文章编号:1000-5404(2013)12-1215-04

论著

人 IL-12 对结肠癌干细胞生物学特性的影响及其机制

尹晓玲[1],陈应果[2],张建红[2],周先云[3],陈华俊[1],赵银晶[1],梁后杰[4] (400081 重庆,重钢总医院:肿瘤科[1],普外科[2],病理科[3];400030 重庆,第三军医大学西南医院肿瘤科[4])

[摘要] **目的** 研究人 IL-12 对结肠癌干细胞(cancer stem cells,CSCs)生物学特性的影响及其机制。**方法** IL-12/慢病毒重组质粒转染结肠 CSCs 构建 IL-12 过表达细胞模型,将 IL-12 过表达 CSCs 接种 NOD/SCID 小鼠,观察成瘤情况,Transwell 检测结肠 CSCs 侵袭性,流式细胞仪检测细胞凋亡,免疫组化检测 CK20 表达,Western blot 检测 STAT6、p-STAT6、survivin、IL-12 和 IL-4 蛋白表达。**结果** 体外实验证明,IL-12 使 CSCs 侵袭性降低 40%,细胞成球能力降低,凋亡增加[(45.2±5.6)% *vs* (4.1±1.2)%]。转染 IL-12 的 CSCs 在小鼠体内肿瘤生长能力降低,抑瘤率 63.53%;慢病毒/IL-12 转染 CSCs 形成的肿瘤体积(189±21)mm^3,质量(1 958.2±41.2)mg;而空载体转染 CSCs 形成的肿瘤体积(1 785±32)mm^3,质量(5 369.8±41.3)mg。Western blot 检测表明,IL-12 过表达显著降低结肠 CSCs 上清 IL-4 和 p-STAT6 表达。**结论** IL-12 降低结肠 CSCs 自我更新能力及侵袭性,促进其分化和凋亡,可能和 IL-4/STAT6 通路有关。

[关键词] IL-12;过表达;肿瘤干细胞;生物学特性
[中图法分类号] R392.11;R73-362;R735.35 [文献标志码] A

Effect and mechanism of human interleukin-12 on biological property of colon cancer stem cells

Yin Xiaoling[1], Chen Yingguo[2], Zhang Jianhong[2], Zhou Xianyun[3], Chen Huajun[1], Zhao Yinjing[1], Liang Houjie[4] ([1]Department of Oncology, [2]Department of General Surgery, [3]Department of Pathology, General Hospital of Chongqing Iron and Steel Group, Chongqing, 400081; [4]Department of Oncology, South westh Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect and mechanism of human interleukin 12 (IL-12) on biological property of colon cancer stem cells (CSCs). **Methods** Colon CSCs were transfected with IL-12/lentivirus recombinant plasmids to construct the cell model over-expressing IL-12. NOD/SCID mice were inoculated with the transfected colon CSCs. The growth of tumors initiated by CSCs in mice was observed, and the invasiveness of colon CSCs was detected by Transwell. Cell apoptosis was detected by flow cytometry, the expression of CK20 was detected by immunohistochemistry, and the protein expression of STAT6, p-STAT6, survivin, IL-12 and IL-4 was detected by Western blotting. **Results** After IL-12 transfection, the capacity of invasiveness of colon CSCs decreased by 40%, the tumorsphere formation capacity reduced, and cell apoptosis increased [(45.2±5.6)% *vs*. (4.1±1.2)%]. After injection into NOD/SCID mice, tumors initiated by colon CSCs transfected with lentivirus/IL-12 showed markedly reduced capacity of tumor growth, and the rate of tumor inhibition was 64.03%. The mean volume of tumor initiated by colon CSCs transfected with lentivirus/IL-12 was 189±21 mm^3, and the mean weight was 1 958.2±41.2 mg. However, the mean volume of tumor initiated by colon cancer stem cells transfected with lentivirus was 1 785±32 mm^3, and the mean weight was 5 369.8±41.3 mg. Western blotting revealed that over-expression of IL-12 reduced the expression of IL-4 and p-STAT6 in colon CSCs supernatants. **Conclusion** IL-12 can reduce the self-renewal and invasiveness of colon CSCs, and promote colon CSCs differentiation and apoptosis through IL-4/STAT6 pathway.

[**Key words**] interleukin-12; over-expression; cancer stem cell; biological property

Supported by the Post-doctoral Daily Fund of Chongqing (RC2011036). Corresponding author: Liang Houjie, E-mail: lianghoujie@sina.com

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一,发病率居恶性肿瘤第三位,病死亡第二位,局部复发及远处转移是导致患者死亡的主要原因。目前研究表明,肿瘤的复发、转移及治疗抵抗都归因于肿瘤干细胞(cancer stem cell,CSCs)的存在[1-2]。最近,更多证据表明结肠癌同样

[基金项目] 重庆市博士后日常经费(渝 RC2011036)
[通信作者] 梁后杰,E-mail:lianghoujie@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130325.0917.002.html(2013-03-25)

存在CSCs[3-4],且与肿瘤转移及复发密切相关。如果能有效抑制CSCs,将给肿瘤治疗带来突破性进展。

细胞因子失衡在多种肿瘤中存在,并与肿瘤局部复发及远处转移有关[5]。例如,大多数前列腺癌、乳腺癌、结肠癌患者均发现血清IL-6、IL-4和IL-8水平升高。研究结果表明[6-7],胃肠癌患者血清IL-12水平极低,几乎检测不到。我们前期试验证实结肠癌患者血清IL-12水平降低,且与肿瘤分期呈负相关,$CD133^+/CD44^+$ SW480结肠癌细胞不表达IL-12,因此我们推测IL-12表达缺失也许和干细胞生物学特性有关。我们前期成功构建人IL-12(白介素-12,interleukin-12)/慢病毒过表达重组体及IL-12过表达结肠CSCs细胞模型,发现IL-12能抑制结肠CSCs自我更新,促进其分化[8]。本课题我们继续研究IL-12对结肠CSCs小鼠移植瘤的影响及其机制。

抗肿瘤细胞凋亡的细胞因子IL-4在结肠癌及多种恶性肿瘤中高表达。Todaro等[9]研究证实"干样"细胞自分泌IL-4,通过上调抗凋亡因子*survivin*实现抗凋亡作用[10-11]。进一步研究表明IL-4通过激活STAT6信号途径,调节*survivin*表达及定位[12]。另有研究[13]发现IL-12能抑制人$CD4^+$ T细胞产生IL-4,但IL-12对CSCs分泌IL-4有无作用不清楚。基于以上背景,我们进一步研究IL-12是否通过IL-4/ STAT6通路影响结肠CSCs生物学特性及小鼠肿瘤生长。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及动物

细胞培养液DMEM/F12及DMEM(高糖)、胎牛血清、重组表皮生长因子(EGF)和碱性成纤维生长因子(bFGF-2)均购于GIBCO公司。含绿色荧光蛋白GFP的慢病毒载体表达质粒(pGC-FU)购于GENECHEM公司,pORF-hIL-12 G2质粒购于InvivoGen公司,胰酶、DEPC、Tris碱、EDTA均购于Sigma公司,抗人CD133/PE抗体及抗人CD44/APC抗体购于BD Pharmingen公司,BCA蛋白定量试剂盒购于Thermo Fisher Scientific,实验用6~8周龄雌性裸鼠由第三军医大学实验动物中心提供,由该中心负责饲养和管理。

1.2 培养、分离、鉴定结肠癌CSCs

结肠癌SW480细胞株购于ATCC,在干细胞条件培养基中(不含胎牛血清的DMEM/F12培养基,含20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF-2、1× B27和1% 青链霉素)中筛选培养2周后,流式细胞仪分选出$CD133^+/CD44^+$ SW480细胞作为结肠CSCs,分析其自我更新及分化。分选出的CSCs用干细胞培养基培养于37 ℃、5 % CO_2孵箱中,细胞增殖实验、克隆形成能力、成球能力及NOD/SCID体内成瘤能力鉴定其"干性"特征[8]。

1.3 构建IL-12过表达慢病毒模型及转染$CD133^+/CD44^+$ SW480细胞

PCR扩增含IL-12p70基因片段的pORF-hIL-12 G2质粒获得IL-12基因,通过酶切及连接构建重组IL-12/慢病毒质粒,取阳性克隆摇菌后行PCR鉴定,酶切鉴定及测序。鉴定正确的克隆摇菌扩大培养,用除内毒素大提试剂盒提取质粒DNA,293T细胞包装病毒,IL-12/慢病毒颗粒感染$CD133^+/CD44^+$ SW480细胞,稳定转染的细胞称为"慢病毒/IL-12细胞"[8]。

1.4 IL-12对结肠CSCs生物学特性的影响

1.4.1 IL-12对结肠CSCs分化的影响(S-P免疫组化试剂盒检测CK20) 为了观察IL-12对结肠CSCs的体外分化能力的影响,我们取转染IL-12过表达慢病毒质粒的细胞及未转染的$CD133^+/CD44^+$ SW480在条件培养基中形成的克隆细胞球,移入含10 %胎牛血清培养基中连续观察其生长情况,对两组细胞进行免疫组化染色,显微镜观察后照相。结果判断:被测细胞细胞质染色黄-棕色为阳性表达。

1.4.2 IL-12对结肠CSCs克隆形成能力的影响 将转染IL-12过表达慢病毒质粒及未转染的$CD133^+/CD44^+$ SW480细胞计数后,调整细胞浓度。两组细胞各取10 000个分别接种于6孔板中,加入适量条件培养基,5% CO_2,37 ℃培养。每隔1天半量换液1次。显微镜下观察细胞生长情况,7 d后终止培养。

1.4.3 IL-12对结肠CSCs侵袭性的影响 实验分组:慢病毒/IL-12转染组;空载体转染组;未转染组(即空白对照)。使用前水化Matrigel基质胶,然后基质胶包被Transwell小室,置于37 ℃,5% CO_2细胞培养箱中孵育。薯蓣皂甙元处理后24 h接种细胞,1×10^4/mL细胞分别接种基质胶包被的小室,无血清培养基培养的细胞加入上层小室,含10% 胎牛血清的完全培养基培养的细胞加入下层小室,将小室置于无菌24孔板中,加入250 μL培养基。下室加入500 μL培养基,5% CO_2,37 ℃静置培养48 h。取出小室,PBS轻轻淋洗,用棉头拭子小心移走膜上层的细胞,95%乙醇侵入到膜下层的细胞40 min。PBS淋洗3次,苏木精染色。倒置显微镜(×200)下计数微孔膜下层的细胞,每孔随机选择5个视野,计数每个视野细胞数目,每个实验重复3次。

1.4.4 IL-12对结肠CSCs体内肿瘤形成能力的影响 动物实验遵循第三军医大学临床学院伦理要求[批准号ID,SCXK(军队)2007015]。6~8周雌性NOD/SCID小鼠培养于无菌环境中,慢病毒感染后48 h,NOD/SCID小鼠($n=15$)皮下注射慢病毒/IL-12细胞5×10^3,或空载体转染的结肠CSCs 5×10^3。接种后观察小鼠毛色、食欲、大小便等基本生命状况,30 d后评估肿瘤形成。实验结束后切取肿瘤组织,称量并作相应检测,游标卡尺测肿瘤长短径,肿瘤体积=长×宽^2。

1.5 IL-12抑制$CD133^+CD44^+$ SW480细胞生存机制研究

1.5.1 Western blot检测结肠CSCs转染前后STAT6、p-STAT6、survivin、IL-12和IL-4蛋白表达 蛋白抽提试剂盒-Ⅱ提取细胞上清液总蛋白,浓缩上清至原体积的1/30~1/10,蛋白样品按照1∶4的比例加入5×上样缓冲溶液,100 ℃变性5 min,分装。BCA法测蛋白浓度,酶标仪测定550 nm处吸光度值。绘制标准曲线,根据标准曲线计算样品浓度。SDS-PAGE垂直电泳,200 mA恒定电流转膜80~90 min。抗原-抗体反应及化学发光法显色,BIO-RAD凝胶成像分析系统扫描及图像分析,相对灰度值表示蛋白相对含量。

1.5.2 IL-12对结肠CSCs凋亡的影响 收集转染后各组细胞,PBS洗2次,1 000 r/min离心5 min,弃上清。用不含EDTA

的消化液消化贴壁细胞。收集的各组细胞加入 500 μL 结合缓冲液中重悬细胞，再加入适量 Annexin V-FITC 和 PI，同时设置阴性对照和补偿对照（分别单染），室温避光孵育 20 min。1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 500 μL 结合缓冲液重悬细胞，流式细胞仪测定每个样本中凋亡细胞所占百分比，每个实验重复 3 次。

肿瘤抑制率 =（对照组瘤质量 − 治疗组瘤质量）/对照组瘤质量 ×100%。

1.6 统计学方法

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 t 检验，使用 SPSS 13.0 软件进行统计。

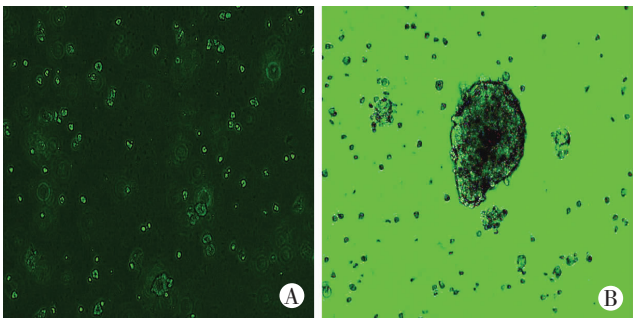
2 结果

2.1 慢病毒-IL-12 质粒构建及在 $CD133^+/CD44^+$ SW480 细胞中表达

前期结果证实慢病毒-IL-12 表达质粒构建成功，慢病毒/IL-12 细胞上清液高表达 IL-12 mRNA 和蛋白[8]，为我们进一步探究 IL-12 体内作用及机制打下基础。

2.2 结肠 CSCs 过表达 IL-12 对肿瘤球形成能力、侵袭性及分化的影响

将 CSCs 悬浮于无血清的干细胞培养液中，肿瘤球形成后光学显微镜观察肿瘤球数量，结果显示 IL-12 降低了结肠 CSCs 肿瘤球形成能力，转染慢病毒-IL-12 的 CSCs 不能形成明显的肿瘤球（图 1A）。但使用 IL-12 抗体阻断后能恢复肿瘤球形成。空载体转染的 SW480 CSCs 形成的肿瘤球更大更紧密（图 1B）。另一方面，与对照组相比，IL-12 增加 CSCs 分化标志 CK20 表达。与 SW480 CSCs 相比，慢病毒/IL-12 转染 CSCs 的侵袭性降低 40%［(8.2 ±4.9) *vs* (2.9 ±2.2)，$P<0.01$］。



A：$CD133^+$ $CD44^+$ SW480 转染慢病毒/IL-12；B：$CD133^+$ $CD44^+$ SW480 转染慢病毒

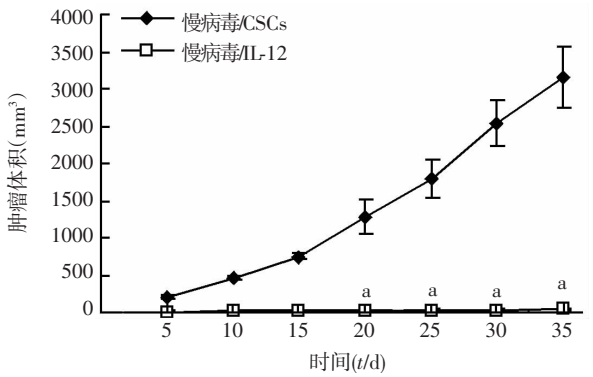
图 1 IL-12 对结肠癌干细胞肿瘤球形成的影响 （LM ×200）

2.3 IL-12 抑制 NOD/SCID 小鼠原发肿瘤生长

研究发现慢病毒/IL-12 减缓了肿瘤生长。慢病毒/IL-12 转染的 CSCs 形成的肿瘤体积显著低于对照组［(189 ±21) *vs* (1 785 ±32) mm^3，$P<0.05$］，质量显著轻于对照组［(1 958.2 ±41.2) *vs* (5 369.8 ±41.3) mg，$P<0.01$］。见图 2。

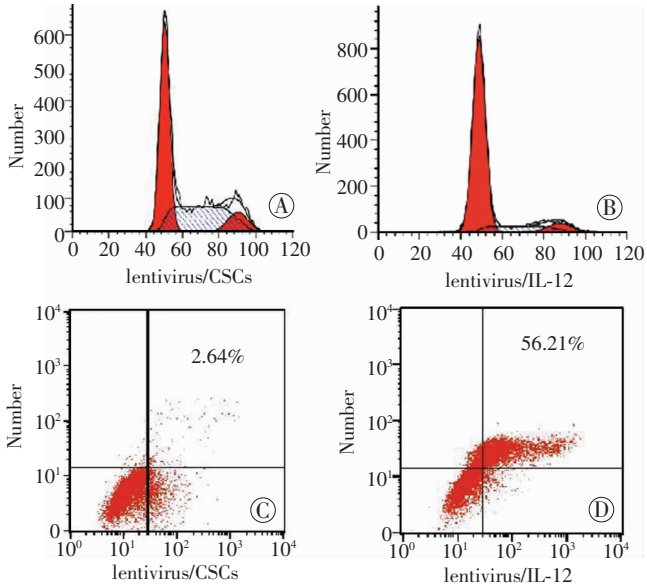
2.4 IL-12 减缓结肠 CSCs 增殖，促使其凋亡

IL-12 转染也影响细胞凋亡及增殖。流式细胞分析显示，慢病毒/IL-12 形成的肿瘤细胞周期发生改变，G_1 期细胞增加［(68.8 ±3.6)% *vs* (52.4 ±2.8)%］，而 S 期细胞降低［(22.6 ±2.8)% *vs* (38.6 ±4.1)%］（图 3A、3B），与对照组相比，凋亡细胞数量明显增加［(45.2 ±5.6)% *vs* (4.1 ±1.2)%］（图 3C、3D）。



a：$P<0.05$，与慢病毒/CSCs 比较

图 2 IL-12 转染干细胞后的肿瘤体积变化



A、B：流式细胞仪检测细胞周期；C、D：细胞凋亡检测

图 3 IL-12 对结肠 CSCs 细胞周期及凋亡的影响

2.5 结肠 CSCs 表达 IL-4 和 STAT6，IL-12 抑制 IL-4/STAT6 信号途径

Western blot 结果显示，CSCs 表达 IL-4 升高，表明 CSCs 内存在 IL-4 自分泌信号。值得注意的是，CSCs 内 STAT6 被激活。慢病毒/IL-12 降低 IL-4/STAT6 及 survivin 产生（图 4）。

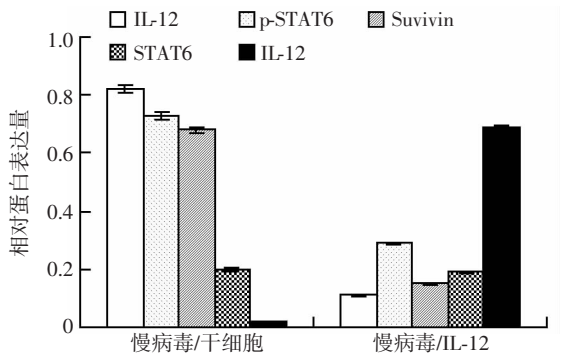


图 4 IL-12 对结肠 CSCs survivin、STAT6、p-STAT6 和 IL-4 表达的影响 （3 次蛋白定量结果的平均值）

3 讨论

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一,随着人们生活水平提高,饮食结构改变,其发病率有增加趋势,尤其在发达国家及发展中国家。直至目前,结肠癌主要的治疗手段仍是手术切除,且手术较其他治疗效果更佳,尤其是早期肿瘤,但肿瘤转移及复发仍是晚期患者治疗失败的主要原因。最近研究表明,CSCs能够始发免疫缺陷小鼠肿瘤生长[1-2],并与肿瘤转移及复发相关。从理论上讲,靶向CSCs治疗能够彻底消除肿瘤复发及转移,因此靶向CSCs的肿瘤治疗策略将比目前的传统治疗方法更有效的根治肿瘤,减少复发和转移的发生率,为肿瘤的靶向诊治提供了新靶标,为根治肿瘤带来了新希望[14]。

免疫抑制仍是多数预期较好的肿瘤治疗手段的主要障碍,而细胞因子失衡是机体免疫功能紊乱的主要原因,并导致肿瘤进展及复发[15-16]。关于细胞因子的抗瘤免疫反应相关研究包括IL-2、IFN-γ、TNF-α、IL-12等,已有研究表明,IL-12能有效地增多种肿瘤的抗瘤免疫反应,但IL-12对CSCs生存及侵袭性的作用并不清楚。本研究报道IL-12低水平表达/不表达与结肠癌进展的相关性,证实IL-12对直接限制CSCs恶性表型的潜在益处。

本研究中,我们成功构建含IL-12 cDNA的重组慢病毒质粒,用包装病毒的工具细胞293T细胞包装纯化后,获得较高滴度的病毒颗粒,将其转染$CD133^+$/$CD44^+$ SW480细胞,慢病毒/IL-12细胞高表达IL-12 mRNA及蛋白,说明稳定转染IL-12的结肠CSCs系建立,同时也证明慢病毒作为基因研究的载体具有低毒、高效的优势。结果表明,IL-12损害干性维持部分是因为抑制CSCs增殖;而且,IL-12降低分化标志CK20表达,证实IL-12介导促进分化的信号通路;与SW480细胞相比,慢病毒/IL-12细胞的侵袭性降低了约40%,表明IL-12显著抑制CSCs侵袭性。

本研究发现,与转染空载体的$CD133^+$/$CD44^+$ SW480细胞相比,慢病毒/IL-12降低CSCs肿瘤形成,慢病毒/IL-12皮下注射明显减少肿瘤体积及重量,抑制肿瘤微血管形成,促进肿瘤局部缺血坏死,与对照组相比,IL-12转染组的肿瘤增殖细胞减少,而凋亡细胞增加,这些发现证实慢病毒/IL-12能够降低结肠癌移植瘤生长,也许对结肠癌患者有益。

IL-12促进CSCs凋亡,降低细胞自我更新及结肠癌移植瘤生长的机制并不清楚,最近研究表明"干细胞"自分泌IL-4,抵抗细胞凋亡,我们研究证实,CSCs高表达IL-4和p-Stat6。综上所述,结果表明结肠CSCs中存在IL-4和p-Stat6信号通路,与对照组相比,IL-12使结肠CSCs分泌IL-4蛋白降低60%,而且,IL-12影响CSCs凋亡及增殖。

尽管我们的数据支持IL-12水平和CSCs及肿瘤生长之间的逆反关系,与对照组相比,IL-12明显降低结肠CSCs分泌IL-4和p-Stat6蛋白,其潜在机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Baker M. Cancer stem cells tracked [J]. Nature, 2012, 48(7409): 13-14.

[2] Visvader J E, Lindeman G J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): 717-728.

[3] Ricci-Vitiani L, Fabrizi E, Palio E, *et al*. Colon cancer stem cells [J]. J Mol Med, 2009, 87(11): 1097-1104.

[4] Dylla S J, Beviglia L, Park I K, *et al*. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy[J]. PLoS One, 2008, 3(6): e2428.

[5] Culig Z. Cytokine disbalance in common human cancers [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(2): 308-314.

[6] Shibata M, Nezu T, Kanou H, *et al*. Decreased production of interleukin-12 and type 2 immune responses are marked in cachectic patients with colorectal and gastric cancer [J]. J Clin Gastroenterol, 2002, 34(4): 416-420.

[7] Nagashima N, Nakayama Y, Inoue Y, *et al*. Prognostic significance of the local expression of interleukin-12 in patients with advanced gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2008, 28(2B): 1277-1283.

[8] 尹晓玲, 王正中, 赵银晶, 等. 人IL-12/慢病毒重组体对结肠癌干细胞"干性"的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(2): 161-167.

[9] Todaro M, Alea M P, Di-Stefano A B, *et al*. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4 [J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(4): 389-402.

[10] Francipane M G, Alea M P, Lombardo Y, *et al*. Crucial role of interleukin-4 in the survival of colon cancer stem cells [J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4022-4025.

[11] Crawley A M, Vranjkovic A, Young C, *et al*. Interleukin-4 downregulates CD127 expression and activity on human thymocytes and mature $CD8^+$ T cells[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(5): 1396-1407.

[12] Di-Stefano A B, Iovino F, Lombardo Y, *et al*. Survivin is regulated by interleukin-4 in colon cancer stem cells[J]. J Cell Physiol, 2010, 225(2): 555-561.

[13] Watford W T, Moriguchi M, Morinobu A, *et al*. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(5): 361-368.

[14] Landen C N Jr, Goodman B, Katre A A, *et al*. Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in ovarian cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(12): 3186-3199.

[15] Peng B, Hu Q, Sun L, *et al*. Duchesnea Phenolic Fraction Inhibits Tumor Growth through Restoring the Th1/Th2 Balance in U14 Cervical Cancer Bearing Mice [J]. Chinese Medicine, 2012, 3(1): 42-45.

[16] Hao N B, Lü M H, Fan Y H, *et al*. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors [J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 948098.

(**收稿**:2012-12-06;**修回**:2013-02-05)

(编辑 汪勤俭)