

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.01.009

· 基础研究 ·

IL-27 通过上调 MIG 和 IP-10 的表达抑制肿瘤血管形成

刘丽华, 单保恩, 王士杰*, 赵连梅(河北医科大学第四附属医院 科研中心; 河北省肿瘤研究所, 石家庄 050011)

[摘要] 目的: 研究 IL-27 对肿瘤血管生成的抑制作用及其机制。方法: IL-27 基因稳定转染的人食管癌细胞(Eca109/IL-27)接种于裸鼠, 建立荷瘤裸鼠模型, 观察肿瘤生长情况和裸鼠生存期。用 ELISA 法检测脾细胞 IFN- γ 的分泌水平; 免疫组化法检测瘤组织中 VEGF 和 CD34 的表达, 并通过 CD34 的水平计算微血管密度; 用 RT-PCR 法检测肿瘤组织趋化因子 IP-10、MIG mRNA 的表达水平。结果: 接种 Eca109/IL-27 细胞荷瘤小鼠的生存期较接种野生型 Eca109 细胞(未转染质粒)和 Eca109/LXSN 细胞(空载体质粒转染)小鼠的生存期明显延长($P < 0.05$)。接种 Eca109/IL-27 细胞的裸鼠瘤组织中 VEGF 和 CD34 的表达水平显著性低于接种 Eca109 细胞和 Eca109/LXSN 细胞, 微血管密度显著降低(均 $P < 0.01$)。Eca109/IL-27 组小鼠脾细胞产生较高水平的 IFN- γ ($P < 0.05$), 趋化因子 IP-10 和 MIG mRNA 的表达水平也显著性高于接种 Eca109 细胞组和 Eca109/LXSN 细胞组($P < 0.05$)。结论: IL-27 在裸鼠体内通过上调 IP-10 和 MIG 表达抑制肿瘤血管生成, 从而发挥抗肿瘤作用。

[关键词] IL-27; 食管癌; 抗血管生成; IP-10; MIG

[中图分类号] R735.1; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)01-040-05

Interleukin-27 inhibits tumor angiogenesis through up-regulating expression of MIG and IP-10

LIU Li-hua¹, SHAN Bao-en, WANG Shi-jie*, ZHAO Lian-mei (Research Center, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University; Hebei Provincial Cancer Institute, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of IL-27 against human tumor angiogenesis and the related mechanisms. **Methods:** Human esophageal carcinoma cells (Eca109/IL-27) stably transfected with IL-27 gene were injected into nude mice to establish tumor-bearing mouse model. The survival time and tumor growth were observed. IFN- γ level secreted by splenocytes was measured by ELISA. Expression of VEGF and CD34 was detected by immunohistochemistry method and MVD was calculated according to CD34 level. RT-PCR was used to detect the expression of IP-10 and MIG mRNA in the tumor tissues. **Results:** The survival time of mice injected with Eca109/IL-27 cells was significantly longer than those of mice injected with wide type Eca109 or Eca109/LXSN (blank vector) cells ($P < 0.05$). Expression of VEGF and CD34 in Eca109/IL-27-inoculated mice was lower than those in Eca109 or Eca109/LXSN groups. Production of IFN- γ by splenocytes in mice injected with Eca109/IL-27 cells was higher than those with Eca109 and Eca109/LXSN ($P < 0.05$). MIG and IP-10 mRNA expression was also higher than those in Eca109 or Eca109/LXSN injected mice ($P < 0.05$). **Conclusion:** IL-27 can inhibit tumor angiogenesis in nude mice through up-regulating the expression of MIG and IP-10, and thus exerts anti-tumor effect.

[Key words] IL-27; esophageal neoplasms; antiangiogenesis; IP-10; MIG

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(1): 40-44]

食管癌作为消化系统常见的恶性肿瘤, 长期以来严重威胁着人们的身体健康。临床上, 多数食管癌患者就诊时已属中、晚期, 由于转移和复发率较高, 术后 5 年生存率一直徘徊在 30% 左右^[1]。因此, 除早期诊断和早期治疗以外, 研究食管癌浸润、转移相关的生物学行为, 对提高患者术后生存率有重要意义。

[基金项目] 科技部重大科技攻关课题(No. 2006BAI02A07)。Supported by the Key Science and Technology Research Project of Chinese Technology Administration(No. 2006BAI02A07)

[作者简介] 刘丽华(1972-), 女, 汉族, 河北承德人, 医学博士, 主要从事食管癌防治的基础研究。E-mail: lihualiu567@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author)。E-mail: hb.w.sj@163.com

研究表明^[24],干扰素(IFN)、白细胞介素(IL)、集落刺激因子(CSF)家族的细胞因子如IFN- γ 、IL-12及GM-CSF对肿瘤有明显的治疗作用。IL-27是一种新的IL-6/IL-12家族细胞因子,主要作用于固有免疫系统和获得性免疫系统的各种细胞而发挥广泛的免疫调节作用^[5]。近年来研究发现,IL-27除了可诱导初始型T细胞增殖,促进IFN- γ 和CTL的产生,在Th1反应中起重要作用^[6],还参与了自身免疫性疾病、慢性炎症反应和某些感染性疾病的发病和调控。然而对于IL-27在抗肿瘤特别是抗转移方面的研究较少。研究表明^[7-9],将转染IL-27基因的小鼠结肠癌细胞C26、神经纤维瘤细胞TBJ移植到小鼠体内,肿瘤的生长均受到明显抑制;对低免疫原性的小鼠黑素瘤细胞B16F10,IL-27不仅通过活化免疫系统发挥抗肿瘤作用,而且还具有直接的抗血管生成作用。本研究采用基因转染的方法将小鼠IL-27基因转染入人食管癌细胞Eca109,建立裸鼠移植瘤模型,观察IL-27在抗肿瘤血管生成中的作用并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人食管癌细胞株Eca109、空载体转染的Eca109/LXSN细胞和IL-27转染的Eca109/IL-27细胞由本室保存^[10]。4~5周龄免疫缺陷BALB/c裸鼠购自中科院北京实验动物中心(实验动物合格证号:SCXK京-2005-0013)。Trizol为Invitrogen公司产品,RPMI 1640培养基购自Gibco公司,兔抗人IL-27抗体为Biolegend公司产品,FITC标记的羊抗兔二抗购自美国Sigma公司,IFN- γ 检测试剂盒购自晶美公司,RT-PCR两步法试剂盒购自Promega公司,兔抗鼠VEGF、CD34抗体和驴抗兔二抗购自北京中山公司。

1.2 免疫荧光法检测转染细胞IL-27的表达

以逆转录病毒为载体,将IL-27基因转染人食管癌细胞株Eca109^[11]。将密度为 5×10^4 /ml Eca109/IL-27、Eca109/LXSN和Eca109 3种细胞接种于预先加有玻片的6孔板中,于37℃、5%CO₂细胞培养箱培养24h,使细胞贴壁生长。4%戊二醛于4℃固定60min,滴加PBS稀释的兔抗IL-27一抗(1:100),室温孵育10min后置于湿盒内,4℃冰箱过夜(12h),滴加FITC标记二抗,37℃孵育40min后,用10%缓冲甘油封片,立即置激光共聚焦显微镜下观察,激发波长为488nm,发射波长505nm。

1.3 Eca109/IL-27的体内抑瘤实验

4~5周龄裸鼠48只,体重12~14g,随机分为4组,每组12只。将Eca109/IL-27、Eca109/LXSN和Eca109细胞(1×10^7 /0.2ml)分别接种于裸鼠腹腔(实验组),空白对照组裸鼠于腹腔注射0.2ml生理盐水,7d后每组处死6只观察肿瘤的形成,剩余裸鼠观察生存期。

1.4 ELISA检测荷瘤裸鼠脾单个核细胞分泌IFN- γ 的水平

无菌分离荷瘤裸鼠脾脏,密度梯度离心法获得单个核细胞,接种于96孔板(含细胞 2×10^5 /孔),加入放射线灭活后的Eca109细胞诱导,培养48h后取上清,用ELISA法检测各孔培养上清中IFN- γ 的含量,操作步骤按产品说明书进行。

1.5 免疫组化染色检测裸鼠移植瘤组织中VEGF和CD34的表达

免疫组化染色检测肿瘤组织VEGF和CD34表达。石蜡切片脱蜡至水,室温孵育,高压蒸汽抗原修复,山羊血清封闭,以抗VEGF和抗CD34抗体为一抗进行常规免疫组化染色,阳性结果判定标准如下:(1)CD34:CD34阳性染色的微血管呈棕黄色至深棕色,任何血管内皮细胞[细胞核和(或)细胞质和(或)细胞膜中]出现棕黄色染色均为CD34阳性(包括单个内皮细胞)。将CD34染色的切片置于低倍镜下($\times 100$)观察,随机选择10个微血管密集区域于400倍显微镜下观察,记录微血管数,取均值即单个高倍镜视野下的微血管数量(MVD值)。

(2)VEGF:参考Kim^[12]方法,从两个方面评分:高倍镜下(400倍)取10个不同视野,每个视野计数100个细胞,胞质染色为阳性细胞。阳性细胞百分率<5%为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。染色强度:无染色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,深棕色或胞质中出现深棕色斑块3分。两积分相加之和作为最后的染色积分。

1.6 RT-PCR检测移植瘤组织IP-10和MIG mRNA的表达

按Trizol产品说明书提取3组肿瘤组织总RNA,以Promega公司两步法试剂进行RT-PCR。首先反转录为cDNA,扩增IP-10基因上游引物5'-AGC CTC CCC ATC AGC ACC AT-3',下游引物5'-TCT CTG CTG TGC ATC CAT CG-3'(片段大小为368bp);MIG基因上游引物5'-GAC ATT CTC GGA CTT CAC TC-3',下游引物5'-GAT TCA GGG TGC TCG TTG GT-3'(片段大小为468bp)。第二步反应条件为:IP-10:95℃ 30s,55℃ 45s,72℃ 30s,

MIG:95 °C 30 s,57°C 30 s,72 °C 30 s,进行30个循环,最后再于72 °C 延伸5 min。每个PCR产物6 μl于10g/L琼脂糖凝胶中80 V电泳30 min,扩增产物采用Gel-pro analysis3.1进行照相扫描并进行密度分析,计算灰度值/β-actin的比值。

1.7 统计学分析

用SPSS 11.5软件对所有数据进行统计学处理。数据以均数 ± 标准差表示,各组均数的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 Eca109/IL-27细胞株的鉴定

经免疫荧光染色,激光共聚焦显微镜检测结果显示,在Eca109/IL-27细胞质中有IL-27蛋白表达(呈绿色荧光);而Eca109/LXSN及野生型Eca109细胞中,IL-27蛋白表达阴性(图1)。

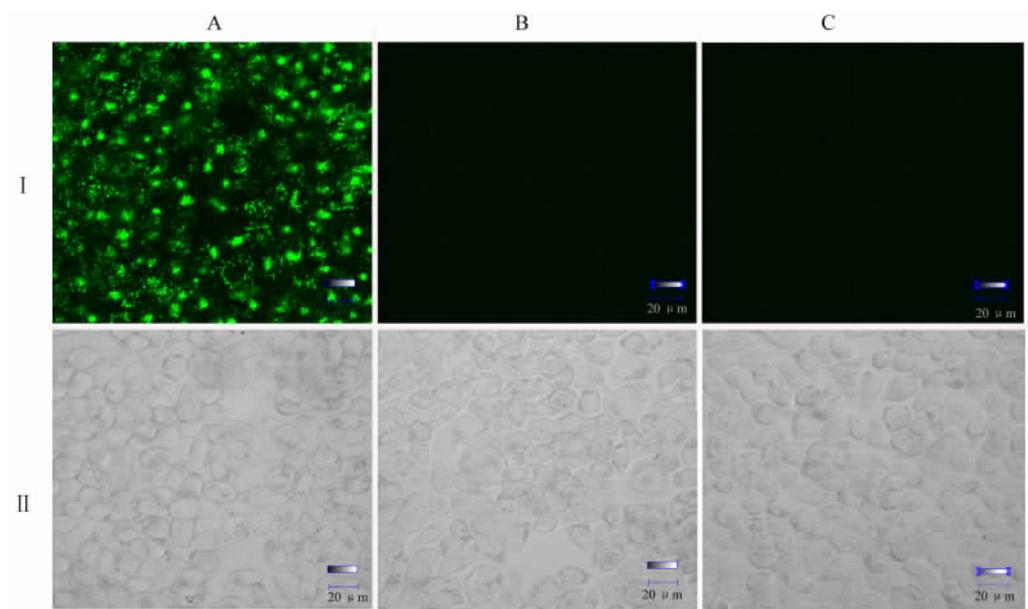


图1 免疫荧光染色检测转染细胞中IL-27的表达

Fig.1 IL-27 expression in Eca109/IL-27 cells detected by immunofluorescent staining

A: Eca109/IL-27 cells; B: Eca109/LXSN cells; C: Eca109 cells

I: Under laser scanning confocal microscope; II: Under light microscope

2.2 Eca109/IL-27的抑瘤作用

将Eca109/IL-27、Eca109/LXSN和Eca109细胞分别接种于裸鼠腹腔,7 d后对每组裸鼠解剖后显示,各组裸鼠腹腔内均形成多数瘤结节,并均有腹水生成;然而,接种Eca109/LXSN和Eca109细胞的裸鼠腹腔内形成瘤结节数量明显多于Eca109/IL-27组[分别为(59.13 ± 8.74)、(62.08 ± 8.21)和(13.63 ± 2.38)个]($P < 0.05$),空白对照裸鼠腹腔内没有肿瘤结节和腹水形成。接种Eca109/LXSN和Eca109细胞组裸鼠的生存期分别为(23.33 ± 1.52)d和(24.00 ± 1.37)d,而接种Eca109/IL-27细胞组裸鼠和空白对照组裸鼠观察至35 d时所有裸鼠均无死亡,说明Eca109/IL-27组荷瘤鼠生存期明显延长($P < 0.05$)。

2.3 IL-27对裸鼠脾单个核细胞分泌IFN-γ的影响

接种Eca109/IL-27细胞组裸鼠脾单个核细胞

在体外经灭活的Eca109细胞诱导后,产生IFN-γ水平为(1424.3 ± 30.7)pg/ml,显著性高于接种Eca109/LXSN细胞、Eca109细胞和生理盐水对照组[分别为(529.0 ± 62.9)pg/ml和(455.9 ± 44.5)pg/ml)]($P < 0.05$)。

2.4 IL-27对裸鼠移植瘤组织血管生成的影响

免疫组化分析结果显示,接种Eca109/IL-27细胞组裸鼠肿瘤组织中微血管数量明显低于接种Eca109/LXSN和Eca109细胞组[分别为(15.56 ± 5.32)、(34.27 ± 7.34)和(35.69 ± 4.72)]($P < 0.01$) (图2)。接种Eca109/IL-27细胞组裸鼠肿瘤组织中VEGF的表达率明显低于接种Eca109/LXSN和Eca109细胞组[积分分别为(1.35 ± 0.10)、(3.63 ± 0.28)和(3.45 ± 0.19)]($P < 0.01$) (图3)。

2.5 IL-27对荷瘤裸鼠肿瘤组织中MIG和IP-10基因表达的影响

接种 Eca109/IL-27 细胞组裸鼠肿瘤组织中 IP-10 mRNA 表达水平为 0.479 ± 0.017 , 明显高于接种 Eca109/LXSN 细胞和接种 Eca109 细胞组[分别为 (0.010 ± 0.001) 和 (0.009 ± 0.001)]($P < 0.01$)。接

种 Eca109/IL-27 细胞组裸鼠肿瘤组织 MIG mRNA 表达水平为 1.346 ± 0.073 , 明显高于接种 Eca109/LXSN 细胞和 Eca109 细胞组[分别为 (0.174 ± 0.012) 和 (0.301 ± 0.018)]($P < 0.01$) (图 4)。

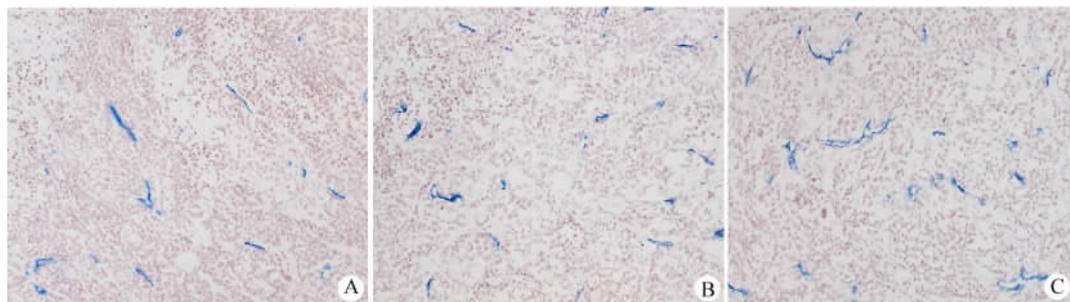


图 2 IL-27 抑制 CD34 在移植瘤组织中的表达($\times 400$)

Fig.2 IL-27 inhibited CD34 expression in transplanted tumor tissue of nude mice($\times 400$)

A: Eca109/IL-27 cells group; B: Eca109/LXSN cells group; C: Eca109 cells group

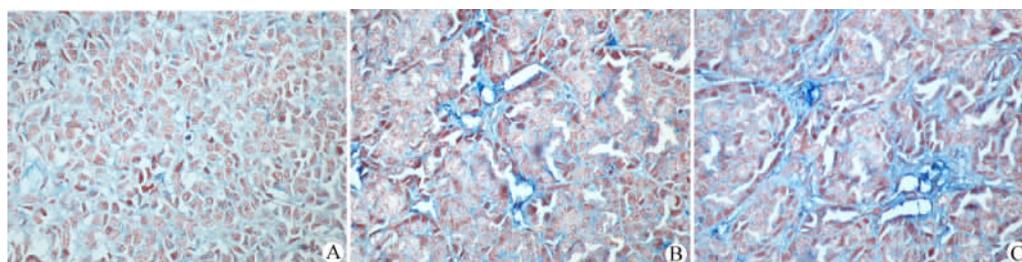


图 3 IL-27 抑制 VEGF 在移植瘤组织中的表达($\times 400$)

Fig.3 IL-27 inhibited VEGF expression in transplanted tumor tissue of nude mice($\times 400$)

A: Eca109/IL-27 cells group; B: Eca109/LXSN cells group; C: Eca109 cells group

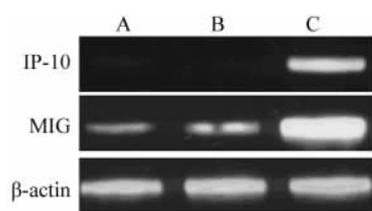


图 4 IL-27 促进 MIG 和 IP-10 基因在移植瘤组织中的表达
Fig.4 IL-27 increased expression of IP-10 and MIG mRNA in transplanted tumor tissue of nude mice

A: Eca109 cells group; B: Eca109/LXSN cells group;
C: Eca109/IL-27 cells group

3 讨论

恶性肿瘤的生长和转移必须依赖丰富的营养供给,肿瘤血管是肿瘤生长和浸润转移的基础,不仅向肿瘤组织提供营养,也向肿瘤宿主输出大量肿瘤细

胞,导致肿瘤的扩散和转移。

肿瘤微血管多采用血管内皮细胞抗原的单克隆抗体染色,其中人原始造血细胞抗原(human hematopoietic progenitor cell antigen, CD34)和第八因子相关抗原(FVIII RAg)单克隆抗体最为常用^[13-14]。实验证明,与 FVIII RAg、CD31 等血管内皮标记物比较,CD34 对于肿瘤内毛细血管、小血管内皮细胞的稳定性、敏感性较强,具有较强的可重复性。先前的研究结果表明^[15],体内,IL-27 可以通过诱导细胞凋亡途径产生抗肿瘤免疫反应;本研究主要对其影响血管生成进行进一步深入探讨。结果发现,接种转染 IL-27 的食管癌细胞在裸鼠体内不仅产生了抗肿瘤效应,而且还有抑制血管生成的作用。提示 IL-27 还有可能通过抑制肿瘤微血管形成而发挥抗肿瘤作用。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是肿瘤血管生长的最主要因子,在肿瘤组织细胞中经常持续高表达。缺氧是其主要诱导剂,它与肿瘤的生长、浸润和转移密切相关^[16]。本

研究结果显示,在接种转染 IL-27 的移植瘤组织中, VEGF 表达较接种野生型和转染空载体细胞组明显降低,这与血管内皮细胞标记的 CD34 结果一致。

肿瘤血管形成是促血管生成因子和抗血管生成因子之间失衡的结果,抑制新生血管形成能够有效抑制肿瘤生长和转移^[17]。内源性抗血管生成剂如内皮抑素和血管抑素, CXC 趋化因子如血小板因子 4(CXCL4)、IFN- γ 诱导蛋白 10(IFN- γ -inducing protein 10, IP-10)、IFN- γ 诱导的单核因子(monokine induced by IFN- γ , MIG)和其他一些细胞因子如 IL-4、IL-12、IL-18 均通过抗血管生成的作用抑制肿瘤的生长和转移。文献报道及本课题前期的研究^[8-12]都显示 IL-27 可以通过诱导肿瘤特异性免疫反应和免疫记忆作用而对肿瘤的初次和再次接种产生抗肿瘤作用,这其中 T 细胞和 NK 细胞产生的 IFN- γ 起核心作用。因此我们进一步对裸鼠食管癌移植瘤组织 MIG 和 IP-10 的表达进行了研究,结果发现转染 IL-27 组裸鼠组织 MIG 和 IP-10 的表达升高, IL-27 通过上调 MIG 和 IP-10 的表达而产生了抗血管生成作用。研究认为^[18-19],如 MIG、IP-10 和 CXCL11(IFN- γ inducible T cell alfa chemoattractant)等在抗血管生成作用中起重要作用的趋化因子不仅由 T 细胞和 NK 细胞产生,还可通过 IFN- γ 活化的单核/巨噬细胞产生,这就进一步说明 IFN- γ 在抗肿瘤免疫中的重要作用。以前的研究^[15]表明, IL-27 有增强 NK 细胞和单核/巨噬细胞产生 IFN- γ 的作用,因而 IL-27 在裸鼠食管癌模型中的抗血管生成作用可能依赖于 IFN- γ 。

综上所述,本研究将转染 IL-27 基因的 Eca109 细胞移植裸鼠后肿瘤生长缓慢,表现出抑瘤作用,其原因可能是 IL-27 在体内促进 IFN- γ 的分泌,上调趋化因子 IP-10 和 MIG 表达抑制肿瘤血管生成,从而发挥抗肿瘤作用。

[参 考 文 献]

- [1] 张立玮,温登瑰,王士杰,等. 食管癌高发区贲门癌、胃癌流行强度分析及其对内镜筛查的启示[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(12):656-659.
- [2] Ciszak L, Kosmaczewska A, Werynska B, et al. Impaired zeta chain expression and IFN-gamma production in peripheral blood T and NK cells of patients with advanced lung cancer[J]. Oncol Rep, 2009, 21(1):173-184.
- [3] Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(16):4677-4685.
- [4] Sharma P, Bajorin DF, Jungbluth AA, et al. Immune responses detected in urothelial carcinoma patients after vaccination with NY-

- ESO-1 protein plus BCG and GM-CSF[J]. J Immunother, 2008, 31(9): 849-857.
- [5] Pflanz S, Timans JC, Cheung J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB3 and 28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells[J]. Immunity, 2002, 16(6): 779-790.
- [6] Owaki T, Asakawa M, Morishima N, et al. A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation[J]. J Immunol, 2005, 175(4):2191-2200.
- [7] Salcedo R, Stauffer JK, Lincoln E, et al. IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for CD8⁺ T cells[J]. J Immunol, 2004, 173(12): 7170-7182.
- [8] Chiyo M, Shimozato O, Yu L, et al. Expression of IL-27 in murine carcinoma cells produces antitumor effects and induces protective immunity in inoculated host animals[J]. Int J Cancer, 2005, 115(3):437-442.
- [9] Motomu S, Mariko S, Toshiyuki O, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27[J]. J Immunol, 2006, 176(6): 7317-7324.
- [10] Liu LH, Wang SJ, Shan BE, et al. IL-27-mediated activation of natural killer cells and inflammation produced antitumor effects for human esophageal carcinoma cells[J]. Scandinavian J Immunol, 2008, 68(5):22-29.
- [11] 刘丽华,单保恩,邵丽丽,等. IL-27 基因转染人食管癌细胞诱导 PBMC 产生 IFN- γ 和 IL-12 的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(4): 252-254.
- [12] Kim YB, Kim GE, Pyo HR, et al. Differential cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 60(3): 822-829.
- [13] Chen X, Maniotis AJ, Majumdar D, et al. Uveal melanoma cell staining for CD34 and assessment of tumor vascularity[J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2002, 43(8):2533-2539.
- [14] Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis[J]. Am J Pathol, 2000, 156(2):361-381.
- [15] Liu LH, Shan BE, Shao LL, et al. Inhibitory effect of IL-27 gene on tumor formation activity of Eca109 cells in nude mice and its mechanisms[J]. Ai Zheng, 2008, 27(1):12-17.
- [16] Boxer GM, Tsiompanou E, Levine T, et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and microvessel counting as prognostic indicators in node-negative colorectal cancer[J]. Tumour Biol, 2005, 26(1):1-8.
- [17] Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(42): 6549-6556.
- [18] Motomu S, Mariko S, Toshiyuki O, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27[J]. J Immunol, 2006, 176(6): 7317-7324.
- [19] Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, et al. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis[J]. Trends Immunol, 2004, 25(4): 201-209.

[收稿日期] 2008-11-14

[修回日期] 2009-01-05

[本文编辑] 徐红梅