤提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

C6 大鼠脑胶质瘤细胞系、C6/IL-18 细胞系由本室建立并保存。SD 大鼠由河北医科大学实验动物中心提供。羊抗大鼠增殖性细胞核抗原 (PCNA) 抗体为美国 Sant Crus 公司产品。小鼠抗大鼠 CD45RO 抗体以及羊抗小鼠 FITC-IgG 抗体为美国 Chemicon 公司产品。SP 法免疫组化试剂盒购自北京中山试剂公司。

CO<sub>2</sub> 培养箱日本 Hitachi 公司产品; 普通光学显微镜、倒置显微镜为日本 Olympus 公司产品; LXG-II 型离心机、大鼠脑立体定向仪 (江湾 I 型) 产自中国上海。Epics-XL II 型流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** C6、C6/IL-18 细胞以 RPMI-1640 培养基, 内含 10% 新生牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 mg/ml, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境下培养。

**1.2.2 大鼠颅内胶质瘤动物模型建立** 取纯种 SD 雄性大鼠 (体重 250~350 g), 共 14 只, 分为两组, 实验组 (9 只) 接种 C6/IL-18 细胞, 对照组 (5 只) 接种 C6 细

收稿日期: 2007-06-20 接受日期: 2007-10-12

\* 通讯作者: Tel: 0311-86265558, E-mail: yanyl@hebmu.edu.cn

胞。动物经 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 固定于大鼠脑立体定向仪头架上。选取颅内尾状核部位接种细胞, 其坐标为大鼠中点前 1.0 mm, 矢状缝右旁开 3.0~3.5 mm, 硬膜下 6.0 mm。按坐标定位, 暴露颅骨标志, 应用牙科磨钻钻孔, 用微量注射器将  $10 \mu\text{l}$   $1 \times 10^6$  个/ml 细胞悬液注入靶区。接种完毕后用骨腊封闭骨孔, 缝合皮肤<sup>[11]</sup>。

**1.2.3 磁共振成像(MRI)检测颅内肿瘤大小** 实验动物于接种后第 20 天利用 MRI 扫描观察肿瘤的生长情况。MRI 扫描条件为: 76 mm 表面线圈, TR/TE=500/20, 层厚 2 mm, 冠状面 T1 加权扫描。扫描前腹腔注射 1 ml 造影剂 GD-DTPA。计算肿瘤体积, 比较肿瘤的生长情况。肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )=(长径 $\times$ 宽径 $\times$ 2 倍层数) $\times\pi/6$ 。

**1.2.4 病理组织学检测** 所有大鼠于致瘤 21 天后脱颈处死, 取脑部肿瘤经福尔马林固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片 4  $\mu\text{m}$  厚, 进行 HE 染色、观察记录。

**1.2.5 免疫组织化学染色检测 PCNA 表达** 一抗为小鼠抗大鼠 PCNA, 按照试剂盒说明采用 SP 法免疫组织化学染色。判断标准: PCNA 表达以细胞核呈棕褐色为阳性细胞, 参照参考文献<sup>[12]</sup>标准, 每个视野中无阳性细胞为一, 阳性细胞 1%~5% 的为 +, 5%~50% 的为 ++, >50% 的为 +++。

**1.2.6 细胞周期及凋亡的 FCM 检测** 采用网搓法将组织制备成单细胞悬液, 调细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml。对收获的细胞用碘化丙啶(propidium iodide, PI) 一步插入性 DNA 荧光染色方法进行染色。DNA 染液中含 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNA 酶及 1.0% Triton-X 100。先用 0.01 mol/L PBS 离心洗涤 2 次, 去除样品中的 70% 乙醇。每份样品中加入 1 ml DNA 染液, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中染色 30 min。调整每份样品的细胞数为  $1 \times 10^6$  个/ml, 以脱落细胞样品中的正常细胞作为二倍体标准。上机检测前以 500 目筛网过滤, 使样品成为合格的单细胞悬液。采用 Epics-XL II 型流式细胞仪, 激发光源为 15 mW 氩离子激发器, 激发波长为 488 nm, 利用 Muticycle AV 软件对细胞周期及凋亡进行分析。测定前调整仪器的 CV 值在 2.0% 以内。

**1.2.7 流式细胞术检测 CD45RO 的表达** 采用网搓法将组织制备成单细胞悬液, 调细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml。二步法进行免疫荧光染色,  $100 \mu\text{l}$  细胞悬液先加  $10 \mu\text{l}$  CD45RO 单抗; 室温避光反应 30 min 后加  $5 \mu\text{l}$  二抗 FITC-IgG, 室温避光反应 30 min 后上机检

测。采用美国 Epics-XLII 型流式细胞仪分析, 蛋白质表达以荧光指数(fluorescence index, FI) 表示相对含量:  $\text{FI} = (\text{样品平均荧光强度} - \text{对照样品平均荧光强度}) / \text{正常样品平均荧光强度}$ 。

**1.2.8 统计学方法** 以上实验均重复 3 次, 实验数据以 SPSS 11.0 软件包采用 t 检验进行统计分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 C6/IL-18 细胞体内致瘤性改变

将 C6/IL-18 细胞、C6 细胞接种于大鼠颅内。分别于接种后 21 天进行鼠头部 MRI 检查, 以确定所形成肿瘤的体积的大小。结果显示: 9 只接种 C6/IL-18 细胞的大鼠有 4 只未成瘤, 而接种 C6 细胞的 5 只大鼠 MRI 显示全部成瘤。接种 C6/IL-18 细胞颅内成瘤的 5 只大鼠的肿瘤体积明显小于接种 C6 细胞大鼠的肿瘤体积, 经统计学分析二者具有显著性差异(表 1)。结果表明, IL-18 基因能够抑制肿瘤在体内生长。

### 2.2 形态学改变

C6 细胞动物模型肿瘤组织 HE 常规染色显示: 肿瘤细胞排列密集, 生长活跃异形性明显, 可见病理性核分裂相, 并向周围脑组织浸润性生长; 在瘤组织内可见肿瘤血管、血窦生成及新生的血管腔, 肿瘤组织和瘤周脑组织少见炎性细胞浸润。与此相比, C6/IL-18 细胞动物模型颅内肿瘤组织 HE 染色显示: 肿瘤区内可见蜕变的瘤细胞, 瘤细胞核固缩, 未见病理性核分裂相。瘤组织内肿瘤新生血管较前明显减少, 肿瘤周围可见大量炎细胞浸润(图 1)。

### 2.3 肿瘤细胞的 PCNA 表达

免疫组织化学染色 PCNA 阴性细胞核呈蓝色; PCNA 表达阳性细胞核呈棕褐色。观察不同细胞差别可见, C6 细胞动物模型颅内肿瘤组织 PCNA 表达呈 +++; C6/IL-18 细胞动物模型颅内肿瘤组织 PCNA 表达呈 ++, 较对照组表达减弱(图 2)。

### 2.4 FCM 检测细胞周期及细胞凋亡

细胞周期测定结果表明, 与 C6 细胞相比, C6/IL-18 细胞形成的肿瘤组织  $G_0/G_1$  期细胞增加, S 期与  $G_2/M$  期细胞减少, 细胞周期进程明显受到抑制。观察二者在细胞凋亡程度的差别, 可见 C6/IL-18 细胞形成的肿瘤组织在二倍体细胞峰前出现一个亚二倍体峰判定为凋亡细胞峰, 以凋亡率表示凋亡状态, 表明二者差别显著(图 3, 表 2)。

### 2.5 肿瘤组织周围浸润淋巴细胞 CD45RO 表达

表 1 C6/IL-18 细胞与 C6 细胞体内致瘤性比较

组别	接种数(只)	成瘤数(只)	成瘤率(%)	瘤体大小( $\bar{x}\pm s$ ) mm <sup>3</sup>
C6 细胞	5	5	100	232.6 ± 22.3
C6/IL-18 细胞	9	5	55.6	49.3 ± 11.5*

与 C6 细胞相比, \*P<0.05。

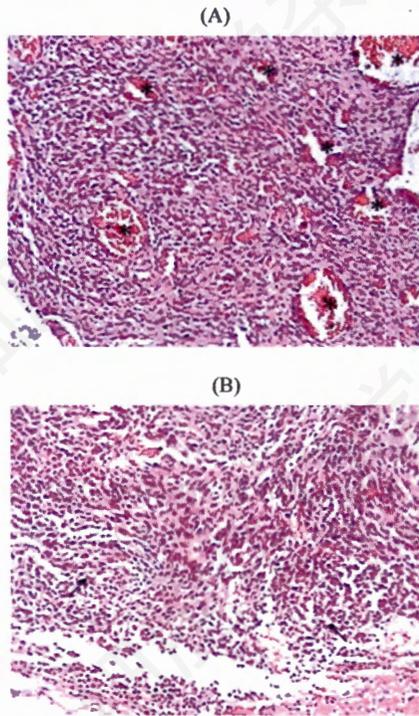


图 1 肿瘤组织 HE 染色

A: C6 细胞形成的肿瘤组织, 100x; B: C6/IL-18 细胞形成的肿瘤组织, 100x。星号(\*)示肿瘤血管; 箭头(→)示炎细胞浸润区域。

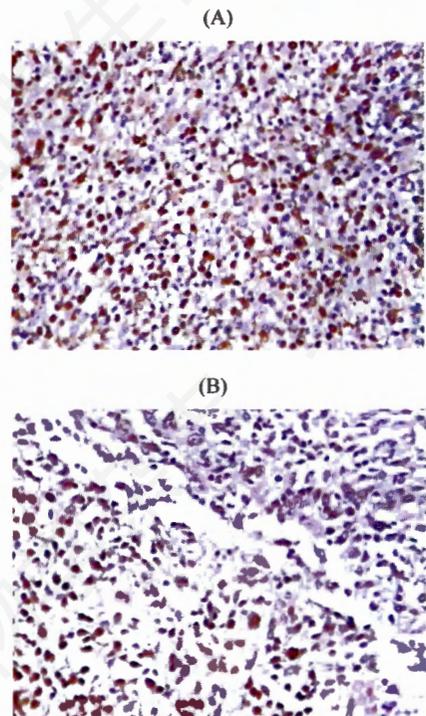


图 2 免疫组化检测肿瘤组织内 PCNA 表达

A: C6 细胞形成的肿瘤组织, 400x; B: C6/IL-18 细胞形成的肿瘤组织, 400x。

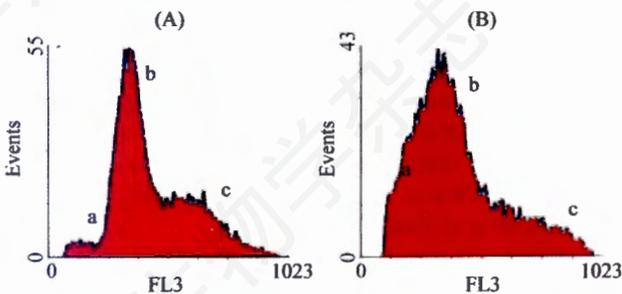


图 3 FCM 检测细胞周期与细胞凋亡率的差别

A: C6 细胞; B: C6/IL-18 细胞。a: 亚二倍体峰; b: G<sub>1</sub> 峰; c: G<sub>2</sub>/M 峰。

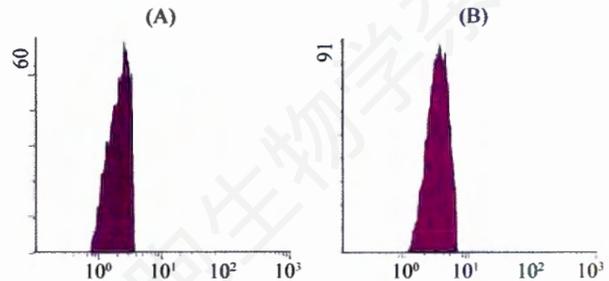


图 4 流式细胞仪检测 CD45RO 表达

A: C6 细胞形成的肿瘤组织; B: C6/IL-18 细胞形成的肿瘤组织。

表 2 FCM 检测 C6 细胞与 C6/IL-18 细胞形成的肿瘤组织内细胞周期与细胞凋亡率的差别[( $\bar{x}\pm s$ )%, n=3]

组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	凋亡率(%)
C6	38.93 ± 1.11	44.27 ± 2.92	32.20 ± 1.89	1.69 ± 0.81
C6/IL-18	71.90 ± 4.12*	6.48 ± 0.27*	12.26 ± 0.54*	13.59 ± 0.94*

与 C6 细胞相比, \*P<0.05。

C6细胞动物模型颅内肿瘤组织内CD45RO表达为 $1.01 \pm 0.03$ ; C6/IL-18动物模型颅内肿瘤组织内CD45RO表达为 $1.83 \pm 0.04$ ,二者差异明显( $P < 0.05$ )。结果说明C6/IL-18动物模型颅内肿瘤组织内T淋巴细胞浸润增加明显(图4)。

### 3 讨论

肿瘤,包括脑胶质瘤的发生、发展与机体的免疫功能关系密切。正常情况下,人体免疫系统中T细胞介导的免疫应答反应是抗肿瘤免疫的主要方式。T细胞可分为2个亚群,即原始T细胞,表达CD45RA;记忆T细胞,表达CD45RO<sup>[13]</sup>。研究显示:肿瘤发生时CD45RO阳性细胞数量减少,使得肿瘤细胞容易逃避宿主的监视,癌细胞易于发生浸润和转移<sup>[14~16]</sup>。

将细胞因子基因导入肿瘤细胞可使其自行分泌细胞因子,并在肿瘤组织周围局部积聚,改变肿瘤局部的免疫微环境,有利于免疫应答反应的激发。同时,免疫基因治疗可以避免全身应用细胞因子带来的毒副作用,并可使细胞因子在肿瘤局部获得长久的维持。经细胞因子基因修饰的肿瘤细胞,免疫原性增强,细胞表面某些黏附分子和MHC抗原的表达增强,诱导机体产生较强的特异性免疫应答,对肿瘤细胞的杀伤力明显提高。已有动物实验证实:IL-2、IL-4、IL-12等细胞因子可以有效治疗和预防颅内胶质瘤的发展,并且有些研究已进入二期临床阶段<sup>[17~19]</sup>。但关于IL-18基因治疗脑胶质瘤的研究尚不多见。

前期工作中我们将IL-18基因通过逆转录病毒载体介导转染入C6鼠脑胶质瘤细胞中,建立了C6/IL-18细胞系,并发现C6/IL-18细胞能够分泌具有生物活性的IL-18;其体外增殖率和体内致瘤性较C6细胞明显降低<sup>[7]</sup>。并进一步在体外培养状况下观察到外源性IL-18基因转染可导致C6细胞周期改变,表现为G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞增多、G<sub>2</sub>/M期细胞减少;PCNA及波形蛋白表达降低,细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白B1 mRNA及蛋白质表达降低;而p21 mRNA及蛋白质表达增高等细胞增殖相关因素的改变<sup>[8~10]</sup>。以上研究表明,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。但关于IL-18基因对C6细胞体内增殖抑制作用,特别是其病理改变和组织学变化,以及是否涉及免疫系统参与等问题还需要深入了解。

对此,在本实验中我们将C6/IL-18和C6细胞植入大鼠颅内,并观察到C6/IL-18肿瘤组织较原代C6细胞所形成的肿瘤组织瘤体减小;瘤组织内肿瘤新生血管较C6细胞明显减少,提示C6/IL-18细胞可通过旁分泌效应抑制肿瘤中的新生血管的形成,降低肿瘤组织的血液供应,从而抑制肿瘤细胞的生长。

另外,研究结果显示C6/IL-18细胞瘤组织中PCNA表达降低;细胞周期进程受到明显抑制,与我们体外观察结果一致<sup>[8~10]</sup>。进一步研究显示:与C6细胞相比,C6/IL-18细胞致瘤组织内细胞凋亡明显,并有大量的记忆型T淋巴细胞浸润。说明IL-18基因可能通过增加肿瘤细胞的免疫原性,激发机体自身的免疫功能达到抗肿瘤的效果。

总之,外源性IL18基因使C6细胞在体内的增殖活性和致瘤性降低,这一作用主要是通过抑制肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤新生血管形成,以及诱发机体T细胞介导的免疫反应来实现的。本研究为进一步探讨IL-18基因对脑胶质瘤的免疫治疗提供了资料。

### 参考文献(References)

- [1] 李文玲等. 中华肿瘤杂志, 2005, 27: 141
- [2] DiMeco F et al. J Neurosurg, 2000, 92: 419
- [3] Wang Q et al. J Cancer Res Clin Oncol, 2001, 127: 718
- [4] Osaki T et al. J Immunol, 1998, 160: 1742
- [5] Nagai H et al. Cancer Invest, 2000, 18: 206
- [6] Cao R et al. FASEB J, 1999, 13: 2195
- [7] 李文玲等. 分子与细胞免疫学杂志, 2004, 20: 522
- [8] 蒋常文等. 细胞生物学杂志, 2005, 26: 339
- [9] 蒋常文等. 第四军医大学学报, 2006, 27: 1192
- [10] 蒋常文等. 肿瘤, 2006, 26: 436
- [11] 焦保华等. 河北医科大学学报, 2000, 21: 208
- [12] Pedersen KB et al. Br J Cancer, 2002, 87: 1281
- [13] Leon SP et al. Cancer, 1996, 77: 362
- [14] Raspadori D et al. Leukemia, 1999, 13: 1254
- [15] Sallusto F et al. Annu Rev Immunol, 2004, 22: 745
- [16] 徐小华等. 中国神经精神疾病杂志, 1995, 21: 323
- [17] Ewend MG et al. J Immunother, 2000, 23: 438
- [18] Glizemen-Smits KM et al. Cancer Res, 2000, 60: 2449
- [19] Okada H et al. Hum Gene Ther, 2001, 12: 575

## The Exogenous IL-18 Gene Inhibits C6 Glioma Cell Tumorigenesis *in Vivo*

Wen-Ling Li, Wen-Qing Zhao<sup>1</sup>, Na-Jing Zhou, Shuo Han, Yan-Ling Wang, Chang-Wen Jiang, Yun-Li Yan\*

(Cell Biology Division, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

<sup>1</sup>Neurosurgery Department, Hebei People's Hospital, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract** To investigate the IL-18 gene inhibit C6 glioma cell growth *in vivo*, the intracranial tumor models were established by rejected C6/IL-18 cells (a cell line with IL-18 genes transfected into C6 glioma cell) and its parents cell line, C6 cells, respectively. After tumor formation for 21 days, tumor sizes were measured under magnetic resonance imaging. Histopathological section and HE stain were made to examine the pathological changes in the tumors. Immunohistochemical stain was applied to test the expression of proliferation cell nuclear antigen (PCNA). Flow cytometer (FCM) were used to examine cell cycle distribution and the expression of the memory T lymphocytes maker, CD45RO. It was showed that the tumor size formed by C6/IL-18 cell was  $49.3 \pm 11.5 \text{ mm}^3$ , which was much smaller than that of  $232.6 \pm 22.3 \text{ mm}^3$  formed by its parents C6 cells. HE stain revealed that the pathological mitotic cells and tumor vessels were rare found in the tumor of C6/IL-18 cell. The PCNA expression in C6/IL-18 cell tumor was +++, while it was ++ in the C6 cell tumor. Compared with the control group, S and G<sub>2</sub>/M phase cells were decreased, and apoptotic rate was significant increased in C6/IL-18 cell group. The T lymphocytes with CD45RO positive were markedly presence in the tumor tissue of C6/IL-18 group detected with FCM. The exogenous IL-18 genes could partially inhibit C6 cell proliferation and tumorigenesis *in vivo*. Its mechanism may include inhibiting the expression of related cellular genes, suppressing the tumor neovascularity and inducing the T cell-mediated anti-tumor immune reaction.

**Key words** IL-18 gene; C6 glioma cell; tumorigenicity; cellular immunity

Received: June 20, 2007 Accepted: October 12, 2007

\*Corresponding author. Tel: 86-311-86265558, E-mail: yanyl@hebmu.edu.cn