

# 白细胞介素-18 对 Lewis 肺癌小鼠移植瘤生长及移植瘤细胞凋亡的作用

杨升<sup>1</sup>, 卢辉山<sup>1</sup>, 陈湘琦<sup>2</sup>, 林挺岩<sup>2</sup>, 李志鹰<sup>2</sup>, 康明强<sup>3</sup>

**Effect of IL-18 on Growth and Apoptosis of Lewis Lung Cancer Xenografts in C57BL/6 Mice**

YANG Sheng<sup>1</sup>, LU Hui-shan<sup>1</sup>, CHEN Xiang-qi<sup>2</sup>, LIN Ting-yan<sup>2</sup>, LI Zhi-ying<sup>2</sup>, KANG Ming-qiang<sup>3</sup>

1. Department of Oncology, The Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China, 2. Department of Respiratory Diseases, 3. Department of Thoracic Surgery

Corresponding Author: Lu Huishan, E-mail: lhs801@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of IL-18 on growth and apoptosis of Lewis lung cancer xenograft growth in C57BL/6 mice. **Methods** C57BL/6 mice implanted with Lewis lung cancer cells were randomly divided into two groups: IL-18 treatment group and bearing tumor model group. Seven days after tumor implantation, IL-18 and saline were given by intraperitoneal injection daily for 7 days. All the animals health status were monitored, the volume and weight of subcutaneous tumors were measured, the xenografts TUNEL was used to assess apoptotic index of tumor cells in the xenografts. **Results** IL-18 effectively inhibits the growth of xenografts by 75% and induces apoptosis of tumor cells in the xenografts while no significant effect on the health situation of animals was observed. **Conclusion** IL-18 may be inhibits the growth of Lewis lung cancer by inducing apoptosis of tumor cells and it may be a potential novel therapy for Lewis lung cancer.

**Key words:** IL-18; Lung cancer; Xenografts; Apoptosis

**摘要:目的** 探讨 IL-18 对 Lewis 肺癌小鼠移植瘤生长及移植瘤细胞凋亡的作用。**方法** 复制 Lewis 肺癌小鼠模型 16 只,随机分为 IL-18 治疗组与荷瘤模型组,每组 8 只,分别予 IL-18、生理盐水于接种第 7 日起每日 1 次腹腔注射,连续 7 次。观察 IL-18 对小鼠健康状况、移植瘤变化的影响,并用 TUNEL 方法检测其对移植瘤细胞凋亡的作用。**结果** IL-18 对小鼠健康状况无明显影响,对移植瘤的生长有抑制作用,肿瘤抑制率为 75%,对移植瘤细胞的凋亡有促进作用。**结论** IL-18 可通过促进肿瘤细胞凋亡等途径对 Lewis 肺癌产生抑制作用,有望成为肺癌治疗的新策略。

**关键词:** IL-18; 肺癌; 移植瘤; 凋亡

**中图分类号:** R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)07-0563-03

## 0 引言

肺癌是世界上发病率及病死率最高的恶性肿瘤,随着国际上生物治疗的兴起,给恶性肿瘤的治疗带来了新希望<sup>[1-2]</sup>。IL-18 作为新近发现的一种多效能细胞因子,在抗肿瘤、免疫调节等方面有着积极的作用<sup>[3-4]</sup>。本研究观察了 IL-18 对小鼠移植瘤生长及移植瘤细胞凋亡的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

C57BL/6 小鼠 16 只,6 周龄,雄性,体重(20±2)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。Lewis 肺癌细胞株,由福建医科大学药学院赠予。IL-18 购自上海晶美公司,来自美国 Sigma 公司, TUNEL 试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司,来自美国 Roche 公司。

### 1.2 Lewis 肺癌模型的建立<sup>[5]</sup>

C57BL/6 小鼠饲养于无特定病原菌(special pathogen free, SPF)环境,将常规复苏后的 Lewis 肺癌细胞接种于小鼠右腋部皮下,当移植瘤生长至直径 2.0 cm 左右,选择肿瘤生长旺盛、且动物一般状况良好的荷瘤鼠,颈椎脱臼处死,而后消毒、切开皮肤,剖取肿瘤组织,用生理盐水以 1:5 的比例均浆

收稿日期:2008-09-03;修回日期:2008-11-05

基金项目:福建省卫生厅青年科研课题资助项目(2005-2-29);福建省自然科学基金计划资助项目(2006J0342)

作者单位:1. 350001 福州,福建医科大学附属协和医院肿瘤科,2. 呼吸内科,3. 胸外科

通信作者:卢辉山, E-mail: lhs801@163.com

作者简介:杨升(1969-),男,硕士,副主任医师,主要从事肿瘤化疗与肿瘤介入微创治疗临床和基础研究工作

制备成细胞悬液,将 Lewis 肺癌单细胞悬液调整为  $2 \times 10^7/\text{ml}$ ,于小鼠右腋部皮下接种 0.1 ml 细胞悬液,密切观察肿瘤生长。

### 1.3 实验动物分组与处理

C57BL/6 小鼠接种后按随机数字法分为 IL-18 治疗组与荷瘤模型组,每组 8 只。于接种第 7 日起 IL-18 治疗组、荷瘤模型组均每日 1 次分别给予 IL-18  $1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 、生理盐水  $100 \mu\text{l}$ ,腹腔注射,连续给药 7 次。实验期间观察小鼠进食、排便、精神状态及活动情况。于接种后第 7、9、11、13、15、17、19 天应用游标卡尺(精度为 0.1 mm)测量并记录小鼠皮下瘤结节大小,计算肿瘤体积,  $V(\text{mm}^3) = 0.52 ab^2$  (a 为瘤体最长径, b 为最短径),取每组均数,制作肿瘤生长曲线。于接种后第 19 天,统一以 10% 水合氯醛  $3 \text{ ml}/\text{kg}$  麻醉小鼠,而后剥离皮下瘤,称瘤重,计算肿瘤抑制率。肿瘤抑制率 = (荷瘤模型组平均瘤重 - IL-18 治疗组平均瘤重) / 荷瘤模型组平均瘤重  $\times 100\%$ 。最后以常规 10% 中性甲醛固定,制成石蜡切片备用。

### 1.4 TUNEL 检测细胞凋亡

常规石蜡切片脱蜡,梯度酒精水化,PBS 冲洗  $2 \text{ min} \times 3$  次,采用蛋白酶 K ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $10 \text{ mM}$  Tris/HCl,  $\text{pH} = 7.4 \sim 8.0$ ),  $21 \text{ }^\circ\text{C} \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$  消化  $15 \sim 30 \text{ min}$ , PBS 冲洗  $2 \text{ min} \times 3$  次,加入  $25 \sim 50 \mu\text{l}$  TUNEL 反应液,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  作用  $60 \text{ min}$ , PBS 冲洗  $3 \text{ min} \times 3$  次,滴加  $25 \sim 50 \mu\text{l}$  的 AP 抗体,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  作用  $30 \text{ min}$ , PBS 冲洗  $3 \text{ min} \times 3$  次,滴加 BCIP/NBT,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  作用  $20 \text{ min}$ , PBS 冲洗  $3 \text{ min} \times 3$  次,核快红复染,封片,烘干。镜下观察染色切片,以细胞核染成蓝黑色者为凋亡细胞,在 400 倍视野下随机选取 5 个癌细胞区,记数细胞总数和凋亡细胞数,计算 TUNEL 染色阳性细胞的百分率,即为凋亡指数 (AI):  $\text{AI} = \text{凋亡细胞数}/\text{癌细胞总数} \times 100\%$ 。

### 1.5 统计学方法

应用 SAS 统计分析软件。实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,肿瘤平均体积比较采用重复测量方差分析,肿瘤平均瘤重、肿瘤细胞凋亡指数比较采用成组  $t$  检

验。  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IL-18 对小鼠肿瘤生长的影响

接种后第 7 日全部小鼠成瘤,皮下结节直径均超过 0.5 cm,成瘤率 100%。IL-18 治疗组小鼠的肿瘤生长速度逐渐减缓,明显受到抑制,而荷瘤模型组小鼠的肿瘤生长速度较快,生长曲线上升明显,见图 1。19 日后 IL-18 治疗组与荷瘤模型组小鼠的肿瘤平均体积之间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), IL-18 治疗组与荷瘤模型组小鼠的肿瘤平均瘤重之间差异亦有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),见表 1。

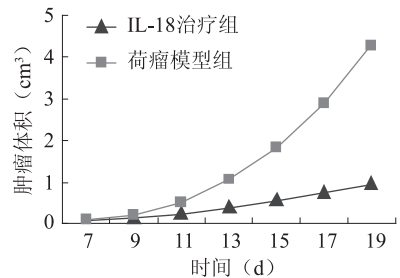


图 1 肿瘤生长曲线

Figure 1 Tumor growth curve

实验期间,各组小鼠健康状况均可,进食、排便、精神及活动等都比较正常,小鼠对 IL-18 治疗的耐受性较好,未见明显的出血、腹泻及其他药物副作用,实验结束前各组小鼠无死亡,均存活,IL-18 治疗组小鼠的体重治疗后较治疗前增加 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 IL-18 对小鼠肿瘤凋亡的作用

TUNEL 检测结果发现,IL-18 治疗组小鼠的肿瘤凋亡细胞较多见,散在分布,典型者细胞间距增宽,细胞质和细胞核聚缩,而荷瘤模型组小鼠的肿瘤细胞密集排列,深染,异型性相对明显,核分裂相较多见,凋亡细胞少见,零星分布,见图 2、3。IL-18 治疗组和荷瘤模型组小鼠的肿瘤细胞凋亡指数之间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),见表 1。此结果表明,IL-18 可以促进肿瘤细胞凋亡。

表 1 接种后第 19 日各组间小鼠的肿瘤平均体积、瘤重的比较、肿瘤抑制率及凋亡指数 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of average transplanted tumor volume, tumor weight, tumor control rate and apoptotic index in two groups on 19th day ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数 (只)	肿瘤平均体积 (cm³)	F	P	肿瘤平均瘤重 (g)	t	P	肿瘤抑制率 (%)	凋亡指数 (%)	t	P
IL-18 治疗组	8	$0.95 \pm 0.84^*$	11.902	0.004	$1.53 \pm 1.43^\#$	4.195	0.001	75	$6.75 \pm 2.49^\Delta$	3.74	0.002
荷瘤模型组	8	$4.30 \pm 2.35$	-	-	$6.07 \pm 2.71$	-	-	-	$3.25 \pm 0.89$	-	-

\*: vs. 荷瘤模型组  $P < 0.01$ , #: vs. 荷瘤模型组  $P < 0.01$ ,  $\Delta$ : vs. 荷瘤模型组  $P < 0.01$

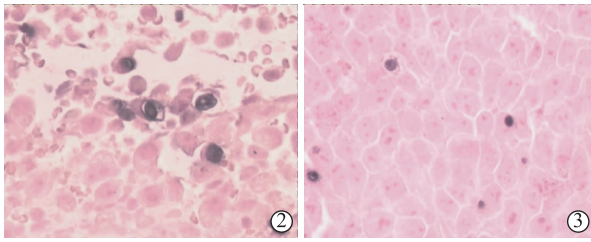


图 2 IL-18 治疗组肿瘤细胞凋亡 (Tunel×400)

图 3 荷瘤模型组肿瘤细胞凋亡 (Tunel×400)

Figure 2 The apoptosis of the IL-18 treated group (Tunel×400)

Figure 3 The apoptosis of the bearing tumor model group (Tunel×400)

### 3 讨论

1995 年 Okamura 等<sup>[6]</sup>首次在“Nature”报道从鼠内毒素休克的肝中可分离并克隆出一种由应激而产生的蛋白,该蛋白具有强诱生 IFN- $\gamma$  能力,故初始命名为 IFN- $\gamma$  诱导因子(interferon gamma inducing factor,IGIF)。1996 年 Ushio 等<sup>[7]</sup>克隆了人类 IGIF 的 cDNA 并在 E. coli 中表达,随后将其命名为白细胞介素 18(interleukin18, IL-18)。目前,诸多研究显示 IL-18 的抗肿瘤作用与诱导肿瘤细胞的凋亡也有着密切联系,愈益引起学者们的重视<sup>[8-9]</sup>。

现代分子生物学与免疫学研究证明,凋亡障碍是肿瘤细胞得以增殖的重要因素,因此诱导凋亡是肿瘤细胞得以抑制的有效机制。1997 年 Ohtsuki 等<sup>[10]</sup>利用电泳与 FACS 分析发现,人骨髓单核细胞 KG-1 细胞在 IL-18 100 mg/ml 浓度作用 20 h 后发生了明显的细胞凋亡,并发现 KG-1 细胞 p53 和 Fas 配体表达的增强,应用表达 Fas 配体细胞和抗 Fas 抗体与拮抗剂等检验,显示 KG-1 细胞 Fas 配体及其受体均有功能,结果证明 IL-18 可通过提高 KG-1 细胞 Fas 配体表达,经 Fas 途径诱导了细胞凋亡。2000 年 Okano 等<sup>[11]</sup>观察到重组犬 IL-18 可导致移植到严重联合免疫缺陷病(SCID)小鼠上的犬乳癌细胞系完全消失,表明 IL-18 无需免疫细胞介导即可直接诱导细胞凋亡而杀伤乳癌细胞。2006 年 Kang 等<sup>[8]</sup>实验揭示丝裂霉素(MMC)诱导宫颈癌的细胞凋亡,不仅通过 caspase-8、caspase-3 所依赖的 fas/fasl 途径,而且还通过调节 IL-18 的表达以及激活与 IL-18 相关 NF- $\kappa$ B 核转录因子的活性而发挥作用。本研究结果显示 IL-18 对 Lewis 肺癌小鼠的健康状况无明显的影响,但对移植瘤生长则有明显的抑制作用,其肿瘤抑制率达 75%,并且 TUNEL 检测发现 IL-18 干预的治疗组小鼠肿瘤细胞凋亡指数明显高于荷瘤的模型组( $P < 0.01$ )。因此,本研究结果提示 IL-18 可能通过促进肿瘤细胞凋亡等途

径对 Lewis 肺癌产生抑制作用。

虽然原有药物不断改进发展,新药不断开发问世,但其疗效、安全性等仍未能达到令人满意的效果,寻找新的抗肿瘤药物、提高肿瘤治疗的临床疗效倍受关注。因此,进一步深入研究 IL-18 抗肿瘤作用机制,有望开辟肿瘤治疗的一条新局面<sup>[12-13]</sup>。

### 参考文献:

- [1] Seve P, Dumontet C. Chemoresistance in non-small lung cancer[J]. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 2005, 5(1): 73-88.
- [2] 傅永强,张在云,柳月安,等.肺癌细胞致敏树突状细胞疫苗的体外外抗肿瘤作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(6): 562-564.
- [3] Robertson MJ, Mier JW, Logan T, et al. Clinical and biological effects of recombinant human interleukin-18 administered by intravenous infusion to patients with advanced cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(14 pt 1): 4265-4273.
- [4] Bachmann M, Dragoi C, Poleganov MA, et al. Interleukin-18 directly activates T-bet expression and function via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB in acute myeloid leukemia-derived predendritic KG-1 cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(2): 723-731.
- [5] Wigginton JM, Lee JK, Wiltrout TA, et al. Synergistic Engagement of an Ineffective Endogenous Anti Tumor Immune Response and Induction of IFN  $\gamma$  and Fas Ligand Dependent Tumor Eradication by Combined Administration of IL-18 and IL-2[J]. *J Immunol*, 2002, 169(8): 4467-4474.
- [6] Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells[J]. *Nature*, 1995, 378(6552): 88-91.
- [7] Ushio S, Namba M, Okura T, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein[J]. *J Immunol*, 1996, 156(11): 4274-4279.
- [8] Kang YH, Lee KA, Ryu CJ, et al. Mitomycin C induces apoptosis via Fas/FasL dependent pathway and suppression of IL-18 in cervical carcinoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2006, 237(1): 33-44.
- [9] Nilkaeo A, Bhuvanath S. Role of interleukin-18 in modulation of oral carcinoma cell proliferation [J]. *Mediators Inflamm*, 2006, 2006(3): 67120.
- [10] Ohtsuki T, Micallef MJ, Kohno K, et al. Interleukin-18 enhances Fas ligand expression and induces apoptosis in Fas-expressing human myelomonocytic KG-1 cells [J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(5A): 3253-3258.
- [11] Okano F, Yamada K. Canine interleukin-18 induces apoptosis and enhances Fas ligand mRNA expression in a canine carcinoma cell line[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(5B): 3411-3415.
- [12] Chaudhry UI, Kingham TP, Plitas G, et al. Combined stimulation with interleukin-18 and CpG induces murine natural killer dendritic cells to produce IFN-gamma and inhibit tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(21): 10497-10504.
- [13] Kanda N, Shimizu T, Tada Y, et al. IL-18 enhances IFN-gamma-induced production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(2): 338-350.