

[文章编号] 1000-4718(2005)10-1883-05

## pEgr-IL18-B7.1 质粒辐射诱导表达特性及其联合辐射抗肿瘤作用\*

金光辉, 田梅, 刘树铮<sup>△</sup>, 杨建征, 杨英  
(吉林大学卫生部放射生物学重点实验室, 吉林 长春 130021)

**[摘要]** 目的:构建 pEgr-IL18-B7.1 双基因表达质粒,探讨不同剂量电离辐射诱导下的表达特性,研究基因放射治疗对恶性黑色素瘤的抑瘤作用。方法:利用基因重组技术构建包含小鼠 IL-18 和 B7.1 的双基因表达质粒 pEgr-IL18-B7.1,分别利用 ELISA 和流式细胞仪检测不同剂量电离辐射诱导下 IL-18 和 B7-1 在体外的表达特性,以移植肿瘤的生长为判断指标,探讨基因放射治疗对恶性黑色素瘤的抑瘤作用。结果:体外实验证实,双基因表达质粒 pEgr-IL18-B7.1 在不同剂量 X 射线诱导下可有效表达 IL-18 和 B7-1,与放疗联合应用可有效抑制肿瘤生长。结论:说明多基因联合辐射治疗是有效的抗肿瘤措施之一。

**[关键词]** 白细胞介素 18; 黑色素瘤; 放射疗法; 基因疗法

**[中图分类号]** R363

**[文献标识码]** A

### Radiation-induced expression of IL-18 and B7.1 genes in transfected B16 cells and antitumor effect of Egr-IL18-B7.1 *in vivo*

JIN Guang-hui, TIAN Mei, LIU Shu-zheng, YANG Jian-zheng, YANG Ying

(MH Radiobiology Research Unit, Jilin University, Changchun 130021, China)

**[ABSTRACT]** AIM: Plasmid Egr-IL18-B7.1 was constructed to explore its expression characteristics induced by different doses of radiation and its suppressive effect on melanoma under radiotherapy. **METHODS:** The plasmid containing both IL-18 and B7.1 genes downstream of Egr-1 was constructed using gene recombination technique. The *in vitro* expression of IL-18 and B7.1 induced by ionizing radiation was measured with ELISA and flow cytometry, respectively. The effect of gene radiotherapy on malignant melanoma was assayed by observing the growth rate of B16 cells implanted into C57BL/6J mice. **RESULTS:** Effective expression of IL-18 and B7.1 by plasmid Egr-IL18-B7.1 treated with different doses of X-irradiation were observed and *in vivo* experiments showed significant inhibition of tumor growth after combined gene-radiotherapy. **CONCLUSION:** Data presented in this paper implicate that gene radiotherapy with plasmid containing double genes might be one of the effective anticancer therapeutic measures.

**[KEY WORDS]** Interleukin-18; Melanoma; Radiotherapy; Gene therapy

研究表明,多基因联合治疗是有效的抗肿瘤措施之一<sup>[1]</sup>。白细胞介素 18(interleukin 18, IL-18)是 Okamura 等<sup>[2]</sup>在中毒性休克的小鼠肝脏中克隆到的一种由应激诱生的蛋白,由于具有很强的干扰素  $\gamma$  诱生能力,又称干扰素  $\gamma$  诱生因子(interferon- $\gamma$  inducing factor, IGIF),具有抗感染、抗肿瘤、抗超敏反应等作用。目前 IL-18 在肿瘤治疗中的意义的研究已成为新的热点,认为 IL-18 通过细胞毒作用、参与粘附分子调节、抑制肿瘤血管生成<sup>[3]</sup>等多种途径发挥其抗肿瘤作用。共刺激分子 B7 是参与 T 细胞活化

的重要粘附分子,表达于大部分抗原递呈细胞表面,与 T 细胞表面的 CD28 相互作用使 IL-2 等淋巴因子的 mRNA 转录增强,为激发 T 细胞免疫反应提供第二信号,大多数肿瘤细胞不表达 B7-1 分子,因而逃避了免疫细胞的监视<sup>[4]</sup>。因此,本实验选择与肿瘤密切相关的免疫因子/表面分子 IL-18 和 B7-1,通过基因工程技术构建包含辐射敏感启动子 Egr-1 的双基因共表达质粒 pEgr-IL18-B7.1,研究体外辐射诱导表达特性,探讨对荷瘤小鼠恶性黑色素瘤生长的抑制作用。

[收稿日期] 2004-01-14 [修回日期] 2004-06-30

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30100033)

<sup>△</sup>通讯作者 Tel:0431-5619443; E-mail: drliusz@yahoo.com

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

**1.1 质粒与菌种** 双基因表达载体 pIRES1neo 购自 BD 公司, pGL3-Egr1-Enhancer Vector 由本实验室田梅博士惠赠, 感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本室保存。

**1.2 工具酶与试剂** 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶、RT-PCR Kit 均为 TaKaRa 产品, Trizol 试剂为 Gibco 公司产品, mouse IL-18 ELISA Set 为 BD 公司产品, mouse CD80 藻红素 (r-phycoerythrin) 偶联抗体 (PE-CD80) 购自 CALTAG 公司。

**1.3 引物设计与合成** 根据 GenBank 中小鼠 IL-18 (GenBank 登录号: XM\_125166) 及 B7-1 (GenBank 登录号: XM\_148237) 编码序列设计了 PCR 引物, mL-18 有义链引物: 5'-ATG GCT GCC ATG TCA GAA GAC TC-3', 反义链引物: 5'-CTA ACT TTG ATG TAA GTT ACT G-3'; B7-1 有义链引物: 5'-CAC CAC TCC TCA AGT TTC CA-3', 反义链引物: 5'-CCC AAG CTA AGG CTG TTG TT-3', 由 TaKaRa 公司合成, GAPDH 有义链引物: 5'-TAT TGG GGC GCC GGG TCA CCA-3', 反义链引物: 5'-CCA CCT TCT

TGA TGT CAT TCA-3', 由田梅博士提供, 所扩增的 IL-18、B7-1、GAPDH 序列长度分别为 580 bp、850 bp、750 bp 左右。

**1.4 细胞系及实验动物** 恶性黑色素瘤细胞 B16 为本室保存; C57BL/6J 纯系小鼠, 一级, 雌性, 体重 (18 $\pm$ 2)g, 健康, 购自北京大学医学部实验动物部。

### 2 方法

**2.1 携带 Egr-1 启动子的表达质粒 pEgr-IL18、pEgr-B7.1 及 pEgr-IL-18-B7.1 构建** 构建流程见图 1, pIRES-IL18-B7.1 重组质粒为本室构建。pIRES-IL18-B7.1 经 *Mlu*I 和 *Eco*RV 酶切, 去掉 CMV 片段, 回收大片段 pIRES-IL18-B7.1, pGL3-Egr1 载体经 *Xba*I 酶切后 T4 聚合酶补平, 再用 *Mlu*I 酶切, 回收 Egr1 片段, 用 T4 DNA 连接酶半定向插入到 pIRES-IL18-B7.1 的 *Mlu*I、*Eco*RV 位点, 得到重组质粒 pEgr-IL18-B7.1。pEgr-IL18 及 pEgr-B7.1 用相同方法重组获得, 图略。重组质粒 pEgr-IL-18-B7.1 分别用 *Bam*HI 和 *Apa*I 内切酶进行酶切鉴定, *Bam*HI 内切酶酶切后预计片段长度分别为 250、750 和 1 300 bp, *Apa*I 内切酶酶切后预计片段长度为 1 100 bp。

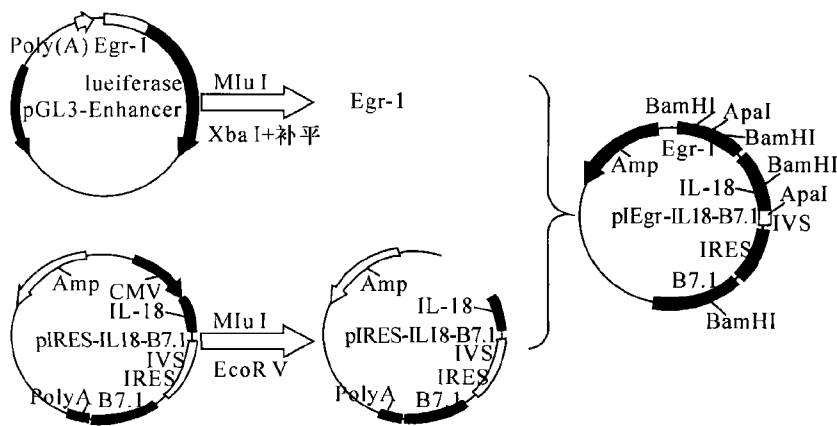


Fig 1 Construction of pEgr-IL18-B7.1 recombinant plasmid.

图 1 pEgr-IL-18-B7.1 重组质粒构建图

**2.2 照射条件** 采用 X 射线深部治疗机进行照射, 电压 200 kV, 电流 10 mA, 过滤板 0.5 mmCu 和 1.0 mmAl, 剂量为 0.5、2.0、5.0 Gy 时靶皮距 50 cm, 剂量率 0.287 Gy/min; 剂量为 0.1 Gy 时靶皮距 212 cm, 剂量率 12.5 mGy/min。

**2.3 细胞表面 B7-1 表达检测** 将处于指数生长期的 B16 细胞接种于 24 孔培养板中, 每孔接种  $2 \times 10^5$  细胞, 每组 4 个样品, 用 1 mL 含 2% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基培养, 待细胞 70% 融合后, 按 lipofec-

tamine (Invitrogen) 转染试剂盒说明, 分别将 2  $\mu$ g pEgr-IL18、pEgr-B7.1 及 pEgr-IL-18-B7.1 转入 B16 细胞中。胰酶消化贴壁细胞, PBS 洗 2 次, 每管加入 0.5  $\mu$ L PE-CD80, 4  $^{\circ}$ C 避光反应 45 min, PBS 洗 2 次, FACScan (BD) 收集  $1 \times 10^4$  个细胞, Cellquest 软件分析结果, 记录阳性细胞百分数, 减去非特异对照组。

**2.4 细胞上清中 IL-18 含量检测** B16 细胞接种于 6 孔培养板中, 每孔接种  $1 \times 10^6$  细胞, 2 mL 含 2% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基培养, 每组 4 个样品,

待细胞 70% 融合后利用 lipofectamine 分别将 5  $\mu$ g pEgr-IL18、pEgr-B7.1 及 pEgr-IL18-B7.1 转入 B16 细胞中。收集细胞上清,参照 Mouse IL-18 ELISA Set 说明书检测上清中 IL-18 表达。

**2.5 mRNA 提取及 RT-PCR** 胰酶消化贴壁细胞, PBS 洗 2 次,用 Trizol 试剂按试剂盒说明书提取总 RNA。参照 TaKaRa one-step RNA PCR kit 试剂盒说明书,以 2  $\mu$ g 总 RNA 为模板,以 GAPDH(引物竞争 PCR)为内参照进行逆转录合成,IL-18 循环参数为: 50  $^{\circ}$ C 30 min, 94  $^{\circ}$ C 2 min, (94  $^{\circ}$ C 30 s, 49  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min)25 个循环,72  $^{\circ}$ C 10 min; B7-1 循环参数为: 50  $^{\circ}$ C 30 min, 94  $^{\circ}$ C 2 min, (94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min)25 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像仪进行扫描,测定电泳带灰度,计算 IL-18/GAPDH、B7-1/GAPDH 比值。

**2.6 荷瘤模型建立及治疗** 于小鼠右后肢皮下接种 B16 肿瘤细胞  $5 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ L,待肿瘤体积达 3 mm  $\times$  10 mm  $\times$  10 mm 左右时将动物随机分组。治疗组肿瘤内注射 20  $\mu$ g 质粒 + 40  $\mu$ g 脂质体/50  $\mu$ L,对照组于瘤内注射等体积 0.9% 的生理盐水,注入质粒后 24 h 开始每隔 48 h 进行放疗,共 3 次。

**3 统计学处理**

计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 Student's *t* 检验。

**结 果**

**1 携带 pEgr-IL18-B7.1 重组质粒酶切鉴定结果** 结果见图 2。

酶切鉴定结果与预计酶切片段相符,证明所构建的重组质粒为正向连接的重组子。

**2 不同剂量 X 射线照射后 pEgr-IL18、pEgr-IL18-B7.1 转染的 B16 细胞上清中 IL-18 表达**

0.1、0.5、2.0、5.0 GyX 射线照射 pEgr-IL18、pEgr-IL18-B7.1 转染的 B16 细胞后 12 h,细胞上清中 mL-18 表达明显升高,分别达到 (174.99  $\pm$  15.26)、(227.39  $\pm$  23.41)、(278.10  $\pm$  23.59)、(276.85  $\pm$  16.01) ng/L 和 (387.57  $\pm$  35.01)、(338.96  $\pm$  10.04)、(438.63  $\pm$  15.12)、(480.51  $\pm$  23.64)ng/L,与未照射对照组比较具有显著差异 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

**3 不同剂量 X 射线照射后 pEgr-B7.1、pEgr-IL18-B7.1 转染的 B16 细胞表面 B7-1 表达**

0.1、0.5、2.0、5.0 GyX 射线照射 pEgr-B7-1、pEgr-IL18-B7.1 转染的 B16 细胞后 12 h,细胞表面 B7-1 表达明显升高,阳性细胞百分数分别达到 (18.22  $\pm$  2.44)%、(28.64  $\pm$  3.50)%、(41.91  $\pm$

3.83)%、(50.61  $\pm$  1.01)% 和 (33.15  $\pm$  1.79)%、(31.74  $\pm$  2.71)%、(52.63  $\pm$  2.20)%、(48.13  $\pm$  1.54)%,与未照射对照组比较具有显著差异 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

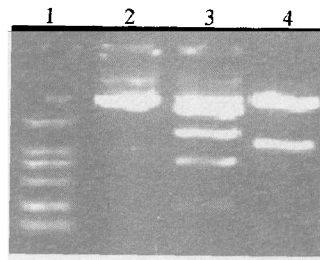


Fig 2 Identification of pEgr-IL18-B7.1 recombinant plasmid. 1: DL2000 marker (downward direction): 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp; 2: pEgr-IL-18-B7.1; 3: pEgr-IL18-B7.1 cut with BamHI; 4: pEgr-IL-18-B7.1 cut with ApaI.

图 2 pEgr-IL18-B7.1 重组质粒酶切鉴定图

**4 不同剂量 X 射线照射后 pEgr-IL18、pEgr-B7.1、pEgr-IL18-B7.1 转染的 B16 细胞中 IL-18、B7-1 mRNA 表达**

以 GAPDH 为内参照,采用 RT-PCR 方法分别对转染 pEgr-IL18、pEgr-B7.1、pEgr-IL18-B7.1 后经不同剂量 X 射线照射的 B16 细胞中的 IL-18 和 B7-1 进行半定量分析,获得电泳图如图 5、6 (B7.1 RT-PCR 产物电泳图略),经凝胶电泳扫描仪扫描分析结果见表 1。从表中可发现经基因转染的 B16 细胞在接受不同剂量 X 射线照射后 IL18 和 B7-1 在 mRNA 水平表达明显增高,与未照射对照组比较具有显著差异,趋势与蛋白水平变化基本一致。

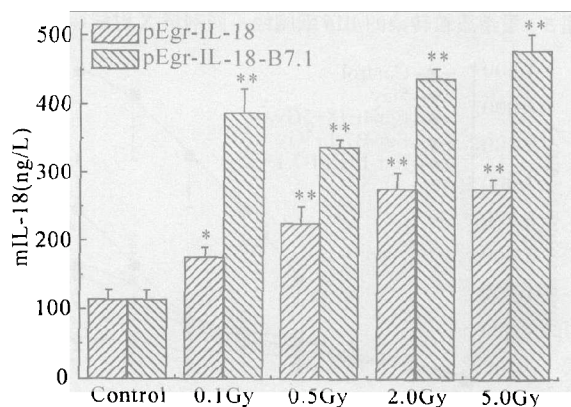


Fig 3 Expression of mL-18 in B16 cells transfected with pEgr-IL18 and pEgr-IL18-B7.1 at 12 h after X-irradiation.  $\bar{x} \pm s, n = 4, * P < 0.05, ** P < 0.01$  vs control.

图 3 pEgr-IL18 和 pEgr-IL18-B7.1 质粒转染的 B16 细胞经不同剂量 X 射线照射后 12 h 上清中 IL-18 蛋白表达改变

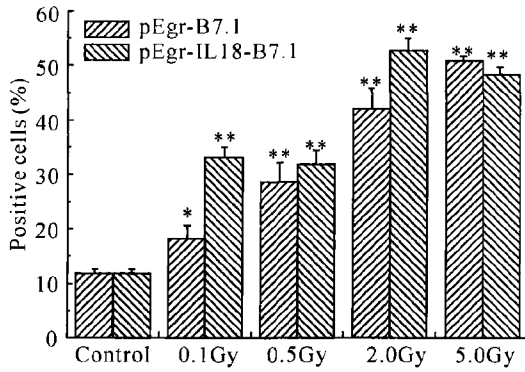


Fig 4 Expression of B7.1 in B16 cells transfected with pEgr-B7.1 and pEgr-IL18-B7.1 at 12 h after X-irradiation.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control.

图4 pEgr-IL18和pEgr-IL18-B7.1质粒转染的B16细胞经不同剂量X射线照射后12h细胞表面B7-1蛋白表达改变

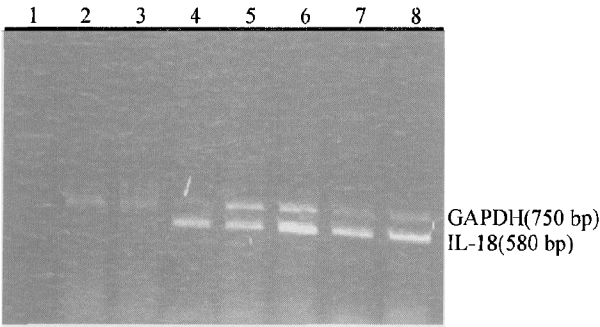
表1 重组质粒转染的B16细胞经不同剂量X射线照射后12h IL-18和B7-1 mRNA水平表达改变

Tab 1 Expression of mL-18 and B7.1 mRNA in B16 cells transfected with plasmid at 12 h after X-irradiation

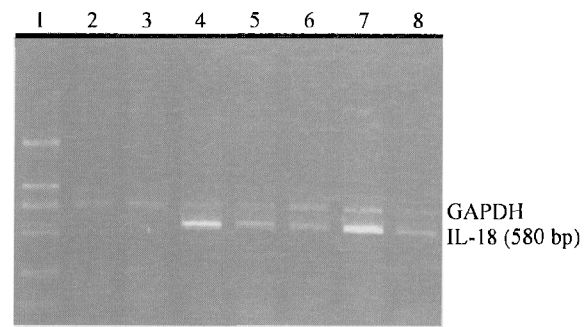
Group		0 Gy	0.1 Gy	0.5 Gy	2.0 Gy	5.0 Gy
IL18/GAPDH	pEgr-IL18	0	1.07	1.37	3.70	5.64
	pEgr-IL18-B7.1	0	2.36	1.46	3.73	6.23
B7.1/GAPDH	pEgr-B7.1	0	0.90	1.45	1.25	1.59
	pEgr-IL18-B7.1	0	1.16	1.35	1.11	1.95

### 5 对B16恶性黑色素瘤抑瘤效应的研究

从肿瘤生长曲线看出,治疗开始第6d(治疗结束第1d)开始单纯放疗组和基因联合放疗组的肿瘤生长明显比对照组缓慢,第14d(治疗后7d)对照组肿瘤体积达到(4 369.95 ± 444.33)mm<sup>3</sup>,而单纯放疗组和pEgr-IL18、pEgr-B7.1、pEgr-IL18-B7.1基因



1: DL2 000 marker (downward direction): 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp; 2: control; 3: pEgr-IL18+0Gy; 4: pCMV-IL18; 5: pEgr-IL18+0.1Gy; 6: pEgr-IL18+0.5Gy; 7: pEgr-IL18+2.0Gy; 8: pEgr-IL18+5.0Gy.



1: DL2 000 marker (downward direction): 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp; 2: control; 3: pEgr-IL18-B7.1+0Gy; 4: pCMV-IL18-B7.1; 5: pEgr-IL18-B7.1+0.1Gy; 6: pEgr-IL18-B7.1+0.5Gy; 7: pEgr-IL18-B7.1+2.0Gy; 8: pEgr-IL18-B7.1+5.0Gy.

Fig 5 Expression of IL-18 mRNA in B16 cells plasmid transfected at 12 h after X-irradiation.

图5 重组质粒转染的B16细胞经不同剂量X射线照射后12h IL-18 mRNA水平表达

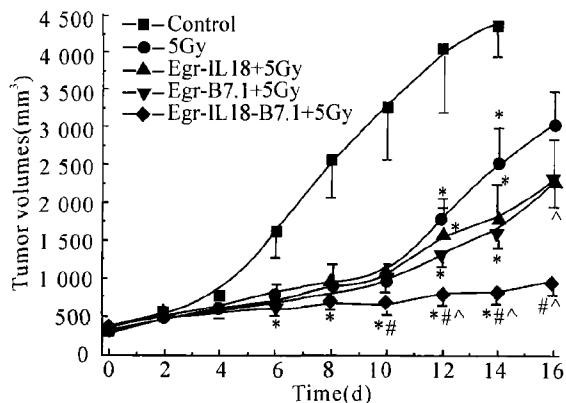


Fig 6 Effect of gene-radiotherapy with plasmids followed by X-irradiation on tumor growth of B16 melanoma implanted in C57BL/6J mice.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ . \*  $P < 0.05$  vs control; #  $P < 0.05$  vs 5 Gy; ^  $P < 0.05$  vs Egr-IL18 and Egr-B7.1.

图6 pEgr-IL18-B7.1重组质粒联合5 Gy X射线照射对恶性黑色素瘤的生长抑制作用

联合放疗组肿瘤体积分别只有(2 530.63 ± 460.39)、(1 780.60 ± 454.07)、(1 619.00 ± 220.12)、(813.08 ± 161.15)mm<sup>3</sup>,单基因联合放疗组的肿瘤生长速度明显低于单纯放疗组,体积分别只有单纯对照组的40.75%、37.52%,并且两组肿瘤生长速度基本相似,说明IL-18和B7-1都是效果很好的抗肿瘤细胞因子。双基因联合放疗组的疗效最好,与其它各组比较均具有显著差异( $P < 0.05$ ),体积只有单纯对照组的18.61%。说明IL-18和B7-1联合放疗是一种很有有效的抗肿瘤措施之一。

### 讨 论

放射治疗是目前临床主要的肿瘤治疗手段,但由于肿瘤临近部位正常组织的放射损伤和某些肿瘤的辐射抗性,放疗的疗效和应用受到一定限制。

因此,寻求减少局部辐射剂量、增强抑瘤效应的治疗措施,已成为目前放射肿瘤学研究面临的重要课题。辐射敏感启动子 Egr-1 (early growth response-1) 的发现为放疗和基因治疗的有效结合提供了新思路,奠定了恶性肿瘤基因放射治疗的理论基础。Weichselbaum 等<sup>[5]</sup>提出将 Egr-1 与 TNF $\alpha$  基因连接,引入肿瘤细胞,接受电离辐射作用后,由于 Egr-1 的反应而启动下游基因的表达,在较小剂量照射下实现抑瘤作用。这样,一方面可以相对降低等效照射剂量,缓解对正常组织的损伤;另一方面也可以通过局部照射来实现基因的定位表达。并且当肿瘤受照时,基因表达,一旦照射停止,基因表达随即终止或减弱,实现了基因表达的空间和时间的可调控性,避免了过度表达带来的副作用。

微小 RNA 病毒家族中的 ECMV 的 5' - 端非翻译区包含的顺式作用元件本身无启动子活性,但却能引导 mRNA 直接进入核糖体开始不依赖于帽子的翻译,这些顺式作用元件被称为 Internal ribosome entry site (IRES),从而可使多种基因在同一载体上获得良好表达。IRES 有一个十分明显的特点是位于该元件前后的两个不同基因的表达高度相关<sup>[6]</sup>。本实验利用 IRES 的这一特点,构建双基因共表达重组质粒,使 IL-18 和 B7-1 在其前后独立、有效表达。

体外表达实验结果表明,不同剂量 X 射线可诱导 Egr-1 启动,进而带动下游基因的有效表达,并且在 mRNA 水平和蛋白水平表达趋势基本一致。在 0.1 - 5.0 Gy 剂量范围内,电离辐射可明显诱导 Egr-1 启动子下游的 IL-18 和 B7-1 表达,值得注意的是中低剂量 X 射线照射也可以诱导下游 IL-18 和 B7-1 的有效表达,这对于今后在肿瘤基因放射治疗中选用较低剂量具有指导意义。抑瘤实验结果表明,基因放射治疗组肿瘤生长受到明显抑制,且其效果明显优于单纯照射组,并且多基因联合治疗效果优于单基因治疗,说明双基因联合辐射治疗肿瘤是一种有效的恶性肿瘤治疗手段,其抑瘤的免疫学机制另文发表。

本实验以多基因表达载体为基因导入系统,建

立 pEgr-IL18-B7.1 的基因-免疫-放射治疗的新模式,试图充分发挥三者各自的优势,达到治疗癌症的目的。一是利用电离辐射直接杀伤肿瘤细胞、抑制肿瘤血管形成<sup>[7]</sup>和诱导 Egr-1 基因转录的多重作用,二是利用 Egr-1 基因启动子中的 CArG 元件诱导连接于其下游的 IL-18 和 B7-1 基因的表达<sup>[5]</sup>,三是通过免疫因子的局部和全身免疫调节作用增强抗癌免疫功能,并利用共刺激分子的协同作用,促进 T 细胞活化。这样既可降低辐射剂量,减轻或避免正常组织损伤,又可诱导 B7.1 和 IL-18 的表达,发挥其调动抗癌免疫功能和抗血管形成的作用,达到抑制肿瘤生长和转移的目的,将为肿瘤治疗开辟新途径。

#### [参 考 文 献]

- [1] Cho D, Kim TG, Lee W, et al. Interleukin-18 and the costimulatory molecule B7-1 have a synergistic anti-tumor effect on murine melanoma; implication of combined immunotherapy for poorly immunogenic malignancy[J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(5): 928-934.
- [2] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells[J]. Nature, 1995, 378(6552): 88-91.
- [3] Cao R, Famebo J, Kurimoto M, et al. Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor[J]. FASEB J, 1999, 13(15): 2195-2202.
- [4] Yoshizawa H, Kagamu H, Gejyo F. Cancer immunogene therapy[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2001, 49(5): 337-343.
- [5] Weichselbaum RR, Kufe DW, Hellman S, et al. Radiation-induced tumour necrosis factor-alpha expression: clinical application of transcriptional and physical targeting of gene therapy[J]. Lancet Oncol, 2002, 3(11): 665-671.
- [6] Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, et al. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies[J]. Biomed Eng, 2001, 17(6): 157-165.
- [7] Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis [J]. Science, 2003, 300(5622): 1155-1159.