

人 IL-21 基因联合  $\gamma$  射线照射对子宫颈癌 Hela 细胞生长的影响邵 盈<sup>1</sup> 曹永珍<sup>1</sup> 王 芹<sup>2</sup> 李 进<sup>2</sup> 赵欣然<sup>2</sup> 陈凤华<sup>2</sup> 宋 力<sup>2</sup> 张鸿艳<sup>1</sup>

中图分类号: Q691 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2010)04-0015-03

**【摘要】** 目的 研究含人 IL-21 基因的重组腺病毒(Ad-IL-21)联合  $\gamma$  射线照射对子宫颈癌 Hela 细胞生长的抑制作用。方法 重组腺病毒 Ad-IL-21 于体外转染子宫颈癌 Hela 细胞,转染后 6 h 进行 6 Gy  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射,用 MTT 方法和流式细胞仪测定 Hela 细胞的生长曲线、抑制率及细胞周期。结果 Ad-IL-21 基因组、照射组和基因联合照射组对 Hela 细胞生长均具有抑制作用,联合照射组的抑制效应最强(44%),明显高于 Ad-IL-21 组和照射组。联合照射组 Hela 细胞出现明显的 G1 期阻滞,G1 期细胞所占比例最高,达到 88.9%,S 期细胞最少(1%)。结论 IL-21 基因联合  $\gamma$  射线照射对子宫颈癌的抑瘤作用具有协同效应,有效地抑制肿瘤细胞的生长。

**【关键词】** IL-21 基因;子宫颈癌;腺病毒;照射

Effects of Adenovirus-mediated IL-21 Gene Vector with  $\gamma$ -ray Radiation on Growth of Cervical Carcinoma Cells. SHAO Ying, CAO Yong-zhen, LI Jin et al. 1. Department of Radiation Oncology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

**【Abstract】 Objective** To study the effect of inhibition on the growth of cervical carcinoma cells by introduction of foreign IL-21 gene vector with  $\gamma$ -ray. **Methods** The recombinant IL-21 gene adenovirus vector was transfected into cervical carcinoma cell line Hela. Hela cells were irradiated with 6 Gy  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -ray after 6 hours transfection. The cells growth curve and cells cycle of Hela cells were detected by MTT assay and flow cytometry respectively. **Results** The growth of Hela cells transfected with Ad-IL-21, radiation and Ad-IL-21 combined with radiation group was all inhibited. The group of Ad-IL-21 combined with radiation resulted in greater inhibition of cells growth, reaching 44%, compared with Ad-IL-21 infection and radiation group. Cells of G1 phases of Hela cells for Ad-IL-21 combined with radiation group were the highest, reaching 88.9%, while those of S phases were the lowest, reaching 1%. **Conclusion** Ad-IL-21 gene transfer combined with radiation show synergism for the inhibition of cervical cancer Hela cells growth.

**【Key words】** Interleukin-21 Gene; Cervical Carcinoma; Adenovirus; Radiation

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,治疗方法以手术、化疗、放疗为主,但是 5 年生存率仍然较低。放射治疗是临床上应用最广泛和最重要的治疗手段之一,但由于肿瘤临近部位的正常组织受到放射损伤和某些肿瘤的辐射抗拒性等问题,影响着放疗的疗效和应用。肿瘤的基因治疗是近年来的研究热点,它是将对肿瘤有直接和间接杀伤作用的基因经载体转入体内,以期在肿瘤生长部位进行表达,杀伤肿瘤,但其临床疗效并不令人满意。利用辐射来实现对转移基因体内表达的时空调控,可以提高基因靶向转移的效率,同时基因能够提高肿瘤对放射治疗的敏感性,有效地将基因治疗与放射治疗有机结合起来,发挥协同效应,这种新治疗模式称为基因放疗(genetic-radiotherapy)<sup>[1]</sup>,已成为肿瘤治疗研究的重要方向之一。本研究用含人 IL-21 基因的重组腺病毒表达载体(Ad-IL-21)感染宫颈癌 Hela 细胞,并进行  $\gamma$  射线照射,观察 IL-21 基因联合放射对宫颈癌细胞生长作用的影响,探讨其联合抑瘤作用,为临床上进行 IL-21 基因-放射治疗肿瘤奠定实验基础。

## 1 材料与方法

1.1 细胞系及培养条件 人子宫颈癌 Hela 细胞由中国医学科学院放射医学研究所惠赠,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,置 5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度、37℃ 培养箱中培养。

1.2 主要试剂和仪器 RPMI1640 培养基(北京赛默飞世尔),MTT(天津华大欣源),分析纯二甲亚砜(天津市江天化工科

技),小牛血清(北京索莱宝科技有限公司),Ad-IL-21 及对腺病毒 Ad-lacZ 由中国医学科学院放射医学研究所构建保存<sup>[2]</sup>。 $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射源(USD 加拿大),酶标仪(美国 Thermo 公司),流式细胞仪(美国 Beckman 公司,Altra II)。

1.3 分组 数字随机表法分为空白对照组(不做任何处理)、Ad-LacZ 对照组(含 lacZ 基因但不含 IL-21 基因的对照腺病毒)、照射组( $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射源 6 Gy 照射,剂量率为 0.75 Gy/min)和 Ad-IL-21 联合照射组(Ad-IL-21 转染后进行 6 Gy 照射)。

1.4 MTT 法检测 Hela 细胞生长情况于转染前 1 天取对数生长长期的 Hela 细胞,按每孔  $2 \times 10^3$  个细胞接种 96 孔板中,转染当天按上述分组处理,每组做 6 个复孔,每孔加 100  $\mu\text{l}$  Ad-IL-21(病毒滴度为  $9 \times 10^{11}$  PFU/ml)。每组分别于处理后培养 0、24、48、72、96 h 后加入 0.5% MTT 液 20  $\mu\text{l}$ ,孵育 4 h 后酶标仪测定 492 nm 吸光度(A)值。绘制细胞生长曲线图,并计算细胞生长的抑制率:抑制率(%) =  $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.5 流式细胞术检测 Hela 细胞周期 于转染前 1 天取对数生长长期的 Hela 细胞按  $3 \times 10^5$  个细胞/孔接种于 6 孔培养板,转染当天按上述分组处理,每孔加 200  $\mu\text{l}$  Ad-IL-21(病毒滴度为  $9 \times 10^{11}$  pfu/ml),每组设 2 孔。培养 48 h 后收集所有悬浮及贴壁细胞,每组用冷 PBS 液洗涤 2 次,70% 冰乙醇 4℃ 固定 1 h, -20℃ 保存。检测前用冷 PBS 液洗 2 次,加入 500  $\mu\text{l}$  碘化丙啶,轻轻混匀,暗处避光反应 30 min,上流式细胞仪 488 nm 波长检测细胞周期。

1.6 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件包进行统计分析,显著性检验采用单因素方差分析  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Ad-IL-21 联合照射对 Hela 细胞生长的影响 空白对

基金项目:天津市自然科学基金项目(09JCYBJC09300),

中国医学科学院放射医学研究所探索基金(ST1006)

作者单位:1 天津医科大学总医院放疗科,天津 300052;

2 中国医学科学院放射医学研究所天津市分子核医学重点实验室,天津 300192

作者简介:邵盈(1988~),女,汉族,江西人,硕士在读,研究方向:肿瘤的立体定向放疗

通讯作者:王芹,曹永珍 wangqin\_1005@yahoo.com.cn

照组和 Ad-lacZ 组 Hela 细胞数量随培养时间延长呈增加的趋势,Ad-IL-21 基因组于转染后 96h 肿瘤细胞出现明显的抑制作用,与空白对照组和 Ad-lacZ 组比较差异有统计学意义( $F=7.181, P<0.05$ ),而空白对照组与 Ad-lacZ 组比较无明显差异( $P>0.05$ )。照射组和 Ad-IL-21 基因联合照射组 Hela 细胞于转染后 48h 出现较明显的抑制作用,与 Ad-lacZ 组和 Ad-IL-21 基因组比较差异有统计学意义( $F=249.88, P<0.05$ ),尤其在转染后 96 h 联合组与照射组和 Ad-IL-21 基因组比较,细胞生长抑制作用明显( $F=42.981, P<0.05$ ) (见图 1)。

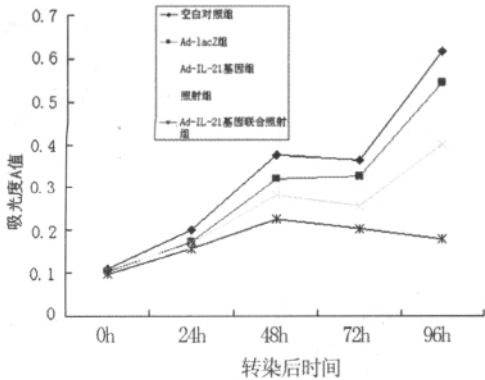


图1 Ad-IL-21 联合照射作用于 Hela 细胞的生长抑制曲线

2.2 Ad-IL-21 联合照射对 Hela 细胞生长抑制率的比较

IL-21 基因转染 Hela 细胞后观察 24 h、48 h、72 h、96 h 细胞的生长抑制情况,Ad-IL-21 基因联合照射组于转染后 96 h 抑制率最高,达 44%,与 Ad-IL-21 基因组和单独照射组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 Ad-IL-21 基因组 Hela 细胞生长抑制率与单独照射组比较无明显差异( $P>0.05$ ) (见表 1)。结果提示 IL-21 基因对 Hela 细胞的生长具有抑制作用,而 IL-21 基因与放射治疗联合应用具有协同效应,能更有效地抑制肿瘤细胞的生长。

表 1 Ad-IL-21 联合照射对 Hela 细胞的生长抑制效应		
分组	A 值	抑制率(%) ( $\bar{x} \pm s$ )
空白对照组	0.334 ± 0.195	-
Ad-lacZ 组	0.294 ± 0.170	13% ± 2.65
Ad-IL-21 基因组	0.263 ± 0.141	21% ± 4.92
单独照射组	0.244 ± 0.114	27% ± 7.37
Ad-IL-21 + 照射组	0.173 ± 0.049	44% ± 20.2

2.3 Ad-IL-21 联合照射对宫颈癌 Hela 细胞周期的影响

从流式细胞术分析结果可见,与 Ad-lacZ 组和空白对照组相比,Ad-IL-21 组、照射组及 Ad-IL-21 联合照射组 Hela 细胞停留在 G1 期的细胞增加,S 期细胞数量减少。其中以联合照射组 G1 期细胞所占比例最高,达到 88.9%,S 期细胞最少,1%,见表 2。结果表明 Ad-IL-21 联合照射使 Hela 细胞主要阻滞在 G1 期。

表 2 Ad-IL-21 转染后 Hela 细胞的细胞周期			
分组	G1(%)	G2(%)	S(%)
空白对照组	76.9	15.9	7.2
Ad-lacZ 组	73.1	5.7	21.2
Ad-IL-21 基因组	84.4	10.8	4.8
单独照射组	83.8	11.6	4.6
Ad-IL-21 基因联合照射组	88.9	11.0	1.0

3 讨论

IL-21 是近年来发现的一种细胞因子,在早期临床研究发现 IL-21 在各种动物模型中具有抗肿瘤活性。Sondergaard<sup>[3]</sup> 等研究发现,在两种同基因肿瘤模型中(B16 黑色素瘤和 Renca 肾脏细胞癌)检测到 IL-21 蛋白的抗肿瘤活性,且影响肿瘤浸润 T 细胞(主要为 CD8<sup>+</sup> T 细胞)密度。IL-21<sup>[4]</sup> 主要由 CD4<sup>+</sup>

Th2 细胞和 NKT 细胞合成和分泌,与 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 高度同源,都属于  $\gamma$  链家族细胞成员。IL-21 受体分布广泛,包括脾、胸腺、PBLs 和淋巴结等淋巴器官和组织分布。Dimitra<sup>[5]</sup> 等发现 IL-21 通过 B 细胞内在机制可直接刺激生发中心 B 细胞增殖与分化。IL-21 也可以与抗 CD40 抗体协同刺激 B 细胞增殖,与抗 CD3 抗体协同刺激 T 细胞增殖,增强抗 CD3 抗体活化的 T 细胞的抗肿瘤活性<sup>[6]</sup>,并能促进骨髓 NK 细胞增殖与分化并表达 CD16 分子,从而完成 NK 细胞的成熟分化,使 NK 细胞具有细胞毒活性。Ugai<sup>[7]</sup> 等发现,将 IL-21 和 IL-23 基因转导到人胰腺癌细胞,能产生自然杀伤细胞依赖性和非依赖性抗肿瘤效应。国内有研究报道<sup>[8]</sup>,将人 IL-21 基因转染卵巢癌细胞,对细胞的生长有明显的抑制作用。

本实验采用我们成功构建的 Ad-IL-21 重组腺病毒载体转染宫颈癌细胞,结合  $\gamma$  射线照射,观察 IL-21 基因与放射两者协同抑制肿瘤的作用。为了确定腺病毒表达载体上基因的作用,本研究以 Ad-lacZ 作为阳性对照,说明此抑制作用来自 IL-21 基因的表达,而不是腺病毒本身。结果表明 Ad-lacZ 和空白对照组比较差异均无统计学意义,提示腺病毒本身对肿瘤生长无影响。

本结果显示,腺病毒载体可有效的将外源性 IL-21 基因转入 Hela 细胞,且进行  $\gamma$  射线照射,IL-21 基因联合照射的细胞生长最为明显缓慢,说明腺病毒介导的 IL-21 基因联合照射可显著抑制 Hela 细胞的生长。有研究指出基因治疗使肿瘤细胞阻滞于 G1 期,减少进入 G2 期和 S 期的细胞,而 G1 后期对放疗比较敏感,从而提高肿瘤细胞的敏感性<sup>[9]</sup>。从理论上讲,放疗和基因治疗两者相互加强,可以取得比单一方法效果更好的抑瘤效果。从本实验的研究结果可以得知转染 IL-21 基因联合  $\gamma$  射线照射作用于宫颈癌 Hela 细胞后的效果要比单独 IL-21 基因组、单独照射组效果更好,单独 IL-21 基因组和单独照射组两者之间没有明显的差别,这为宫颈癌的进一步基因放疗研究提供了理论基础和实验依据。

参考文献:

[1] Keall PJ, Lammering G, Lin PS, et al. Tumor control probability Prediction for genetic radiotherapy [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003 57(1): 255-263.

[2] 王芹,李进,王颖媛,等. 人 IL-21cDNA 的克隆及重组腺病毒表达载体的构建 [J]. 广西医科大学学报,2009,26(4): 516-518.

[3] Sondergaard H, Frederiksen KS, Thygesen P, et al. Interleukin 21 therapy increases the density of tumor infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells and inhibits the growth of syngeneic tumors [J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(9): 1417-1428.

[4] Sondergaard H, Skak K. IL-21: roles in immunopathology and cancer therapy [J]. Tissue Antigens 2009 74(6): 467-479.

[5] Zotos D, Conquet JM, Zhang Y, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism [J]. J Exp Med 2010 207(2): 365-378.

[6] Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function [J]. Nature, 2000 408(8): 57-63.

[7] Ugai S, Shimozato O, Yu L, et al. Transduction of the IL-21 and IL-23 genes in human pancreatic carcinoma cells produces natural killer cell-dependent and independent antitumor effects [J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(10): 771-778.

[8] 王芹,李进,宋力,等. 人 IL-21 基因对卵巢癌细胞生长的抑制作用 [J]. 中国辐射卫生 2009, 18(4): 396-397.

[9] Badie B, Kramar MH, Lau R, et al. Adenovirus-mediated p53 gene delivery potentiates the radiation-induced growth inhibition of experimental brain tumors [J]. J Neurooncol, 1998, 37(3): 217-222.