论著

文章编号:1000-5404(2010)15-1632-03

转基因马铃薯中人白介素-12的生物学活性

陈佳瑜,刘喜平,葛正龙 (563003 贵州 遵义,遵义医学院生物化学教研室)

【摘要】 目的 检测转基因马铃薯体系中表达的人白介素-12(human interleukin 12,hIL-12)的肿瘤杀伤活性。方法 通过ELISA法检测转基因马铃薯中hIL-12刺激外周血单个核细胞(PBMC)产生IFN-γ的量以反映生物学活性,并观察hIL-12单克隆抗体对此生物活性的阻断效应;MTT法检测经转基因马铃薯中hIL-12作用的PBMC对NK敏感肿瘤细胞K562的杀伤作用,肿瘤细胞凋亡以Annexin V/PI双染后激光共聚焦显微镜观察。结果 转基因马铃薯叶和块茎中表达的hIL-12与重组人白介素-12(rhIL-12)标准品在25~400 pg/ml间均能诱生IFN-γ,其中转基因马铃薯叶和块茎中hIL-12刺激PBMC产生IFN-γ的量分别为(163.34±22.17)~(12 107.10±3 996.51)pg/ml和(224.20±25.76)~(11 196.30±4 067.48)pg/ml,与野生对照组均有统计学差异($P<0.01$),而hIL-12单克隆抗体能完全阻断此诱生IFN-γ效应。同时200 pg/ml转基因马铃薯叶、块茎中提取的hIL-12对人红白血病细胞K562的杀伤率分别为(28.4±8.7)%、(32.3±6.9)%,而与野生对照组(10.3±4.9)%的杀伤率相比,有统计学差异($P<0.05$)。激光共聚焦显微镜观察到经转基因马铃薯表达hIL-12作用的K562细胞出现早、中、晚各期的凋亡特征。结论 转基因马铃薯表达的hIL-12具有诱导PBMC产生IFN-γ及杀伤肿瘤细胞K562的生物学活性。

【关键词】 人白介素-12;生物活性;马铃薯;转基因植物
【中图法分类号】 Q94;R394.11 【文献标志码】 A

Bioactivity of human interleukin-12 from transgenic potatoes

Chen Jiayu, Liu Xiping, Ge Zhenglong (Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563003, China)

【Abstract】 Objective To detect the bioactivity of human interleukin-12 (hIL-12) extracted from transgenic potatoes. Methods ELISA was used to assess hIL-12-induced IFN-γ secretion in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and observe the blocking effect of monoclonal antibody to hIL-12 on the bioactivity of hIL-12. Lethal effect of hIL-12-activated PBMC on NK sensitive K562 cell line was detected by MTT assay. Apoptosis of tumor cells was observed under laser confocal microscope with double Annexin V/PI staining. Results The expression of hIL-12 and recombinant hIL-12 (rhIL-12) extracted from transgenic potato leaves or tubers at the concentration of 25 pg/ml to 400 pg/ml induced IFN-γ secretion in PBMC. The mount of secreted IFN-γ was (163.34±22.17) pg/ml to (12 107.10±3 996.51) pg/ml after treated with hIL-12 from potato leaves and was (224.20±25.76) pg/ml to (11 196.30±4 067.48) pg/ml after treated with potato tubers, which was significantly higher than that of commercially available hIL-12 ($P<0.01$). The secreted IFN-γ was almost fully blocked by monoclonal hIL-12 antibody. The apoptotic rate of K562 cells treated with 200 pg/ml hIL-12 extracted from transgenic potato leaves or tubers was (28.4±8.7)% and (32.3±6.9)%, respectively, which was much higher than that of commercially available hIL-12 ($P<0.05$). Laser confocal microscopy showed the characteristic apoptosis of K562 cells at early, middle and late phases after treated with the extracted hIL-12. Conclusion hIL-12 extracted from transgenic potato induces PBMC producing IFN-γ and excert antitumor effect on K562 leukemia cells.

【Key words】 human interleukin 12; bioactivity; potato; transgenic plant

Supported by the Key Tackling Programs from Guizhou Science & Technology Committee (2004NGZ002) and the Key Program of Guizhou Committee of Education (2004118). Corresponding ahthor: Ge Zhenglong, Tel: 86-852-8608572, E-mail: zlongge@hotmail.com

IL-12是1989年首次由佛波醇酯(phorbol dibutyrate, PDBU)刺激的经EB病毒转化的人B淋巴细胞母细胞株(RPMI8866)培养上清液中纯化得到的一种新的细胞因子,称为自然杀伤细胞刺激因子(natural killer cell stimulation factor, NKSF)或细胞毒性淋巴成熟因子(cyotoxiclymphocytc maturation factor, CLMF)。1991年Gubler等证实两者为同一种新的细胞因子,并统一命

【基金项目】 贵州省科委重大攻关项目(2004NGZ002);贵州省教育厅重点项目(2004118)
【通信作者】 葛正龙,电话:(0852)8608572,E-mail:zlongge@hotmail.com

名为白介素-12(interleukin 12,IL-12)。它具有增强 NK 细胞和活化 T 细胞的细胞毒活性、诱生干扰素(IFN-γ),调节 Th1 细胞的发育等免疫学活性,已被临床应用于抗肿瘤、抗病毒、抗感染[1]。目前运用基因工程生产 IL-12 是开发 IL-12 的主要途径[2,3]。因此本实验室以植物基因工程技术建立转基因马铃薯表达体系生产人白介素-12(human interleukin 12,hIL-12)[4],主要对此转基因马铃薯表达体系中 hIL-12 生物活性作进一步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

本室构建并传代培养的第 10 代 hIL-12 转基因马铃薯试管苗,遵义市农科所提供的中薯 1 号野生对照马铃薯试管苗,人红白血病细胞株 K562 购自中国典型培养物保藏中心。

1.2 主要试剂

重组人白介素-12(rhIL-12)标准品购自 PEPROTECH EC 公司,鼠抗人 IL-12(p70)单克隆抗体、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 R&D 公司,RPMI1640 培养基购自 HyClone 公司,胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司,二甲基亚砜(DMSO)为美国 Amresco 公司产品,人 IFN-γ ELISA 试剂盒、Annexin V-FITC 凋亡试剂盒由深圳晶美进口分装,其余常规生化试剂均为进口化学分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 马铃薯可溶性总蛋白的提取 分别取等量的第 10 代转基因马铃薯株和野生对照株的叶和块茎,加入液氮研碎后,以 10 ml 预冷的蛋白提取缓冲液制成匀浆,在 4 ℃ 13 000 r/min 离心 10 min,上清用 PBS 透析彻底后,冻干成蛋白干粉,加入 1 ml 无菌双蒸水溶解,定量除菌后备用。

1.3.2 人外周血单个核细胞(PBMC)的分离与培养 无菌操作下取 6 名健康献血员的新鲜肝素抗凝血各 100 ml,采用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC,调整细胞浓度为 2×10^5/ml,接种于 96 孔细胞培养板,每孔加入 0.2 ml 细胞悬液,分别分组培养。

1.3.3 hIL-12 对 PBMC 诱生 IFN-γ 的作用 每份细胞悬液分为 4 组:转基因马铃薯叶组、块茎组、rhIL-12 标准品组和野生马铃薯对照组。转基因马铃薯叶组、块茎组加不同浓度(25、50、100、200、400 pg/ml)的蛋白提取液,rhIL-12 标准品组中加不同浓度(25、50、100、200、400 pg/ml)rhIL-12 标准品,野生马铃薯对照组加入 400 pg/ml 的蛋白提取液。孵育 48 h,ELISA 法检测细胞培养上清液中 IFN-γ 的产生情况。

1.3.4 hIL-12 单克隆抗体对 hIL-12 诱生 IFN-γ 作用的影响 按上述浓度梯度加入转基因马铃薯叶、块茎蛋白和 rhIL-12 标准品时,加入 hIL-12 单克隆抗体,使 anti-hIL-12 抗体与hIL-12 的比例为 5∶1,孵育 48 h,取细胞培养上清液用 ELISA 法检测 IFN-γ,观察 hIL-12 单抗对 hIL-12 刺激 PBMC 产生 IFN-γ 作用的影响。

1.3.5 hIL-12 对肿瘤细胞 K562 的杀伤作用

1.3.5.1 K562 细胞的培养 人红白血病细胞 K562 是对 NK 细胞毒作用敏感的靶细胞。将 K562 细胞在含 10% FBS RPMI1640 培养液中传代培养,取对数生长期细胞作为靶细胞用于实验。

1.3.5.2 外周血效应细胞的制备 用含 10% FBS RPMI1640 培养液调整 PBMC 浓度为 1×10^6/ml,分为 4 组:实验组分别加入含 hIL-12 200 pg/ml 转基因马铃薯叶、块茎蛋白,标准品组加入 200 pg/ml rhIL-12 标准品,野生对照组加入 200 pg/ml 野生马铃薯蛋白,另设空白对照组,培养 3 d,作为效应细胞用于实验。

1.3.5.3 MTT 法[5]测杀伤活性 调整上述 K562 细胞、PBMC 悬液浓度,按效/靶细胞 50∶1 的比例,共同培养 44 h,MTT 法测 hIL-12 对 K562 杀伤活性。

1.3.6 hIL-12 作用的 K562 细胞形态学观察 用含 200 pg/ml hIL-12 转基因马铃薯蛋白刺激 PBMC 3 d 后,与 K562 细胞共培养 48 h,调整细胞浓度为 1×10^6/ml,取 1 ml 细胞用冰冷 PBS 漂洗 2 次,再将细胞重悬于 200 μl Binding Buffer 中。加入 10 μl Annexin V-FITC 和 5 μl 碘化丙啶(propidium iodide,PI),混匀后室温避光反应 15 min。加入 300 μl Binding Buffer,离心,取细胞沉淀涂片,立即进行激光共聚焦显微镜观察。

1.4 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 hIL-12 促 PBMC 产生 IFN-γ 的作用及抗体阻断效应

转基因马铃薯中表达的 hIL-12 与 rhIL-12 在浓度为 25、50、100、200、400 pg/ml 时,均有促进 PBMC 分泌 IFN-γ 的能力;而野生株马铃薯无诱生 IFN-γ 的能力($P<0.01$,表 1)。加入抗 hIL-12 单抗后,可完全阻断 hIL-12 诱使 PBMC 分泌 IFN-γ 的能力($P<0.01$,表 1),即 hIL-12 诱生 IFN-γ 是特异的。

2.2 hIL-12 诱导的 PBMC 对肿瘤细胞的杀伤作用

以浓度为 200 pg/ml hIL-12 诱导 PBMC 48 h,用 MTT 法检测其对 NK 敏感细胞 K562 体外杀伤活性(E∶T = 50∶1)。结果显示,经转基因马铃薯叶、块茎中 hIL-12 诱导的 PBMC 对 K562 细胞的杀伤率为(28.4 ± 8.7)% 和(32.3 ± 6.9)%,rhIL-12 标准品作用的 PBMC 对 K562 细胞的杀伤率为(38.5 ± 7.8)%,与野生对照组(10.3 ± 4.9)% 的杀伤率相比,均有统计学差异($P<0.05$)。

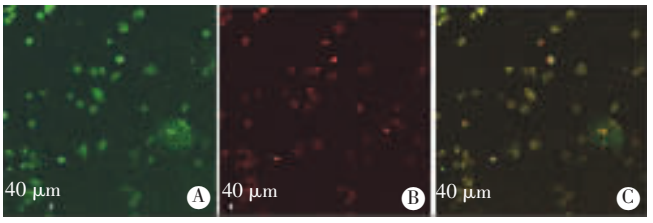
表 1 hIL-12 单克隆抗体对转基因马铃薯中 hIL-12 及 rhIL-12 刺激 PBMC 产生 IFN-γ 作用的影响(pg/ml,$n=6$,$\bar{x}\pm s$)

浓度	转基因马铃薯叶组		转基因马铃薯块茎组		rhIL-12 标准品组	
	未加抗体	加抗体	未加抗体	加抗体	未加抗体	加抗体
25 pg/ml	163.34 ± 22.17[ab]	6.18 ± 1.58	224.20 ± 25.76[ab]	4.73 ± 2.41	135.73 ± 20.38[ab]	5.73 ± 1.41
50 pg/ml	11 386.64 ± 4 396.96[ab]	10.78 ± 2.75	9 830.59 ± 3 566.05[ab]	10.32 ± 4.62	8 670.44 ± 3 287.69[ab]	10.08 ± 1.76
100 pg/ml	11 608.39 ± 4 638.52[ab]	14.40 ± 3.85	11 306.24 ± 3 524.96[ab]	12.04 ± 3.42	8 840.12 ± 4 076.67[ab]	11.51 ± 3.09
200 pg/ml	12 045.30 ± 5 196.28[ab]	18.35 ± 4.64	10 912.72 ± 3 229.83[ab]	14.19 ± 2.94	8 978.92 ± 2 817.83[ab]	13.38 ± 2.65
400 pg/ml	12 107.13 ± 3 996.51[ab]	19.61 ± 3.26	11 196.30 ± 4 067.48[ab]	17.21 ± 3.92	10 859.05 ± 153.26[ab]	15.21 ± 2.86

a:$P<0.01$,与相应野生对照马铃薯叶组[(0.09 ± 0.02) pg/ml]及野生对照马铃薯块茎组[(0.04 ± 0.01) pg/ml]比较;b:$P<0.01$,与对应加抗体组比较

2.3 转基因马铃薯hIL-12诱导肿瘤细胞K562凋亡的观察

FITC标记的Annexin V结合于完整细胞膜，FITC受激发后呈绿色荧光；PI能通过损伤的细胞膜结合于细胞核，受激发后呈红色荧光。故正常活细胞Annexin V-FITC和PI均为低染；细胞凋亡早期的细胞PI低染，凋亡中、晚期细胞则Annexin V-FITC和PI均高染。结果可见，IL-12处理PBMC后，共培养的K562细胞出现凋亡早、中、晚各期的凋亡特征（图1）。



A：FITC被激发的通道；B：PI被激发的通道；C：两通道同时开放

图1 Annexin V-FITC/PI双染色法观察与hIL-12处理的PBMC共培养的K562细胞（激光共聚焦显微镜）

3 讨论

随着植物转基因技术的创立和发展，转基因植物以其安全可靠、低成本、高效成为一种大量生产重组药用蛋白的崭新生产体系，现在已有几十种药物蛋白或多肽在转基因植物中成功表达[6,7]。而由于外源基因在转基因植物的当代或后代失活现象即基因沉默现象普遍发生，因此外源基因能否在转基因植物中高水平地稳定表达直接影响转基因植物的应用前景。本实验室建立的hIL-12转基因马铃薯表达体系能否稳定表达有生物学活性的hIL-12是下一步进行育种及入土大规模栽培的前提，因此本研究选用传代培养至第10代的转基因植株研究其表达的hIL-12生物学活性。

目前，评价IL-12有无生物活性的标准是检测IL-12体外诱生IFN-γ、刺激NK细胞及T细胞增生的功能[3]，本研究采用PBMC-IFN-γ诱生法，ELISA检测IFN-γ的产量后统计发现从转基因马铃薯茎叶中粗提的hIL-12均能促进PBMC分泌IFN-γ，而野生薯无此活性，且相当量的hIL-12粗提品与纯化的rhIL-12诱导PBMC生成IFN-γ的量无统计学差异（$P>0.05$）。而且hIL-12诱导PBMC分泌IFN-γ的效应可被hIL-12单克隆抗体几乎完全阻断。IL-12增强效应细胞应答引起IFN-γ产生是其抗肿瘤作用的理论基础[8,9]。说明本实验室传代培养的转基因马铃薯茎叶中表达的hIL-12诱导IFN-γ的分泌具有特异性的体外抗肿瘤作用。

同时也有hIL-12诱导肿瘤细胞凋亡的报道[10,11]。激光共聚焦显微镜技术从形态学上观察凋亡细胞的特征是可靠且简便的方法。Annexin V能与细胞凋亡早期从细胞膜内转移到膜外的磷脂酰丝氨酸（PS）结合；PI则能透过凋亡中晚期和死细胞的细胞膜而使细胞核红染。故标记上异硫氰酸荧光素（FITC）的Annexin V就能在共聚焦下检测到还未出现形态学改变的早期凋亡细胞，而PI则能检测出凋亡中晚期的细胞和死细胞[12]。本研究中共聚焦的结果进一步印证转基因马铃薯表达的hIL-12可诱导K562细胞凋亡。

以上结果提示，本室构建、传代的转基因马铃薯能稳定表达具有较好的抗肿瘤作用的hIL-12，且其活性与纯化的重组hIL-12无明显差异。转基因马铃薯叶和块茎中均有生物学活性的hIL-12表达，为进行后期大田化推广及纯化hIL-12时原料选取提供了实验室依据。

参考文献：

[1] Hamza T, Barnett J B, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(3): 789-806.

[2] Shin Y J, Lee N J, Kim J, *et al*. High-level production of bioactive heterodimeric protein human interleukin-12 in rice[J]. Enzyme Microb Technol, 2010, 46(5): 347-351.

[3] Liu C, Towler M J, Medrano G, *et al*. Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor[J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 102(4): 1074-1086.

[4] 邵敏，周鹤峰，葛正龙. 人白介素-12植物表达载体的构建[J]. 第四军医大学学报，2007，28(10)：868-870.

[5] Xing W, Wu S, Yuan X, *et al*. The anti-tumor effect of human monocyte-derived dendritic cells loaded with HSV-TK/GCV induced dying cells[J]. Cell Immun, 2009, 254(2): 135-141.

[6] Sorrentino A, Schillberg S, Fischer R, *et al*. Molecular farming of human tissue transglutaminase in tobacco plants[J]. Amino Acids, 2009, 36(4): 765-772.

[7] Sardana R, Dudani A K, Tackaberry E, *et al*. Biologically active human GM-CSF produced in the seeds of transgenic rice plants[J]. Transgenic Res, 2007, 16(6): 713-721.

[8] Cao X, Leonard K, Collins L I, *et al*. Interleukin 12 stimulates IFN-gamma-mediated inhibition of tumor-induced regulatory T-cell proliferation and enhances tumor clearance[J]. Cancer Res, 2009, 69(22): 8700-8709.

[9] 罗善明，高建，彭明利. sCD40L联合TB. HSP70-H22肽刺激树突状细胞诱导特异性抗肿瘤免疫的研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(11)：1024-1028.

[10] Komita H, Homma S, Saotome H, *et al*. Interferon-gamma produced by interleukin-12-activated tumor infiltrating $CD8^+$ T cells directly induces apoptosis of mouse hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2006, 45(5): 662-672.

[11] Wang H, Chen S. Immune Killing Activity of Lymphocytes on Hela Cells Expressing Interleukin-12 *in vitro*[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences, 2008, 28(3): 343-345.

[12] 杨永长，传良敏，黄文芳，等. 辛伐他汀抑制K562细胞MAPK1、cyclin D1、E2F1、c-myc mRNA的表达[J]. 第三军医大学学报，2009，31(3)：241-244.

（收稿：2010-02-08 修回：2010-04-06）

（编辑 张 维）