文章编号:1000-5404(2010)08-0819-04

论著

白介素-21基因转导人宫颈癌细胞产生T细胞和NK细胞依赖的抗肿瘤作用

刘晓云[1,2],熊正爱[1],李好山[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院妇产科[1];563002 贵州 遵义,遵义医学院第三附属医院妇产科[2])

[摘要] **目的** 探讨白介素-21(interleukin-21,IL-21)基因抗肿瘤作用的机制。**方法** 采用包含有人IL-21的质粒电转染至宫颈癌细胞(HeLa细胞),移植到用人外周淋巴细胞免疫重建和非免疫重建的重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠体内,并用抗唾液酸神经节苷酯(anti-asialo GM_1)删除小鼠的NK细胞,以及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)法检测荷瘤鼠的脾细胞毒性和酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)双夹心法测定对靶细胞产生的IFN-γ。**结果** 含有IL-21基因的宫颈癌细胞(HeLa-IL-21细胞)在免疫重建和非免疫重建小鼠中的生长完全被抑制,HeLa细胞在免疫重建鼠中的生长较非免疫重建小鼠滞后,肿瘤体积也明显小。删除NK细胞后暂时消除了HeLa-IL-21细胞对肿瘤的生长抑制,同时非免疫重建组消除肿瘤生长抑制较免疫重建组明显;免疫重建组荷HeLa-IL-21细胞小鼠脾细胞毒性为(16.55±4.53),高于非免疫重建组荷HeLa-IL-21细胞(8.32±2.12)($P<0.05$)和荷HeLa细胞(3.42±1.56)($P<0.01$),对靶细胞产生IFN-γ的量也大于免疫重建组荷HeLa细胞(5.12±2.34)($P<0.05$)。**结论** 在NK细胞缺乏的情况下,表达IL-21的HeLa细胞能产生T淋巴细胞依赖和不依赖的抗肿瘤作用。

[关键词] IL-21;宫颈癌细胞;NK细胞;T淋巴细胞
[中图法分类号] R392.11;R73-362;R737.33 **[文献标志码]** A

Tumorigenesis of IL-21-transfected HeLa cells in SCID or hu-PBL-SCID mice

Liu Xiaoyun[1,2], Xiong Zheng'ai[1], Li Haoshan[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Third Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563002, China)

[Abstract] **Objective** To explore the antitumor effect of interleukin 21 (IL-21) after transfected into in HeLa cells in severe combined immunodeficiency (SCID) mice or human peripheral blood lymphocytes-SCID (hu-PBL-SCID) mice. **Methods** pcDNA4/HisMax-IL-21 was transfected into human cervical cancer cell line HeLa to produce HeLa-IL-21 cells. Totally 48 SCID mice were randomly and equally divided into SCID group (0.2 ml PBS, i.p.) and hu-PBL-SCID group (0.2 ml 2×10^7/ml hu-PBL, i.p.). Then every group was further divided into 3 subgroups ($n=6$) to receive a subcutemeous implantation of HeLa, HeLa-vector or HeLa-IL-21 cells, and the rest 6 mice were intraperitoneally injected with anti-asialo GM_1 50 mg/animal 1 d before and 4 d after HeLa-IL-21 cells transplantation for NK cell depletion. The growth of the tumor mass was observed. Flow cytometry was used to detect CD8- and DX5-positive cells in hu-PBL from hu-PBL-SCID mice, and spleen NK cells from SCID mice or hu-PBL-SCID mice. The secretion of IFN-γ and cytotoxicity of splenic cells from HeLa/HeLa-IL-21-bearing SCID mice or hu-PBL-SCID mice were detected with double sandwich ELISA assay and LDH assay respectively. **Results** Growth of HeLa-IL-21 tumors was significantly suppressed compared with that of HeLa cells, with a slow development and smaller volume. But this growth suppression was not observed in NK cell depletion groups, with SCID group more severe than hu-PBL-SCID group. hu-PBL-SCID mice bearing HeLa-IL-21 cells (16.55±4.53) had a higher toxicity in spleen cells than those SCID mice bearing HeLa-IL-21 cells (8.32±2.12) or HeLa cells (3.42±1.56) ($P<0.01$), and had larger production of IFN-γ than ofhu-PBL-SCID mice bearing splenocytes from hu-PBL-SCID bearing HeLa cells (5.12±2.34) ($P<0.05$). **Conclusion** Expression of IL-21 in HeLa cells can produce T cell dependent and -independent antitumor effects in an NK cell-defective condition.

[Key words] interleukin-21; cevrical carcinoma; HeLa cells; NK cells; T cells

Corresponding author: Xiong Zheng'ai, Tel: 86-23-63693503, E-mail: xiongzhengai61@21cn.com

[通信作者] 熊正爱,电话:(023)63693503,E-mail:xiongzhengai61@21cn.com

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,在世界范围每年有50万妇女发病[1],患者免疫系统有Th1向Th2转化的现象[2],增强宿主的免疫功能是一种有效的抑制肿瘤的生长和转移的一种方法。由Th1细胞释放的细胞因子,能够使免疫系统由Th2向Th1逆转,发挥机体防御肿瘤作用[3]。细胞因子白介素-21(interleukin-21,IL-21)的生物功能特性是与Th1的功能密切相关的。它主要是由$CD4^+$T细胞分泌,可以诱导被激活的T和NK细胞的增殖,并提高了细胞毒性T细胞和NK细胞的溶解的功能[4]。为了探索IL-21是否有对人宫颈癌产生抗肿瘤效应,我们使用免疫缺陷鼠动物模型,通过人的淋巴细胞重建其免疫功能,来研究IL-21细胞因子的抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株和实验动物

HeLa细胞株来源于重庆医科大学超生研究所,培养于10%的新生牛血清(四季青公司)RPMI1640(HyClone公司)培养基中;重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency,SCID)小鼠共48只4~6周龄,雌性,体质量(16±2.5)g,购于北京中国医学科学院实验动物中心,无免疫渗漏(IgG<5 mg/ml),于SPF条件下饲养,温度保持在(25±2)℃,相对湿度40%~70%,光照时间为明:暗=12 h:12 h,换气量8~10次体积/h。笼具、饲料、水、垫料均高压消毒,每3天在无菌条件下更换1次,每天对饲养盒外环境消毒。

1.2 构建人源性IL-21质粒

抽取女性健康供血者(已取得知情同意)的无菌肝素抗凝血3 ml按密度梯度离心法分离人外周血淋巴细胞(human peripheral blood lymphocyte, huPBL),然后各加入1 μg/μl CD3/CD28抗体(Santa Cruz公司)共刺激,培养24 h收获细胞。按照Trizol使用说明书提取总RNA。Trizol(Invitrogen公司)RT-PCR合成cDNA。IL-21上游引物5′-CCCAAGCTT ATGAGATC-CAGTCCTGGCAAC-3′,下游引物5′-CCGCTCGAG GGAATCT-TCACTTCCGTG-3′,扩增条件为:94 ℃3 min→94 ℃ 30 s→55 ℃ 30 s 30个循环→72 ℃ 30 s→72 ℃ 15 s。扩增产物长度为489 bp,测序正确,连接到pcDNA4/HisMaxA载体(Invitrogen公司)。该载体有Zeocin抗性,IL-21启动子为CMV,可以在哺乳动物细胞内高表达。

1.3 pcDNA4/HisMax-IL-21对细胞的转染

用电参数为1 000 V/cm, 100 μs的脉宽,2个脉冲,加入质粒15 μl(1 μg/μl)电转染后培养24 h,然后用300 μg/ml Zeocin(InvovGen公司)的含10%新生牛血清的RPMI1640进行选择培养,约4周后细胞克隆形成。分别得到HeLa-vector(空载体)、HeLa-IL-21(转染真核表达质粒pcDNA4/HisMax-IL-21)细胞。

1.4 Western blot检测细胞转染前后IL-21蛋白的表达

HeLa-IL-21细胞经裂解,提取蛋白,蛋白混合物经SDS-PAGE电泳后,予以抗体(R&D公司)检测IL-21蛋白的表达(Western blot检测试剂盒为Shine Gene产品),并作半定量测定。

1.5 huPBL重建SCID鼠的免疫功能

分离出的女性健康供血者的huPBL,并用PBS洗2次,配成2×10^7/ml。将SCID鼠按完全随机法分为2组:免疫重建组(A组)和非免疫重建组(B组),A组腹腔内注射0.2 ml huPBL($n=24$);B组注射PBS 0.2 ml($n=24$)。

1.6 SCID鼠肿瘤细胞的皮下移植

用皮下注射细胞悬液成瘤法,将2组小鼠分别在小鼠右下肢内侧相当于腹股沟处接种HeLa、HeLa-vector、HeLa-IL-21细胞(1×10^7)(各6只),2组另外6只在注射HeLa-IL-21细胞前1 d和注射后4 d,分别向小鼠腹腔内注射抗唾液酸神经节苷酯(anti-asialo GM_1)抗体50 mg/只(Abcam公司)以删除SCID鼠内的NK细胞。每4天观察肿瘤生长情况,肿瘤体积根据公式(长×宽^2/2)计算并绘制生长曲线。

1.7 流式细胞计数小鼠脾细胞CD8和DX5水平

2组小鼠脾细胞分别用大鼠抗人FITC CD8单抗(Serotec公司)标记(与人和鼠的抗原不发生反应)、兔抗鼠CD49b/Pan-NK细胞FITC-DX5多克隆抗体小鼠(eBioscience公司)标记(与人和鼠的抗原不发生反应),比较免疫重建组小鼠脾细胞内人源性T淋巴细胞,荷HeLa、HeLa-vector与HeLa-IL-21细胞小鼠的脾NK细胞。抗体标记的细胞经FACScan检测,采用CellQuest分析。

1.8 酶联免疫吸附法测IFN-γ水平

将放射线^{60}Co 5 Gy照射的HeLa、Caski细胞(1×10^6/ml)与从免疫重建组和非免疫重建组的荷瘤鼠脾细胞(2×10^7/ml)(即效靶比为20:1),在10%胎牛血清RPMI1640培养基内培养24 h,收集上清液用ELISA双夹心法测定γ干扰素(IFN-γ)的浓度(北京四正柏生物科技有限公司)。

1.9 乳酸脱氢酶释放法测量小鼠脾细胞毒性

将免疫重建组和非免疫重建组中的荷HeLa和HeLa-IL-21细胞小鼠脾细胞(2×10^6/ml)100 μl作为效应细胞,加对数增长期的HeLa细胞(1×10^5/ml)100 μl作为靶细胞(实验组);对照组加入靶细胞和培养液各100 μl;实验组和对照组均设3个复孔,效靶比均为20:1,培养在96孔板内、5% CO_2培养箱中共培养4 h,收集上清液,用全自动生化仪检测乳酸脱氢酶含量(Promega公司)。脾细胞的杀伤活性=(实验组-效应细胞自然释放值-靶细胞自然释放值)/(靶细胞最大释放值-靶细胞自然释放值)×100%。实验重复3次,结果以平均值表示。

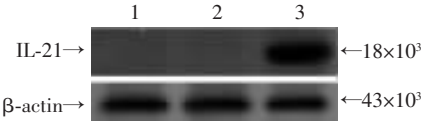
1.10 统计学分析

结果以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,行单因素方差分析,有差异进一步作LSD-t检验(方差齐)或Games-Howell检验(方差不齐)进行组间差异比较。

2 结果

2.1 pcDNA4/HisMax-IL-21 转导细胞构建 HeLa-IL-21

脉冲电场将载有 IL-21 质粒转导细胞内，用 Zeocin 抗性筛选出表达有 HeLa-IL-21 的细胞克隆，经 Western blot 检测有相对分子质量为 18×10^3 的人 IL-21 蛋白分子的表达，而 HeLa-vector 和 HeLa 细胞未检测到（图 1）。

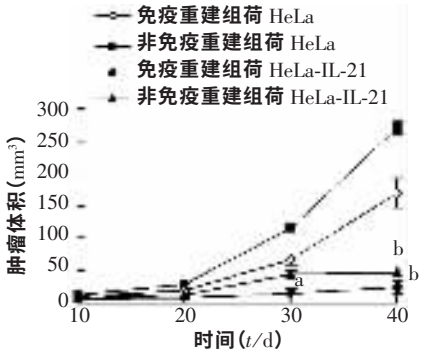


1：HeLa；2：HeLa-vector；3：HeLa-IL-21

图 1 Western blot 检测 HeLa-IL-21、HeLa-vector 和 HeLa IL-21 蛋白的的表达

2.2 IL-21 在 SCID 鼠实验中的抗肿瘤作用

免疫重建组和非免疫重建组中 HeLa 和 HeLa-vector 全部成瘤，且肿瘤生长无统计学差异（$P>0.05$）；非免疫重建组荷 HeLa 肿瘤生长在移植后第 6 天就出现小的肿瘤结节，而免疫重建组荷 HeLa 肿瘤生长出现在第 10 天；在第 30、40 天，非免疫重建组荷 HeLa 肿瘤体积与免疫重建组荷 HeLa 比较有统计学差异（$P<0.05$），同组中荷 HeLa 和 HeLa-vector 肿瘤体积比较无统计学差异（$P>0.05$）。HeLa-IL-21 细胞在 2 组小鼠中 40 d 均未见肿瘤结节生长，非免疫重建组荷 HeLa-IL-21 的 1 只在 46 d 出现了小的肿瘤结节。免疫重建组和非免疫重建组荷 HeLa-IL-21 SCID 鼠注射 anti-asialo GM_1 后，均出现肿瘤的生长，但 30 d 时免疫重建组荷 HeLa-IL-21 与非免疫重建组肿瘤体积相比仍然呈现肿瘤生长抑制（$P<0.05$）。见图 2。NK 细胞删除这 2 组荷 HeLa-IL-21，在 40 d 时，与荷 HeLa 细胞鼠的肿瘤体积相比仍有明显的肿瘤生长抑制（$P<0.01$）。



a：$P<0.05$，与非免疫重建组荷 HeLa-IL-21 比较；b：$P<0.01$，分别与免疫重建组和非免疫重建组荷 HeLa 比较

图 2 免疫重建组和非免疫重建组荷 HeLa 及荷 HeLa-IL-21 鼠注射 anti-asialo GM_1 删除 NK 细胞后肿瘤的生长曲线

2.3 2 组荷瘤鼠脾细胞流式细胞计数

流式细胞仪检测结果显示，免疫重建鼠脾细胞 0.1% 人源 CD8 相对于非免疫重建鼠高出 10 倍；DX5 在免疫重建鼠也明显高于非免疫重建鼠（$P<0.05$）。

2.4 荷瘤鼠脾细胞对不同靶细胞产生的 IFN-γ

结果显示，用人淋巴细胞重建免疫功能的小鼠脾细胞对靶细胞产生了较高的 IFN-γ（$P<0.01$）；HeLa-IL-21 组间比较有统计学差异（$P<0.05$）；HeLa-vector 组间无统计学差异（$P>0.05$）；各组对靶细胞 HeLa 产生的 IFN-γ 量要高于对靶细胞 Caski 所产生的 IFN-γ 量（$P<0.05$）；免疫重建组荷 HeLa-IL-21 对靶细胞 HeLa 产生的 IFN-γ 量明显高于其余各组（$P<0.05$），而 SCID 鼠针对 2 种宫颈癌细胞以及无细胞（None）产生的 IFN-γ 量均 <30 pg/ml。见表 1。

表 1 荷瘤鼠脾细胞对不同靶细胞产生的 IFN-γ（pg/ml，$\bar{x}\pm s$）

脾细胞来源鼠	HeLa	Caski	None
免疫重建组荷 HeLa	408.92 ± 157.49^{bc}	359.13 ± 138.32	55.47 ± 12.83
非免疫重建组荷 HeLa	329.48 ± 126.90^{abc}	191.2 ± 93.60^{a}	30.46 ± 16.55^{a}
免疫重建组荷 HeLa-vector	472.32 ± 74.71^{bc}	353.56 ± 136.56	42.39 ± 17.45
非免疫重建组荷 HeLa-vector	399.88 ± 148.90^{b}	183.97 ± 90.56	34.68 ± 18.85
免疫重建组荷 HeLa-IL-21	529.81 ± 81.81^{b}	398.28 ± 150.38	56.92 ± 14.93
非免疫重建组荷 HeLa-IL-21	389.89 ± 150.17^{bc}	326.69 ± 125.81^{c}	35.89 ± 10.79^{c}

HeLa、Caski 为辐照的靶细胞 a：$P<0.01$，与免疫重建组荷 HeLa 比较；b：$P<0.05$，与 Caski 比较；c：$P<0.05$，与免疫重建组荷 HeLa-IL-21 比较

2.5 脾细胞对 HeLa 细胞的毒性作用

采用乳酸脱氢酶释放法检测免疫重建组、非免疫重建组的荷 HeLa、HeLa-IL-21 细胞及非荷瘤 SCID 鼠的脾细胞对 HeLa 细胞的细胞毒性。来源于免疫重建组荷 HeLa-IL-21 细胞 SCID 鼠脾细胞针对 HeLa 细胞毒性（16.55 ± 4.53）明显高于非免疫重建组荷 HeLa-IL-21（8.32 ± 2.12）（$P<0.05$）、荷 HeLa（3.42 ± 1.56）和免疫重建组荷 HeLa（5.12 ± 2.34）SCID 鼠脾细胞毒性（$P<0.01$）；非免疫重建组荷 HeLa-IL-21 与免疫重建组及非免疫重建组荷 HeLa 细胞 SCID 鼠脾细胞毒性比较也有统计学差异（$P<0.05$）。

3 讨论

SCID 小鼠细胞和体液免疫功能缺陷，但巨噬细胞和 NK 细胞功能未受影响。它既可携带人类肿瘤，又可用人类淋巴细胞进行免疫功能重建[5-7]，是较为理想的免疫治疗临床前实验的动物模型。

IL-21 抗肿瘤作用可能和抑制肿瘤的血管生成有关，曾有报道 IL-21 在体外能够阻止血管胚芽的形成[8]。在本研究中，2 组中 HeLa 和 HeLa-vector 全部成瘤，且 2 组中肿瘤生长无统计学差异（$P>0.05$），说明在没有 IL-21 的情况下含有空质粒的 HeLa 对肿瘤没有抑制作用。免疫重建组和非免疫重建组出现肿瘤的时间不同且体积比较有统计学差异，我们认为是由于在免疫重建组的小鼠体内有 T 淋巴细胞的存在对

肿瘤的生长有一定的缓慢作用。在免疫重建与非免疫重建SCID鼠中移植HeLa-IL-21细胞,移植小鼠肿瘤的生长完全被抑制,而且在NK细胞删除2组HeLa-IL-21,在40 d时与免疫重建组和非免疫重建组的荷HeLa细胞肿瘤鼠的肿瘤生长体积相比出现明显的肿瘤生长抑制。我们认为IL-21在活体内可以激活NK或/和T淋巴细胞产生抗肿瘤作用,这对于指导肿瘤的治疗具有重要的意义。GM_1删除NK后,发现免疫重建组与非免疫重建组的肿瘤体积暂时出现差异,但是在30~40 d肿瘤体积大小逐渐趋于一致,这是因为IL-21在20~30 d后由于NK细胞的逐渐恢复而使肿瘤抑制重新出现[9]。虽然在免疫缺陷荷瘤鼠中,抗肿瘤免疫主要是NK细胞介导的天然免疫,然而淋巴细胞重建其免疫系统后,肿瘤生长受到明显抑制,说明了T淋巴细胞在SCID小鼠中抗肿瘤生长也是很重要的。

IL-21在体外能够通过激活NK和T细胞产生INF-γ并提高细胞毒性作用[10,11],但活体研究不是很深入。本研究采用人外周血淋巴细胞成功重建了SCID小鼠的免疫功能,通过FCM证实在鼠脾脏有人的CD8 T淋巴细胞和DX5 NK细胞,对于具有一定的人源性T淋巴细胞和/或自身带有NK细胞的小鼠显示出对HeLa细胞肿瘤的生长抑制;移植HeLa细胞至免疫重建小鼠组,肿瘤生长较非免疫重建组滞后,肿瘤体积也较之小;所以我们认为T淋巴细胞介导的抗宫颈癌生长在荷瘤鼠中起一定的作用。

为了解IL-21在小鼠抗肿瘤作用与NK细胞的关系,我们免疫重建荷HeLa、HeLa-IL-21肿瘤细胞鼠的脾细胞对HeLa和Caski细胞产生的IFN-γ量大于非免疫重建组,对HeLa细胞产生的IFN-γ的量也大于对Caski细胞,细胞毒性同样是免疫重建组大于非免疫重建组,荷HeLa-IL-21大于荷HeLa,这表明IL-21在SCID小鼠发挥的抗肿瘤作用是涉入了NK细胞和T淋巴细胞的参与,同时效应细胞具有对HeLa细胞毒性的特异性,这可能还和HeLa和Caski的免疫源性不同有关。有研究[12]表明,HeLa细胞表面主要组织相容性抗原复合物(MHC-Ⅰ)和CD54的表达较Caski细胞高。

宫颈癌90%的发病与HPV感染有关[13],针对HPV病毒癌蛋白疫苗的开发已经进入临床前实验,疫苗的安全性也限制它的广泛应用,其目的都是促发机体的CTL反应,从而对肿瘤细胞起杀伤作用。低表达MHC-Ⅰ类分子或缺乏共刺激分子进而逃逸宿主的免疫监视是肿瘤细胞的重要特征[12],因此,提高肿瘤细胞的免疫原性,恢复机体对肿瘤细胞的免疫监视功能是抗肿瘤治疗的重要策略[14],如能通过基因改造形成肿瘤疫苗,增强机体的抗肿瘤免疫将值得期待。综上所述,人宫颈癌细胞表达的IL-21能够诱导T细胞依赖和不依赖性的抗肿瘤免疫,可能成为对宫颈癌产生免疫耐受患者的一种治疗策略。

参考文献:

[1] Waggoner S E. Cervical cancer[J]. Lancet, 2003, 361(9376): 2217-2225.

[2] 武燕. 宫颈癌患者Th1/Th2细胞因子表达水平的研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2006, 18(5):310-312, 316.

[3] 姚金晶, 陈宜涛. Th1/Th2平衡调节与疾病发生的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(13): 2597-2600.

[4] Parrish-Novak J, Dillon S R, Nelson A, *et al*. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function[J]. Nature, 2000, 408(6808): 57-63.

[5] Beaman M H, Remington J S, Meyer D J. Human peripheral blood lymphocyte severe combined immunodeficiency (hu-PBL SCID) models of toxoplasmosis[J]. Immunol Cell Biol, 2000, 78(6): 608-615.

[6] Russell P J, Voeks D J. Animal models of prostate cancer[J]. Methods Mol Med, 2003, 81: 89-112.

[7] Jackson D J, Elson C J, Kumpel B M. Reduction of human anti-tetanus toxoid antibody in hu-PBL-SCID mice by immunodominant peptides of tetanus toxoid[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 137(2): 245-252.

[8] Castermans K, Tabruyn S P, Zeng R, *et al*. Angiostatic activity of the antitumor cytokine interleukin-21[J]. Blood, 2008, 112(13): 4940-4947.

[9] 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.

[10] Davis I D, Skak K, Smyth M J, *et al*. Interleukin-21 signaling: functions in cancer and autoimmunity[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(23): 6926-6932.

[11] Kasaian M T, Whitters M J, Carter L L, *et al*. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity[J]. Immunity, 2002, 16(4): 559-569.

[12] Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape[J]. J Cell Physiol, 2003, 195(3): 346-355.

[13] 成海恩, 张溢, 张翠莉, 等. 沉默HPV16 E6基因对人宫颈癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 486-489.

[14] 李勇, 孙燕, 张湘茹. 肿瘤的抗血管生成治疗研究进展[J]. 癌症进展, 2008, 6(1): 65-76.

(**收稿**:2009-11-10;**修回**:2010-02-01)

(编辑 王小宴)