

[文章编号] 1000-2200(2008)02-0144-03

· 基础医学 ·

# IL-18 真核表达载体的构建及其在 HO-8910 细胞株的表达

吴晓莉<sup>1,2</sup>, 张林杰<sup>1</sup>, 许 健<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:通过构建人白细胞介素 18(IL-18)真核表达载体,观察其在 HO-8910 细胞株的表达情况。方法:应用分子克隆技术将 IL-18 基因插入 pCI 真核表达载体,应用脂质体介导法转染人卵巢癌 HO-8910 细胞株。转染分 3 组,空白组:人卵巢癌 HO-8910 细胞株 + 脂质体;对照组:卵巢癌 HO-8910 细胞株 + pCI;实验组:卵巢癌 HO-8910 细胞株 + pCI-hIL-18。以 RT-PCR 方法分别检测 3 组的 IL-18 表达情况。结果:成功构建 pCI-hIL-18 真核表达载体并转染 HO-8910 细胞株,RT-PCR、ELISA 显示转染 pCI-hIL-18 重组质粒组在转染的细胞内获得表达。结论:IL-18 基因能够转染到 HO-8910 细胞株中并获得表达。

**[关键词]** 卵巢肿瘤;白细胞介素-18;基因,免疫应答;HO-8910 细胞株;质粒

**[中国图书资料分类法分类号]** R 737.31;R 392.12 **[文献标识码]** A

## Constructing of interleukin-18 eukaryotic expression vector and expression of interleukin-18 in HO-8910 cell line

WU Xiao-li<sup>1,2</sup>, ZHANG Lin-jie<sup>1</sup>, XU Jian<sup>2</sup>

(1. Department of Immunology, Anhui Medical University, Hefei Anhui 230032;

2. Life Science College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou Zhejiang 310053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct the eukaryotic expression vector of interleukin-18 (IL-18) and study its expression in HO-8910 cell line. **Methods:** Interleukin-18 gene was inserted into the eukaryotic expression vector pCI with molecular cloning technique, transferred to HO-8910 cell line with Lipotectamine. Three transferred groups were studied: HO-8910 + Lipotectamine, HO-8910 + pCI and HO-8910 + pCI-hIL-18. The expression of IL-18 gene was confirmed by RT-PCR technique. **Results:** The eukaryotic expression vector of IL-18 (pCI-hIL-18) was successfully constructed and transferred to HO-8910 cells and expressed in mRNA and protein level of the HO-8910 cell line, but not expressed in the other two groups. **Conclusions:** The IL-18 gene could be expressed in the HO-8910 cell line.

**[Key words]** ovarian neoplasms; interleukin-18; genes, immune response; HO-8910 cell line; plasmids

白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18) 是一种重要的细胞因子,能促进 T 淋巴细胞的分化增殖并诱导 GM-CSF、IL-2 和 TNF- $\alpha$  等细胞因子的产生,增强 Fas 介导的 Th1 型细胞的细胞毒性及 NK 细胞、CTL 细胞的细胞毒作用等多种生物学功能<sup>[1]</sup>。在抗肿瘤、抗感染及免疫调节等方面发挥重要的生物学活性。尤其是其独特的免疫增强功能,更使得其在肿瘤治疗领域倍受关注。本研究旨在构建人 IL-18 真核表达载体,并观察其在人卵巢癌细胞 HO-8910 中的表达,为卵巢癌的免疫基因治疗提供实验基础。

### 1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 pGEM-hIL-18 质粒,大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ ,人卵巢癌 HO-8910 细胞株,pCI 载体(5 472 bp)(由浙江中医药大学生命科学院临床检验教研

室提供)。DNA Maker、One Shot PCR 试剂盒、限制性内切酶和 T4 连接酶(TakaRa 公司);RNA 提取试剂盒、superscript II 反转录试剂盒(Promega 公司);DNA 纯化、回收试剂盒(上海生物工程有限公司);筛选药 GENETZCIN (G-418 Safce) (GIBCO 公司);Lipotectamine2000 (Invitrogene 公司);人 IL-18 ELISA 试剂盒(上海卓康生物科技有限公司)。其它试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 方 法

1.2.1 IL-18 真核表达载体的构建 (1)hIL-18 的亚克隆。以 pGEM-hIL-18(3 750 bp)为模板,在 hIL-18 基因的两端设计引物,上游引物 P1:5'-GCG AAT TCA TGT ACT TTG GCA AGC TTG AAT C-3',下游引物 P2:5'-CCG TCG ACG TCT TCG TTT TGA ACA ATG-3',在上下游引物中分别引入 EcoR I 和 Sal I 酶切位点,进行 PCR。拟扩增的 IL-18 基因长度为 581 bp,添加酶切位点后,PCR 产物的长度为 597 bp。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,54.6  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。反应体积为 25  $\mu$ l。(2)PCR 产物纯化与 pCI 质粒提取,按试剂盒说明书进行。(3)pCI-hIL-18 真核表达载体的构建。PCR 产物、pCI 质粒分别经 Sal I 和 EcoR I

[收稿日期] 2007-10-12

[基金项目] 浙江省科技攻关计划项目重点科研社会发展项目(2006C23024)

[作者单位] 1. 安徽医科大学 免疫学教研室,安徽 合肥 230032; 2. 浙江中医药大学 生命科学院,浙江 杭州 310053

[作者简介] 吴晓莉(1975-),女,讲师。

[通讯作者] 张林杰,男,研究生导师,教授。

双酶切,酶切产物分别进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,将目的片段回收,按回收试剂盒说明书进行。回收产物进行连接,连接体系体积为 10  $\mu$ l, pCI 载体与 PCR 产物分别按 1:3 比例加入反应体系,在 T4 连接酶的作用下于 16  $^{\circ}$ C 连接 2 h,将连接产物直接转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂于含氨苄西林的固体培养基,挑选阳性克隆进行扩大培养,按照质粒提取试剂盒说明书提取重组质粒,进行酶切鉴定,将酶切鉴定正确的质粒进行测序。

**1.2.2 pCI-hIL-18 的转染** pCI-hIL-18 转染卵巢癌 HO-8910 细胞株,实验分 3 组。空白组:卵巢癌 HO-8910 细胞株 + 脂质体;对照组:卵巢癌 HO-8910 细胞株 + pCI;实验组:卵巢癌 HO-8910 细胞株 + pCI-hIL-18。每组各做 2 孔。转染按照脂质体转染试剂盒说明书进行。G418 药物进行筛选抗性克隆并扩大培养。

**1.2.3 转染 pCI-hIL-18 卵巢癌 HO-8910 细胞株 RT-PCR 鉴定** 分别按照 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒说明书进行,取 cDNA 进行 PCR,引物设计、反应条件参照前面所述。

**1.2.4 ELISA 检测转染细胞上清中的 hIL-18 含量** 收集 24 h 培养的细胞上清液,按照人 IL-18 ELISA 检测试剂盒说明书进行 hIL-18 含量测定,灵敏度 5 pg/ml。

## 2 结果

**2.1 IL-18 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳结果** 见图 1。拟扩增的 IL-18 基因长度为 581 bp,添加酶切位点后,PCR 产物的长度预期为 597 bp。图 1 在 597 bp 可见一条明显的条带,与预期 PCR 产物大小一致。

**2.2 pCI-hIL-18 酶切产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳结果** 见图 2。pCI-hIL-18 质粒长度为 6 033 bp,经 *Sal* I 和 *Eco*R I 双酶切后应出现 5 448 bp 和 585 bp 两条带。如图 2 所示:在 5 448 bp 和 585 bp 左右分别出现两条特异性条带,酶切结果与预期结果相符。经测序分析完全正确,无错配及移码。

**2.3 转染 pCI-hIL-18 卵巢癌 HO-8910 细胞株 RT-PCR** 转染后的卵巢癌 HO-8910 细胞株经 G418 筛选出抗性克隆,提取细胞 RNA 进行 RT-PCR,1% 琼脂糖凝胶电泳显示空白组和空载体 pCI 组均未扩增出目的条带,转染 pCI-hIL-18 组在图中看泳道位置 PCR 产物在 597 bp 左右可见一条清晰条带。电泳结果见图 3,说明转染成功,细胞在 mRNA 水平已经开始表达。

**2.4 ELISA 检测 hIL-18 含量** 显示 10<sup>6</sup> 个细胞

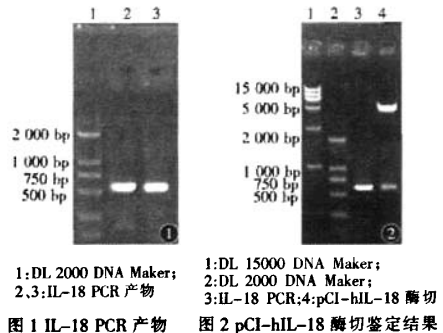


图 1 IL-18 PCR 产物

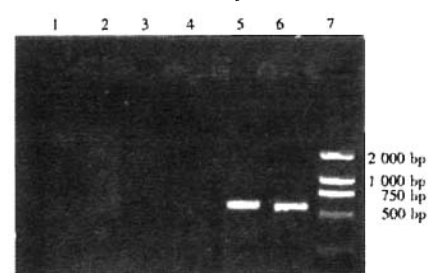


图 2 pCI-hIL-18 酶切鉴定结果

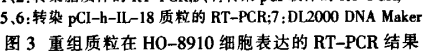


图 3 重组质粒在 HO-8910 细胞表达的 RT-PCR 结果

24 h 分泌 hIL-18 含量为 (104.18  $\pm$  15.73) pg, 空白组和对照组细胞未检测到 hIL-18。表明转染 pCI-hIL-18 质粒的人卵巢癌 HO-8910 能够分泌 hIL-18。

## 3 讨论

IL-18 是一种具有多种生物学功能的重要的免疫调节因子,它能将 NK 细胞、吞噬细胞介导的非特异性免疫与 Th、Tc 细胞介导的特异性免疫有机地结合起来,从而在机体抗肿瘤、抗过敏、抗感染等方面发挥重要作用。尤其是它可作为佐剂增强疫苗的免疫效果,更使得其在肿瘤治疗领域倍受关注。国内外许多研究证明,应用 IL-18 或将 IL-18 基因转入效应细胞对多种肿瘤有明显的抗肿瘤作用<sup>[2-4]</sup>。包珊等<sup>[5]</sup>应用 IL-18 基因通过脂质体转染给子宫颈癌 (Hela 细胞) 观察到 IL-18 基因能成功在子宫颈癌 (Hela 细胞) 中表达;韩明勇等<sup>[6]</sup>将 IL-18 基因分别转染大肠癌细胞 SW480 和乳腺癌 Bcap37 中均发现 IL-18 在这两株细胞中稳定表达,从而证明应用分子生物学的方法将 IL-18 基因转入效应细胞,使机体对肿瘤的再侵袭产生免疫能力是极具前景的一种肿瘤治疗方法,IL-18 是一种重要的抗肿瘤因子。

卵巢癌是妇科肿瘤中较常见的一种恶性肿瘤,死亡率居妇科恶性肿瘤之首。卵巢癌发生发展过程中的基因改变近年来受到重视,如何用基因方法或以基因作为靶点来防治卵巢癌亦成为近年来研究的热点。基因免疫治疗主要是运用分子生物学等技术

将某些细胞因子或黏附分子的基因转染到机体免疫细胞或癌细胞中,以提高机体免疫系统对肿瘤细胞的识别和反应能力。目前在卵巢癌基因免疫治疗方面研究较多的细胞因子是 IL-2,但 IL-18 用于卵巢癌基因免疫治疗的报道尚少见。研究证明肿瘤的发生与 IL-18 作用受损有关<sup>[7]</sup>,Wang 等<sup>[8]</sup>通过对正常卵巢上皮和卵巢癌上皮 IL-18 表达检测表明正常卵巢上皮能够表达 IL-18,但癌变的卵巢癌上皮则丧失这种功能。黄啸等<sup>[9]</sup>通过 IL-18 对卵巢癌细胞系 HO-8910 抗肿瘤作用的研究认为 IL-18 能诱导外周血单核细胞分泌 IFN- $\gamma$  因子,提高单核细胞对 HO-8910 卵巢癌细胞系的杀伤率及抑制卵巢癌细胞的生长。但是将 IL-18 基因直接转染卵巢癌细胞观察其抗肿瘤作用的报道却很少见。

本研究成功构建了人 IL-18 真核表达载体,通过 Lofectamine2000 介导法将人 IL-18 基因转入卵巢癌细胞系中,筛选出阳性克隆。RT-PCR 结果表明,转入的人 IL-18 基因在卵巢癌细胞中能稳定表达 mRNA。空载体转染的肿瘤细胞和未转染的肿瘤细胞均未检测到 IL-18 基因的 mRNA。ELISE 方法检测各组细胞上清液 hIL-18 含量,转 pCI-hIL-18 质粒的实验组检测到 hIL-18,而对照组和空白组均未检测到 hIL-18 的表达。说明在转染重组质粒的人卵巢癌 HO-8910 细胞株中 IL-18 在 mRNA 水平和蛋白水平均获得表达,为卵巢癌的基因免疫治疗提供了实验基础,但转染后肿瘤细胞的生物学活性或致

瘤性发生了怎样的变化? 将有待于进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] 朱林. 白细胞介素 18 与肿瘤[J]. 国外医学·免疫学分册, 2004, 27(3): 164-167.
- [2] Micallef MJ, Tanimoto T, Kohno K, et al. Interleukin 18 induces the sequential activation of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes to protect syngeneic mice from transplantation with Meth A sarcoma [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(20): 4557-4563.
- [3] Xiang J, Chen Z, Huang H, et al. Regression of engineered myeloma cells secreting interferon-gamma-inducing factor is mediated by both CD4(+) / CD8(+) T and natural killer cells [J]. *Leuk Res*, 2001, 10(25): 909-915.
- [4] Kiyoshi Y, Shoichi H, Norio I, et al. Successful immunogene therapy using colon cancer cells (colon 26) transferred with plasmid vector containing mature interleukin-18 cDNA and the Ig $\kappa$  leader sequence [J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(1): 9-16.
- [5] 包珊, 杨舒盈, 符生苗, 等. IL-18 基因的克隆及其在宫颈癌细胞中的表达研究 [J]. 中国热带医学, 2003, 3(5): 571-573.
- [6] 韩明勇, 于金明, 郭其森, 等. 白细胞介素-18 转导人大肠癌细胞株的建立及其生物学活性的研究 [J]. 肿瘤防治杂志, 2003, 10(8): 809-810.
- [7] Kobashi K, Iwagaki H, Yoshino T, et al. Down-regulation of IL-18 receptor in cancer patients; its clinical significance [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(5): 3285-3293.
- [8] Wang ZY, Gaggero A, Rubartelli A, et al. Expression of interleukin-18 in human ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium: evidence for defective processing in tumor cells [J]. *Int J Cancer*, 2002, 98(6): 873-878.
- [9] 黄啸, 周决, 张凤坤, 等. IL-18 对卵巢癌细胞系抗肿瘤作用的研究 [J]. 中国癌症杂志, 2002, 12(2): 106-109.

(上接第 143 页)

在胸水细胞学和 LUNX 基因检测的比较研究中, 细胞学检测阳性者, LUNX 基因均呈阳性, 细胞学检测阴性胸水标本, LUNX 基因仍有部分呈现阳性, 提示胸水 LUNX 基因检查可以弥补细胞学的不足。细胞学检测阳性率不高的原因, 可能由于恶性细胞在胸水环境中易受某些因素影响而变形, 难以与间皮细胞或炎性增生细胞鉴别, 降低了检测阳性率, 提示对于胸水细胞学阴性而 LUNX 基因阳性者, 应高度怀疑胸水系肺癌胸膜转移所致, 应反复进行胸水送检及其他检查, 以防漏诊。本研究中有 5 例肺癌胸水标本 LUNX 基因及细胞学检测均为阴性, 在复查中, 1 例经胸膜活检证实为肺癌, 主要考虑发生胸膜侵袭的癌细胞脱落入胸水呈间断性, 先前脱落入胸水的癌细胞已呈溶解状态, LUNX mRNA 检测不出, 而 4 例两项检查均为阴性胸水标本, 考虑为类癌性胸水。胸水 LUNX 基因检测, 除可鉴别侵袭胸膜的癌细胞系肺源性抑或其它组织来源外, 对肺癌伴胸水的患者, 尚可鉴别胸水系癌细胞侵袭胸膜所

致恶性胸水抑或类癌性胸水。

#### [参 考 文 献]

- [1] Iwao K, Watanabe T, Fujiwara Y, et al. Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2001, 91(4): 433-437.
- [2] Wong LS, Cantrill JE, Odogwu S, et al. Detection of circulating tumor cells and nodal metastasis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique [J]. *Br J Surg*, 1999, 84(6): 834-839.
- [3] Bodenmueller H. The biochemistry of CYFRA 21-1 and other cytokeratin tests [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 1999, 5(3): 61-73.
- [4] 高云朝, 王美琴, 陆云, 等. 血清肿瘤标志物的检测对肺癌患者的诊断价值 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(4): 268-269.
- [5] Mitas M, Hoover L, Silvestri G, et al. LUNX is a superior molecular marker for detection of non-small cell lung cancer in peripheral blood [J]. *J Mol Diagn*, 2003, 5(4): 237-242.
- [6] 邵康, 赫捷, 程邦昌, 等. RASSF1 基因不同转录本在肺癌组织中的转录表达及临床意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2003, 25(2): 149-152.
- [7] 朱广迎, 刘德林, 陈杰. 肺癌患者三种微转移标志物临床意义的比较研究 [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2003, 12(3): 178-182.