

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.01.016

· 基础研究 ·

骨髓间充质干细胞表达外源性 IL-12 对胶质瘤 C6 细胞增殖的影响

翟旭, 张弘, 霍晓川, 刘兴波* (辽宁医学院附属第一医院 神经外科, 辽宁 锦州 121001)

[摘要] 目的: 探讨以骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)为基因治疗载体表达外源性 IL-12 对胶质瘤 C6 细胞增殖的影响。方法: 分离培养大鼠 MSCs, 腺病毒介导 IL-12 基因转染大鼠 MSCs(AdIL-12-MSCs), RT-PCR 及 Western Blotting 检测 AdIL-12-MSCs 中 IL-12 基因 mRNA 及蛋白表达。MTT 法检测 AdIL-12-MSCs 分泌的外源性 IL-12 对 C6 胶质瘤细胞增殖活性的影响, 光镜下观察外源性 IL-12 对 C6 细胞形态的影响。结果: 腺病毒介导 IL-12 基因成功转染 MSCs 形成 AdIL-12-MSC, 其 IL-12 基因在 mRNA 及蛋白水平均有明显表达。AdIL-12-MSC 分泌的外源性 IL-12 显著抑制胶质瘤 C6 细胞的增殖($P < 0.05$)。结论: 转染 IL-12 的 MSCs(AdIL-12-MSC)能够在 mRNA 及蛋白水平表达外源性 IL-12 基因, 显著抑制胶质瘤 C6 细胞的增殖。

[关键词] 胶质瘤; 骨髓间充质干细胞; IL-12; 增殖

[中图分类号] R739.41; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)01-071-04

Effect of AdIL-12 infected mesenchymal stem cells on proliferation of C6 glioma cells

ZHAI Xu, ZHANG Hong, HUO Xiao-chuan, LIU Xing-bo* (Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of mesenchymal stem cells (MSC) infected by AdIL-12 on the proliferation of C6 glioma cells. **Methods:** The MSCs were cultured from rat bone marrow and verified by immunohistochemistry and flow cytometry. Recombinant adenovirus vectors harboring IL-12 (AdEasy-IL-12) were infected into MSCs to construct AdIL-12-MSC containing exogenous IL-12. RT-PCR and Western Blotting were used to detect IL-12 mRNA and protein expression in AdIL-12-MSC. MTT method was used to detect the effect of AdIL-12-MSC supernatant on the proliferation of C6 glioma cells. **Results:** Exogenous IL-12 gene was effectively transfected into MSCs by recombinant adenovirus vectors. IL-12 was expressed in MSCs at both mRNA and protein levels as detected by RT-PCR and Western Blotting. The supernatant of AdIL-12-MSC significantly inhibited the proliferation of C6 glioma cells compared with MSC supernatant ($P < 0.05$). **Conclusion:** MSCs transfected with IL-12 gene (AdIL-12-MSC) can express IL-12 at mRNA and protein levels and inhibit the proliferation of C6 glioma cells.

[Key words] glioma, mesenchymal stem cells (MSCs), IL-12; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(1): 71-74]

白细胞介素 12 (IL-12) 是由相对分子质量 40 000 和 35 000 两个亚基组成的异二聚体, 主要由 B 淋巴细胞和巨噬细胞及树突状细胞等产生的糖蛋白类细胞因子。作为 T 细胞的生长因子, IL-12 能促进 Th1 介导的 CD4⁺ 细胞的分化与增殖, 控制细胞免疫调节反应; 促进 T 淋巴细胞、NK 细胞的发育与增殖, 并刺激这些细胞产生 IFN- γ ; 促进 NK 细胞和细胞毒淋巴细胞的活化; 增强 LAK 细胞的活力, 以及诱导有效的抗新生血管形成等多种生物学效应^[1]。IL-12 的上述性质提示其作为一种免疫调节因子治疗恶性肿瘤的潜在价值。因此, IL-12 作为肿

瘤免疫基因治疗的候选基因受到越来越多的关注^[2-5]。

本研究利用间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为基因治疗的载体, 通过腺病毒介导大鼠 IL-12 基因转入 MSCs 中, 研究外源性 IL-12 对

[基金项目] 锦州市科学技术计划项目(No. 08B1E28)。Supported by the Science and Technology Program of Jinzhou (No. 08B1E28)

[作者简介] 翟旭(1968-), 男, 辽宁省锦州市人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事胶质瘤的免疫治疗方面的研究

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: jialincha2@sina.com

胶质瘤细胞增殖的影响,初步探索以 MSCs 作为基因治疗载体表达外源性 IL-12 的抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

300~400 g 雄性 SD 大鼠由辽宁医学院实验动物中心提供[动物合格证书编号为 SCXK(辽)2003-0007]。原代 MSCs 由辽宁医学院细胞生物学实验室提供。大鼠胶质瘤 C6 细胞由本室保存。IL-12 重组腺病毒载体 AdIL-12 由本室构建。RPMI 1640、L-DMEM、HEPES、Trizol 和 RNA 提取试剂盒购自 Gibco 公司。Percoll 细胞分离液购自 Pharmacia 公司,小牛血清购自天津川页生化制品有限公司。CD34、CD44、CD54 单克隆抗体购自博士德公司,鼠抗 β -actin 购自美国 Sigma 公司,碱性磷酸酶标记的羊抗兔和马抗小鼠二抗购自北京中山公司产品,MTT 购自北京中山生物技术公司。RT-PCR 酶复合物试剂盒和 EB 购自华美生物试剂公司。

1.2 细胞培养

麻醉 SD 大鼠,用含 50 U/ml 肝素的低糖 DMEM (L-DMEM)冲洗股骨干髓腔,将冲出的骨髓液移入预置有等体积的 1.073 g/ml Percoll 细胞分离液的离心管中,离心 30 min。收集中间层单个核细胞,DMEM 洗涤后以 1.0×10^6 /ml 接种于培养瓶内;72 h 后除去非贴壁细胞,待细胞长至瓶底的 80%~90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,传代后约 1 周左右融合。免疫组化及流式细胞术鉴定细胞表面标志物 CD34、CD44、CD54。MSCs 细胞和 C6 细胞用 RPMI 1640 培养液置 37 °C、5% CO₂ 环境下培养。培养液内含 10% 新生牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μ g/ml。

1.3 腺病毒介导 IL-12 基因感染大鼠骨髓间充质干细胞

取增殖期大鼠骨髓间充质干细胞接种于培养瓶中,3 d 后第 1 次换液,以后隔天换液,10~14 d 细胞接近融合,0.25% 胰蛋白酶消化,1:3 传代,待细胞生长至 70% 融合时加入携 IL-12 的重组腺病毒载体 AdIL-12,设感染倍数(MOI)为 50,24 h 后加入含新生牛血清的新鲜培养液 10 ml,继续培养,感染后细胞命名为 AdIL-12-MSC。

1.4 RT-PCR 检测 AdIL-12-MSC 中 IL-12 mRNA 的表达

提取感染后细胞总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 的纯度,凝胶成像分析系统观察 RNA 电泳结果。cDNA 逆转录合成第一链。PCR 扩增上游引物

为:5'-CACAGATGAGTTGGGGACT-3';下游引物为:5'-AGTCAGAGATGGTAGAATT-3',扩增片段长度为 632 bp。用 β -actin(912 bp)为内参照。反应条件为:37 °C 逆转录 50 min,96 °C 5 min;然后进行下列循环:96 °C 30 s,59.5 °C 30 s,72 °C 45 s,共 35 个循环,之后 72 °C 再延长 5 min。RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.5 Western Blotting 检测 AdIL-12-MSC 细胞 IL-12 蛋白的表达

取对数生长期 AdIL-12-MSC 细胞(1×10^6 /ml)用 PBS 洗涤 1 次,细胞裂解缓冲液直接裂解细胞,匀浆 1 min,4 °C 离心 15 min,取上清液作为样品。5% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,转印至硝酸纤维素膜上。0.01 mol/L PBS 洗膜 10 min,加入包被液封闭过夜;再用 0.01 mol/L PBS 洗膜 5 min \times 3 次;加入一抗(1:400)和 β -actin 鼠抗人单克隆抗体(1:400),室温孵育 2 h;用 0.01 mol/L PBS 分别洗膜 5 min \times 2 次,与第二抗体(1:2 000)室温孵育 2 h。用 0.01 mol/L PBS 洗膜 5 min \times 2 次。加入碱性磷酸酶底物 O-dianidine 及 β -naphthyl acid phosphate,显色液显色 15 min,出现条带后双蒸水终止反应。UPV 扫描仪扫描成像。

1.6 MTT 法检测 AdIL-12-MSC 对 C6 细胞体外增殖的影响

实验分 2 组:感染组将 C6 细胞接种于 AdIL-12 转染 24 h 后的 MSCs 上清液,对照组 C6 细胞接种于 MSCs 培养 24 h 后的上清液。每组设 6 个孔,每孔加入 2 ml 含有小牛血清的新鲜 RPMI 1640 培养液。取对数生长期感染组和对照组 C6 细胞,以 1×10^5 /ml 细胞接种于 96 孔培养板,每孔加入 100 μ l 细胞悬液,37 °C、5% CO₂ 条件下培养 6 d。每日测定细胞生长情况,测定之前每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μ l,孵育 4 h 后,离心吸去上清,加入二甲基亚砜(DMSO)200 μ l/孔终止反应。用酶标仪测 570 nm 波长光密度值(D_{570} 值)。

1.7 光镜下观察 AdIL-12-MSC 对 C6 细胞生长形态的影响

光镜下观察感染组 C6 细胞及对照组 C6 细胞第 24、48、72 h 的生长形态。

1.8 统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析。使用 t 检验检测组间差异的显著性, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 AdIL-12-MSCs 中 IL-12 mRNA 的表达

RT-PCR 结果表明, AdIL-12-MSC 细胞在 632 bp 处有阳性条带出现, 符合 IL-12 扩增片段长度, 说明在感染后 MSCs 细胞中有 IL-12 mRNA 的表达, 而在对照的 MSCs 细胞中未检测到 IL-12 mRNA 的表达(图 1)。

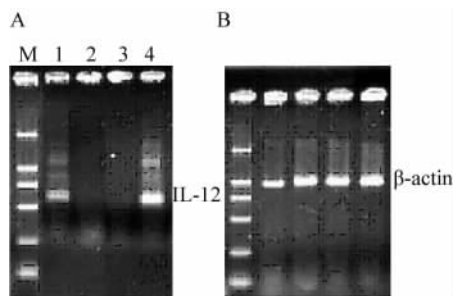


图 1 RT-PCR 检测转染后 AdIL-12-MSCs 中 IL-12 mRNA 的表达

Fig. 1 IL-12 mRNA expression in AdIL-12-MSCs as detected by RT-PCR

A: 1,4: AdIL-12-MSCs; 2,3: MSCs; M: Marker.
B: β -actin

2.2 AdIL-12-MSCs 中 IL-12 蛋白的表达

Western Blotting 结果表明, AdIL-12-MSC 组细胞有清晰条带出现, 说明在感染后 MSCs 细胞有 IL-12 蛋白的表达, 而在对照的 MSCs 细胞中未检测到 IL-12 蛋白的表达(图 2)。

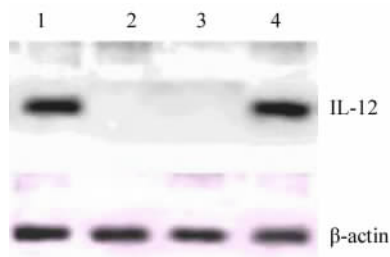


图 2 Western Blotting 检测转染后 AdIL-12-MSCs 中 IL-12 蛋白的表达

Fig. 2 IL-12 protein expression in AdIL-12-MSCs as detected by Western Blotting

1,4: AdIL-12-MSCs; 2,3: MSCs

2.3 AdIL-12-MSCs 对 C6 细胞增殖的影响

MTT 法检测转染组和对照组的 C6 细胞 24 ~ 72 h 体外增殖情况, 结果显示, 转染组的 C6 细胞与对照组 C6 细胞相比, 增殖能力有显著下降 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.4 AdIL-12-MSCs 感染后 C6 细胞形态的变化

培养 48 h 后, 光镜下观察细胞生长情况, 见转

染组的 C6 细胞生长受到明显抑制, 细胞贴壁率下降, 细胞密度降低, 细胞突起减少; 对照组的 C6 细胞形态正常(图 3)。

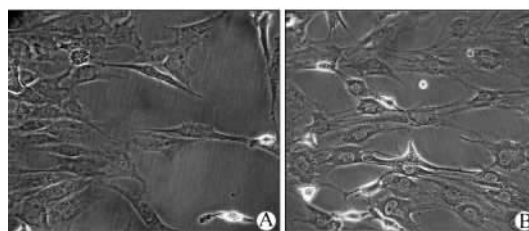


图 3 外源性 IL-12 对胶质瘤 C6 细胞生长形态的影响 ($\times 200$)

Fig. 3 Effect of AdIL-12-MSCs supernatant on growth of rat C6 glioma cells ($\times 200$)

A: Infected C6 cells; B: Control C6 cells

表 1 AdIL-12-MSCs 对 C6 细胞增殖的抑制 ($n = 6, D_{570}$)

Tab. 1 Inhibition of AdIL-12-MSCs on C6 cells proliferation

Group	24 h	48 h	72 h
Infected C6 cells	$0.716 \pm 0.024^*$	$0.876 \pm 0.005^*$	$0.940 \pm 0.090^*$
Control C6 cells	1.003 ± 0.009	1.375 ± 0.019	1.576 ± 0.075

* $P < 0.05$ vs control C6 cells

3 讨论

目前 IL-12 被越来越多地应用于肿瘤的免疫治疗。IL-12 是一种由二硫键连接的异二聚体细胞因子, 是由专职抗原提呈细胞产生, 如 B 淋巴细胞、树突状细胞和单核细胞^[6-8]。IL-12 对 T 细胞及 NK 细胞产生多种生物学效应, 如诱导 $\text{INF-}\gamma$ 的产生、提高 T 细胞及 NK 细胞增殖及溶细胞功能、促进 Th1 型免疫反应等。其特别适合于对抗免疫抑制因子的作用, 如胶质瘤产生的转化生长因子 B (TGF-B)、前列腺素 E2、IL-10、胰岛素样生长因子 I (IGF-I) 等。另外, IL-12 有抗血管增殖特性, 这可能是其抗肿瘤作用中的一种机制^[9]。已有一些研究表明在鼠肿瘤模型中存在治疗效果^[10]。

转基因肿瘤细胞株的建立和生物学活性研究是肿瘤基因治疗的重要基础^[11], 研究表明, 通过基因重组技术将编码细胞因子的基因导入肿瘤细胞中构建肿瘤疫苗, 经处理后使其失去致癌性, 而保存分泌细胞因子的能力; 外源基因的表达产物直接作用于免疫细胞, 促进免疫细胞的生长、分化, 诱导 CTL 和 NK 细胞活性, 能显著增强机体抗肿瘤免疫能力^[12-13]。目前已在实验室研究转染的细胞因子有 IL-2、IL-44、IL-6、B7、GM-CSF、IL-12、IL-15、IL-18

等。对细胞因子转染瘤苗的众多研究中显示,IL-12抑制局部肿瘤形成的作用最强。

在实验肿瘤模型中,重组 IL-12 有对抗移植瘤、化学诱导肿瘤及基因修饰小鼠自发生长肿瘤的良好效应;IL-12 诱导的 IFN- γ 和其他细胞因子对肿瘤细胞有直接的毒性,也许可激活潜在的抗血管生成机制^[14]。IL-12 抗原特异性免疫的刺激活性主要在于其决定或增强和 TH1 或 CTL 反应,因此 IL-12 是极具潜力的肿瘤疫苗的免疫佐剂^[15-16]。许多抗癌免疫模型的临床前期研究使我们看到了希望,IL-12 将成为有效的抗癌治疗因子^[17-19]。

目前,IL-12 对胶质瘤细胞的作用尚缺乏研究。对此,本研究将 IL-12 基因用腺病毒导入 MSCs 细胞,构建了 AdIL-12-MSC 细胞。应用 RT-PCR 以及 Western blotting 检测表明:AdIL-12-MSC 细胞内 IL-12 基因在 mRNA 水平和蛋白质水平均获得成功表达。进一步观察 AdIL-12-MSC 细胞分泌的外源性 IL-12 对 C6 细胞体外增殖的影响,结果显示,转染组 C6 细胞的增殖活性较对照组 C6 细胞明显降低。这一现象可能与 IL-12 抑制肿瘤细胞生长有关;另外还可能与外源性 IL-12 能够导致部分胶质瘤细胞的凋亡,以及诱导肿瘤细胞良性转化有关。对此,本研究正在进行相关实验。

综上所述,本研究成功地应用腺病毒将外源性 IL-12 基因导入 MSCs 细胞,构建了 AdIL-12-MSC 细胞系,并观察到其分泌的外源性 IL-12 对 C6 细胞增殖有明显抑制作用。该细胞系可进一步应用于 IL-12 作用机制、基因修饰肿瘤疫苗和基因治疗肿瘤方面的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Duda DG, Sunamura M, Lozonchi L, *et al.* Direct *in vitro* evidence and *in vivo* analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4): 1111-1116.
- [2] Li D, Yu H, Xu TF, *et al.* Interleukin-12 gene modification exerts anti-tumor effects on murine mammary sarcoma cell line *in vivo* [J]. *Cell Mol Immunol*, 2008, 5(3): 225-230.
- [3] Kanagawa N, Gao JQ, Motomura Y, *et al.* Antitumor mechanism of intratumoral injection with IL-12-expressing adenoviral vector against IL-12-unresponsive tumor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(4): 821-825.
- [4] Zhu S, Li S. Systemic IL-12 gene therapy for treating malignancy via intramuscular electroporation[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 423:327-337.
- [5] Nagashima N, Nakayama Y, Inoue Y, *et al.* Prognostic significance of the local expression of interleukin-12 in patients with advanced gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(2B):1277-1283.
- [6] Valdés L, San José E, Alvarez Dobaño JM, *et al.* Diagnostic value of Interleukin 12 p40 in tuberculous pleural effusions[J]. *Eur Respir J*, 2008, 12:[Epub ahead of print].
- [7] Hemdan NY. The role of interleukin-12 in the heavy metal-elicited immunomodulation: relevance of various evaluation methods[J]. *J Occup Med Toxicol*, 2008, 6(3):25.
- [8] Thomas JD, Morris KR, Godfrey DI, *et al.* Expression, purification and characterisation of recombinant *Escherichia coli* derived chicken interleukin-12[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 126(3-4):403-406.
- [9] Gately MK, Woltizky AG, Quinn PM, *et al.* Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12[J]. *Cell Immunol*, 1992, 143(1):127-142.
- [10] 叶树楠,杨述华,杨操,等. 肿瘤靶向性载体介导的 IL-12 基因增强裸鼠抗骨肉瘤免疫[J], *肿瘤防治研究*, 2005, 32(5): 305-307.
- [11] 姜彦艳,魏于全. 肿瘤基因与分子疫苗的研究现状及进展 [J]. *癌症*, 2000, 19(1):90-91.
- [12] Peterson AC, Harlin H, Gajewski TF, *et al.* Immunization with Melan-A peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin-12 induces clinical activity and T-cell responses in advanced melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2342-2348.
- [13] Feng KK, Zhao HY, Qiu H, *et al.* Combined therapy with flk1-based DNA vaccine and interleukin-12 results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects[J]. *Cancer Lett*, 2005, 221(1): 41-47.
- [14] Nikitina EY, Desai SA, Zhao X, *et al.* Versatile prostate cancer treatment with inducible caspase and interleukin-12[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 4309-4319.
- [15] Suzuki T, Fukuhara T, Tanaka M, *et al.* Vaccination of dendritic cells loaded with interleukin-12-secreting cancer cells augments *in vivo* antitumor immunity: characteristics of syngeneic and allogeneic antigen-presenting cell cancer hybrid cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1): 58-66.
- [16] Keke F, Hongyang Z, Hui Q, *et al.* A combination of flk1-based DNA vaccine and an immunomodulatory gene (IL-12) in the treatment of murine cancer[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2004, 19(5): 649-657.
- [17] Schultz J, Pavlovic J, Moelling K. Immune modulation in cancer using DNA inoculation-antitumor effect of interleukin-12[J]. *Dev Biol(Basel)*, 2000, 104:109-114.
- [18] 陈吉泉,修清玉,沈策,等. 白介素-12 基因修饰的树突细胞疫苗治疗自发性转移性肺癌[J]. *癌症*, 2002, 21(12): 1328-1331.
- [19] Knutson KL, Disis ML. IL-12 enhances the generation of tumour antigen-specific Th1 CD4 T cells during *ex vivo* expansion[J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 135(2): 322-329.

[收稿日期] 2008 - 11 - 25

[修回日期] 2009 - 01 - 26

[本文编辑] 韩丹