基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0014-04

GLS/IL-12 对黑色素瘤细胞 B16 的增殖及凋亡的影响

何永林,杨 春,张 黎,徐 蕾,李 娜,王渝伟
(重庆医科大学病原生物学教研室与免疫学教研室、神经科学中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:体外检测人 GLS 活性肽和小鼠 IL-12 基因的共表达产物对黑色素瘤细胞 B16 的增殖及凋亡的影响。方法:用脂质体将含 GLS 活性肽和小鼠 IL-12 基因的共表达质粒转染黑色素瘤细胞 B16 并用 RT-PCR 检测其表达,再用 MTT 试验、Hoechst33258 染色、AO/EB 染色和 Annexin V—FITC 流式细胞分析检测基因表达产物对 B16 细胞的增殖抑制与促凋亡作用。结果:GLS 活性肽和小鼠 IL-12 基因能在 B16 细胞中表达,MTT 法观察到表达产物对 B16 有明显的细胞增殖抑制作用,经 Hoechst33258 染色、AO/EB 染色和流式细胞分析观察到细胞核浓缩、深染、细胞膜改变等凋亡特征,凋亡指数明显高于对照组。结论:GLS 活性肽和小鼠 IL-12 基因的共表达产物对黑色素瘤细胞 B16 具有明显的增殖抑制作用及促凋亡作用。

【关键词】颗粒溶素;黑色素瘤细胞 B16;增殖;凋亡;IL-12
【中图图书分类法分类号】R730.59 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-26

Effect of granulysin(GLS) and IL-12 genes' expression products on proliferation and apoptosis of melanoma B16 cell

HE Yong-lin, et al
(*Department of Pathobiology and Immunology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To dectect the effect of granulysin and IL-12 genes' expression products on proliferation and apoptosis of melanoma B16 cell in vitro. *Methods*: Co-expression plasmid including granulysin peptide and murine interleukin 12 (mIL-12) genes was transfected into melanoma B16 cell with Lipofectamin ™2000 and its expression products were detected by RT-PCR. Growth suppression was detected with MTT colorimetric assay, and cell apoptotic alterations were evaluated by Hoechst 33258 staining, AO/EB staining, and Annexin V-FITC flow cytometry (FCM). *Results*: GLS peptite and IL-12 genes could be expressed in B16 cells. Expression products inhibited the proliferation of melanoma cells under MTT observaton. Cells apoptosis with nuclear chromatin condensation, fragmentation and cell membrane change were observed under Hoechst 33258 staining and AO/EB staining. FCM analysis showed the apoptotic rates in test group was 21.02%, which was higher than that in control in control group (15.57%). *Conclusion*: Expression products of granulysin and mIL-12 genes can not only inhibit proliferation but also induce apoptosis of murine melanoma cell line B16 in vitro.

【Key words】Granulysin; Melanoma B16 cell; Proliferation; Apoptosis; Interleukin-12

GLS 是免疫效应细胞—NK 细胞、杀伤性 T 细胞(CTL细胞)合成分泌的一种具有抗菌抗肿瘤的效应蛋白,包含 Mr15 000 的前体和 Mr9 000 的活性肽两种形式,由后者发挥效应功能[1]。IL-12 是一种重要的细胞因子,在调节细胞免疫,促进机体抗胞内菌感染、抗肿瘤中发挥重要作用。我们已成功构建人 GLS 活性肽和小鼠 IL-12 基因的真核共表达质粒 pBudCE4.1-S9K/mIL-12,并能分泌表达携带分子[2]。本实验旨在考察表达分子在体外对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响,为后续以合适载体运送到体内抗肿瘤奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Zeocin 抗生素、真核转染试剂 LipofectaminTM 2000 购自重庆百瑞公司(美国 Invitrogen 公司产品);MTT 购自重庆惠利试剂中心(美国 Sigma 公司产品);Annexin V—FITC 凋亡

作者简介:何永林(1972-),男,讲师,
研究方向:基因治疗应用。

基金项目:重庆市科委自然科学基金(编号:CSTC,2006BB5273);重庆医科大学校办课题(编号:XBYB200869)。

检测试剂盒购自深圳晶美生物技术公司；Hoechst 33258 凋亡检测试剂盒、活细胞/凋亡细胞/坏死细胞鉴别试剂盒(AO/EB 染色试剂盒)购自南京凯基生物科技发展有限公司；小鼠黑色素瘤细胞株 -B16 由上二医江山博士后赠送。

1.2 方法

1.2.1 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 转染 B16 细胞的表达检测 B16 细胞接种于 6 孔细胞培养板，每孔加 500 μl 细胞浓度为 1×10^6 个/ml 的细胞悬液，置细胞培养箱中 37℃，50 ml/L CO_2 孵育。12 h 后用 Lipofectamine ™2000 转染质粒 pBudCE4.1-S9K/mIL-12，同时设空质粒转染对照和无转染对照。48 h 后，收集细胞提取总 RNA，通过逆转录 PCR(RT-PCR)检测 GLS 和 IL-12 在 B16 细胞肿瘤细胞中的表达。GLS 基因的扩增引物 P1：5'-ATAAGCTTACCATGGCTACCTGGGCCCTCCTGC-3'，P2：5'-AGGGATCCTCACCTGAGGTCCTCACAGATCTG CTGG-3'，扩增片段长约 267bp；mIL-12 基因的扩增引物 P3：5'-TGAATTCGCGGCCGCATATGGGTCCTCAGAAGCTA AC-3'，P4：5'-GATAAGCTTGGTACCGGATCTCAGGCGGAG CTCAGAT-3，扩增片段约 1 632 bp。

1.2.2 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 表达产物对 B16 细胞增殖活性的影响 B16 细胞接种于 96 孔细胞培养板，每孔加 100 μl 细胞浓度为 1×10^5 个 /ml 的细胞悬液，置细胞培养箱中 37℃，50 ml/L CO_2 孵育。实验设未转染细胞组、转染 pBudCE4.1 细胞组与转染 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 细胞组，每组 12 复孔。12 h 后转染质粒，采用 MTT 法检测表达产物对 B16 细胞增殖活性的影响。即在转染质粒后第 68 h，向所有 96 孔细胞培养板每孔加 5 mg/ml MTT 10 μl，微型震荡器上震荡混匀后放孵箱内继续培养 4 h。取出细胞培养板，1 500 rpm × 10 min 离心去上清，每孔加 100 μl DMSO，震荡混匀，室温放置 20 min 后，于酶标仪上测 570 nm A 值。按下列公式计算细胞抑制率。

$$细胞抑制率(\%)=\frac{未转染细胞孔\ A\ 均值-转染质粒孔\ A\ 均值}{未转染细胞孔\ A\ 均值}\times100\%$$

1.2.3 Hoechst 染色观测 B16 细胞的凋亡 将 B16 细胞接种于含多聚赖氨酸处理盖玻片的 6 孔细胞培养板中(制作细胞爬片)，每孔加入 500 μl 浓度为 1×10^6 个 /ml 的细胞悬液，置细胞培养箱中 37℃，50 ml/L CO_2 孵育。实验设空细胞组、转染 pBudCE4.1 细胞组与转染 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 细胞组。12 h 后用脂质体 Lipofectamine™2000 转染质粒。转染后 48 h，取出细胞培养板，倒置显微镜高倍镜下进行形态学观测是否有细胞膜突起或发泡现象。随后取出爬片，PBS 漂洗，中性树胶粘片，按 Hoechst 染色试剂盒说明固定、染色后滴加 50 μl 防荧光淬灭剂，加盖玻片后立即置荧光显微镜下以激发波长 352 nm 进行观测，随机记数 10 个视野，每个视野计数 100 个细胞，计数紫蓝色核固缩、浓染的凋亡细胞。按公式计算凋亡指数，比较各组的凋亡指数差异。

凋亡指数(AI)= 凋亡细胞数/肿瘤细胞数 × 100%

1.2.4 AO/EB 染色观测 B16 细胞的凋亡 将 B16 细胞接种于 6 孔细胞培养板中，每孔加入 500 μl 浓度为 1×10^6 个 /ml 的细胞悬液，置细胞培养箱中 37℃，50 ml/L CO_2 孵育。实验设空细胞组、转染 pBudCE4.1 细胞组与转染 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 细胞组。12 h 后用脂质体 Lipofectamine™2000 转染质粒。转染后 48 h 及 72 h，PBS 漂洗，用 0.1% 胰酶消化细胞，收集到 1.5 ml 离心管中。再用 PBS 洗涤细胞 2 次，调整细胞浓度为 1×10^6 个 /ml。吸取 100 μl 的细胞悬液滴加活细胞/凋亡细胞/坏死细胞(AO/EB 双染色法)鉴别试剂盒中的 2 种试剂混合物 4 μl，室温染色 10 min。吸取 40 μl 滴于一洁净的载玻片，加盖玻片后立即置荧光显微镜下以激发波长 510 nm 进行观测，随机记数 10 个视野，每个视野计数 100 个细胞，分类计数，分别计算出凋亡和坏死细胞百分率。按公式计算细胞凋亡率、坏死率。

细胞凋亡率(或细胞坏死率)=

$$\frac{凋亡细胞数(或坏死细胞数)}{未凋亡坏死细胞数+凋亡细胞数+坏死细胞数}\times100\%$$

1.2.5 流式细胞术检测 B16 细胞的凋亡 将 B16 细胞接种于 6 孔细胞培养板中，每孔加入 500 μl 浓度为 1×10^6 个 /ml 的细胞悬液，置细胞培养箱中 37℃，50 ml/L CO_2 孵育。实验设转染 pBudCE4.1 细胞组与转染 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 细胞组。12 h 后用脂质体 Lipofectamine ™2000 转染质粒。转染后 48 h，用 0.1% 胰酶消化洗脱细胞，收集到 1.5 ml 离心管中，4℃预冷的 PBS 洗细胞 2 次后按 Annexin V—FITC 凋亡检测试剂盒说明，用流式细胞仪检测 B16 细胞凋亡细胞百分率。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件包进行数据处理，实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，两组间的均数比较采用 t 检验。检验水平 $\alpha=0.05$，$P\leq\alpha$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GLS 活性肽与 mIL-12 在 B16 细胞中的表达

转染质粒 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 的细胞提取的总 RNA，经逆转录成 cDNA，用 GLS 特异性的引物 P_1、P_2 扩增出约 267 bp 的 DNA 条带；用 IL-12 的特异性引物 P_3、P_4 扩增出约 1 632 bp 的 DNA 条带。而转染的对照空质粒 pBudCE4.1 转染细胞组和空细胞组未扩增出相应条带(图 1)。



1. DNA Marker DL 2000；2. pBudCE4.1-S9K/mIL-12 转染组(P_1P_2)；3. pBudCE4.1-S9K/mIL-12 转染组 (P_3P_4)；4. pBudCE4.1 转染组(P_1P_2)；5. pBudCE4.1 转染组(P_3P_4)；6. 无质粒转染组(P_1P_2)；7. 无质粒转染组(P_3P_4)

图 1 质粒转染 B16 细胞的 RT-PCR 鉴定结果

2.2　GLS 活性肽对 B16 肿瘤细胞增殖活性的影响

采用 MTT 法显示表达产物对肿瘤细胞有明显的抑制作用，转染 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 后 72 h 对肿瘤细胞平均抑制率达到了 34.27%（n=12），转染 pBudCE4.1 空质粒对照细胞组的平均抑制率仅为 1.86%（n=12）。

2.3　Hoechst 染色观测转染的 B16 细胞的凋亡

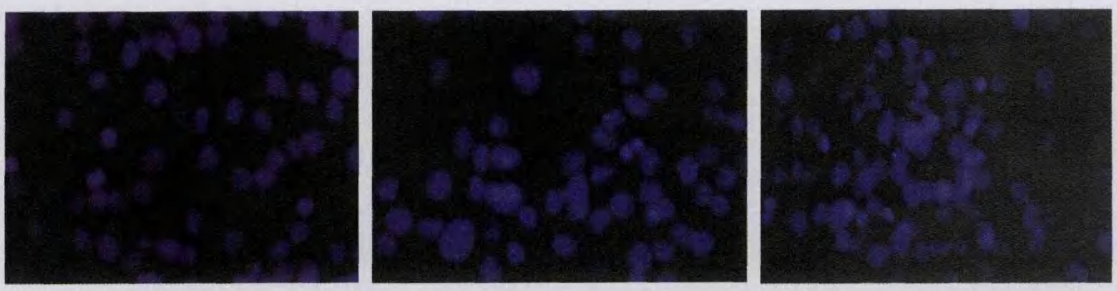
取出转染 48 h，各组细胞爬片用 Hoechst33258 染色在荧光显微镜下观察，未转染质粒的细胞组和转染空质粒 pBudCE4.1 细胞组，细胞形态正常，染色浅淡，肿瘤细胞凋亡指数分别为 3.60% ± 1.65% 与 5.70% ± 1.64%（图 2A，2B）。pBudCE4.1-S9K/mIL-12 质粒转染组可看到凋亡细胞的出泡现象，而细胞核形态异常，呈致密浓染，或呈碎块状致密浓染，荧光显微镜下散发出强烈荧光（图 2C），肿瘤细胞凋亡指数达 31.40% ± 4.01%。

2.4　AO/EB 染色观测 B16 细胞的凋亡

转染后 48 h 和 72 h，肿瘤细胞经 AO/EB 染色可在荧光显微镜下区分正常细胞、坏死细胞和凋亡细胞。正常细胞被染成绿色，细胞与胞核形态正常。坏死细胞由于失去了核膜的完整性，细胞核被溴化乙锭染成深红色。而凋亡细胞出现膜外翻、膜出泡、棒状或芽状突起等形态，细胞被染成橙色，核形态不规则。图 3A，3B 显示未转染质粒和转染空质粒 pBudCE4.1 的 B16 染色观察情况，细胞被染成绿色，细胞圆形或椭圆性，无出泡现象，坏死细胞较少；图 3C，3D 显示质粒 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 转染 48 h 和 72 h 的凋亡检测结果，可见细胞多染成橙黄色，有明显的出泡、芽状突起而使细胞形态不规则，凋亡细胞多，同时有不同程度的坏死细胞被染成红色。

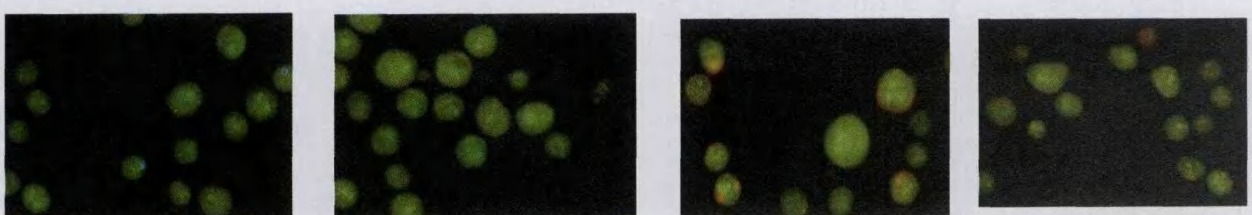
2.5　流式细胞术检测 B16 细胞的凋亡

转染后 48 h，用 Annexin V-FITC 和碘化丙啶双染，流式细胞仪检测 B16 细胞凋亡早期细胞膜磷脂酰丝氨酸（PS）的外翻。图 4A、4B 分别显示了空质粒对照组和 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 实验组的流式细胞分析结果。转染 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 质粒 48 h 后 B16 细胞处于凋亡期的比率为 21.02%；同样处理的空质粒对照则为 5.45%，说明 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 质粒的表达产物直接导致细胞的凋亡率增加了约 15.57%。



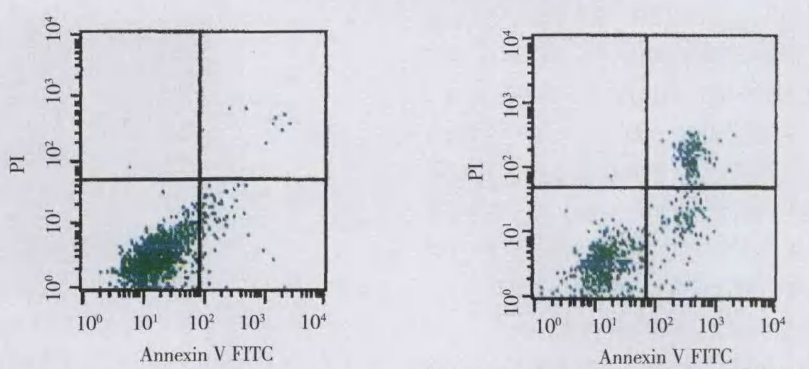
A. 无质粒转染组　　B. pBudCE4.1 转染组　　C. pBudCE4.1-S9K/mIL-12 转染组

图 2　Hoechst 染色观测转染 B16 细胞的凋亡



A. 无质粒转染组　　B. pBudCE4.1 转染组　　C. pBudCE4.1-S9K/mIL-12 转染 48 h 组　　D. pBudCE4.1-S9K/mIL-12 转染 72 h 组

图 3　AO/EB 染色观测 B16 细胞的凋亡



A. pBudCE4.1 转染组　　B. pBudCE4.1-S9K/mIL-12 转染组

图 4　转染的 B16 细胞流式细胞术分析

表 1 细胞内转染 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 质粒对 B16 细胞的影响(n=10, $\bar{x} \pm s$,%)

分 组	凋亡率	坏死率
pBudCE4.1 转染组	5.40 ± 1.07	5.10 ± 1.37
pBudCE4.1-S9K/mIL-12 转染组	32.80 ± 4.83[a]	5.30 ± 1.49[b]

[a]P<0.05 vs pBudCE4.1 转染组；[b]P>0.05 vs pBudCE4.1 转染组

3 讨 论

近年来的研究发现，颗粒溶素是一种天然的、具有抗肿瘤作用的免疫效应分子。在肿瘤患者，尤其是进展期肿瘤颗粒溶素的水平大大降低，而在肿瘤消退期其水平上升[3-4]。现已把血清颗粒溶素水平作为衡量机体细胞免疫指标和判断预后的一个重要指标[5-7]。研究者在 GLS 转基因小鼠中发现，GLS 可在多种组织和细胞中表达，并能对肿瘤细胞加以排斥[8]。颗粒溶素诱导肿瘤细胞的凋亡机制主要通过调节细胞膜上鞘磷脂/神经酰胺的比例、活化半胱天冬酶、损伤线粒体尽管在多种肿瘤细胞中看到重组颗粒溶素的促凋亡现象，但采用转染质粒在肿瘤细胞中表达颗粒溶素直接促进肿瘤细胞的凋亡报道较少。前部分实验已克隆出 GLS 的活性肽基因，并能在真核细胞中进行表达与分泌，然而其活性仍需验证，以利于后续的动物实验。由于 GLS 对肿瘤的作用主要是凋亡作用，故在体外的抗瘤作用主要通过观察细胞形态与核的改变考察 GLS 凋亡诱导作用，并区分坏死。用于体外肿瘤研究肿瘤细胞株有多种，包括人源与鼠源性的，为了和后续动物实验的成瘤建模一致，我们选择小鼠黑色素瘤细胞株—B16 进行转染检测凋亡。

一般基因药物主要影响细胞的增殖、凋亡和坏死等方面，因此，通过对转染细胞的增殖、凋亡和坏死检测可反映基因药物的效能。细胞增殖抑制的检测方法有多种，MTT 法[13]是最常用的一种方法，其法简单、方便、快捷。结果显示共表达质粒转染组的增殖抑制率明显高于空质粒转染组，这说明颗粒溶素与 IL-12 基因表达产物具有明显的增殖抑制作用。针对细胞凋亡的检测方法有多种。由于细胞的凋亡在不同时期出现的表现有所差异，故凋亡的检测很难用一种方法确认，需要结合多种方法来综合确认。我们结合 Hoechst 染色观察，AO/EB 双染观察及 Annexin V—FITC 和碘化丙锭双染流式细胞仪分析，综合分析细胞形态改变，细胞膜的变化和细胞核的异常有利于确立细胞凋亡、区分坏死与正常细胞。与对照组相比较，转染 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 实验组的 B16 细胞能够表达 GLS。Hoechst 染色，AO/EB 双染及 Annexin V—FITC 和碘化丙啶双染流式细胞术分析均显示表达产物能明显促进肿瘤细胞的凋亡。实验中我们采用 AO/EB 同时进行凋亡坏死检测，结果显示它主要引起凋亡，对坏死影响较小。GLS 与 IL-12 在 B16 的成功表达及抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡的作用，为后续以合适载体运送到体内抗肿瘤奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Stenger S, Hanson D A, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin[J]. Science, 1998, 282(5386): 121-125.

[2] 何永林，李 娜，杨 春，等.人颗粒溶素活性肽与小鼠白细胞介素 -12 共表达质粒的构建与真核表达[J].中国生物制品学杂志，2007, 20(3): 153-156.

[3] Kishi A, Takamori Y, Ogawa K, et al.Differential expression of granulysin and perforin by NK cells in cancer patients and correlation of impaired granulysin expression with progression of cancer [J].Cancer Immunol Immunother, 2002, 50(11): 604-614.

[4] Nagasawa M, Kawamoto H, Tsuji Y, et al.Transient increase of serum granulysin in a stage IVs neuroblastoma patient during spontaneous regression: case report[J].Int J Hematol. 2005; 82(5): 456-457.

[5] Ogawa K, Takamori Y, Suzuki K, et al. Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity[J]. Eur J Immunol. 2003, 33(7): 1925-1933.

[6] Sakai M, Ogawa K, Shiozaki A, et al. Serum granulysin is a marker for Th1 type immunity in pre-eclampsia[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136 (1): 114-119.

[7] Saigusa S, Ichikura T, Tsujimoto H, et al. Serum granulysin level as a novel prognostic marker in patients with gastric carcinoma[J].J Gastroenterol Hepatol. 2007, 22(8): 1322-1327.

[8] Huang L P, Lyu S C, Clayberger C, et al. Granulysin-mediated tumor rejection in transgenic mice[J]. J Immunol, 2007, 178(1): 77-84.

[9] Okada S, Li Q, Whitin J C, et al. Intracellular mediators of granulysin-induced cell death[J]. J Immunol, 2003, 171(5): 2556-2562.

[10] Kaspar A A, Okada S, Kumar J, et al.A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin[J]. J Immunol, 2001, 167(1): 350-356.

[11] Pardo J, Perez-Galan P, Gamen S, et al. A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis[J]. J Immunol, 2001, 167(3): 1222-1229.

[12] Gamen S, Hanson D A, Kaspar A, et al. Granulysin-induced apoptosis. I. Involvement of at least two distinct pathways[J]. J Immunol, 1998, 161 (4): 1758-1764.

[13] 黄 伟，张 徽，姜小良，等.Hedgehog 信号转导途径对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖与凋亡以及对 CycinD1 表达的影响[J].重庆医科大学学报，2009, 34(1): 45-48.

（责任编辑：冉明会）