论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1054-03

CpG-ODN 预防膀胱肿瘤复发的可行性研究

聂志林,靳风烁,王洛夫,梁培禾,叶 锦 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨新型免疫佐剂 CpG-ODN 预防膀胱肿瘤复发中的应用前景。**方法** 采用骨髓分离法分离小鼠树突状细胞(DCs)并培养鉴定,应用 BCG、CpG-ODN 刺激 DCs,采用 ELISA 法检测培养上清中细胞因子 IL-12、IL-10 含量的变化。**结果** 经骨髓分离法培养的 DCs 经 BCG 及 CpG-ODN 刺激后具有典型 DCs 的形态及表型,IL-12 含量均明显增高($P<0.01$),两组之间无显著性差异($P>0.05$);而 IL-10 含量 BCG 组明显高于其他各组($P<0.01$),而 CpG-ODN 组刺激 DCs 后 IL-10 无明显变化($P>0.05$),non-CpG-ODN 刺激 DCs 后与对照组比较 IL-12、IL-10 含量无明显变化($P>0.05$),表明 CpG-ODN 刺激 DCs 引起的 IL-12 升高具有序列特异性。**结论** CpG-ODN 可诱导 DCs 产生 Th1 型细胞因子 IL-12,对 Th2 型细胞因子 IL-10 影响很小,比 BCG 更能调节免疫应答向 Th1 型转换,可能在预防膀胱肿瘤复发的应用中具有良好前景。

关键词: 膀胱肿瘤;寡核苷酸;佐剂;免疫

中图法分类号: R730.51;R737.14;R979.5 **文献标识码:** A

Immunologic adjuvant CpG-ODN to prevent the recurrence of bladder neoplasms

NIE Zhi-lin, JIN Feng-shuo, WANG Luo-fu, LIANG Pei-he, YE Jin (Department of Urinary Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the role of new immunologic adjuvant CpG-ODN in preventing the recurrence of bladder neoplasms. Methods The dendritic cells (DCs) were induced with GM-CSF and TNF-α and then identified. After DCs were stimulated with BCG and CpG-ODN, cytokines IL-12 and IL-10 were measured by ELISA. Results The cultured DCs had phenotype of mature DC. IL-12 in cultured supernatants was increased significantly after DCs were stimulated either by BCG or CpG-ODN ($P<0.01$), whereas only IL-10 was enhanced in BCG group ($P<0.01$). Both IL-12 and IL-10 did not change in non-CpG-ODN group ($P>0.05$). Conclusion CpG-ODN can induce murine DCs to produce Th1 cytokine IL-12, but it displays little effect on Th2 cytokine IL-10. CpG-ODN may be a potential adjuvant used to prevent the recurrence of bladder neoplasms.

Key words: bladder neoplasms; oligonucleotides; adjuvants; immunology

膀胱肿瘤是泌尿系常见肿瘤,其临床特点是复发率高。自 1976 年应用卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin, BCG)预防膀胱肿瘤复发以来,其复发率虽下降,但仍有相当部分复发,且 BCG 副作用较大,患者耐受性差,有必要寻找一种新的预防膀胱肿瘤复发的方法。自从 1984 年 Tokunaga 等[1]研究发现 BCG 的 DNA 具有抗肿瘤活性后,细菌 DNA 的免疫调节作用被人们广泛认识和重视。研究表明,细菌 DNA 中所含的非甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(CpG)序列是其具有免疫活性的物质基础,而人工合成的具有 CpG 序列的寡核苷酸即 CpG-ODN 也具有同样免疫功能,能诱导多种免疫细胞的活化[2]。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是目前已知功能最强的抗原提呈细胞(APC),具有独特的免疫学功能,能在体内外摄取肿瘤抗原,直接激活初始 T 淋巴细胞,促进 T 辅助细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的生成,从而在肿瘤免疫中发挥至关重要的作用。为探讨 CpG-ODN 能否替代 BCG 预防膀胱肿瘤复发,我们研究了 CpG-ODN 刺激树突状细胞(DCs)后细胞因子 IL-12 及 IL-10 的变化。

作者简介:聂志林(1971-),男,河北省昌黎县人,硕士研究生,主治医师,主要从事泌尿生殖系统肿瘤方面的研究。电话:(023)68757344

通讯作者:靳风烁,电话:(023)68757364

收稿日期:2006-02-17;修回日期:2006-03-24

1　材料与方法

1.1　动物与试剂

T739 近交系小鼠 5 只，体质量 20～25 g，我院实验动物中心提供；鼠 GM-CSF、IL-4 及抗鼠 CD80、CD86、MHC-Ⅱ免疫荧光标记抗体购于美国 Promega 公司；IL-12、IL-10 免疫酶联吸附测定（ELISA）试剂盒购于深圳晶美生物公司；参照文献[3]中 CpG-ODN（ATAATCGACGTTCAAGCAAG）及 non-CpG-ODN（ATAATGCAGCTTCAAGCAAG），由上海生工生物技术公司合成，两端均用磷硫酰修饰。

1.2　鼠骨髓 DCs 的分离、培养及鉴定

无菌条件下取 BTT739 小鼠股骨，用 15% NCS 1640 液冲洗收集骨髓细胞，过 200 目筛网，用 Tris-NH_4Cl 去除其中红细胞，洗涤后悬于含 500 U/ml 鼠 GM-CSF 和 200 U/ml 鼠 IL-4 的 1640 液中，调整细胞浓度至 1×10^6/ml，37 ℃ 5% CO_2 培养 7 d。

1.3　CpG-ODN、BCG 刺激 DCs 细胞因子的检测

收集培养 7 d 的 DCs 用于实验，调整细胞浓度至 2×10^6/ml 加入 24 孔培养板，每孔 100 μl。实验分 4 组：CpG-ODN 刺激组：CpG-ODN 终浓度为 2 μmol/L；BCG 刺激组：BCG 终浓度为 1.25×10^5 CFG/ml；non-CpG-ODN 刺激组：non-CpG-ODN 终浓度为 2 μmol/L；对照组：无刺激物，加等量培养液，每组设 3 复孔。37 ℃条件下培养 3 d，收集培养上清液，采用 ELISA 法检测细胞因子 IL-12 及 IL-10 浓度（按试剂盒说明进行），FACS 检测 DCs 表面分子表达情况。

1.4　统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 Excel 2000 软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　鼠骨髓 DCs 的鉴定

扫描电镜观察：可见树突状细胞表面有许多细长的突起，呈梭状、面纱状、星形，突起长短不一，有的突起末端呈不规则的球形膨大。众多突起甚至遮盖了胞体。透射电镜观察：细胞有长而形态不规则突起，细胞质中线粒体相当丰富，有少量溶酶体和粗面内质网，细胞核形不规则，多偏于一端，细胞质内含有少量吞饮小泡。经鼠 IL-4、GM-CSF 共同培养至第 7 天后的 DCs，经 BCG 和 CpG-ODN 刺激后，FACS 分析其表面 CD 分子的表达率，符合成熟 DCs 的细胞表型。

2.2　CpG-ODN、BCG 刺激 DCs 后 IL-12、IL-10 的变化

与对照组比较，BCG 及 CpG-ODN 刺激 DCs 后 IL-12 含量均明显增高（$P<0.01$），两组之间无显著性差异（$P>0.05$）。而 IL-10 含量 BCG 组明显高于其他各组（$P<0.01$），而 CpG-ODN 组刺激 DCs 后 IL-10 无明显变化（$P>0.05$），non-CpG-ODN 刺激 DCs 后与对照组比较 IL-12、IL-10 含量无明显变化（$P>0.05$），表明 CpG-ODN 刺激 DCs 引起的 IL-12 升高具有序列特异性（表 1）。

表 1　BCG、CpG-ODN 及 non-CpG-ODN 刺激 DCs 前后 IL-12 及 IL-10 变化（pg/ml，$\bar{x}\pm s$）

组别	IL-12	IL-10
对照组	392.21 ± 31.07	140.19 ± 11.62
BCG 组	5 496.95 ± 338.85[ab]	772.41 ± 64.52[abc]
CpG-ODN 组	5 608.94 ± 347.02[ab]	160.36 ± 15.18
non-CpG-ODN 组	415.05 ± 45.66	157.71 ± 13.34

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 non-CpG-ODN 组比较；c：$P<0.01$，与 CpG-ODN 组比较

3　讨论

研究表明，肿瘤局部是以 Th2 型细胞因子占优势状态，抗肿瘤免疫作用处于被抑制状态，肿瘤局部的肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）分泌 IL-4 等 Th2 型细胞因子，促使局部发生 Th2 的漂移，同时 IL-4 可诱导肿瘤组织产生 IL-10，维持新的 Th2 型 TIL 细胞，形成正反馈。因此，如何促使荷瘤机体由 Th2 向 Th1 逆转，使肿瘤局部高表达 IL-2、IL-12 和 IFNγ 等 Th1 型细胞因子，进而诱导 T 细胞、NK 细胞的活化和增殖，介导细胞免疫反应，发挥其对靶细胞的杀伤作用是目前膀胱癌免疫治疗需要解决的课题。

自从应用 BCG 膀胱灌注预防膀胱肿瘤复发以来，膀胱肿瘤的复发率有了大幅度下降。其免疫学机制主要是通过 BCG 激活膀胱黏膜免疫系统，产生以细胞免疫为主的免疫应答，发挥杀瘤作用。研究表明 BCG 膀胱灌注后，尿液中可检测到 Th1 型细胞因子，如 IL-12、IL-2 及 IFNγ，又可检测到 Th2 型细胞因子 IL-10、IL-6。Th1 型细胞因子的产生是 BCG 预防膀胱肿瘤复发的主要机制，而 Th2 型细胞因子的产生是 BCG 治疗失败的主要原因[4,5]，因此如何诱导机体免疫应答向 Th1 型转换成为预防膀胱肿瘤复发的关键。

研究表明，BCG 的 DNA 具有抗肿瘤活性，其中所含的非甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸（CpG）序列是其具有免疫活性的物质基础，将中间为未甲基化的 CpG 二核苷酸，5′端为 2 个嘌呤，3′端为 2 个嘧啶的具有免疫刺激作用的 6 核苷酸序列称为 CpG 结构。而人工合成的具有 CpG 序列的寡核苷酸即 CpG-ODN 也具有同样免疫功能。CpG-ODN 作为一种新型免疫佐剂，通过与细胞表面 TLR9（Toll-like receptor 9，TLR9）受体特异性结合，活化机体 DCs、NK、B 细胞，产生 Th1 型细胞因子[6]。目前认为，CpG-ODN 是作为一种病原相关分子模式（PAMPs），通过与 TLR9 结合，激活 TLR/IL-1R 信号通路而发挥效应[7]，该途径的活化进一步激活 NF-κB 诱导激酶（NIK），进而导致 NF-κB 活

化并进入细胞核，与 DNA 结合，诱导 IL-12 等细胞因子基因活化、表达[8]。体内实验表明，CpG-ODN 是 Th1 细胞活化的非常有效的佐剂，它可诱导 Th1 型应答或调节免疫应答向 Th1 型转换[9]，目前已作为 Th1 型免疫佐剂应用于抗哮喘、抗病毒及抗肿瘤的研究。动物实验研究表明，在黑色素瘤、肺癌等肿瘤周围注射 CpG-ODN 可抑制肿瘤生长[10]，CpG-ODN 联合抗原刺激的 DCs 可治疗对放疗不敏感的大鼠肿瘤[11]。

DCs 是目前发现的体内功能最强的抗原提呈细胞，能高水平地表达与抗原递呈有关的 MHC-Ⅰ类和 MHC-Ⅱ类分子、多种共刺激分子及某些黏附分子。DCs 在受细胞因子调控时，本身亦可产生多种细胞因子，在此基础上，DCs 可摄取肿瘤相关抗原，并呈递给 T 细胞，激活相应的 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞。DCs 还可以活化 Th 细胞，使 Th 细胞产生大量的细胞因子，进一步调节活化的 Th 细胞，以增强机体的细胞免疫和体液免疫功能，发挥主动免疫的抗肿瘤作用。研究表明膀胱肿瘤局部 DCs 存在功能异常[12]，可能与肿瘤微环境中的免疫抑制因子 IL-10、TGFβ、VEGF 等作用有关[13]。

为观察 CpG-ODN 诱导 DCs 产生细胞因子的变化，探讨 CpG-ODN 特别是联合 DCs 疫苗预防膀胱肿瘤复发的可行性，我们首先分离、培养了小鼠骨髓来源的 DCs，经 BCG 和 CpG-ODN 刺激后，分离、培养获得的 DCs 具有典型的形态学特征及表型；进一步观察了 CpG-ODN 刺激 DCs 后细胞因子的变化，并与 BCG 进行比较，结果显示，CpG-ODN 刺激 DCs 后其上清液中 IL-12 含量显著增高，高达（5 608.94 ± 347.02）pg/ml，BCG 组为（5 496.95 ± 338.85）pg/ml，两组之间相差不显著（$P>0.05$），均显著高于对照组（$P<0.01$）；CpG-ODN 刺激 DCs 后其上清液中 IL-10 含量变化不明显，BCG 组为（772.41 ± 64.52）pg/ml，显著高于其他各组（$P<0.01$），non-CpG-ODN 组和对照组测得的 IL-12、IL-10 含量无显著差异。我们的结果表明，CpG-ODN 可刺激 DCs 产生 Th1 型细胞因子 IL-12，对 Th2 型细胞因子 IL-10 影响很小，而 BCG 刺激 DCs 后既可产生 IL-12，又可产生 IL-10。non-CpG-ODN 组不含 CpG 基序，不产生细胞因子反应，因此这种反应具有 DNA 序列特异性。

综上所述，在刺激 DCs 产生细胞因子方面，CpG-ODN 比 BCG 更能调节免疫应答向 Th1 型转换，特别是联合 DCs 疫苗对于预防膀胱肿瘤复发可能更有价值，具有良好的应用前景。当然，BCG 预防膀胱肿瘤复发的机制比较复杂，CpG-ODN 在预防膀胱肿瘤复发中的作用需进一步的实验研究。

参考文献：

[1] TOKUNAGA T, YAMAMOTO H, SHIMADA S, *et al*. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity [J]. J Natl Cancer Inst, 1984, 72(4): 955 - 962.

[2] HARTMANN G, KRIEG A M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells[J]. J Immomol, 2000, 164(2): 944 - 953.

[3] ATKINS H, DAVIES B R, KIRBY J A, *et al*. Polarisation of a T-helper cell immune response by activation of dendritic cells with CpG-containing oligonucleotides: a potential therapeutic regime for bladder cancer immunotherapy[J]. Br J Cancer, 2003, 89(12): 2312 - 2319.

[4] ESUVARANATHAN K, ALEXANDROFF A B, MCINTYRE M, *et al*. Interleukin-6 production by bladder tumors is upregulated by BCG in immunotherapy[J]. J Urol, 1995, 154(2 Pt 1): 572 - 575.

[5] DE-REIJKE T M, DE-BOER E C, KURTH K H, *et al*. Urinary cytokines during intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: processing, stability and prognostic value[J]. J Urol, 1996, 155(2): 477 - 482.

[6] WEINER G J, LIU H M, WOOLDRIDGE J E, *et al*. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(20): 10833 - 10837.

[7] HOSHINO K, KAISHO T, IWABE T, *et al*. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation [J]. Int Immunol, 2002, 14(10): 1225 - 1231.

[8] BRIGHTBILL H D, MODLIN R L. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response[J]. Immunology, 2000, 101(1): 1 - 10.

[9] VOLLMER J, WEERATNA R, PAYETTE P, *et al*. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities[J]. Eur J Immunol, 2004, 34(1): 251 - 262.

[10] KAWARADA Y, GANSS R, GARBI N, *et al*. NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides[J]. J Immunol, 2001, 167(9): 5247 - 5253.

[11] HECKELSMILLER K, BECK S, RALL K, *et al*. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy[J]. Eur J Immunol, 2002, 32(11): 3235 - 3245.

[12] TROY A J, DAVIDSON P J, ATKINSON C H, *et al*. CD1a dendritic cells predominate in transitional cell carcinoma of bladder and kidney but are minimally activated[J]. J Urol, 1999, 161(6): 1962 - 1967.

[13] BANCHEREAU J, STEINMAN R M. Dendritic cells and the control of immunity[J]. Nature, 1998, 392(6673): 245 - 252.

（编辑 龙 亮）