

高表达 IL-12 卵巢癌细胞的建立

王 秦¹, 张家佳², 刘成桂¹, 曹登成¹

(电子科技大学医学院附属妇女儿童医院·成都市妇女儿童中心医院检验科¹, 妇产科²,
四川 成都 611731)

摘要:目的 建立高表达 IL-12 的卵巢癌细胞, 为后续 IL-12 治疗卵巢癌奠定基础。方法 将人卵巢癌细胞株 SKOV3 分为 SKOV3 组、SKOV3/GFP 组和 SKOV3/IL-12 组三个实验组, SKOV3 组不做任何处理, SKOV3/GFP 组给予空载病毒感染 SKOV3 细胞, SKOV3/IL-12 组给予 IL-12 基因腺病毒感染 SKOV3 细胞。腺病毒感染 SKOV3 细胞 48 h 后, 使用荧光显微镜检测三个实验组的感染效率, RT-PCR 检测各组 SKOV3 细胞 IL-12 p35、p40 mRNA 水平的表达量, ELISA 方法检测感染 72 h 后各组细胞培养液中 IL-12 的含量。结果 SKOV3/GFP 和 SKOV3/IL-12 组中的 SKOV3 细胞均可以在荧光显微镜下观察到绿色荧光, 而 SKOV3 组没有观察到绿色荧光, SKOV3/GFP 和 SKOV3/IL-12 组的感染效率分别是 (97±1)% 和 (95±1)%, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); RT-PCR 结果表明, 与 SKOV3 和 SKOV3/GFP 组相比较, SKOV3/IL-12 组可以成功扩增出 IL-12 p35、p40 亚基, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); ELISA 结果表明, 与 SKOV3 和 SKOV3/GFP 组比较, SKOV3/IL-12 组能够高表达 IL-12P70 蛋白, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 成功建立了高表达 IL-12 的卵巢癌 SKOV3 细胞, 为进一步采用 IL-12 进行卵巢癌的免疫治疗打下了基础。

关键词: IL-12; 卵巢癌; 高表达; SKOV3 细胞

中图分类号: R737.3

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2019.21.024

文章编号: 1006-1959(2019)21-0078-04

Establishment of High Expression of IL-12 Ovarian Cancer Cells

WANG Qin¹, ZHANG Jia-jia², LIU Cheng-gui¹, CAO Deng-cheng¹

(Department of Clinical Laboratory¹, Department of Obstetrics and Gynecology², Women and Children's Hospital, University of Electronic Science and Technology of China·Chengdu Women and Children Center Hospital, Chengdu 611731, Sichuan, China)

Abstract: Objective To establish ovarian cancer cells with high expression of IL-12, and lay a foundation for the subsequent treatment of ovarian cancer with IL-12. Methods The human ovarian cancer cell line SKOV3 was divided into three groups: SKOV3 group, SKOV3/GFP group and SKOV3/IL-12 group. SKOV3 group was not treated. SKOV3/GFP group was given virus-infected SKOV3 cells, The SKOV3/IL-12 group was administered with IL-12 gene adenovirus to infect SKOV3 cells. After infection with SKOV3 cells for 48 h, the infection efficiency of the three experimental groups was detected by fluorescence microscopy. The expression levels of IL-12 p35 and p40 mRNA in SKOV3 cells were detected by RT-PCR. ELISA method was used to detect the content of IL-12 in the culture medium of each group 72 h after infection. Results The SKOV3 cells in the SKOV3/GFP and SKOV3/IL-12 groups were observed to have green fluorescence under the fluorescence microscope, while the green fluorescence was not observed in the SKOV3 group, and the infection efficiencies in the SKOV3/GFP and SKOV3/IL-12 groups were (97±1)% and (95±1)%, the difference was statistically significant ($P<0.05$); RT-PCR results showed that compared with SKOV3 and SKOV3/GFP group, IL-12 p35 and p40 subunits could be successfully amplified in SKOV3/IL-12 group, the difference was statistically significant ($P<0.05$); ELISA results showed Compared with SKOV3 and SKOV3/GFP group, SKOV3/IL-12 group can express IL-12P70 protein with high expression, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Conclusion The ovarian cancer SKOV3 cells with high expression of IL-12 have been successfully established, which lays a foundation for further immunotherapy of ovarian cancer with IL-12.

Key words: IL-12; Ovarian cancer; High expression; SKOV3 cells

卵巢癌(ovarian carcinoma)是一种常见的女性生殖系统恶性肿瘤,也是全球范围内最常见的妇科肿瘤之一,它是第 5 位致死性女性恶性肿瘤^[1],美国每年大约有 14000 人因卵巢癌死亡,并且有近 22000 名妇女被新确诊为卵巢癌^[2]。由于其处于腹部深处早期不易发现,而且肿瘤细胞容易脱落通过腹腔液向其他盆腔和腹膜器官扩散转移,所以卵巢癌的治疗效果不佳,5 年总生存率约为 46.5%^[3]。卵巢癌的主要治疗手段是手术以及紫杉醇和铂类药物等的联合化疗,虽然大部分患者在早期进行积极的一线治疗后可以得到完全的临床缓解,但是随着化疗药物耐药性的增加,越来越多的患者在复发后将难以治愈,也缺乏更有效的治

疗手段,近年来国内外研究者一直致力于靶向药物免疫疗法来治疗肿瘤,这一疗法为复发性卵巢癌的治疗带来了新的曙光^[4]。白细胞介素 12(IL-12)是人体内重要的细胞因子,它主要由抗原递呈细胞分泌并参与免疫调节过程,具有抗肿瘤抗炎的作用,也广泛应用于多种肿瘤的治疗之中^[5],本实验拟建立高表达 IL-12 的卵巢癌细胞株模型,观察 IL-12 在卵巢癌细胞株中是否能高表达,为后续 IL-12 治疗卵巢癌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 实验室前期构建保存的携绿色荧光蛋白的空载病毒载体 pAd5F35-GFP 和重组人 IL-12 腺病毒载体 pAd5F35-IL-12^[6],实验室前期保存的人卵巢癌细胞株 SKOV3,胎牛血清和细胞培养液 RPMI-1640 购自 Gibco 公司,磷酸盐缓冲液 PBS 购自博士德公司,总 RNA 提取试剂 Trizol、逆转录试剂盒以及

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(编号:16PJ076)

作者简介:王秦(1986.12-),女,四川成都人,博士,主管技师,主要从事肿瘤微环境和肿瘤免疫治疗方面的研究

DNA Maker 均购自 TaKaRa 公司, 大连宝生物技术公司合成实验所需引物 (IL-12 p35、p40 和 β -actin), ELISA 试剂盒 (检测人 IL-12 p70 蛋白) 购自 R&D 公司。

1.2 方法

1.2.1 培养卵巢癌细胞 SKOV3 在生物安全柜中复苏冻存的人卵巢癌细胞株 SKOV3, 用已配好的细胞培养液 (含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液) 培养, 全程无菌操作, 然后将细胞放置于 37℃ 含 5% CO₂ 的孵箱中进行培养。24 h 后观察 SKOV3 细胞生长的情况并更换培养液, 此后细胞每天换液, 隔天传代 1 次, 然后选用对数生长期的 SKOV3 细胞进行后续的实验。将人卵巢癌细胞株 SKOV3 分为 SKOV3 组、SKOV3/GFP 组和 SKOV3/IL-12 组三个实验组, SKOV3 组不做任何处理, SKOV3/GFP 组给予空载病毒感染 SKOV3 细胞, SKOV3/IL-12 组给予 IL-12 基因腺病毒感染 SKOV3 细胞。

1.2.2 重组人 IL-12 腺病毒感染卵巢癌细胞株 SKOV3 离心收集前期培养的对数生长期的 SKOV3 细胞, 细胞培养液重悬细胞后计数, 然后三组中分别

加入 1×10^6 个卵巢癌细胞, 其中 SKOV3 组不做处理, SKOV3/GFP 和 SKOV3/IL-12 组分别加入相应感染复数为 100 并带有绿色荧光蛋白的腺病毒, 处理 48 h 后使用显微镜观察 SKOV3 细胞的形态和荧光表达情况, 并采集三个实验组的细胞图片。

1.2.3 RT-PCR 测定各组 SKOV3 细胞 IL-12 p35、p40 mRNA 水平的表达量 按照 1.2.2 的操作收集病毒感染 48 h 后的三组 SKOV3 细胞, 先使用总 RNA 提取试剂 Trizol 提取 SKOV3 细胞的总 RNA, 然后将 RNA 逆转录为 cDNA, 以此为反应模板在 PCR 仪上进行聚合酶链反应, 扩增内参基因 β -actin、IL-12 p35、p40 基因, 扩增基因时先在 GeneBank 中查找 β -actin、IL-12 p35、p40 的基因序列, 分别是 NM_001101.3、NM_000882.3 和 NM_002187.2, 然后根据基因序列设计合成相应的引物, 见表 1。扩增反应完成后立即将产物收集起来进行琼脂糖凝胶电泳, 采用的是浓度为 2.5% 的凝胶进行电泳, 电泳条件是 180 V 电泳 15 min, 电泳完成后在凝胶成像仪下观察三组基因的扩增情况并拍照, 采用 Quantity One 软件对电泳的条带进行分析。

表 1 β -actin、IL-12 p35、p40 基因的引物序列

基因	引物序列	方向	扩增产物大小(bp)
β -actin(NM_001101.3)	³¹⁸ CTGGGACGACATGGAGAAAA ³³⁷	Sense	564
	⁸⁸¹ AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC ⁸⁶²	Anti-sense	
p40(NM_002187.2)	⁶¹³ GTGGAGTGCCAGGAGGACA ⁶³¹	Sense	148
	⁷⁶⁰ TCTTGGGTGGGTCAGGTTT ⁷⁴²	Anti-sense	
p35(NM_000882.3)	³⁶⁹ CTGGACCACCTCAGTTTGG ³⁸⁷	Sense	155
	⁵²³ TCAGAAGTGCAAGGGTAAAA ⁵⁰⁴	Anti-sense	

1.2.4 ELISA 方法检测卵巢癌细胞培养液中 IL-12 的含量 按照 1.2.2 的操作收集病毒感染 72 h 后的三组 SKOV3 细胞培养液, 10000 r/min 离心 5 min 后使用无菌吸管吸取上清液, 低温保存备检, 然后根据 IL-12 ELISA 试剂盒操作说明书进行细胞培养液中 IL-12 p70 蛋白的检测, 最终通过绘制标准曲线的方法计算出三个实验组培养液中 IL-12 p70 蛋白的具体含量。

1.3 统计学分析 使用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析, 实验数据均使用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

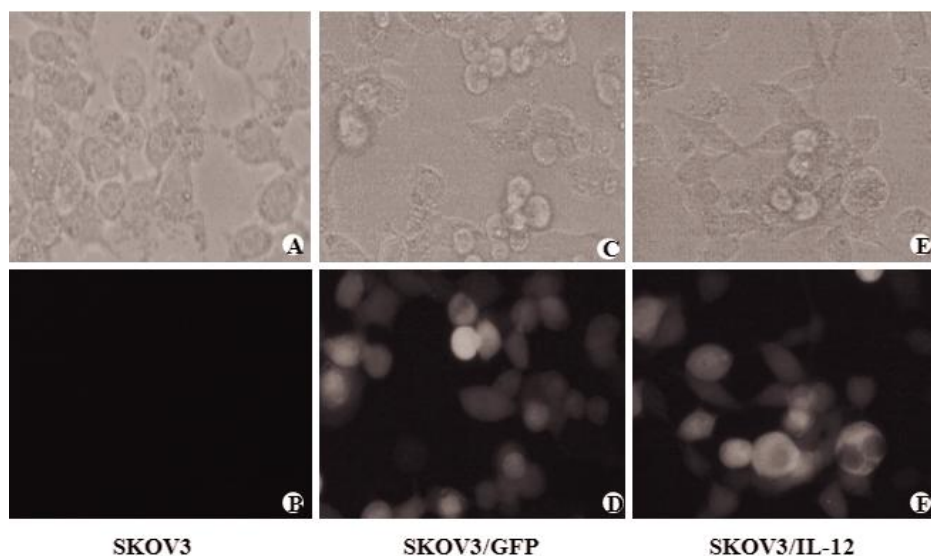
2 结果

2.1 IL-12 腺病毒感染 SKOV3 细胞的感染效率 荧光显微镜下观察到 SKOV3/GFP 组和 SKOV3/IL-12 组中的 SKOV3 细胞均可以发出绿色荧光, 而 SKOV3 组不能发出绿色荧光; SKOV3 组, SKOV3/GFP 组和 SKOV3/IL-12 组的感染效率分别是 0%、(97 \pm 1)%、

(95 \pm 1)%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。

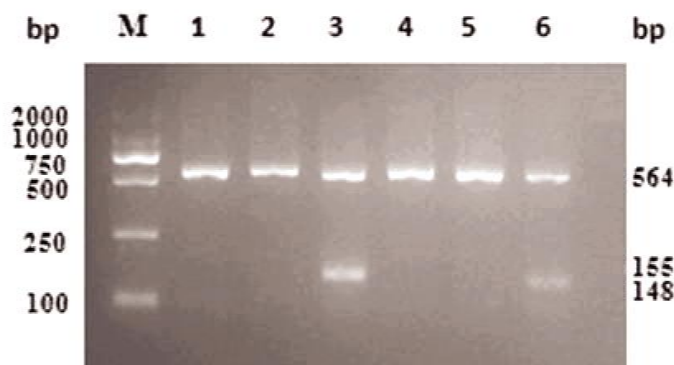
2.2 逆转录 PCR 检测 IL-12 p35、p40 mRNA 水平 重组 IL-12 腺病毒感染 SKOV3 细胞 48 h 后逆转录 PCR 检测到: 与 SKOV3 组和 SKOV3/GFP 组相比较, SKOV3/IL-12 组可以观察到扩增出的 155 bp 的 IL-12 p35 条带和 148bp 的 IL-12 p40 条带, 而其他两组均未检测到相应亚基的条带, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。这表明 IL-12 腺病毒可以成功感染 SKOV3 细胞并在 mRNA 水平表达 IL-12 基因。

2.3 卵巢癌细胞培养液中 IL-12 的含量 SKOV3/IL-12 组卵巢癌细胞培养液中 P70 蛋白的浓度是 (715.54 \pm 4.12) pg/ml, 而 SKOV3 组和 SKOV3/GFP 组的细胞培养液中均未检测到蛋白浓度, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 IL-12 腺病毒感染 SKOV3 细胞后, SKOV3 细胞能够高表达 IL-12, 成功建立了高表达 IL-12 的卵巢癌细胞。



注:A、C 和 E 为普通显微镜观察结果;B、D 和 F 为荧光显微镜观察结果

图 1 腺病毒感染卵巢癌细胞 48 h 后镜下表现($\times 200$)



注:M:DNA marker DL2000;1,4:SKOV3 组;2,5:SKOV3/GFP 组;3,6:SKOV3/IL-12 组;1~3:IL-12 p35 亚基;4~6:IL-12 p40 亚基

图 2 逆转录 PCR 检测 IL-12 腺病毒感染 SKOV3 细胞后 IL-12 p35 和 IL-12 p40 基因表达情况

3 讨论

随着全球范围内肿瘤研究的深入,在传统的肿瘤手术切除和放疗化疗等治疗方案的基础上,肿瘤的生物治疗成为了研究的热点,尤其是以细胞因子介导的免疫治疗,而 IL-12 近年来也是细胞因子抗肿瘤治疗的重点研究对象。其主要是由抗原递呈细胞分泌,促进 DC 细胞成熟和淋巴细胞增殖,增强 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用等,具有抗炎抗肿瘤的作用。已有研究发现 IL-12 对恶性黑色素瘤、结肠癌、卵巢癌、乳腺癌等多种肿瘤有抑制肿瘤生长^[7],并在许多动物模型中也具有明显的抗肿瘤作用^[8-11]。

近年来生物治疗成为卵巢癌患者治疗的重要手段^[12],尤其是将 IL-12 应用于卵巢癌治疗一直是研究的热点。早在 2007 年就有研究者在 II 期临床实验中使用重组的 IL-12 蛋白质治疗卵巢癌患者,结果发现只有小部分患者病情得到控制,IL-12 发挥了抗炎抗肿瘤的作用,但是与之伴随的药物的副作用也比较明显,患者都出现了不同程度的头痛、腹胀、外周血白细胞减少等症状^[13]。因此,如何更有效

的进行局部靶向给药成为了 IL-12 治疗卵巢癌研究的瓶颈,也是近年来 IL-12 用于抗肿瘤治疗的研究难点。本实验旨在构建高表达 IL-12 的卵巢癌细胞,使卵巢癌细胞局部高度表达 IL-12,对卵巢癌的免疫治疗具有重要意义。

本实验中采用 IL-12 的腺病毒载体感染卵巢癌细胞,感染效率高于 90%,感染后的卵巢癌细胞发出绿色荧光,表明重组腺病毒成功进入卵巢癌细胞。腺病毒感染 48 h 后检测到 IL-12 腺病毒组中的卵巢癌细胞能够扩增出 IL-12 的 p35 和 p40 基因,并能够在腺病毒感染 72 h 后的细胞培养液中检测到高浓度的 IL-12 p70 蛋白,上述结果表明重组 IL-12 的腺病毒载体能够成功感染卵巢癌细胞,并能够局部分泌高浓度的 IL-12 蛋白。肿瘤的免疫治疗一直是肿瘤研究热点,IL-12 作为一种重要的抗肿瘤免疫细胞因子也是近年来研究重点,本实验成功建立了高表达 IL-12 的卵巢癌细胞,为下一步研究如何使用 IL-12 对卵巢癌进行免疫治疗奠定了前期基础。

(下转第 84 页)

(上接第 80 页)

参考文献:

- [1]Ledermann JA,Raja FA,Fotopoulou C,et al.Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma:ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis,treatment and follow-up[J].Ann Oncol,2018,29(Suppl 4):iv259.
- [2]Eisenhauer EA.Real-world evidence in the treatment of ovarian cancer[J].Ann Oncol,2017,28(Suppl_8):viii61-viii65.
- [3]奉颖,肖梅珠,张紫寒,等.卵巢癌微环境中巨噬细胞和 LPA 的研究进展[J/OL].现代妇产科进展,2019(10):1-8[2019-10-16].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1211.r.20190704.1323.002.html>.
- [4]吴小华,张剑,尹如铁,等.优化卵巢癌 I 期临床研究管理中国专家经验[J].中国癌症杂志,2019,29(5):321-327.
- [5]Nair RE,Jong YS,Jones SA,et al.IL-12+GM-CSF microsphere therapy induces eradication of advanced spontaneous tumors in HER-2/neu transgenic mice but fails to achieve long-term cure due to the inability to maintain effector T-cell activity[J].J Immunother,2006,29(1):10-20.
- [6]成凤,匡文斌,王秦,等.携人 IL-12 基因腺病毒的构建及其对 Hep3B 细胞增殖及 TGF- β 表达的影响[J].中国免疫学杂志,2012,8(5):402-406.
- [7]张晓妮,胜利.IL-12 抗肿瘤作用机制的研究进展[J].医学综述,2018,24(2):301-305.
- [8]Issaranggum Na Ayuthava B,Everts V,Pavasant P.The immunopathogenic and immunomodulatory effects of interleukin-12 in periodontal disease[J].Eur J Oral Sci,2018,126(2):75-83.
- [9]Kamensek U,Tesic N,Sersa G,et al.Clinically usable interleukin 12 plasmid without an antibiotic resistance gene: functionality and toxicity study in murine melanoma model[J].Cancers (Basel),2018,10(3):60.
- [10]Burkart C,Mukhopadhyay A,Shirley SA,et al.Improving therapeutic efficacy of IL-12 intratumoral gene electrotransfer through novel plasmid design and modified parameters[J].Gene Ther,2018,25(2):93-103.
- [11]Lamprecht Tratar U,Kos S,Kamensek U,et al.Antitumor effect of antibiotic resistance gene-free plasmids encoding interleukin-12 in canine melanoma model[J].Cancer Gene Ther,2018,25(9-10):260-273.
- [12]盛敏佳,薛丽娟,王立岩,等.卵巢癌抗原冲击 DC 在体外对 SKOV3 细胞作用的研究[J].中国实验诊断学,2016,20(11):1811-1816.
- [13]Lenzi R,Edwards R,June C,et al.Phase II study of intraperitoneal recombinant interleukin-12 (rhIL-12) in patients with peritoneal carcinomatosis (residual disease <1 cm) associated with ovarian cancer or primary peritoneal carcinoma[J].J Transl Med,2007(5):66.

收稿日期:2019-9-5;修回日期:2019-9-15

编辑/肖婷婷