

人 IL-21 基因对卵巢癌细胞生长的抑制作用

王 芹, 李 进, 宋 力, 刘 强, 岳井银, 樊飞跃

中图分类号: R811.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2009)04-0396-02

【摘要】 目的 研究含有 IL-21 基因的重组腺病毒表达载体 (Ad-IL-21) 抑制人卵巢癌细胞生长的作用。方法 Ad-IL-21 重组体于体外转染卵巢癌细胞株 ES-2 用 MTT 比色法和流式细胞术观察 ES-2 细胞的生长曲线和细胞周期的变化。结果 Ad-IL-21 组 ES-2 细胞的生长比空白对照组和对照腺病毒组慢, 在转染后第 3 天开始生长明显缓慢 ($P < 0.05$), 转染后第 5 天 Ad-IL-21 组的细胞生长基本稳定在一定水平 ($P < 0.05$)。Ad-IL-21 转染后 ES-2 细胞停留在 G_1 期细胞增加, 而 G_2 期和 S 期细胞减少。结论 腺病毒介导的外源性 IL-21 基因可有效转染人卵巢癌细胞, 并对其生长有抑制作用。

【关键词】 IL-21 基因; 卵巢癌; 腺病毒载体

Inhibiting of Adenovirus-Mediated IL-21 Gene on Growth of Ovarian Carcinoma Cells WANG QIN, LI Jin, SONG Li et al. Tianjin 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 ovarian carcinoma cells by introduction of foreign IL-21 gene. Methods The recombinant IL-21 gene adenovirus vector was transfected into ovarian carcinoma cell line ES-2. The cells growth curve and cells cycle of ES-2 cells were detected by MTT assay and flow cytometry respectively. Results The growth of ES-2 cells transfected with Ad-IL-21 was slower than that of Ad-lacZ and blank control cells, especially at 3rd day after transfection ($P < 0.05$). Compared with Ad-lacZ and blank control, cell growth at 5th day after infection was inhibited significantly ($P < 0.05$). Cells of G_1 phases transfected with Ad-IL-21 increased, cells of G_2 and S phases decreased. Conclusion The recombinant IL-21 gene adenovirus vector can transfect ES-2 cells efficiently and inhibit ES-2 cell growth.

【Key words】 Interleukin-21 Gene; Ovarian Carcinoma; Adenovirus Vector

人白细胞介素 21 (Interleukin-21, IL-21) 是 2000 年新发现的细胞因子, 人 IL-21 基因定位于 4^q26-27, mRNA 为 566 bp, 编码由 162 个氨基酸残基组成的多肽, 分子量为 15 kD^[1]。IL-21 是 CD4⁺T 辅助细胞的产物, 通过与 T_H17 等细胞受体结合, 选择性的修饰体液和细胞介导的免疫反应。国外研究报道^[2], 体外重组的 IL-21 蛋白可增强抗 CD3 mAb 活化的 T 细胞的抗肿瘤作用。本研究用我们已构建好的含人 IL-21 基因的重组腺病毒表达载体 (Ad-IL-21) 感染卵巢癌细胞 ES-2 观察 IL-21 基因对 ES-2 细胞的生长和细胞周期的影响, 探讨 IL-21 基因对卵巢癌细胞生长的抑制作用, 为进一步开展 IL-21 基因在肿瘤治疗中的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 Ad-IL-21 重组腺病毒表达载体 (本室构建), Taq 酶 (大连宝生物公司), DNA 提取试剂盒 (北京博大泰克公司), RMI1640 培养基 (Gibco 公司), MTT (Amresco 公司), PCR 引物和分析纯二甲基亚砷 (上海生工生物工程公司), PCR 扩增仪和酶标仪 (美国 Thermo 公司), 凝胶电泳图像处理系统 (美国 Bio-Rad 公司), 流式细胞仪 (美国 Beckman 公司, Altra II)。

1.2 ES-2 细胞内 IL-21 基因的表达鉴定 将 5×10^5 ES-2 细胞接种于 6 孔板中, 用已构建好的 Ad-IL-21 转染 ES-2 细胞。48 h 后提取细胞 DNA, 经 PCR 扩增检测 IL-21 基因, 以未加 Ad-IL-21 的 ES-2 细胞为对照。上游引物: 5' - ATG

AGA TCC AGT CCT GGC - 3', 下游引物: 5' - TCA GGA ATC TTC ACT TCC - 3'。扩增条件为 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 68℃ 1 min 共 25 个循环。PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 ES-2 细胞培养及实验分组 ES-2 细胞用含 10% 小牛血清的 RMI1640 培养基, 在 37℃ 含 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。按以下方法分组: ① Ad-IL-21 组: 每孔加入含 IL-21 基因的重组腺病毒 (滴度为 1.6×10^8 pfu/ml); ② Ad-lacZ 组: 每孔加入含 lacZ 基因 (不含 IL-21 基因) 的对照腺病毒; ③ 空白对照组: 不做任何处理。

1.4 IL-21 基因对 ES-2 肿瘤细胞生长的影响 转染前一天用胰酶消化 ES-2 细胞并计数, 以 10^3 个细胞/孔加入 96 孔板, 在 37℃ 含 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养过夜。Ad-IL-21 质粒 1μ l 感染单层细胞, 转染当天按不同分组处理, 每组做 6 个复孔。37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。从转染后每组分别于处理后第一天、第三天、第五天用 MTT 法测其在 492 nm 波长下各孔的吸光值, 绘制生长曲线。

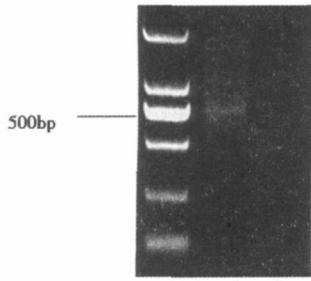
1.5 IL-21 基因对 ES-2 肿瘤细胞的细胞周期影响 转染前一天胰酶消化 ES-2 细胞, 以 5×10^5 个细胞/孔加入 6 孔板, 在 37℃ 含 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养过夜。Ad-IL-21 质粒 5μ l 感染单层细胞。转染当天按不同分组处理, 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养 48 h 收集细胞, 每个样本离心收集 1×10^6 细胞, PBS 洗 2 次, 弃上清后加入二碘化丙啶 (PI) 800 μ l 混匀。4℃ 避光反应 30 min, 尼龙网过滤, 流式细胞仪 488 nm 波长上样检测。

1.6 统计方法 采用 Excel 软件进行方差分析比较存活细胞数量, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 转染 Ad-IL-21 后 ES-2 细胞中 IL-21 基因的表达鉴

定以提取的 ES-2 细胞 DNA 为模板 PCR 扩增 IL-21 基因, 从图 1 可以看到对照组 ES-2 细胞中没有扩增出片段, 而转染了 Ad-IL-21 重组腺病毒的 ES-2 细胞中扩增出了预计的 IL-21 基因片段 (493 bp), 表明 Ad-IL-21 成功转染了 ES-2 细胞。



1 道是转染 Ad-IL-21 后 ES-2 细胞的 PCR 结果
2 道是对照 ES-2 细胞的 PCR 结果

图 1 Ad-IL-21 转染 ES-2 细胞后 IL-21 基因鉴定

2.2 Ad-IL-21 转染对 ES-2 细胞生长的影响 从细胞生长曲线可以看出, 空白对照组和 Ad-lacZ 组 ES-2 细胞数量随培养时间延长呈增加的趋势, Ad-IL-21 重组腺病毒组的生长较慢, 在转染后第 3 天开始 ES-2 细胞生长明显缓慢 ($P < 0.05$), 转染后第 5 天 Ad-IL-21 组的细胞生长基本稳定在一定水平 ($P < 0.05$), 而 Ad-lacZ 组和空白对照组无明显差别, 见图 2。结果表明 Ad-IL-21 对卵巢癌细胞的生长具有抑制作用。

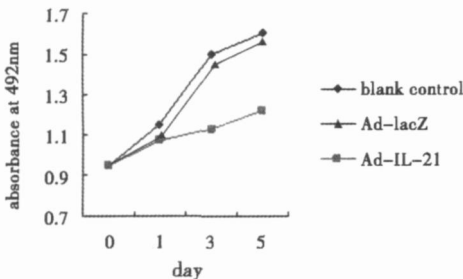


图 2 Ad-IL-21 转染后 ES-2 细胞的生长曲线

2.3 Ad-IL-21 转染对 ES-2 细胞周期的影响 从流式分析结果可见, 转染 ES-2 细胞后, Ad-IL-21 组与空白对照组相比, G_1 期细胞增加 14%, G_2 期和 S 期细胞分别减少 6% 和 9%, 而 Ad-lacZ 组和空白对照组差别不大, 见表 1。表明 IL-21 基因使 ES-2 细胞发生 G_0/G_1 期细胞周期阻滞。

表 1 Ad-IL-21 转染后 ES-2 细胞的细胞周期

分组	G_0/G_1 (%)	G_2/M (%)	S (%)
blank control	53.2	16.3	31.5
Ad-lacZ	55.7	15.5	28.8
Ad-IL-21	67.2	10.4	22.4

3 讨论

IL-21 具有广泛的生物学功能, 能促进骨髓中的 NK 细胞增殖与分化并表达 CD16 分子, 与抗 CD40 mAb 协同可刺激 B 细胞增殖, 与抗 CD30 mAb 协同可刺激 T 细胞增殖^[1], 单独作用或与其它刺激分子协同作用, 能增强效应 T 细胞及活化 NK 细胞的功能, 增加机体的天然免疫和特异性免疫。有研究报道^[3], 将 IL-21 基因导入肿瘤细胞内, 可以促使肿瘤局部 T 细胞的增殖、活化、增加 IFN- γ 的分泌, 促进 NK 细胞的分化成

熟, 从而加强 NK 细胞的细胞毒活性, 发挥强大的抗肿瘤免疫作用。IL-21 基因治疗有望在将来的肿瘤生物治疗中发挥重要作用。

选择合适的载体, 安全有效的转染方式和保证外源性基因的有效表达, 是基因治疗的关键。目前国内外利用基因进行肿瘤基因治疗的研究一般采用质粒或逆转录病毒为载体^[4]。由于体内有效的基因治疗需要足够高的感染率, 大部分逆转录病毒载体很难达到, 而腺病毒载体介导基因转移具有导入效率高、制备的病毒滴度高、对分裂和非分裂细胞均有感染性等优点, 因此重组腺病毒载体的体内抑瘤作用明显优于质粒载体和逆转录病毒载体^[5]。本实验我们选择复制缺陷型腺病毒 (E1 区缺失) 作载体, E1 区是跟病毒复制有关的基因功能区, 因 E1 区的缺失使病毒 DNA 不能被复制和表达, 保证了转染的安全性。

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。

本实验采用我们已经成功构建的 Ad-IL-21 重组腺病毒载体转染卵巢癌细胞, 结果显示, 腺病毒载体可有效的将外源性 IL-21 基因转入 ES-2 细胞, 且细胞的生长明显缓慢, 说明腺病毒介导的 IL-21 基因可显著抑制 ES-2 细胞的生长。

抑制肿瘤细胞生长的机理与细胞周期阻滞作用有关^[6], 如果细胞提前从 G_1 期进入 S 期, 细胞分裂则加快, DNA 损伤修复不完全, 进而导致肿瘤发生; 如果 G_1 期细胞增加使转入 S 期的细胞减少, 则肿瘤细胞的 DNA 合成受到抑制, 从而影响肿瘤细胞的分裂和增生。我们发现, 转染 IL-21 基因的 ES-2 细胞停滞于 G_1 期, G_2 期和 S 期细胞减少, 表明 IL-21 基因有助于细胞保持在静止期, 有效的抑制肿瘤细胞的异常增生。本实验为卵巢癌的进一步基因治疗研究提供了理论基础和实验依据。

参考文献:

[1] Parish-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.

[2] Asao R, Kudo T, Makabe K, et al. Antitumor activity of interleukin 21 prepared by novel refolding procedure from inclusion bodies expressed in Escherichia coli [J]. FEBS Lett, 2002, 528(1-3): 70-76.

[3] Dou J, Chen G, Wang J, et al. Preliminary study on mouse interleukin-21 application in tumor gene therapy [J]. Cell Mol Immunol, 2004, 1(6): 461-466.

[4] He H, Wisner P, Yang G, et al. Combined IL-21 and low-dose IL-21 therapy induces anti-tumor immunity and long-term curative effects in a murine melanoma tumor model [J]. J Transl Med, 2006, 4(24): 1-16.

[5] 范凌云, 谢庆军. 腺病毒载体的研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(2): 153-157.

[6] Sun A, Bagelja L, Tutton S, et al. From G_0 to S Phase: A view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway [J]. J Cell Biochem, 2007, 102(6): 1400-1404.