

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2006 )13-1214-03

## 外源性 IL-18 基因对 C6 胶质瘤细胞增殖及相关基因表达的影响

蒋常文<sup>1</sup>, 闫蕴力<sup>1</sup>, 马卫东<sup>1</sup>, 高庆华<sup>2</sup>, 申园<sup>1</sup>, 郑力芬<sup>1</sup>, 王彦玲<sup>1</sup>, 周娜静<sup>1</sup>( 河北医科大学<sup>1</sup>: 基础医学院细胞生物室, <sup>2</sup> 公共卫生学院流行病学教研室, 河北石家庄 050017 )

### Effects of exogenous IL-18 gene on the proliferation and related gene expression in C6 glioma cells

JIANG Chang-Wen<sup>1</sup>, YAN Yun-Li<sup>1</sup>, MA Wei-Dong<sup>1</sup>, GAO Qing-Hua<sup>2</sup>, SHEN Yuan<sup>1</sup>, ZHENG Li-Fen<sup>1</sup>, WANG Yan-Ling<sup>1</sup>, ZHOU Na-Jing<sup>1</sup><sup>1</sup>Cell Biology Division, School of Basic Medicine, <sup>2</sup>Department of Epidemiology, School of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the effects of exogenous IL-18 gene on the proliferative ability and related gene expression in transfected C6 glioma cells. **METHODS:** The cell cycle distributions and proliferation index of C6/IL-18 and its parental C6 cells were detected by flow cytometry. RT-PCR, immunocytochemistry and Western blot analysis were applied to test the mRNA and protein expression of cyclin D1, cyclin B1 and Bcl-2 in C6/IL-18 and C6 cells respectively. **RESULTS:** Compared with C6 cells, C6/IL-18 cells were arrested at G0/G1 phase with fewer G2/M cells. The proliferation index of C6/IL-18 cells was lower than that of C6 cells. At both mRNA and protein levels, the Bcl-2, cyclin B1 and cyclin D1 expression in C6/IL-18 cells were decreased. **CONCLUSION:** Exogenous IL-18 gene could reduce the proliferative ability of C6 cells by inhibiting the progress of cell cycle and down-regulating the Bcl-2, cyclin B1 and cyclin D1 expressions.

**【Keywords】** Bcl-2; cyclin; C6 glioma cell; IL-18 gene transfection; proliferation index

**【摘要】**目的: 研究 IL-18 基因转染对 C6 胶质瘤细胞增殖活性及相关基因表达的影响。方法: 用流式细胞仪观察 C6/IL-18 细胞周期、增殖指数的变化; 用 RT-PCR、蛋白印迹、免疫细胞化学方法分析 C6/IL-18 细胞 cyclin D1、cyclin B1、Bcl-2 mRNA 及蛋白的表达。结果: 与亲代 C6 细胞相比, C6/IL-18 细胞表现为 G0/G1 期细胞增多、G2/M 期细胞减少, 细胞增殖指数 (PI) 降低。C6/IL-18 细胞的 cyclin D1 和 cyclin B1、Bcl-2 mRNA

及蛋白表达降低。结论: 外源性 IL-18 基因可降低 C6 细胞的增殖活性, 其机制可能与 Bcl-2、cyclin B1 和 cyclin D1 表达下调有关。

**【关键词】** Bcl-2; 细胞周期蛋白; C6 胶质瘤细胞; IL-18 基因转染; 增殖指数

**【中图分类号】** R73-3 **【文献标识码】** A

### 0 引言

细胞因子基因修饰的肿瘤细胞疫苗, 可通过靶基因表达而发挥其抗肿瘤作用, 同时可提高肿瘤的免疫源性, 激发机体的免疫反应, 已成为目前研究的热点。有研究报道表明, IL-18 基因修饰的肿瘤细胞疫苗具有激发机体的抗肿瘤免疫反应、抑制肿瘤生长的作用<sup>[1]</sup>。一般认为, IL-18 可通过活化 NK 细胞, 促进 T 细胞的增殖及诱导 NK 细胞、T 细胞产生 IFN- $\gamma$  而发挥其抗肿瘤作用。同时, 也有研究报道 IL-18 在体外有直接杀灭肿瘤细胞的作用<sup>[2]</sup>。我们将 IL-18 基因导入 C6 胶质瘤细胞, 成功建立了能够稳定表达具有生物活性 IL-18 的 C6/IL-18 系, 并观察到 C6/IL-18 细胞的体内致瘤性、体外增殖能力明显降低<sup>[3]</sup>。但对其具体作用机制尚需进一步了解。本实验旨在探讨 C6/IL-18 细胞增殖相关基因表达的改变, 为 IL-18 基因介导的抗肿瘤作用研究与应用提供资料。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 大鼠 C6/IL-18 细胞( 逆转录病毒介导 IL-18 基因转染的 C6 胶质瘤细胞 )、C6 胶质瘤细胞均由本室保存。Trizol 及 PCR 试剂为 Promega 公司产品。鼠抗人细胞周期蛋白 D1( cyclin D1 )、Bcl-2 一抗、兔抗人细胞周期蛋白 B1( cyclin B1 )一抗为 Santa Cruz 产品。辣根过氧化物酶标记羊抗鼠/兔二抗购自北京中山生物技术公司。RT-PCR 引物由北京赛百盛基因公司合成。RPMI 1640 培养基为 Sigma 公司产品。

#### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** C6/IL-18 细胞、C6 细胞以 RPMI 1640 培养基培养, 内含 100 mL/L 胎牛血清、青霉素 100 U/mL, 链霉素 100  $\mu$ g/mL。置 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L

收稿日期 2005-11-14; 接受日期 2006-02-17

通讯作者: 闫蕴力。Tel (0311) 86265558 Email yanyl@hebmu.edu.cn

作者简介: 蒋常文, 副教授, 博士生( 导师闫蕴力 )。Tel (0311)

86265558 Email jiangchangwen\_gl@163.com

## CO<sub>2</sub> 培养箱培养.

1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期细胞 0.4 g/L EDTA 消化、离心,用冷 PBS 洗两次,700 mL/L 乙醇固定 24 h. 上机前离心去乙醇,再以 PBS 洗涤 1 次. 用含 10 μg/mL RNA 酶、10 μg/mL 溴化乙锭染液 4℃ 染色 30 min. 经尼龙网过滤后,用 FACSTARCalibur 型流式细胞仪检测. 应用 DNA 细胞周期分析软件计算 DNA 组方图 G0/G1, S, G2/M 期的百分比,以细胞增殖指数(proliferation index, PI)表示细胞增殖活性,计算公式为  $PI = (S + G2/M) / (G0/G1 + S + G2/M)$ .

1.2.3 引物设计 根据核苷酸序列用 Premier 5.0 软件设计引物. Cyclin D1 上游引物为:5'-GCG TAC CCT GAC ACC AAT C-3',下游引物为 5'-CCT CCT CTT CGC ACT TCT G-3',扩增产物长度为 184 bp; Cyclin B1 上游引物为:5'-AAA ATA AGG CCA AGG TCA G-3',下游引物为 5'-GCA AGA ATC ACA TCG GAG A-3',扩增产物长度为 385 bp; Bcl-2 上游引物:5'-CGG GAG AAC AGG GTA TGA-3',下游引物 5'-CAG GCT GGA AGG AGA AGA T-3',扩增产物长度为 149 bp; β-actin 上游引物为:5'-GAG GGA AAT CGT GCG TGA C-3',下游引物为:5'-CTG GAA GGT GGA CAG TGA G-3',扩增产物长度为 445 bp.

1.2.4 RNA 提取与 cDNA 合成 取对数生长期 C6 细胞、C6/IL-18 细胞,按 Trizol 试剂盒说明提取细胞总 RNA 取 2 μg 细胞总 RNA 为模板逆转录成 cDNA. 反应条件为 42℃ 逆转录 30 min,95℃ 5 min 灭活 AMV 逆转录酶.

1.2.5 PCR 反应 取 2 μL 逆转录产物以 β-actin 为内参照进行 PCR 扩增. 条件为 95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 40 s,53℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,共 30 个循环,72℃ 再延伸 10 min. PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察结果、照相,用凝胶图像分析系统分析结果,分别计算 C6/IL-18 细胞、C6 细胞条带的光密度与相对的 β-actin 条带光密度的比值,该值为各目的基因 mRNA 表达的相对水平. 本实验重复 3 次.

1.2.6 免疫细胞化学检测 Bcl-2 蛋白表达 分别取对数生长期 C6/IL-18 和 C6 细胞 0.4 g/L EDTA 消化后,加入培养液吹打混匀. 以 10<sup>8</sup>/L 密度接种于预先置有消毒盖片的 6 孔培养板中,待细胞爬满盖片后用 40 g/L 多聚甲醛固定 40 min,30 mL/L 过氧化氢 10 min,3 g/L triton X-100 处理 10 min,100 mL/L 正常羊血清处理 15 min,cyclin D1, cyclin B1, Bcl-2 一抗(1:100)4℃ 孵育过夜. 用 PBS 代替一抗作为阴性对照. 羊抗鼠/兔生物素标记的二抗 37℃ 孵育 40

min 过氧化物酶标记链霉卵白素 37℃ 孵育 40 min,0.5 g/L DAB 显色、苏木精复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明、封片,光镜下观察.

1.2.7 蛋白印迹检测 Cyclin D1, cyclin B1 蛋白表达 分别取对数生长期 C6/IL-18 细胞与 C6 细胞,提取蛋白. 用考马斯亮蓝 G250 试剂盒,在分光光度计 595 nm 下检测样本的吸光值(A 值)并计算蛋白的浓度. 每孔加入 70 μg 胞浆蛋白或(50 μg 胞核蛋白)进行 SDS-PAGE 凝胶电泳. 将靶蛋白从凝胶转移至硝酸纤维素膜(NC)膜,进行丽春红染色,根据蛋白码克以确定转膜效果及靶蛋白的位置. NC 膜在 50 g/L 脱脂奶粉中封闭 1 h,按 0.1 mL/cm<sup>2</sup> 膜加入一抗(1:100)4℃ 静置过夜. 然后 37℃ 与辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠/兔 IgG 抗体温育 1 h,利用化学发光法进行显色反应、照相及观察结果.

统计学处理:实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 11.0 统计软件进行 *t* 检验.  $P < 0.05$  为有显著性差异.

## 2 结果

2.1 细胞周期分布 流式细胞仪分析结果表明 C6/IL-18 主要表现为 G0/G1 期细胞增多、G2/M 期细胞减少,细胞增殖指数(PI)降低. 说明 C6/IL-18 较亲代 C6 细胞增殖能力降低(表 1).

表 1 C6/IL-18 细胞周期及增殖指数变化 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

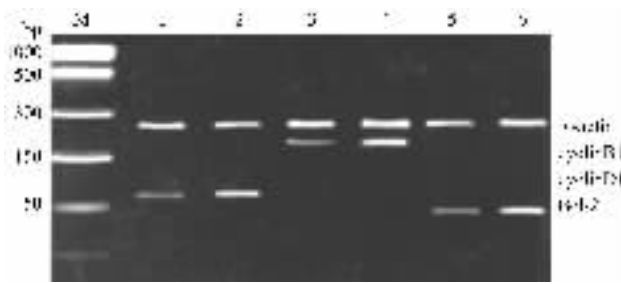
细胞类型	G0/G1(%)	S(%)	G2/M(%)	PI
C6/IL-18	52.82 ± 3.12 <sup>b</sup>	40.11 ± 2.23	7.05 ± 2.17 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>a</sup>
C6	42.81 ± 2.69	43.25 ± 2.75	13.92 ± 2.05	0.57 ± 0.03

<sup>a</sup> $P < 0.05$  <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs C6.

2.2 RT-PCR 检测 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后在各泳道的 445 bp 处观察到 β-actin 的电泳条带,在 184, 385 和 149 bp 处分别观察到 cyclin D1, cyclin B1, Bcl-2 的电泳条带(图 1). C6/IL-18 细胞 cyclin D1, cyclin B1, Bcl-2 与 β-actin 的 A 比值分别为 0.67 ± 0.06, 0.66 ± 0.08 和 0.68 ± 0.10, C6 细胞 cyclin D1, cyclin B1, Bcl-2 与 β-actin 的 A 比值分别为 1.16 ± 0.13, 0.95 ± 0.09 和 0.85 ± 0.09. 与 C6 细胞相比, C6/IL-18 细胞 cyclin D1, cyclin B1, Bcl-2 mRNA 表达均降低( $P < 0.05$ ).

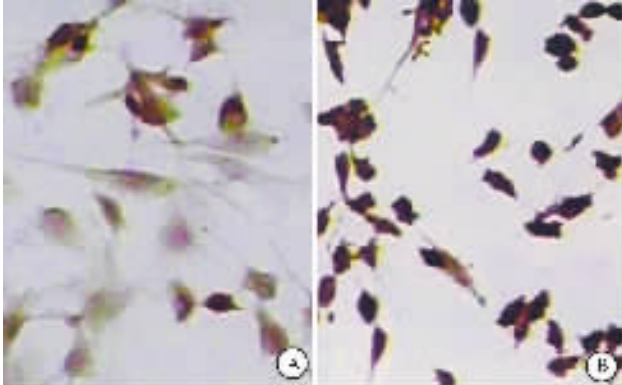
2.3 免疫细胞化学检测 Bcl-2 免疫阳性染色位于细胞浆. C6 细胞的免疫阳性细胞较多,染色较深,呈棕黑色. C6/IL-18 细胞的免疫阳性细胞较少,染色较浅,呈棕黄色. 与 C6 细胞比较, C6/IL-18 细胞的 Bcl-

## 2 蛋白表达降低( 图 2A , B )



M : DNA marker ; 1 , 3 , 5 : C6/IL-18 细胞 2 , 4 , 6 : C6 细胞.

图 1 CyclinD1 , cyclin B1 和 Bcl-2 mRNA 表达



A : C6/18 细胞中表达 ; B : 在 C6 细胞中表达.

图 2 Bcl-2 蛋白表达 ×200

## 2.4 蛋白印迹分析 C6/IL-18 细胞的 cyclin D1 , cyclin B1 蛋白表达降低( 图 3 )



1 : C6/IL-18 细胞 ; 2 : C6 细胞.

图 3 蛋白的表达

## 3 讨论

研究表明细胞异常增殖与基因表达及调控异常有关,基因表达异常与肿瘤的发生、发展及恶性程度密切相关<sup>[4-5]</sup>. Cyclin D1 在肿瘤细胞中表达增高,并与胶质瘤细胞的异常增殖、侵袭和预后有关<sup>[6]</sup>. 有研究报道 cyclin D1 在舌癌中异常表达,与舌癌的组织学分级和淋巴转移有关<sup>[7]</sup>. Cyclin B1 在恶性肿瘤中也常呈高表达,与肿瘤的恶性程度有关<sup>[8-9]</sup>. Bcl-2 能延长细胞寿命,有阻止凋亡的能力,在癌的发生中起到重要作用. 近年来发现 Bcl-2 在胶质瘤中呈高表达,基因在肿瘤中的高表达使胶质瘤耐药性增高<sup>[10-11]</sup>,用反义核苷酸封闭 Bcl-2 基因表达可抑制肿瘤细胞的增殖和增加细胞凋亡<sup>[12]</sup>.

C6/IL-18 细胞是我们用 IL-18 基因转染 C6 胶质瘤细胞而建立的一个新的细胞系. C6/IL-18 细胞具有表达 IL-18 mRNA,分泌 IL-18 蛋白及诱导脾细胞生成 IFN- $\gamma$  的能力,同时体内致瘤性明显降低. 本研究表明 C6/IL-18 细胞与亲代 C6 细胞相比, cyclin D1, cyclin B1, Bcl-2 表达下调, PI 降低,说明外源性 IL-18 基因可能通过下调细胞增殖相关基因表达来影响 C6 胶质瘤细胞的增殖活性.

## 【参考文献】

- [1] Hikosaka S, Hara I, Miyake H, et al. Antitumor effect of simultaneous transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes and its mechanism in a mouse bladder cancer model [ J ]. Int J Urol, 2004, 11 ( 8 ): 647 - 652.
- [2] Okano F, Yamada K. Canine interleukin-18 induces apoptosis and enhances Fas ligand mRNA expression in a canine carcinoma cell line [ J ]. Anticancer Res, 2000, 20( 5B ): 3411 - 3415.
- [3] 蒋常文, 闫蕴力, 马卫东, 等. IL-18 基因转染对大鼠 C6 胶质瘤细胞生长特性的影响 [ J ]. 细胞生物学杂志, 2005, 27( 3 ): 339 - 342.
- [4] Perkins E, Calvert J, Lancon JA, et al. Inhibition of H-ras as a treatment for experimental brain C6 glioma [ J ]. Brain Res Mol Brain Res, 2003, 111( 1-2 ): 42 - 51.
- [5] Lokker NA, Sullivan CM, Hollenbach SJ, et al. Platelet-derived growth factor ( PDGF ) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors [ J ]. Cancer Res, 2002, 62( 13 ): 3729 - 3735.
- [6] Arato OT, Sawa H. Over-expression of cyclin D1 induces glioma invasion by increasing matrix metalloproteinase activity and cell motility [ J ]. Int J Cancer, 1999, 83( 3 ): 387 - 392.
- [7] 安虹, 王亚利, 郝小静, 等. 舌鳞癌组织中 Cyclin D1 的表达与临床病理相关性 [ J ]. 第四军医大学学报, 2004, 25( 2 ): 179 - 181.
- [8] Scott IS, Heath TM, Morris LS, et al. A novel immunohistochemical method for estimating cell cycle phase distribution in ovarian serous neoplasms: Implications for the histopathological assessment of paraffin-embedded specimens [ J ]. Br J Cancer, 2004, 19( 8 ): 1583 - 1590.
- [9] Yoshida T, Tanaka S, Mogi A, et al. The clinical significance of Cyclin B1 and Wee1 expression in non-small-cell lung cancer [ J ]. Ann Oncol, 2004, 15( 2 ): 252 - 256.
- [10] Fels C, Schafer C, Huppe B, et al. Bcl-2 expression in higher-grade human glioma: a clinical and experimental study [ J ]. Neurooncol, 2000, 48( 3 ): 207 - 216.
- [11] Del BD, Trisciuoglio D, Biroccio A, et al. Bcl-2 overexpression decreases BCNU sensitivity of a human glioblastoma line through enhancement of catalase activity [ J ]. J Cell Biochem, 2001, 83( 3 ): 473 - 483.
- [12] Julien T, Frankel B, Longo S, et al. Antisense-mediated inhibition of the Bcl-2 gene induces apoptosis in human malignant glioma [ J ]. Surg Neurol, 2000, 53( 4 ): 360 - 369.

编辑 许福明