

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2006)21-1929-03

小鼠 IL-12 基因转染对人卵巢癌 Skov<sub>3</sub> 细胞的生长及细胞因子的表达

王 晶, 刘 娟, 隋丽华 (哈尔滨医科大学附属肿瘤医院妇科, 黑龙江 哈尔滨 150040)

Effect of mouse IL-12 gene transfection on the growth of ovarian cancer Skov<sub>3</sub> cells and the expression of related factors

WANG Jing, LIU Juan, SUI Li-Hua

Department of Gynecology, Tumor Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150040, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the effect on the proliferation of ovarian cancer Skov<sub>3</sub> cells and the expression of related factors, by the plasmid with mouse IL-12 gene transfected into Skov<sub>3</sub> cells, which cultured with spleen cells *in vitro*. **METHODS:** Human ovarian cancer Skov<sub>3</sub> cells were transfected with mouse IL-12 gene by lipofect. The expressions of IL-12 and INF- $\gamma$  were detected by ELISA, and the effects on the proliferation of Skov<sub>3</sub> ovarian cancer cells were evaluated by MTT. **RESULTS:** A high expression level of IL-12 (473  $\pm$  38) ng/L was found 48 h after transfection, more higher than that in control group (13 - 17 ng/L,  $P < 0.05$ ). Ovarian cancer cells could produce INF- $\gamma$  under the influence of spleen cells, and the highest level (173  $\pm$  18) ng/L emerged 24 h after transfection, which also was significantly different from untransfected group ( $P < 0.05$ ). Skov<sub>3</sub> ovarian cancer cells' proliferation was restrained by IL-12 when they were cultured with spleen cells ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry revealed that the cancer cells could produce IL-12 after transfection, and the latter could restrain the proliferation of Skov<sub>3</sub> ovarian cancer cells. **CONCLUSION:** The IL-12 genes could be transfected into Skov<sub>3</sub> ovarian cancer cells to product IL-12 and relative cell factors, which could restrain the proliferation of the cells and then kill the carcinoma cells of ovary.

**【Keywords】** interleukin-12; ovarian neoplasms; genetherapy

**【摘要】**目的 观察含小鼠 IL-12 全长基因的质粒转染到 Skov<sub>3</sub> 人卵巢癌细胞中, 在脾细胞存在的情况下对肿瘤细胞的影响及相关细胞因子的表达。方法 脂质体转染技术将基因转

染至 Skov<sub>3</sub> 人卵巢癌细胞中, ELISA 方法检测 IL-12 及 INF- $\gamma$  的表达, MTT 方法检测对 Skov<sub>3</sub> 卵巢癌细胞增殖的影响。结果 转染后 48 h 检测到 IL-12 的高表达, 约(473  $\pm$  38) ng/L; 而未转染组约 13 ~ 17 ng/L, 两者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。在脾细胞作用下产生 INF- $\gamma$ , 以作用后 24 h 表达量高, 约(173  $\pm$  18) ng/L, 较未转染组高, 比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。转染后癌细胞免疫组化可见 IL-12 表达, 在脾细胞的作用下, IL-12 对 Skov<sub>3</sub> 卵巢癌细胞有抑制其增殖的作用 ( $P < 0.05$ )。结论: 可以将 IL-12 基因转染至 Skov<sub>3</sub> 人卵巢癌细胞中并表达 IL-12, 脾细胞检测其活性并有相应的细胞因子产生, 对 Skov<sub>3</sub> 细胞有抑制其增殖作用, 从而杀伤卵巢癌细胞, 具有抗肿瘤作用。

**【关键词】** 白细胞介素-12; 卵巢肿瘤; 基因治疗

**【中图分类号】** R737.71 **【文献标识码】** A

## 0 引言

肿瘤生物学治疗的许多细胞因子中 IL-12 是最有效的<sup>[1]</sup>。它具有明显的抗原发和转移瘤的作用, 且毒性远比 IL-2 低, 成为广大学者研究的热点之一。卵巢恶性肿瘤在盆腔内生长, 易于转移而广泛播散, 复发率、转移率均较高。杨红等<sup>[2]</sup>将  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶基因转入卵巢癌细胞以探索卵巢癌临床基因治疗。我们将含有小鼠 IL-12 全长基因的质粒转染至 Skov<sub>3</sub> 人卵巢癌细胞中, 观察其表达情况及其相关细胞因子的表达, 评价其抗肿瘤效果, 探讨临床应用的可行性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人卵巢浆液性乳头状囊腺癌 Skov<sub>3</sub> 细胞株(美国 Memorial Sloan Kattering Cancer Center)用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 (Gibco 公司产品)培养液, 在 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养, 隔天换液, 细胞长满单层后用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代。含有全长小鼠 IL-12 质粒[PCAGGS-IL-12 (7.1 kb) [PCAGGS-IL-12P35-TRES-IL-12P40]]的大肠杆菌(哈尔滨医科大学微生物教研室); 成年 KM 小鼠 2 只, 购于黑龙江省肿瘤研究所实验动物中心; 脂质体转染试剂盒 Roche 公司产品。

**1.2 方法** 将已经转化质粒[PCAGGS-IL-12 (7.1 kb) [PCAGGS-IL-12P35-TRES-IL-12P40]]的大肠杆菌菌株加入 LB 培养基 5 mL 中, 置于 37 $^{\circ}$ C 摇床中 24 h,

收稿日期 2005-11-08; 接受日期 2005-12-28

基金项目 黑龙江省攻关课题(GC04C31003)

通讯作者 刘娟. Tel (0451) 83035595 Email liujuan90011@yahoo.com.cn

作者简介 王晶, 博士, 副教授, 副主任医师, 副主任. Tel (0451) 88582494 Email wj6507@163.com.cn

传代过夜,见培养基较浑浊后进行提取,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存并取  $25\ \mu\text{L}$  质粒溶液加入蒸馏水  $1\ \text{mL}$  中,分光光度计  $260\ 280\ \text{nm}$  下观察  $A$  值,得到质粒的浓度和纯度。DNA 浓度公式  $\alpha(\text{mg/L}) = A_{260\ \text{nm}}/0.20$ ; DNA 纯度公式  $A_{260\ \text{nm}}/A_{280\ \text{nm}}$ 。将 Skov<sub>3</sub> 细胞制成单细胞悬液,以  $1 \times 10^6$  接种于 6 孔板中。贴壁后,用不含血清和抗生素的 RPMI 1640 培养液洗板 3 次,将含有质粒和脂质体的混合液 ( $25\ \mu\text{L} + 50\ \mu\text{L} = 75\ \mu\text{L}$ ) 轻轻混匀放置  $10\ \text{min}$  后将混合液加入 6 孔板中,设无小鼠 IL-12 基因的空白质粒为对照。置  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $50\ \text{mL/L CO}_2$  孵箱中培养  $6\ \text{h}$  后更换含  $100\ \text{mL/L}$  胎牛血清的培养液,于孵箱中继续培养进行转染。收获不同时间 ( $24\ 48\ 72\ \text{h}$ ) 的培养上清按小鼠 IL-12 ELISA 试剂盒说明建立标准曲线,于转染后  $24\ 48\ 60\ \text{h}$  检测上清 IL-12 表达水平。以未转染的 Skov<sub>3</sub> 为对照。

取成年 KM 小鼠脾脏,制备脾细胞悬液,加 RPMI 1640 培养液  $3\ \text{mL}$  混匀培养,稀释 10 倍后细胞计数器计数  $\mathcal{C}_{(\uparrow/\text{mL})} = (A + B + C + D)/4 \times 10 \times 10^4$ 。吸取转染后  $48\ \text{h}$  的上清,加入脾细胞悬液中 (约含  $1.0 \times 10^6$  脾细胞),培养  $0\ 24\ 48\ \text{h}$ ,分别检测 INF- $\gamma$  表达;收集转染后的 Skov<sub>3</sub> 卵巢癌细胞,将脾细胞悬液 (约含  $1.0 \times 10^6$  脾细胞) 加入其中,共同培养  $24\ 48\ \text{h}$  后,收集上清,检测 INF- $\gamma$  表达。

以未转染的 Skov<sub>3</sub>  $A$  值为对照 MTT 法检测 Skov<sub>3</sub> 卵巢癌细胞抑制率  $= [(A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}})/A_{\text{对照组}}] \times 100\%$

统计学处理:全部数据经统计软件 SPSS 10.1 处理,组间比较用方差分析  $P < 0.05$  为有统计学意义。

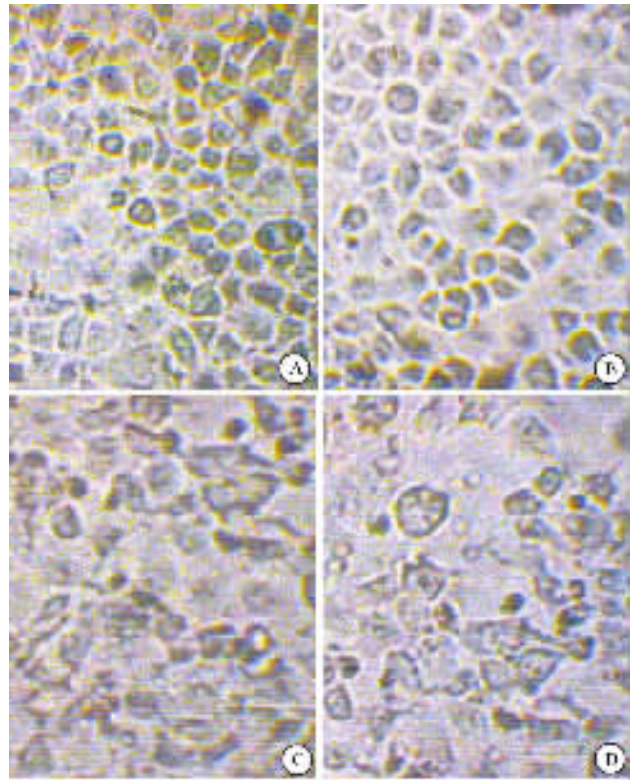
## 2 结果

质粒浓度  $= 0.54\ \mu\text{g/L}$ ; DNA 纯度:  $A_{260\ \text{nm}}/A_{280\ \text{nm}} = 0.18$ 。转染后 Skov<sub>3</sub> 细胞光镜下形态未见明显变化 (图 1)。

**2.1 小鼠 IL-12 的表达** 转染后  $24\ 48$  及  $60\ \text{h}$  IL-12 表达水平 ( $\mu\text{g/L}$ ) 分别为  $75 \pm 9\ 473 \pm 38\ 522 \pm 32$  而未转染组分别为  $13 \pm 4\ 16 \pm 4\ 17 \pm 6$ 。转染后组 IL-12 表达水平较未转染组明显增高,  $48$  和  $60\ \text{h}$  的表达有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 INF- $\gamma$  的表达** 转染后  $48\ \text{h}$  上清与脾细胞悬液共同培养作用  $0\ 24\ 48\ \text{h}$ , ELISA 方法检测得 INF- $\gamma$  的表达水平 ( $\mu\text{g/L}$ ) 分别为:  $32.0 \pm 2.1\ 82.0 \pm 3.2\ 30.0 \pm 1.0$ , 其中共同作用  $24\ \text{h}$  INF- $\gamma$  表达水平较高,转染  $48\ \text{h}$  后 Skov<sub>3</sub> 卵巢癌细胞中加入脾细胞悬液 (约  $1.0 \times 10^6$ ), 共同培养  $24\ 48\ \text{h}$  后, 收集

上清检测 INF- $\gamma$  的表达,测得 INF- $\gamma$  表达水平 ( $\mu\text{g/L}$ ) 分别为:  $185.0 \pm 17.6\ 157.0 \pm 7.2$ 。转染后的 Skov<sub>3</sub> 卵巢癌细胞与脾细胞共同作用  $24\ \text{h}$  后可测得高水平 INF- $\gamma$  的表达。提示转染后 Skov<sub>3</sub> 的卵巢癌细胞持续分泌的 IL-12 能促进效应细胞 (脾细胞) 产生持续高水平的 INF- $\gamma$  表达。脾细胞与转染后 Skov<sub>3</sub> 的卵巢癌细胞 (T-Skov<sub>3</sub> + S) 共同作用  $24\ \text{h}$  后,  $A_{490\ \text{nm}}$  为  $0.735 \pm 0.036$ , 与未转染的 Skov<sub>3</sub> 卵巢癌细胞  $A_{490\ \text{nm}}$   $2.040 \pm 0.124$  比较有差异 ( $P < 0.05$ ); 与未转染的 Skov<sub>3</sub> + S 作用后的  $A_{490\ \text{nm}}$  值  $2.038 \pm 0.228$  比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。而 T-Skov<sub>3</sub>, Skov<sub>3</sub>, Skov<sub>3</sub> + S, Skov<sub>3</sub> 组比较差异无统计学意义。转染后的 Skov<sub>3</sub> 卵巢癌细胞与脾细胞共同作用  $24\ \text{h}$  后, 对卵巢癌细胞的抑制率为  $64.0\%$ , 表明在脾细胞存在共同作用下小鼠 IL-12 对 Skov<sub>3</sub> 卵巢癌细胞的增殖有明显的抑制作用。



A: 正常生长的 Skov<sub>3</sub> 卵巢癌细胞; B: 转染后  $48\ \text{h}$ ; C: 转染后  $48\ \text{h}$  加入脾细胞  $0\ \text{h}$ ; D: 转染后  $48\ \text{h}$  与脾细胞共同作用  $24\ \text{h}$ 。

图 1 转染前后人卵巢癌 Skov<sub>3</sub> 细胞光镜下形态 SABC  $\times 400$

## 3 讨论

细胞因子疗法是肿瘤生物疗法之一。Yamazaki 等<sup>[3]</sup>将含有鼠 IL-12 基因的质粒转导到 BCG 中,发现能够检测到 IL-12, INF- $\gamma$  的高表达并且增加了

BCG 的肿瘤杀伤效应。王克敏等<sup>[4]</sup>将含有小鼠 IL-12 基因与 MHC I 基因的质粒采用脂质体转染法转染到肝癌细胞株中,用 ELISA 方法测得上清中小鼠 IL-12 表达为 48 ng/L。我们以脂质体转染技术将含有鼠全长 IL-12 基因的质粒转染到 Skov<sub>3</sub> 卵巢癌细胞中,脂质体作为治疗基因载体较病毒载体的优点是安全、操作简单、转染成功率较高,但转染率较低,因此 IL-12 表达水平不是特别高,较相关文献报道水平低。

INF- $\gamma$  具有较强的抗肿瘤作用<sup>[5-6]</sup>,能够抑制肿瘤生长,并能抑制机制转移蛋白酶,从而抑制肿瘤转移。IL-12 通过诱导 INF- $\gamma$  的产生,抑制肿瘤。

本实验结果显示在部分效应细胞脾细胞的存在下,小鼠 IL-12 对卵巢癌细胞的抑制杀伤作用,并检测了相应的效应因子的表达,初步探讨了其在卵巢癌细胞中的抗肿瘤作用。由于细胞因子间相互作用是一个复杂的网络,本研究中的细胞因子种类有限,不能全面解释 IL-12 的抗卵巢癌作用,尚需继续完善。

## 【参考文献】

- [1] Gorelik E, Edwards RP, Feng X, et al. IL-12 receptor-mediated upregulation of FasL in human ovarian carcinoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2004, 112(4): 620-627.
- [2] 杨红,辛晓燕,秦卫军.  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶基因转染人卵巢癌细胞的生物学特性[J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24(17): 1575-1577.
- [3] Yamazaki M, Zhang R, Straus FH, et al. Effective gene therapy for medullary thyroid carcinoma using recombinant adenovirus inducing tumor-specific expression of interleukin-12[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(1): 64-74.
- [4] 王克敏,夏爱娣,陈诗书. 脂质体介导 Mil-12 基因与 MHC I 基因联合对小鼠试验性肝癌的治疗作用[J]. *癌症*, 2002, 21(10): 1041-1046.
- [5] Comes A, Carlo ED, Musiani P, et al. IFN- $\gamma$ -independent synergistic effects of IL-12 and IL-15 induce anti-tumor immune responses in syngeneic mice[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(7): 1914-1923.
- [6] Yun CH, Lundgren A, Azem J, et al. Natural killer cells and Helicobacter pylori infection: Bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(3): 1482-1490.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)21-1931-01

## 脑室中枢神经细胞瘤的影像分析

郑运松,徐会吾

(陕西中医学院附属医院磁共振室,陕西 咸阳 712000)

【关键词】脑室 中枢神经细胞瘤 影像分析

【中图分类号】R445 【文献标识码】B

1 对象和方法 本组中枢神经细胞瘤(CNS)6(男3,女3)例,年龄18~42(平均31.2)岁,病程2 wk~11 mo。临床表现:头疼3例,呕吐、视力下降2例,双颞部隐痛、突发昏厥1例。本组6例术前经CT、MRI检查均诊断错误,4例诊断为室管膜瘤,2例诊断为胼胝体胶质瘤。CT检查4例,其中3例作增强扫描,MRI检查5例,SE序列, $T_1$ WI450/15 ms, $T_2$ WI2500/90 ms,其中3例亦作增强扫描。

2 结果 本组6例中3例生长在侧脑室联合部,2例累及胼胝体,1例向下突入三脑室。肿瘤边缘不规整,最大径约6.2 cm。MRI显示 $T_1$ WI肿瘤呈等、低混杂信号,边缘似有厚薄不均的包膜样结构,信号强度与脑白质相近, $T_2$ WI肿瘤主要呈高信号,间杂以等信号或更高信号区,肿瘤中心或边缘区可见流空的血管结构。增强后1例表现较为均匀的显著性强化,2例肿瘤实质强化不均,瘤体内可见多发斑块状异常强化区,瘤内坏死囊变区无强化。CT平扫检查,肿瘤表现为非均质性稍高密度影。本组1例肿瘤向下突入三脑室、鞍上池并脑膜广泛转移。

3 讨论 CNC好发于青壮年,生长缓慢,肿瘤常发于侧脑室、透明隔,长的很大时阻塞Monro孔,引起梗阻性脑积水<sup>[1]</sup>。CNC的诊断与鉴别诊断还必须从影像学出发,探讨其特殊性。

3.1 CNC影像学特征 CT:CT显示肿瘤为位于侧脑室体部邻近Monro孔的等或稍高密度肿块。典型的表现为以广基与侧脑室透明隔相连的肿物。大多数可以见到肿瘤钙化,增强扫描为轻度到中度强化;由于常伴有Monro孔阻塞,一般均能见到单侧或双侧侧脑室扩张。MR:MR可以更好地确定CNC的范围,大多数的CNC在 $T_1$ WI为不均匀的等信号,其中可以见到代表囊变、钙化灶或肿瘤血管的低信号或无信号的区域;在 $T_2$ WI肿瘤的信号不一,一些呈相对等信号,而其他的主要为高信号,这些高信号可能代表坏死或囊变。造影强化程度不一,从无强化到中度强化,可以见到肿瘤内有肿瘤血管的流空现象。有报道认为,位于脑室内的信号不一以及匍行性流空是CNC MR的特征表现。笔者认为肿瘤边缘呈绳索状改变是CNC的一个较为特征的影像学表现。

3.2 CNC的鉴别诊断<sup>[2]</sup> 本组6例CNC术前均误诊:①误诊为室管膜瘤4例,室管膜瘤是起源于室管膜或室管膜残余部分的肿瘤。其在儿童的发病率是成人的4~6倍,60%位于后颅凹,其中90%位于第IV脑室,40%位于幕上,而幕上的室管膜瘤2/3~3/4位于脑室外。CT平扫呈等密度,大多数有钙化。MRI诊断主要靠肿瘤位置和形态的改变,而不是肿瘤的信号特征。脑室内室管膜瘤有向室旁脑实质内生长的倾向,我们认为这一点对两者的鉴别有一定的价值。②误诊为胶质瘤2例,胶质细胞瘤可发生在脑室任何部位,肿瘤形态不规则,边界不清,常侵入脑实质伴有瘤周水肿,易发生坏死囊变。

## 【参考文献】

- [1] 马振宇,隋大立,罗世祺,等.侧脑室神经细胞瘤[J]. *中华神经外科杂志*, 1992, 8(2): 191-193.
- [2] 金行薄,石群立,孟奎,等.中枢神经细胞瘤7例临床与病理观察[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2000, 16(5): 361-364.

编辑 井晓梅

收稿日期 2006-09-04; 接受日期 2006-09-20

作者简介 郑运松,本科,住院医师。Tel: (029) 33320943 Email: niuriu231@chinaren.com