

## 人 IL-17F 对裸鼠人肝癌移植瘤生长的影响

# The Effect of Human IL-17F on Growth of Human Hepatocarcinoma Xenograft Tumor in Nude Mice

谢宇锋 盛伟华 缪竞诚 杨吉成\*

XIE Yu-Feng, SHENG Wei-Hua, MIAO Jing-Cheng and YANG Ji-Cheng\*

苏州大学医学院细胞与分子生物学教研室 苏州 215123

*Department of Cellular and Molecular Biology, Medical School, Soochow University, Suzhou 215123, China*

**摘 要** 利用 RT-PCR 方法从 PHA 活化的人外周血单个核细胞(PBMCs)中克隆 hIL-17F 基因,亚克隆至逆转录病毒载体 pSIV-1 与辅助病毒载体 pHIT456 和 pHIT60 脂质体法共转染 293T 包装细胞,获得的成熟重组逆转录病毒(RV-hIL-17F)再感染 SMMC-7721 人肝癌细胞,并经 G418 筛选建立 hIL-17F 转基因肝癌细胞。PCR、RT-PCR 和 Western blot 结果表明 hIL-17F 基因在肝癌细胞中能成功整合、转录和表达。MTT 和 FCM 结果表明 hIL-17F 不能改变 SMMC-7721 肝癌细胞的增殖活力和细胞周期,但 ELISA 结果表明其能明显下调肝癌细胞 IL-6、IL-8 和 VEGF 的表达。转基因肝癌细胞 rhIL-17F 表达上清具有抑制 ECV304 人脐静脉内皮细胞生长的作用。裸鼠皮下成瘤试验结果表明 hIL-17F 转基因肝癌细胞裸鼠致瘤能力明显减弱,VEGF 和 CD34 表达降低,血管形成显著减少。hIL-17F 可通过减少肿瘤血管形成显著抑制裸鼠人肝癌移植瘤的生长,为其进一步开展肿瘤血管靶向基因治疗和开发抗血管新药提供了一定的实验依据。

**关键词** 人 IL-17F 逆转录病毒 肝癌 抑瘤效应

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0772-07

**Abstract** The human interleukin-17F(hIL-17F) gene was amplified by RT-PCR from PHA-activated human peripheral blood mononuclear cells(PBMCs). It was then subcloned into the retrovirus vector pSIV-1. The pSIV-1/hIL-17F together with its two-helper virus vectors pHIT456 and pHIT60 cotransfected into the package cell 293T by lipofectin to produce mature recombinant retrovirus, which was then used to infect SMMC-7721 hepatocarcinoma cells(HCCs), and the cells were selected in the presence of G418. The integration, transcription, expression of hIL-17F gene in SMMC-7721 cells was identified by PCR, RT-PCR and Western blot respectively. MTT and FCM showed that hIL-17F couldn't alter the proliferation and cell cycle of SMMC-7721 cells, but ELISA showed that it could down-regulate IL-6, IL-8 and VEGF expression. The effect of rhIL-17F supernatant on growth suppressing of ECV304 cells was observed by MTT. The experiment of human hepatocarcinoma xenograft tumor in nude mice showed that the formation and growth rates of hIL-17F-transgenic SMMC-7721 showed an obvious decline, and VEGF and CD34 expression and angiogenesis of the transgenic neoplasms was also evidently defined. hIL-17F can markedly inhibit the growth of human hepatocarcinoma xenograft tumor in nude mice by antiangiogenesis. This study provided an experimental evidence for further conducting tumor gene therapy by targeting vascularity and exploiting antiangiogenic novel medicine related to hIL-17F.

**Key words** human interleukin-17F, retrovirus, hepatocarcinoma, antitumor effect

肿瘤的生长和转移依赖于血管生成,血管生成抑制因子对于肿瘤等血管增生性疾病具有潜在的治疗价值<sup>[1,2]</sup>。近年来研制血管生成抑制剂控制肿瘤的生长和转移已成为肿瘤防治的新策略<sup>[3]</sup>。人 IL-17F (hIL-17F)最早是由 Starnes 等在活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞和单核细胞中鉴定,毛细血管形成实验表明其能显著抑制血管形成,在抗肿瘤微血管形成的肿瘤治疗中将有一定的应用前景<sup>[4]</sup>。hIL-17F 具有显著的抗血管形成活性,而国内外其抗血管形成作用及其机制的研究报道甚少,抗肿瘤治疗的研究尚属空白。因而本文利用 RT-PCR 技术,从 PHA 活化的人外周血单个核细胞中成功克隆 hIL-17F 基因,并构建 hIL-17F 重组逆转录病毒载体和建立 SMMC-7721 转基因肝癌细胞,观察其对肝癌细胞生物学特性的影响,并建立裸鼠人肝癌移植瘤模型进一步评价 hIL-17F 基因表达在裸鼠体内的抗血管形成活性和抑瘤效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、细胞与菌种:** pUCm-T 购自 Sangon 公司,逆转录病毒载体 pSIV-1、辅助病毒载体 pHIT456 和 pHIT60 及 293T 包装细胞由苏州大学陈永井老师惠赠,菌株 DH5 $\alpha$ 、SMMC-7721 人肝癌细胞和 ECV304 人脐静脉内皮细胞由本室保种。

**1.1.2 试剂:** Trizol 试剂盒购自 Sangon 公司;各种工具酶等购自 TaKaRa 公司;质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和胶回收试剂盒购自 V-gene 公司;脂质体 Lipfectamine 购自 Invitrogen 公司;人 IL-6、IL-8 和 VEGF ELISA 试剂盒购自晶美公司;羊抗人 IL-17F 多抗 [IL-17F (C-13):sc-20599]、兔抗羊 IgG-AP、兔抗人 VEGF 多克隆抗体和鼠抗鼠 CD34 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;SP 超敏试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

**1.1.3 PCR 引物:** 下列引物(见表 1)由 Sangon 公司合成。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Number	Primer sequences
1)	5'-CAGCGCAACATGACAGTGAAGAC-3'
2)	5'-CACCTCTTACTGCACATGGTGGAT-3'
3)	5'-GCA GAATTCATGGTCAAGTACTGTGCTG-3'
4)	5'-CTC GGATCCTTACTGCACATGGTGGATG-3'
5)	5'-CTCCAT GAACTCCGTTCCCATCCAGCAAG-3'
6)	5'-GGAACG GAGTTCATGGAGATGTCCTTCCT-3'

### 1.2 方法

**1.2.1 hIL-17F 基因的克隆:** 分离外周血单个核细胞,加入终浓度为 10 $\mu$ g/mL 的 PHA 刺激培养 24h 后,提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA 第一链,利用 P1、P2 引物进行 PCR 克隆 hIL-17F 基因;并将 RT-PCR 产物亚克隆至 pUCm-T 载体进行 PCR、测序鉴定。

**1.2.2 pSIV-1/hIL-17F 重组逆转录病毒载体的构建:** 以 pUCm-T/hIL-17F 质粒为模板,分别利用 P3、P6;P5、P4 两对引物进行 PCR 扩增,获得 PCR1、PCR2,再以纯化的 PCR1、PCR2 为模板,利用 P3、P4 引物进行 PCR 扩增,获得 PCR3(即 EcoR I 酶切位点经 GAATTC $\rightarrow$ GAACTC 同义点突变的 462bp hIL-17F 编码序列,包括 20aa 信号肽序列);并将 PCR3 亚克隆至逆转录病毒载体 pSIV-1 进行 PCR、双酶切和测序鉴定。

**1.2.3 重组逆转录病毒的包装成熟:** 将重组逆转录病毒载体 pSIV-1/hIL-17F 与辅助病毒载体 pHIT456 和 pHIT60 按 2:1:1 的量用脂质体法共转染 6 孔板中 50%~60% 汇片的 293T 包装细胞,以包装释放具有感染能力的成熟重组逆转录病毒(RV-hIL-17F),并制备成熟空载体逆转录病毒(RV)和未转染载体的 293T 细胞作为阴性对照。镜下观察 293T CPE,并转染 48、72h 各时间段收集 RV-hIL-17F 病毒培养上清、RV 病毒培养上清和 293T 细胞对照培养上清,并以上述收集的培养上清为模板,利用 P3、P4 引物进行 PCR 鉴定。

**1.2.4 SMMC-7721 肝癌细胞的感染和阳性细胞的筛选:** 感染前一天,SMMC-7721 以细胞浓度 1 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL,2mL 的量接种于 6 孔板,至细胞生长汇片 50%~60%,吸尽培养基,加入 1mL 上述收集的 RV-hIL-17F 病毒培养上清,同时加入 polybrene 使其终浓度为 8ng/mL,37 $^{\circ}$ C 感染 6h 后,添加含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基至 2.5mL/孔继续培养,隔夜感染重复 3 次,并用 RV 病毒培养上清感染 SMMC-7721 和 293T 细胞对照培养上清培养 SMMC-7721 作为阴性对照。感染 72h 后,收集细胞,按 1:6 稀释,将其置于含 G418(终浓度为 500 $\mu$ g/mL)的选择性培养基中筛选 3 周,并进行克隆化和扩增培养。

**1.2.5 hIL-17F 转基因肝癌细胞的鉴定:** 收集经 G418 筛选的转基因阳性细胞(SMMC-7721/RV-hIL-17F)和培养上清,提取细胞基因组 DNA 和总 RNA。以基因组 DNA 为模板,利用 P3、P4 引物进行 PCR 鉴定。hIL-17F 基因与肝癌细胞基因组的整合,以总

RNA为模板,利用 P3、P4 引物进行 RT-PCR 鉴定 hIL-17F 基因在肝癌细胞中的转录;Western blot 鉴定 rhIL-17F 蛋白在肝癌细胞中的表达,并用 SMMC-7721 和 SMMC-7721/RV 细胞及其培养上清作为阴性对照。

**1.2.6 转基因肝癌细胞增殖活力和细胞周期检测:**取对数生长期的 SMMC-7721/RV-hIL-17F(转基因细胞实验组)、SMMC-7721(细胞对照组)和 SMMC-7721/RV(空载体细胞对照组)3 组肝癌细胞,调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$ /ml,分别以每孔  $100 \mu\text{L}$  的量接种于 96 孔板中培养,共设 4 个平行孔,并设零孔。在相同条件下培养 1、2、3d 各时间段,MTT 法检测各组细胞增殖活力。将上述 3 组肝癌细胞分别在相同条件下培养 3d 收集细胞(约  $1 \times 10^6$ )于  $4^\circ\text{C}$  70%乙醇固定后上流式细胞仪检测细胞周期。

**1.2.7 ELISA 检测转基因肝癌细胞 IL-6、IL-8 和 VEGF 的表达:**将上述 3 组肝癌细胞调整细胞浓度为  $2 \times 10^5$ /mL,分别以每孔 0.5mL 的量接种于 24 孔板中培养,共设 4 个平行孔。在相同条件下培养 48h 后,收集各组细胞培养上清,ELISA 检测培养上清 IL-6、IL-8 和 VEGF 的表达水平。

**1.2.8 rhIL-17F 蛋白的 ECV304 细胞增殖抑制试验:**收集经相同条件下培养 48h 的 SMMC-7721/RV-hIL-17F、SMMC-7721 和 SMMC-7721/RV 细胞培养上清用于 ECV304 细胞增殖抑制试验。取对数生长期的 ECV304 细胞,调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$ /mL,滴入 96 孔板,每孔加入  $100 \mu\text{L}$ 。待细胞贴壁后,换入 100%、50%、25%、12.5% 不同浓度的 rhIL-17F 表达上清  $100 \mu\text{L}$  培养,并设相应浓度的 SMMC-7721、SMMC-7721/RV 细胞培养上清作对照,实验共设 4 个平行孔,并设零孔。分别培养 1、2、3d 各时间段,MTT 法检测 ECV304 细胞增殖活力,并根据抑制率(%) =  $(1 - \text{实验组吸光度值}/\text{细胞对照吸光度值}) \times 100\%$  公式计算细胞生长抑制率。

**1.2.9 裸鼠皮下成瘤试验:**取雌性 BALB/C 裸鼠 10 只 4~5 周龄,随机分成 2 组,每组 5 只,实验组接种 SMMC-7721/RV-hIL-17F 转基因细胞,阴性对照组接种 SMMC-7721/RV 空载体细胞,每只裸鼠右前肢腋部皮下接种浓度为  $2 \times 10^7$ /mL 的单细胞悬液  $100 \mu\text{L}$ 。无菌条件下饲养,以皮下结节直径超过 0.5cm 为成瘤标准,记录成瘤时间。连续观察 5 周,处死裸鼠分离皮下肿瘤,测量肿瘤最大及最小直径并称量,根据:肿瘤体积( $\text{cm}^3$ ) =  $(\text{长径} \times \text{短径}^2) / 2$  公式计算瘤体体积和瘤体重量计算抑瘤率。

**1.2.10 免疫组化检测:**将裸鼠瘤组织以 10% 甲醛常规固定、石蜡包埋,切片采用免疫组化 SP 法分别检测瘤组织中 hIL-17F、VEGF 和 mCD34 的表达。随机选取 10 个视野计数平均每个视野下的血管数,进行血管形成检测。

**1.2.11 统计学处理:**采用 SPSS10.0 统计学软件进行单因素方差分析,数据测定结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 hIL-17F 基因的克隆和鉴定

以 PHA 活化的 PBMCs 总 RNA 为模板,利用 P1、P2 引物 RT-PCR 所扩增产物约为 500bp,同 hIL-17F 基因理论值大小相一致(图 1(A))。以挑取白色菌落所抽提的质粒为模板,PCR 能扩增出约 500bp 的基因片段(图 1(B)),表明其已亚克隆至 pUCm-T 载体。测序结果证实了所克隆的基因确为 hIL-17F 基因,与 GenBank(登录号:AF384857)报道的序列完全一致。

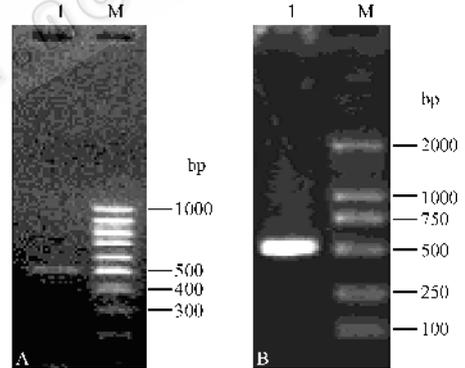


图 1 hIL-17F 基因的克隆和鉴定

Fig.1 Cloning and identification of hIL-17F gene

(A) RT-PCR of hIL-17F; 1: RT-PCR product; M: 100bp DNA ladder; (B) Identification of pUCm-T/hIL-17F by PCR; 1: PCR product; M: DL2000 marker.

### 2.2 pSIV-1/hIL-17F 重组逆转录病毒载体的构建和鉴定

以质粒 pUCm-T/hIL-17F 为模板,利用 P3、P6; P5、P4 两对引物分别都能扩增出 PCR1 和 PCR2 产物,以 PCR1、PCR2 为模板,利用 P3、P4 引物能扩增出 PCR3 产物,且 PCR1、PCR2 和 PCR3 产物大小与预计扩增的基因片段大小相一致(图 2(A))。重组载体经 PCR 能扩增出约 460bp 大小的条带(图 2(B))和 *Eco*R I、*Bam*H I 双酶切能释放出相同大小的片段(图 2(C))均表明目的基因片段已成功亚克隆至逆转录病毒载体 pSIV-1。DNA 序列测定证实亚克隆的 462bp hIL-17F 基因除有一处为构建重组逆

转录病毒载体而自行设计的同义点突变(AAT→AAC 均为 Asn)外,其余均与 GenBank 报道的序列完全一致,成功构建了 pSIV-1/hIL-17F 重组逆转录病毒载体。

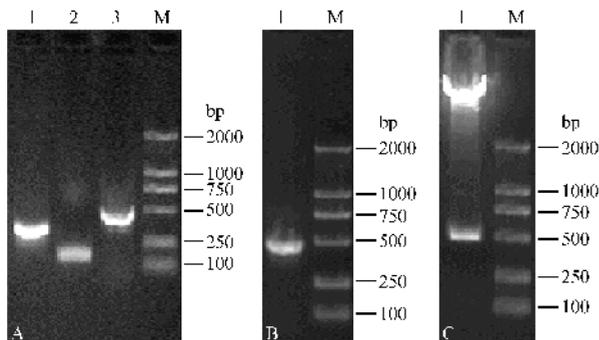


图2 重组逆转录病毒载体 pSIV-1/hIL-17F 的构建和鉴定

Fig.2 Construction and identification of recombinant retrovirus vector pSIV-1/hIL-17F

(A) PCR of hIL-17F, 1. PCR1 product; 2. PCR2 product; 3. PCR3 product; M. DL2000 marker; (B) Identification of pSIV-1/hIL-17F by PCR, 1: PCR product; M: DL2000 marker; (C) Identification of pSIV-1/hIL-17F by restriction endonuclease digestion, 1: pSIV-1/hIL-17F digested by *EcoR*I and *Bam*HI; M: DL2000 marker.

### 2.3 重组逆转录病毒的获得

pSIV-1/hIL-17F 和 pSIV-1 分别与辅助病毒载体 pHIT456 和 pHIT60 共转染 48、72h 后,转染组 293T 细胞圆缩、脱落,均出现 CPE,而 293T 细胞对照则生长良好。结果表明(重组)逆转录病毒载体在 293T 细胞中进行了包装成熟和裂细胞释放。以收集的病毒培养上清为模板,利用 P3、P4 引物进行 PCR 鉴定(图 3)进一步证明了携有 hIL-17F 基因的重组逆转录病毒载体在 293T 细胞中成功地进行了包装成熟和释放。

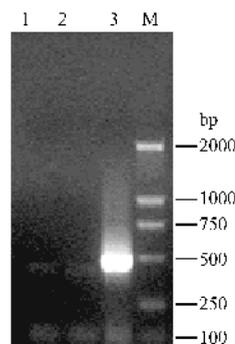


图3 293T 细胞培养上清成熟重组逆转录病毒的鉴定

Fig.3 Identification of mature recombinant retrovirus in 293T supernatant

1 293T supernatant control by PCR; 2 :293T/RV supernatant control by PCR; 3 293T/RV-hIL-17F supernatant by PCR; M: DL2000 marker.

### 2.4 转基因肝癌细胞的鉴定

以基因组 DNA 为模板进行 PCR 鉴定结果[图 4 (A)]和 RT-PCR 鉴定结果[图 4 (B)]显示,SMMC-7721 转 hIL-17F 基因的细胞中均有一条约 460bp 的扩增条带,而两组阴性对照均无此特异性条带产生;Western blot 结果[图 4 (C)]显示 SMMC-7721 转 hIL-17F 基因的细胞培养上清中有一条约 20kD 的与抗 hIL-17F 抗体特异性结合的条带,而两组阴性对照细胞培养上清在该位置均无此条带出现。结果表明导入的外源 hIL-17F 基因在 SMMC-7721 细胞中不仅能与肝癌细胞基因组整合和转录,而且能成功地表达目的蛋白。

### 2.5 转基因肝癌细胞增殖活力和细胞周期检测

由图 5 可见,SMMC-7721/RV-hIL-17F 转基因肝癌细胞组增殖活力与 SMMC-7721 细胞对照组和 SMMC-7721/RV 空载体细胞对照组相当( $P > 0.05$ )。MTT 检测结果表明 hIL-17F 对 SMMC-7721 肝癌细胞

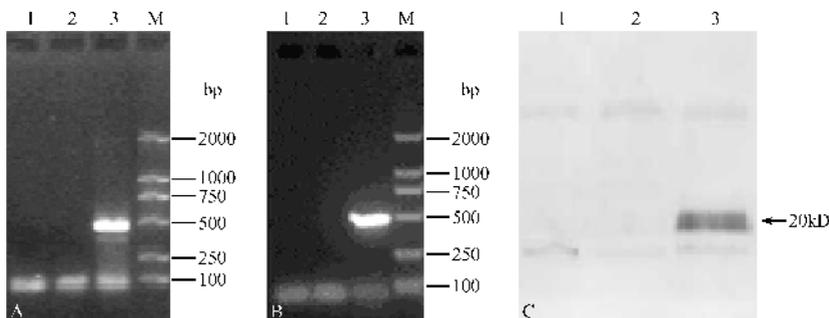


图4 hIL-17F 转基因肝癌细胞的鉴定

Fig.4 Identification of hIL-17F-transgenic SMMC-7721 cell line

(A) Identification of gene integration by PCR. 1: SMMC-7721 cell control; 2: SMMC-7721/RV cell control; 3: SMMC-7721/RV-hIL-17F cell; M: DL2000 marker; (B) Identification of gene transcription by RT-PCR, 1: SMMC-7721 cell control; 2: SMMC-7721/RV cell control; 3: SMMC-7721/RV-hIL-17F cell; M: DL2000 marker; (C) Identification of gene expression by Western blot, 1: SMMC-7721 supernatant control; 2: SMMC-7721/RV supernatant control; 3: SMMC-7721/RV-hIL-17F supernatant.

的体外增殖无影响。FCM 检测(结果略)进一步表明 hIL-17F 不能改变 SMMC-7721 肝癌细胞的细胞周期,这与 MTT 法检测细胞增殖活力结果相一致。

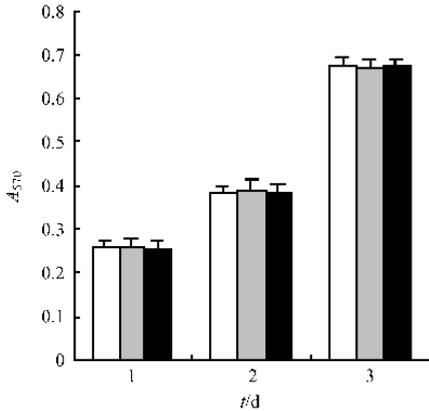


图5 hIL-17F 对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖的影响

Fig.5 The effect of hIL-17F on SMMC-7721 proliferation

□ SMMC-7721 □ SMMC-7721/RV ■ SMMC-7721/RV-hIL-17F

2.6 转基因肝癌细胞 IL-6、IL-8 和 VEGF 表达检测

ELISA 结果(图6)显示,SMMC-7721/RV-hIL-17F 转基因肝癌细胞组 IL-6、IL-8 和 VEGF 的表达与 SMMC-7721 细胞对照组和 SMMC-7721/RV 空载体细胞对照组比较均具显著性差异( $P < 0.01$ ),其分别下调了 11 倍、2 倍和 0.5 倍,而 SMMC-7721 细胞对照组与 SMMC-7721/RV 空载体细胞对照组比较无差异( $P > 0.05$ )。结果表明 hIL-17F 具有下调 SMMC-7721 肝癌细胞表达 IL-6、IL-8 和 VEGF 的生物学效应。

2.7 rhIL-17F 蛋白对 ECV304 细胞的生长抑制作用

由图7可见,经 100、50、25、12.5% 不同浓度的肝癌细胞 rhIL-17F 表达上清作用 24、48、72h 不同时间的 ECV304 细胞增殖能力均低于同一时间相同培养上清浓度比较的细胞对照组和空载体细胞对照组( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ),而细胞对照组与空载体细胞对照组之间无差别( $P > 0.05$ )。不同浓度 rhIL-

17F 表达上清作用不同时间的 ECV304 细胞生长抑制率见表 2。由表 2 可见,在同一浓度不同培养时间比较,时间越长,其细胞生长抑制率越高;在同一培养时间不同浓度比较,浓度越高,其细胞生长抑制率也越高。结果表明 SMMC-7721 肝癌细胞表达的 rhIL-17F 蛋白具有抑制 ECV304 细胞增殖的作用,并呈一定的剂量依赖性和时间依赖性。

表 2 rhIL-17F 表达上清作用不同时间的 ECV304 细胞生长抑制率( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 2 Growth inhibition rate of ECV304 cultured by rhIL-17F supernatant in different time( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

培养上清浓度 (%)	Growth inhibition rate (%)		
	24h	48h	72h
100	13.30 ± 3.48 <sup>1)</sup>	19.99 ± 1.09 <sup>2)</sup>	29.68 ± 0.90 <sup>3)</sup>
50	6.09 ± 2.21 <sup>4)</sup>	12.82 ± 3.59 <sup>5)</sup>	21.09 ± 2.53 <sup>6)</sup>
25	5.78 ± 3.85 <sup>7)</sup>	8.30 ± 4.86 <sup>8)</sup>	13.03 ± 3.95 <sup>9)</sup>
12.5	4.93 ± 1.85 <sup>10)</sup>	5.81 ± 3.05 <sup>11)</sup>	8.40 ± 2.51 <sup>12)</sup>

Compared at same concentration, in different time: 1) 2) 3) compared with each other,  $P < 0.01$ ; 4) 5) 6) compared with each other,  $P < 0.01$ ; 9) compared with 7) 8),  $P < 0.01$ ; 7) compared with 8),  $P < 0.05$ ; 12) compared with 10) 11),  $P < 0.05$ ; 10) compared with 11),  $P > 0.05$ . Compared in same time, at different concentration: 3) 6) 9) 12) compared with each other,  $P < 0.01$ ; 2) compared with 5) 8) 11),  $P < 0.01$ ; 5) compared with 8),  $P > 0.05$ ; 8) compared with 11),  $P > 0.05$ ; 1) compared with 4) 7) 10),  $P < 0.01$ ; 4) 7) 10) compared with each other,  $P > 0.05$ .

2.8 转基因肝癌细胞裸鼠体内致瘤性差异

2.8.1 成瘤时间: SMMC-7721/RV 空载体细胞对照组 5 只裸鼠在接种瘤细胞后第 10 ~ 13d 成瘤,成瘤时间为(11.6 ± 1.1)d;而 SMMC-7721/RV-hIL-17F 转基因细胞组 5 只裸鼠在接种瘤细胞后第 18 ~ 20d 才成瘤,成瘤时间为(19.2 ± 0.8)d,其成瘤时间明显长于 SMMC-7721/RV 空载体细胞对照组( $P < 0.01$ )。

2.8.2 肿瘤终体积和重量: 各组瘤细胞接种 5 周后,处死动物和分离皮下肿瘤(图8),测量肿瘤最大及最小直径,计算平均终体积并称重。空载体细胞对照组

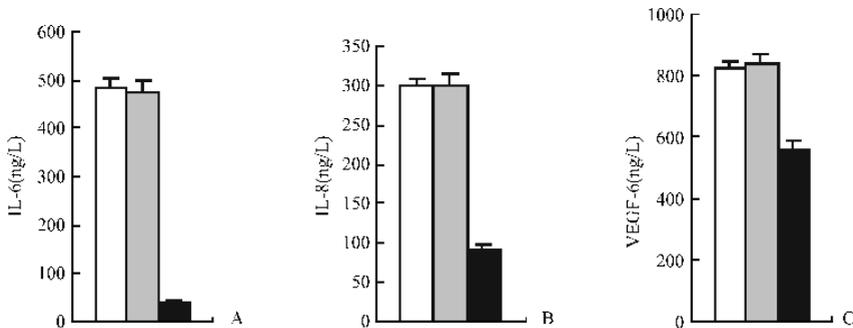


图6 ELISA 检测转基因 SMMC-7721 细胞 IL-6、IL-8 和 VEGF 表达水平

Fig.6 The concentrations of IL-6, IL-8, and VEGF determined by ELISA

(A, B, C) Detection of human IL-6 (A), IL-8 (B), and VEGF (C) by ELISA, respectively.

□ SMMC-7721 □ SMMC-7721/RV ■ SMMC-7721/RV-hIL-17F © 中国微生物菌种研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

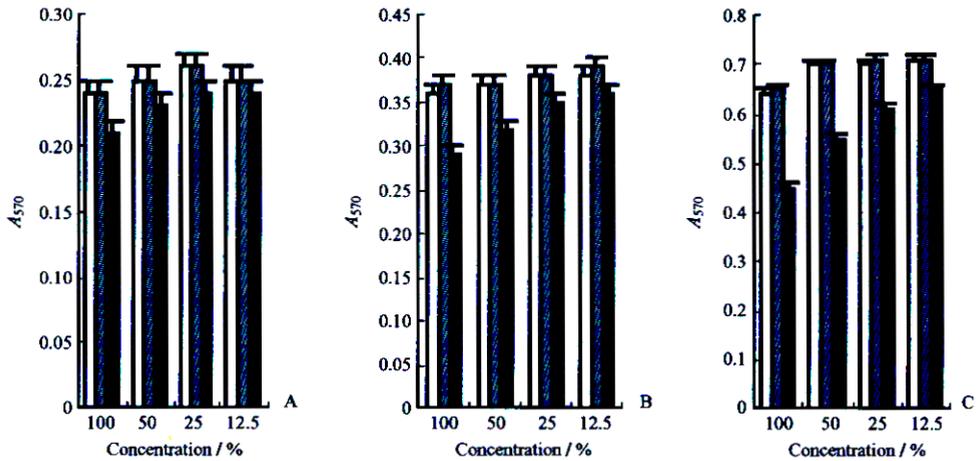


图 7 rhIL-17F 表达上清对 ECV304 细胞增殖的影响

Fig. 7 The effect of rhIL-17F supernatant on ECV304 proliferation

(A, B, C) The growth inhibition of 12.5, 25, 50, and 100% rhIL-17F supernatant on ECV304 for 24h (A), 48h (B), and 72h (C), respectively.

□ ECV304 cultured by SMMC-7721 Supernatant; ▨ ECV304 cultured by SMMC-7721/RV Supernatant; ■ ECV304 cultured by SMMC-7721/RV-hIL-17F Supernatant.

和转基因细胞组肿瘤平均终体积依次为(0.66 ± 0.10) cm<sup>3</sup>、(0.43 ± 0.10) cm<sup>3</sup>; 肿瘤平均重量依次为(0.77 ± 0.15) g、(0.44 ± 0.05) g。转基因细胞组肿瘤平均终体积和重量均明显小于空载体细胞对照组 (P < 0.01), 其抑瘤率为 41.38 ± 11.15%。结果表明 hIL-17F 在裸鼠体内具有抑制人肝癌移植瘤生长的作用。

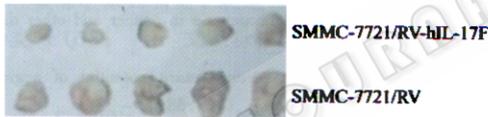


图 8 裸鼠皮下人肝癌移植瘤照片

Fig. 8 Human hepatocarcinoma xenograft tumor in nude mice

**2.8.3 移植瘤组织 hIL-17F 表达鉴定:** hIL-17F 免疫组化染色结果 (图 9) 显示, 转基因细胞组移植瘤组织中呈棕黄色颗粒状分布, 而空载体细胞对照组结果为阴性。结果表明转基因肝癌细胞在裸鼠体内同样能表达 hIL-17F。

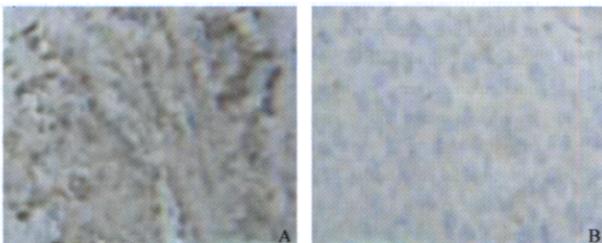


图 9 移植瘤组织 hIL-17F 表达的免疫组化鉴定 (× 200)

Fig. 9 Identification of human IL-17F expression in xenograft tumor tissue by IH (× 200)

A: SMMC-7721/RV-hIL-17F; B: SMMC-7721/RV.

**2.8.4 移植瘤组织 hVEGF 表达检测:** VEGF 免疫组化染色结果 (图 10) 显示, 转基因细胞组瘤组织中 VEGF 棕黄色颗粒染色较空载体细胞对照组减弱, 这与体外细胞水平 ELISA 检测结果基本相一致。结果表明 hIL-17F 在裸鼠体内同样具有抑制 SMMC-7721 肝癌细胞 VEGF 的表达。

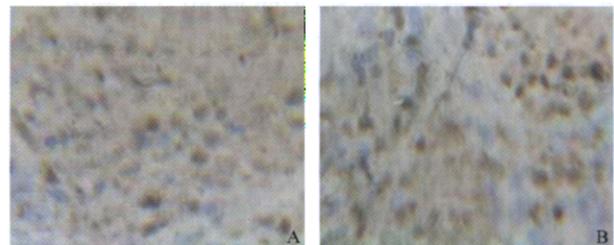


图 10 移植瘤组织人 VEGF 表达的免疫组化检测 (× 200)

Fig. 10 Detection of human VEGF expression in xenograft tumor tissue by IH (× 200)

A: SMMC-7721/RV-hIL-17F; B: SMMC-7721/RV.

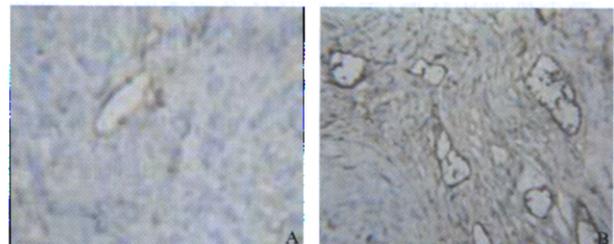


图 11 移植瘤组织小鼠 CD34 表达的免疫组化检测 (× 200)

Fig. 11 Detection of mouse CD34 expression in xenograft tumor tissue by IH (× 200)

A: SMMC-7721/RV-hIL-17F; B: SMMC-7721/RV.

**2.8.5 移植瘤组织血管形成分析: CD34 免疫组化**

染色结果(图 11)显示,空载体细胞对照组组织血管丰富,管壁完好,CD34 阳性表达高,其微血管数为  $7.1 \pm 1.2$ ,而转基因细胞组组织血管稀少,管壁支架塌陷,CD34 阳性表达低,其微血管数仅为  $2.1 \pm 0.8$ ,与空载体细胞对照组比较明显减少,降低了近 3 倍,差异有显著性( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

hIL-17F 是由活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞和单核细胞产生的具有抗血管形成活性的细胞因子,而国内外对其研究报道甚少,为进一步研究 hIL-17F 的抗血管形成活性及其在抗血管生成的肿瘤治疗中开展基础和应用研究,本文首先 RT-PCR 从 PHA 活化的人 PBMCs 中成功克隆了 hIL-17F 基因。hIL-17F 基因其开放阅读框报道有两种:一种为 462bp<sup>[4]</sup>,起始密码子 ATG 附近与 Kozak 序列几乎完全吻合,有利于翻译起始;另一种为 492bp<sup>[5]</sup>,根据蛋白质翻译起始于第一个 ATG 原则而报道,因为有趣的是在上述 462bp 开放阅读框起始密码子 ATG 的上游(相隔 30bp)也存在 ATG。但上述两种阅读框编码的蛋白分别为 20aa 和 30aa,均生成相同的 133aa 成熟单体<sup>[4,5]</sup>。本文从克隆 hIL-17F 编码区全长基因的角度,克隆了开放阅读框为 492bp 的 hIL-17F 基因。

逆转录病毒载体 pSIV-1 选择的酶切位点只有 EcoR I 和 BamH I,而 hIL-17F 基因内含 EcoR I 酶切位点,因而本文利用 PCR 法成功构建了 hIL-17F 基因内 GAATTC→GAACTC 同义点突变的重组逆转录病毒载体 pSIV-1/hIL-17F,并在其辅助病毒载体的协助下,经 293T 细胞包装成具有感染能力的成熟重组逆转录病毒,再感染 SMMC-7721 肝癌细胞,通过筛选获得稳定表达 hIL-17F 的转基因肝癌细胞。逆转录病毒载体经包装细胞包装成熟后,其病毒滴度一般来说都比较低,本文隔夜反复感染的方法,成功建立了以逆转录病毒为载体感染的 hIL-17F 转基因肝癌细胞。

MTT 和 FCM 检测结果表明 hIL-17F 在体外不能改变 SMMC-7721 肝癌细胞的增殖活力和细胞周期,但 ELISA 检测结果显示其能显著下调 SMMC-7721 表达 IL-6,IL-8 和 VEGF 的生物学效应。有报道认为 IL-6 和 IL-8 与肿瘤的生长和转移密切相关<sup>[6-9]</sup>,提示 hIL-17F 通过下调肝癌细胞 IL-6 和 IL-8 的表达可能参与了抑制裸鼠人肝癌移植瘤的生长。VEGF 是最重要的血管生成因子,本实验中 hIL-17F 能下调 SMMC-7721 肝癌细胞 VEGF 的表达,并且提示其

也可能通过下调 ECV304 等其他内皮细胞 VEGF 的表达而协同参与抗血管形成和抑制肿瘤的生长和转移。目前认为肿瘤细胞分泌的 VEGF 不仅以旁分泌方式作用于血管内皮细胞和诱导血管新生,也可通过自分泌途径与自身表达的血管内皮生长因子受体 flt-1 和/或 KDR 结合而促进癌细胞的生长、迁移或抗凋亡<sup>[10]</sup>。但本文 hIL-17F 下调肝癌细胞 VEGF 的表达体外对肝癌细胞的增殖活力和细胞周期无影响,其机理还有待于进一步研究。ECV304 生长抑制试验表明转基因肝癌细胞表达的 rhIL-17F 上清具有抑制 ECV304 内皮细胞增殖的活性,且呈一定的剂量和时间依赖性。裸鼠皮下成瘤试验证实 hIL-17F 能明显地抑制裸鼠人肝癌移植瘤的生长,其转基因肝癌细胞致瘤能力减弱,成瘤时间延长,瘤体和重量明显减小,VEGF 和 CD34 表达降低,血管形成能力下降。结果表明 hIL-17F 在裸鼠体内通过显著抑制肿瘤血管形成而具有明显的抑瘤效应。

本文 hIL-17F 转基因肝癌细胞的建立及对 SMMC-7721 生物学特性影响和裸鼠人肝癌移植瘤生长抑制作用的研究,为进一步开展 hIL-17F 的抗血管生成治疗肿瘤的基础研究奠定了基础。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, **407**: 249 - 257
- [2] Gasparini G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs*, 1999, **58**: 17 - 38
- [3] Gasparini G, Longo R, Toi M *et al.* Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005, **2**: 562 - 577
- [4] Stames T, Robertson M, Sledge G *et al.* Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol*, 2001, **167**: 4137 - 4140
- [5] Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP *et al.* IL-17s adopt a cysteine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J*, 2001, **20**: 5332 - 5341
- [6] Tartour E, Fossiez F, Joyeux I *et al.* Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res*, 1999, **59**: 3698 - 3704
- [7] Scala G, Quinto I, Ruocco MR *et al.* Expression of an exogenous interleukin 6 gene in human Epstein Barr virus B cells confers growth advantage and in vivo tumorigenicity. *J Exp Med*, 1990, **172**: 61 - 68
- [8] Durandy A, Emilie D, Peuchmaur M *et al.* Role of IL-6 in promoting growth of human EBV-induced B-cell tumors in severe combined immunodeficient mice. *J Immunol*, 1994, **152**: 5361 - 5367
- [9] Singh RK, Gutman M, Radinsky R *et al.* Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res*, 1994, **54**: 3242 - 3247
- [10] Mercurio AM, Bachelder RE, Bates RC *et al.* Autocrine signaling in carcinoma VEGF and the alpha6beta4 integrin. *Semin Cancer*