

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.10.005

文章编号: 1005-8982(2016)10-0020-05

论著

转染白细胞介素 18 基因通过下调多药耐药基因 表达增强顺铂对 C6 胶质瘤细胞毒作用*

吕雨虹¹, 陈庆², 赵娟¹, 王彦玲¹, 祝建峰², 闫蕴力¹

(1. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017; 2. 河北省胸科医院, 河北 石家庄 050041)

摘要:目的 探讨转染白细胞介素 18(IL18)基因对大鼠 C6 胶质瘤细胞顺铂化疗敏感性的影响及可能的作用机制。**方法** 体外培养转染 IL18 基因的 C6/IL18 细胞株和未转染的 C6 细胞系, MTT 法观察顺铂对两类肿瘤细胞的抑制率; 流式细胞术检测顺铂作用后转染及未转染肿瘤细胞的凋亡率; 反转录 PCR 及蛋白质印迹法(Western blot)检测转染细胞内多药耐药基因(*Mdr1*)和拓扑异构酶 *Topo II α* 的 mRNA 水平和蛋白质水平的表达变化。**结果** 顺铂对转染 IL18 基因的胶质瘤细胞株的抑制率明显高于未转染细胞($P < 0.05$), 半数抑制浓度分别为 29.66 $\mu\text{g/ml}$ 和 55.49 $\mu\text{g/ml}$; 流式细胞术显示顺铂作用后的转染细胞凋亡增多($P < 0.05$); 反转录 PCR 及 Western blot 显示转染细胞的 *Mdr1* 基因表达显著下降, *Topo II α* 基因表达无明显变化。**结论** 转染 IL18 基因能够下调多药耐药基因 *Mdr1* 的表达, 增强顺铂对大鼠 C6 胶质瘤细胞的毒作用。

关键词: 白细胞介素 18; C6 胶质瘤; 多药耐药基因; P 糖蛋白

中图分类号: R739.41

文献标识码: A

Transfection of IL 18 gene enhances cytotoxicity of cisplatin on C6 glioma cells by reducing *Mdr1* expression*

Yu-hong Lyu¹, Qing Chen², Juan Zhao¹, Yan-ling Wang¹, Jiang-feng Zhu², Yun-li Yan¹

(1. Department of Cell Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China; 2. Department of Gastroenterology, Hebei Chest Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050041, China)

Abstract: Objective To explore the effect of transfection of interleukin 18 (IL 18) on sensitivity of rat C6 glioma cells to cisplatin chemotherapy and the possible mechanism. **Methods** C6 cells with and without transfection of IL 18 (C6/IL18 cells and C6 cells) were cultured *in vitro*. The growth inhibition ratios of both types of glioma cells were measured by MTT assay, when treated with cisplatin at various concentrations. Cell apoptosis was detected by flow cytometry after being treated with 50% inhibition concentration of cisplatin. The levels of mRNA and protein of *Mdr1* and *Topo II α* were evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. **Results** Upon cisplatin treatment, the ratio of growth inhibition was significantly higher in the C6/IL18 cells than that in the C6 cells ($P < 0.05$), the 50% inhibition concentration of cisplatin was 29.66 $\mu\text{g/ml}$ and 55.49 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The apoptosis ratio of the C6/IL18 cells was higher than that of the C6 cells after treatment with cisplatin ($P < 0.05$). In the C6/IL18 cells, the expressions of *Mdr 1* was markedly down-regulated identified by RT-PCR and Western blot, but the expressions of *Topo II α* had no significant differences. **Conclusions** Transfection with IL 18 significantly reduces the expressions of *Mdr1*, then strengthens the chemo-sensitivity of C6 glioma cells to cisplatin.

Keywords: interleukin 18; C6 glioma cell; *Mdr1*; Pgp

收稿日期: 2015-12-10

* 基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划(No: 20160508)

基因治疗是新兴的肿瘤治疗手段,其利用基因重组和转染技术,对肿瘤细胞基因组进行改良,以期实现治疗肿瘤的目的。白细胞介素 18 (Interleukin 18, IL18)是一种多功能的细胞因子,能够增强体内抗肿瘤免疫反应^[1],是基因治疗的候选基因。李文玲^[2]等应用逆转录病毒转染的方法构建了稳定表达具有生物活性的白细胞介素 18 的 C6/IL18 细胞系,并在体外和体内观察到有显著意义的细胞生长抑制现象。不仅如此,蒋常文^[3]等发现转染 IL18 基因能够显著性下调 C6 细胞周期相关基因 PCNA、cyclin D1、cyclin B1 的表达,上调 P21 的表达。然而,转染 IL18 基因能否下调多药耐药基因表达,增强化疗药物对肿瘤细胞毒性,尚未有深入的研究报道。明确转染基因能否增强化疗敏感性,将为基因治疗提供更广阔的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大鼠 C6 胶质瘤细胞和导入 IL18 基因的 C6/IL18 细胞系,河北医科大学细胞生物教研室制备并保存^[4]。顺铂(齐鲁制药有限公司),RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(天津灏洋生物公司),四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(美国 Sigma 公司),Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒(美国 Invitrogen 公司),RT-PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司),小鼠抗大鼠 β actin、Mdr1、Topo II α ,以及辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二

抗均来自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 MTT 检测不同浓度顺铂对肿瘤细胞的抑制率 取对数生长期 C6 和 C6/IL18 细胞,接种于 96 孔培养板,24 h 后根据不同药物浓度组:2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 及 160.0 μ g/ml 加入药物,对照组加入等量的生理盐水,每组均做 3 个复孔,实验重复 3 次($n=9$)。药物与细胞共培养 24 h 后加入 MTT,孵育 4 h 后终止反应。酶标仪(BIO-TEK ELX800,美国)在 490 nm 波长下测吸光值(A 值)。根据公式计算细胞抑制率:对照孔 A 值 - 用药孔 A 值 / 对照孔 A 值 $\times 100\%$ 。由细胞抑制率与药物浓度的对数值作线性回归,求出顺铂对每种细胞的半数抑制浓度(IC50)。

1.2.2 流式细胞术检测顺铂作用后的细胞凋亡率 取对数生长期 C6 和 C6/IL18 细胞,接种于培养瓶中,24 h 后加入终浓度为 30.0 μ g/ml (C6/IL18 细胞的 IC50)的顺铂作用 24 h,胰酶消化,冷 PBS 洗 2 次, Binding Buffer 重悬细胞,设置阴性对照组(不加染料)、同型对照组(分别只加 Annexin V-FITC 和 PI)以及药物处理组(混合 Annexin V-FITC 和 PI),室温避光反应 10 min 上流式细胞仪(BD FACS Calibur,美国)检测,调节电压和补偿,收集 10 000 个事件,统计门内细胞的凋亡比例。实验重复 3 次。

1.2.3 反转录 PCR 检测 mRNA 的表达 Trizol 法提取细胞总 RNA,并进行反转录反应,反转录产物进行 PCR 反应, Mdr1、Topo II α 、 β actin 和 IL18 的退火温度分别为 51、55、53 及 59 $^{\circ}$ C。引物见表 1。

表 1 扩增基因的引物序列及长度

	正向	反向	扩增产物长度
β actin	5'-GAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'	5'-CTGGAAGGTGGACAGTGAG-3'	445 bp
Mdr1	5'-ACTTTCGCACTGTCGTCT-3'	5'-CTGAAGCACTGGGATGTT-3'	455 bp
Topo II α	5'-TTCACGGCGGATTAGAC-3'	5'-TGCCAGCAGTGGAGGTTA-3'	319 bp

1.2.4 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测蛋白的表达 提取细胞总蛋白,使用 BCA 法测定蛋白浓度,25 μ g/ml 孔上样,蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后,转至 NC 膜上。NC 膜用一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育(Mdr1、Topo II α 、 β actin 一抗均 1:1 000 稀释),TBS 洗膜,37 $^{\circ}$ C 二抗孵育 1 h(1:2 000 稀释),洗膜后,滴加 ECL 化学发光液,采用凝胶成像系统(BIO-RAD Chemi Doc XRS,美国)记录图像。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,实验

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,作非配对 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂对 C6/IL18 和 C6 细胞抑制率的比较

顺铂对细胞的抑制率随浓度升高而增大(见图 1),除 0.5 μ g/ml 外,其他浓度 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 及 160.0 μ g/ml,对 C6/IL18 细胞的抑制率均高于 C6 细胞(见表 2), $P < 0.05$, $n=9$ 。经计算,顺铂对 C6/IL18 细胞的半数抑制浓度(IC50)为

29.66 $\mu\text{g/ml}$, 明显低于其对 C6 细胞的 IC50 55.49 $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.05$ 。

2.2 顺铂对 C6/IL18和 C6 细胞凋亡率的比较

C6/IL18 和 C6 细胞经顺铂作用 24 h 后, C6/IL18 细胞凋亡率[(22.63 \pm 2.85)%, $n = 3$]明显高于 C6 细胞凋亡率[(10.57 \pm 1.93)%, $n = 3$, $P = 0.012$, $F = 1.16$]。

2.3 转染 IL18 基因对 C6 细胞 Mdr1 和 Topo II α 基因表达的影响

反转录 PCR 和 Western blot 结果显示(见图 2,3), 相对于 C6 细胞, C6/IL18 细胞的 Mdr1 mRNA 和蛋白表达水平均明显减少(见表 3,4), Topo II α 变化不明显。

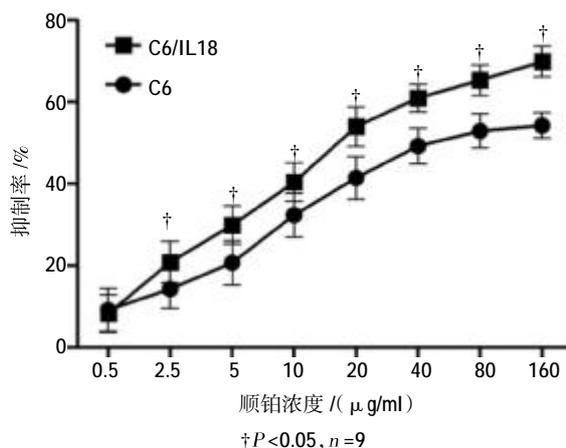


图 1 顺铂对细胞的生长抑制曲线

表 2 顺铂对细胞的生长抑制率 ($n = 9, \bar{x} \pm s$)

组别	顺铂浓度 / ($\mu\text{g/ml}$)							
	0.5	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	80.0	160.0
C6/IL18	8.8 \pm 1.1	19.2 \pm 4.7 [†]	29.4 \pm 6.8 [†]	40.0 \pm 10.2 [†]	53.1 \pm 6.2 [†]	61.5 \pm 8.0 [†]	65.8 \pm 8.9 [†]	69.6 \pm 6.4 [†]
C6	9.5 \pm 1.7	14.1 \pm 3.6	20.6 \pm 6.8	29.2 \pm 7.5	40.7 \pm 11.4	50.2 \pm 8.6	53.5 \pm 9.5	55.3 \pm 13.4
P 值	0.324	0.021	0.014	0.021	0.011	0.011	0.012	0.011
F 值	2.587	1.703	1.008	1.860	3.395	1.144	1.138	4.297

注: † $P < 0.05$

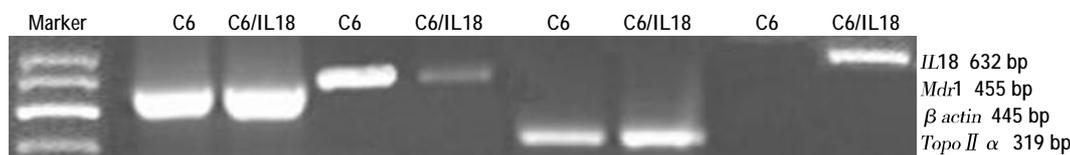
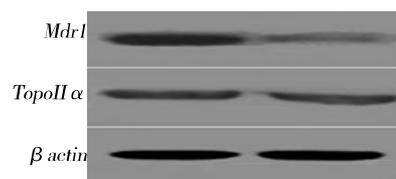


图 2 转染 IL18 基因下调 Mdr1 转录水平



左侧孔为 C6 细胞, 右侧孔为 C6/IL18 细胞

图 3 转染 IL18 基因减少 Mdr1 蛋白表达

表 3 Mdr1、Topo II α 基因转录水平相对值 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	C6/IL18	C6	P 值	F 值
Mdr1	0.11 \pm 0.04 [†]	0.55 \pm 0.05	0.000	2.054
Topo II α	0.54 \pm 0.06	0.47 \pm 0.03	0.153	5.105

注: † $P < 0.05$

表 4 Mdr1、Topo II α 基因蛋白水平相对值 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	C6/IL18	C6	P 值	F 值
Mdr1	0.10 \pm 0.05 [†]	0.40 \pm 0.05	0.002	1.246
Topo II α	0.21 \pm 0.04	0.19 \pm 0.04	0.405	1.000

注: † $P < 0.05$

3 讨论

神经胶质瘤是成人中枢神经系统中最常见的原发性肿瘤, 占颅内肿瘤的 70%, 预后差, 死亡率高。胶质瘤治疗采用手术、放化疗结合的手段, 然而患者生存时间并没有大幅度提升和改善。主要原因是胶质瘤呈浸润性生长, 手术不能完全切除; 另一方面由于其内在的耐药性, 化疗药物很难有效地杀伤肿瘤细胞, 从而导致化疗失败。

化疗过程中, 患者在接触化疗药物一段时间后, 多数会发生耐药, 并且对其他在结构和机制上完全不同的药物表现出交叉耐药, 这种现象称多药耐药 (multidrug resistance, MDR)。恶性肿瘤细胞产生多药耐药的机制尚未完全阐明, 其中已知的最重要的形成机制是 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, Pgp) 过度表达^[4], 该蛋白是跨膜转运蛋白, 定位在细胞膜和高尔基体上, 可以将药物分子泵出胞外, 减少药物的胞内

累积,不仅如此,Pgp 对底物要求不严格,可将不同类型的药物泵出,从而形成多药耐药。Pgp 过度表达,与肿瘤耐药、复发和预后密切相关^[5-8]。周荣福^[9]等的临床研究发现,人脑星形细胞瘤 Pgp 表达先天存在,对化疗药物有先天耐受性,当药物刺激后 Pgp 阳性表达能产生继发耐药或增强先天耐药。人类编码这一蛋白的基因为 *Mdr1*,定位在 7 号染色体长臂 2 区 1 带,含 28 个外显子。*Mdr1* 基因启动子及其邻近区域,可与多条信号通路的转录因子结合,调节 *Mdr1* 的转录^[4,10-12]。另一条介导多药耐药的途径是 DNA 拓扑异构酶(Topoisomerase,Topo)的数量或活性减少^[13]。真核细胞中 *Topo II* 的主要作用是调节 DNA 空间结构,参与 DNA 修复、复制和转录。以 *Topo II* 为靶点的抗肿瘤药物通过形成药物-酶-DNA 复合物抑制 DNA 的复制与转录。研究发现^[14-15],*Topo II* 的含量或活性下调,引起药物失去靶,形成细胞耐药。这类耐药没有 *Mdr1* 基因过表达,主要表现为 *Topo II* 基因突变或缺失;*Topo II* 酶水平减少或磷酸化水平提高。

白细胞介素 18 是一种多功能细胞因子,能够增强体内抗肿瘤免疫反应^[1],是基因治疗的候选基因。研究表明^[16],*IL18* 基因单独转染,或与其他细胞因子联合转染,如 *IL12*、*IFN*、*FASL* 等,表现出显著地抑制肿瘤生长的特性。*XU*^[16]等应用慢病毒转染的方法,将 *IL18* 和 *IFN β* 基因导入骨髓基质干细胞,发现这些转基因细胞能显著抑制胶质瘤细胞生长,促进其凋亡;大鼠模型显示,这些转基因细胞还能增强其他抗肿瘤因子的分泌,以及 *CD4⁺* 和 *CD8⁺* T 细胞对瘤组织的浸润,延长荷瘤大鼠生存期。虽然转染 *IL18* 基因能显著地抑制肿瘤生长,但是这些研究中的肿瘤细胞并不能全部清除。转染 *IL18* 基因能否增强化疗效果尚未有深入研究。本研究首先观察 C6/*IL18* 和 C6 两种细胞,在不同浓度顺铂下的生长抑制情况,发现顺铂对 C6/*IL18* 细胞的生长抑制明显增强。之后,进一步检测这两种细胞的 Pgp 和 *Topo II α* 的 mRNA 和蛋白水平的变化,发现 C6/*IL-18* 细胞中 Pgp 表达量明显减少,这与顺铂对其有较高抑制率的结果相对应,推测转染 *IL18* 基因通过下调多药耐药基因 *Mdr1* 的表达,增强药物对 C6 细胞的毒作用。

Mdr1 基因表达可被多条信号通路调节,其中 ERK/MAPK 和 PI3K/AKT 最密切相关。*MUNOZ*^[17]等人的研究发现,胶质瘤细胞系对替莫唑胺耐药的过

程包含两个阶段:早期阶段,胞浆内的 Pgp 转运到胞膜,伴随构象活性改变;晚期阶段,肿瘤细胞自分泌 EGF,与自身的 EGFR 受体结合,激活 ERK1/2-JNK-AP-1 信号通路,增强 *Mdr1* 基因转录。大量研究表明^[18-21],药物作用肿瘤细胞会引起 PI3K/AKT 信号活化,进而上调 *Mdr1* 表达,应用小 RNA 干扰或抑制 PI3K-AKT 活性能下调 *Mdr1*。而 PI3K/AKT 下游的哪个或哪些靶基因作用 *Mdr1*,不同课题组得出的结果不尽相同。一些研究发现抑制耐药细胞的 PI3K-AKT 活性后,通过 NF- κ B 途径调节 *Mdr1*^[19]。而其他研究发现,药物可通过 Akt-mTOR 信号通路增加 *Mdr1* 表达^[20],阻断 mTOR 通路能抑制膜转运蛋白 ABCB1、ABCC1 和 ABCG2 的表达,逆转细胞的耐药性^[21]。这些研究使用的药物以及肿瘤细胞类型不同,肿瘤基因组异质性较强,可能存在多个途径影响 *Mdr1* 表达。之前的研究报道 C6 细胞中转染 *IL18* 基因能够显著性上调 *P21* 的表达,下调周期蛋白 *cyclin D1* 和 *cyclin B1* 的表达,引起细胞周期阻滞^[3]。而 AKT 活化介导的下游信号与这一作用相反,通过抑制 *P21* 的活性,稳定 *cyclin-CDK* 复合物,促进细胞周期进展。因此,转染 *IL18* 基因可能通过对抗 PI3K-AKT 信号,调节 *Mdr1* 基因表达。

综上所述,转染 *IL18* 基因能够下调 *Mdr1* 基因表达,减少细胞内 Pgp 蛋白水平,增强 C6 细胞的药物敏感性,为 *IL18* 基因治疗提供更广阔的应用前景。

参 考 文 献:

- [1] CHRISTOFIDES A, KOSMOPOULOS M, PIPERI C. Pathophysiological mechanisms regulated by cytokines in gliomas[J]. *Cytokine*, 2015, 71(2): 377-384.
- [2] 李文玲, 闫蕴力, 单保恩, 等. 逆转录病毒介导 *IL18* 基因在大鼠胶质瘤细胞 C6 中的表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20(5): 522-525.
- [3] 蒋常文, 闫蕴力, 马卫东, 等. *IL18* 基因转染对大鼠 C6 胶质瘤细胞生长特性的影响[J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27(3): 339-342.
- [4] AMBUDKAR S V, KIMCHI-SARFATY C, SAUNA Z E, et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism [J]. *Oncogene*, 2003, 22(47): 7468-7485.
- [5] WU Q, YANG Z, NIE Y, et al. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches [J]. *Cancer Lett*, 2014, 347(2): 159-166.
- [6] ABRAHAM J, SALAMA N N, AZAB A K. The role of P-glycoprotein in drug resistance in multiple myeloma [J]. *Leuk Lym-*

- phoma, 2015, 56(1): 26-33.
- [7] JAMROZIAK K, ROBAK T. Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 gene: the influence on risk and clinical outcome of haematological malignancies[J]. Hematology, 2004, 9(2): 91-105.
- [8] HAAR C P, HEBBAR P, WALLACE GC, et al. Drug resistance in glioblastoma: a mini review[J]. Neurochem Res, 2012, 37(6): 1192-1200.
- [9] 周荣福, 侯卫东, 李飞, 等. P 糖蛋白在脑星形细胞瘤中的表达及意义[J]. 中国临床神经外科杂志, 2007, 12(12): 729-731.
- [10] CHEN K G, SIKIC B I. Molecular pathways: regulation and therapeutic implications of multidrug resistance[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(7): 1863-1869.
- [11] SUI H, FAN Z Z, LI Q. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/P-gp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells[J]. J Int Med Res, 2012, 40(2): 426-435.
- [12] ANDORFER P, ROTHENEDER H. Regulation of the Mdr1 promoter by E2F1 and EAPP [J]. FEBS Lett, 2013, 587(10): 1504-1509.
- [13] TSURUO T, NAITO M, TOMIDA A, et al. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal [J]. Cancer Sci, 2003, 94(1): 15-21.
- [14] JUN K Y, PARK S E, LIANG J L, et al. Benzo[b]tryptanthrin inhibits Mdr1, topoisomerase activity, and reverses adriamycin resistance in breast cancer cells[J]. Chem MedChem, 2015, 10(5): 827-835.
- [15] WANG Y L, YAN Y L, ZHOU N J, et al. Mechanism of multidrug resistance of human small cell lung cancer cell line H446/VP[J]. Chin Med J, 2010, 123(22): 3299-3303.
- [16] XU G, GUO Y, SENG Z, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells co expressing interleukin-18 and interferon- β exhibit potent antitumor effect against intracranial glioma in rats[J]. Oncol Rep, 2015, 34(4): 1915-1922.
- [17] MUNOZ J L, RODRIGUEZ-CRUZ V, GRECO S J, et al. Temozolomide induces the production of epidermal growth factor to regulate MDR1 expression in glioblastoma cells[J]. Mol Cancer Ther, 2014, 13(10): 2399-2411.
- [18] XIE X, TANG B, ZHOU J, et al. Inhibition of the PI3K/Akt pathway increases the chemo-sensitivity of gastric cancer to vincristine[J]. Oncol Rep, 2013, 30(2): 773-782.
- [19] LIN X, ZHANG X, WANG Q, et al. Perifosine downregulates MDR1 gene expression and reverses multidrug-resistant phenotype by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway in a human breast cancer cell line [J]. Neoplasma, 2012, 59(3): 248-256.
- [20] WANG S F, CHOU Y C, MAZUMDE R N, et al. 7-Ketocolesterol induces P-glycoprotein through PI3K/mTOR signaling in hepatoma cells[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(4): 548-560.
- [21] ZOU Z, ZHANG J, ZHANG H, et al. 3-Methyladenine can depress drug efflux transporters via blocking the PI3K-AKT-mTOR pathway thus sensitizing MDR cancer to chemotherapy[J]. J Drug Target, 2014, 22(9): 839-848.

(张蕾 编辑)