DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.12.016
第26卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 12
2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

文章编号:1000-5404(2004)12-1071-04

论著

IL-2和IL-12联合基因治疗小鼠肝癌的实验研究

刘 勇,胡大荣,谭晓华,胡学玲,范公忍,韩聚强,吴忆贫 (北京军区总医院全军肝病治疗中心,北京 100700)

提 要:目的 探讨瘤内注射共表达mIL-12和hIL-2质粒DNA抗小鼠肝癌皮下移植瘤的作用。方法 构建pDC511hIL2-mIL12、pDC511mIL-12、pDC511hIL-2真核表达质粒载体;ELISA方法检测各组质粒在真核细胞的表达;小鼠肝癌H22皮下移植瘤瘤内注射各组质粒DNA后,检测不同时间血清中细胞因子浓度;观察各组小鼠存活时间,肿瘤大小变化;并检测各组小鼠脾脏细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)活性。对各治疗组在质粒DNA注射后一月进行瘤体组织学观察。结果 酶切鉴定各组质粒载体,均示构建成功,并能在真核细胞内高效表达相应细胞因子。瘤内注射各组质粒载体后,pDChIL2-mIL12组在不同时间表达的hIl2和mIL12分别与pDC511hIL2组($F=71.11$, $P<0.01$)、pDC511mIL12组($F=30.70$, $P<0.05$)比较有显著性差异。mIL-12基因和hIL-2基因联合治疗组,肿瘤生长明显受抑制,疗效显著优于各单独治疗组和对照组($P<0.05$),并且小鼠脾细胞CTL杀伤活性增强。双基因联合治疗组,病灶内肿瘤细胞坏死明显,炎性细胞广泛浸润。结论 IL-12、IL-2基因治疗可抑制小鼠肝癌H22皮下移植瘤的生长,提高机体的抗肿瘤免疫应答,两者联合运用可产生协同效应。为进一步运用高效基因导入技术进行肝癌基因治疗研究提供初步的实验依据。

关键词:肝细胞癌;mIL-12;hIL-2;免疫基因治疗;动物模型
中图法分类号:R392.11;R730.59;R735.7 文献标识码:A

Gene therapy with IL-2 and IL-12 for murine hepatocellular carcinoma

LIU Yong, HU Da-rong, TAN Xiao-hua, HU Xue-ling, FAN Gong-ren, HAN Ju-qiang, WU Yi-pin (Institute of Hepatic Diseases, Beijing General Hospital, Bejing Military Area Command, Beijing 100700, China)

Abstract: Objective To explore the anti-tumor efficacy of intratumor administration of plasmid DNA expressing both mIL12 and hIL2 in mice H22 hepatocellular carcinoma grafted subcutaneously. Methods Eukaryotic expression plasmid vectors of hIL2-mIL12, mIL12, and hIL2 were constructed. The expressions of the plasmid in the the eukaryotic cells in different groups were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cytokine expression in serum was detected at different time after intratumor administration of plasmid DNA. The mean diameter of the tumor mass and the livability of mice were measured in each mouse model group. Lactic dehydrogenase (LDH) assay was used to examine whether or not the treatment with different plasmid DNA could induce systemic cytolytic activity of lymphocytes against parental H22 cells. Histopathological changes were observed after administration of plasmid DNA vectors in each mouse model group. Results Plasmid vectors were constructed successfully and could efficiently express cytokines. After the intratumor administration, the expression levels of hIL2 and mIL12 in the pDC511hIL2-mIL12 group were statistically different as compared with that in group pDC511hIL2 ($F=71.11$, $P<0.01$) or group pDC511mIL12 ($F=30.70$, $P<0.05$) at different time, respectively. Growth of tumor in combined gene therapy group was significantly inhibited as compared with that in other groups ($P<0.05$). Enhanced activity of CTL was observed in the pDC511hIL2-mIL12 group. In the group treated with pDC511hIL2-mIL12 plasmid DNA, inflammatory cell infiltration was more extensive and necrosis was more definite than those in other groups. Conclusion Both IL-2 and IL-12 are able to inhibit the growth of mice H22 hepatocellular carcinoma grafted subcutaneously and induce the host anti-tumor immune response efficiently. Combination of IL-2 and IL-12 may have synergistic effect in anti-tumor.

Key words: hepatocellular carcinoma; murine interleukin-12; human interleukin-2; genetic immunotherapy; animal model

作者简介:刘 勇(1974-),男,贵州省赤水市人,硕士研究生,医师,主要从事肝癌基因治疗方面的研究。电话:(010)66721183-201
收稿日期:2003-04-18;修回日期:2003-09-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

IL-2、IL-12是近几年肿瘤基因治疗研究中选用较多的两个细胞因子，已在众多肿瘤模型中显示了较好的治疗效应[1~5]。IL-12和IL-2在激发机体特异和非特异抗肿瘤免疫反应方面具有强大的功能，可分别作用于免疫反应中抗原提呈细胞和免疫效应细胞等相同或不同环节，联合运用可产生协同抗肿瘤效应[4]。本实验旨在通过直接瘤内注射"裸"质粒DNA方法，探讨IL-12、IL-2在抗小鼠H22肝癌中的协同效应，为下一步运用该共表达质粒通过高效基因导入技术对肝癌进行基因治疗研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

载体质粒pDC511（加拿大，Microbix Biosystem Inc）；携带mIL-12 cDNA质粒F596 mIL2（第二军医大学免疫学教研室曹雪涛教授惠赠）；pBOX hIL2（本室谭晓华博士惠赠）。各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶、碱性磷酸酶（TaKaRa公司）；大量质粒提取纯化试剂盒（promega公司）；脂质体lipofectamineTM2000转染试剂盒（invitrogen公司）；non-radioactive cytotoxicity assay试剂盒（promega公司）；mIL-12（P70）ELISA检测试剂盒（Endogen公司）；hIL-2 ELISA检测试剂盒（Endogen公司）；细胞培养基1640（GIBCO公司）；胎牛血清（hyclone公司）。

1.2 动物及细胞株

6~8周龄雌性BALB/c小鼠购自中国医学科学院实验动物研究所；体质量（120±15）g COS-7细胞株以及小鼠肝癌细胞株H22本室保存。

1.3 质粒载体的构建

1.3.1 构建质粒pDC511mIL-12 在真核质粒载体pDC511 *Eco*RⅠ位点，插入来自F596 mIL12的mIL-12片段，*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ分别酶切鉴定正向连接。

1.3.2 构建质粒pDC511hIL2-mIL12 在构建好的质粒pDC511mIL12 mIL12表达盒上游*Pac*Ⅰ位点，插入来自于pBOX-hIL-2的hIL-2表达盒。*Xho*Ⅰ酶切鉴定正向连接。

1.3.3 构建质粒pDC511hIL-2 在质粒pDC511 *Pac*Ⅰ位点插入来自于PBOXhIL-2的hIL-2表达盒，*Xba*Ⅰ酶切鉴定正向连接。

1.4 转染COS-7细胞，检测细胞因子的表达

24孔板培养COS-7细胞，待细胞达到80%~90%融合时按试剂盒操作说明，将各组质粒DNA用脂质体转染COS-7细胞，以空质粒pDC511为阴性对照，24 h后收集培养液上清，用mIL-12和hIL2 ELISA试剂盒检测相应细胞因子的表达。

1.5 各组质粒DNA注射后血清细胞因子表达情况

6~8周龄雌性BALB/c小鼠右后侧背部皮下接种小鼠肝癌细胞H22 5×10^6/只，待瘤体直径长至3~5 mm时，随机分为4组，每组3只。将纯化质粒用无菌生理盐水稀释，每只小鼠分别瘤内注射pDC511hIL2-mIL12、pDC511hIL-2、pDC511mIL-12、pDC511（阴性对照）DNA 20 μg，两周后各组再注射等量DNA。然后每隔3天测量瘤体长、短径，最后根据公式[6]：$4/3\pi r^3$（r为长短半径均值），观察瘤体体积变化。同时每组间隔5 d观察小鼠生存情况，连续观察3个月。

1.6 抗肿瘤效应

与上述同样荷瘤小鼠随机分为4组，每组7只。将纯化后质粒用无菌生理盐水稀释，每只小鼠分别瘤内注射pDC511hIL2-mIL12、pDC511hIL-2、pDC51 lmIL-12、pDC511（阴性对照）DNA 20 μg，两周后各组再注射等量DNA。然后每隔3天测量瘤体长、短径，最后根据公式[6]：$4/3\pi r^3$（r为长短半径均值），观察瘤体体积变化。同时每组间隔5 d观察小鼠生存情况，连续观察3个月。

1.7 CTL实验

与上述同样荷瘤BALB/c小鼠4组，每组3只。将各组纯化后质粒（质粒pDC511为阴性对照）按上述方法瘤内注射20 μg/只。于第2次注射后两周取小鼠脾，分离脾细胞作为效应细胞，以培养至对数生长期的H22为靶细胞，按non-radioactive cytotoxicity assay试剂盒操作说明，检测各组小鼠CTL对靶细胞H22的杀伤能力。

1.8 瘤体组织学观察

pDC511mIL12-hIL2组、pDC51 lmIL12组、pDC511hIL2组质粒DNA注射后1个月，分别取出瘤组织，10%福尔马林固定24 h，石蜡包埋，连续切片，常规HE染色，光镜检查肿瘤组织学。

1.9 统计学处理

各式图表均用Excel软件处理。统计处理应用SAS软件，对各处理组小鼠生存期用PL法进行生存分析，瘤体体积比较用重复测量多因素方差分析。

2 结果

2.1 构建载体酶切鉴定

酶切鉴定均示成功构建质粒pDC511hIL2-mIL12、pDC511hIL2、pDC511mIL12。结果如图1、2、3。

2.2 质粒载体在真核细胞内高效表达相应的细胞因子

各组质粒DNA转染COS-7细胞24 h后，ELISA法测定培养液中细胞因子含量，结果：pDC511hIL2-mIL12组：hIL2为3 087.18 pg/ml；mIL12为674.56 pg/ml。pDC511mIL12组mIL12为504.37 pg/ml。pDC511hIL2组hIL2为4 274.19 pg/ml。空载体pDC511组未测到这两种细胞因子的表达。

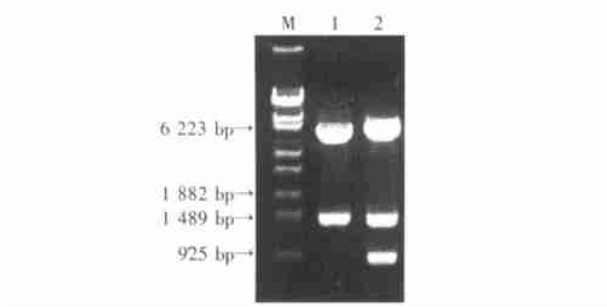


1, 3: pDC511 control; 2: A 2 400 bp fragment was excised by *Eco*RⅠ of plasmid vector, indicating forward insertion of gene mIL12; 4: A 1 300 bp fragment was excised by *Xho*Ⅰ of plasmid vector, further indicating forward insertion of gene mIL12

图1 pDC511mIL12酶切鉴定

Fig 1 Analysis of recombinant plasmid vector pDC511mIL12 by agarose electrophoresis

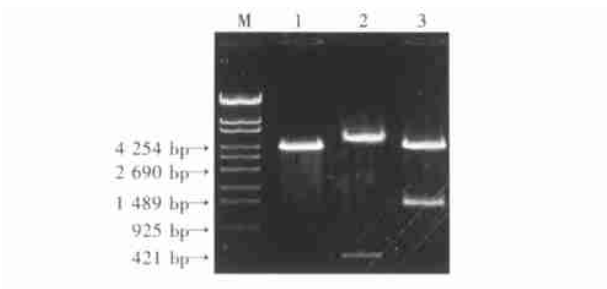
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



1: pDC511mIL12 control; A 1 300 bp fragment was excised by *Xho* Ⅰ; 2: A 1 300 bp and 900 bp fragment was excised by *Xho* Ⅰ, indicating forward insertion of gene hIL2.

图 2　**pDC511hIL2-mIL12** 酶切鉴定

Fig 2　Analysis of recombinant plasmid vector pDC511hIL2-mIL12 by agarose electrophoresis



1: pDC511 control; 2: A 537 bp fragment was excised by *Xba*Ⅰ, indicating reverse insertion of gene hIL2; 3: Plasmid vector: A 1 407 bp fragment was excised by *Xba*Ⅰ, indicating forward insertion of gene hIL2.

图 3　**pDC511hIL2** 酶切鉴定

Fig 3　Analysis of recombinant plasmid vector pDC511hIL2 by agarose electrophoresis

2.3　瘤内注射各组质粒 DNA 后血清中细胞因子表达情况

pDC511hIL2-mIL12 组从质粒注射后第 1 天到第 7 天 hIL2 呈高水平表达。在注射后第 3 天达峰值(140. 85 pg/ml)。pDC511hIL2 组从质粒注射后第 2 天到第 7 天 hIL2 呈较高水平表达, 也在注射后第 3 天达峰值(98. 34 pg/ml)。各组间 hIL2 浓度有非常显著性差异(F = 71. 11, P< 0. 01)。pDC511hIL2-mIL12 组从质粒注射后第 1 天到第 10 天 mIL12 呈高水平表达, 在注射后第 7 天达峰值(75. 52 pg/ml)。pDC511mIL12 组从质粒注射后第 2 天到第 10 天 mIL12 呈较高水平表达, 在注射后第 5 天达峰值(49. 38 pg/ml)。各组间 mIL12 浓度有显著性差异(F = 30. 70, P = 0. 05)。

2.4　双表达载体组明显抑制肿瘤生长

对各组质粒 DNA 注射后不同时间测得的瘤体体积进行方差分析, 差别有显著性意义(F = 4. 10, P = 0. 02)。进一步用 Q 检验对各实验组瘤体体积两两间进行比较, 结果 pDC511mIL12 组和 pDC511hIL2 组间无显著性差异(P> 0. 05), pDC511hIL2-mIL12 组与 pDC511mIL12、pDC511hIL2 组间比较有显著性差异(P< 0. 05)。表明单表达质粒载体组之间的抑瘤作用无差别, 双表达载体组与单表达载体组相比, 抑瘤作用更显著。

2.5　双表达载体组明显延长荷瘤小鼠生存期

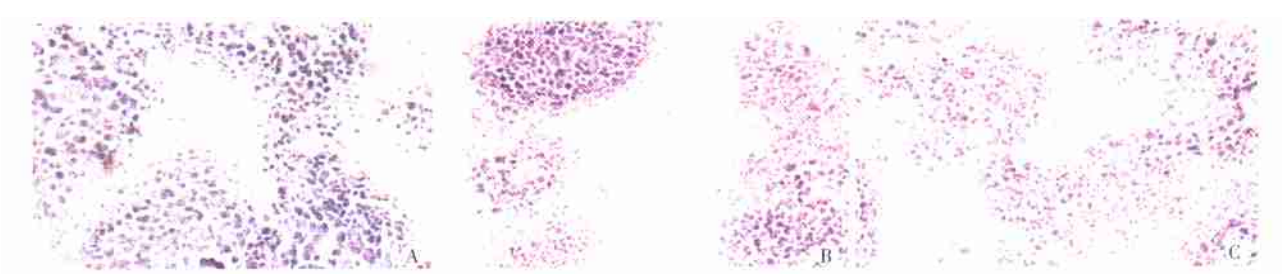
用生存分析的乘积-积限法(PL 法)对各组进行生存分析。结果 4 组生存时间差别有非常显著性意义(χ^2= 15. 56, P= 0. 001)。进一步两两间进行比较, pDC511hIL2-mIL12 组(χ^2= 14. 32, P= 0. 000 2)、pDC511hIL2 组(χ^2= 4. 48, P= 0. 03)、pDC511mIL12 组(χ^2= 4. 48, P= 0. 03)分别与空载体组相比有显著性差异; pDC511mIL12 组与 pDC511hIL2 组间比较生存期无差异(χ^2= 0. 16, P= 0. 69); pDC511hIL2-mIL12 组与单表达质粒载体组生存期比较有显著性差异(P< 0. 05)。表明各实验组的生存期要长于空载体组, 单表达质粒载体组对延长荷瘤小鼠生存期无差别, 双表达质粒载体组与单表达载体组相比, 更能延长荷瘤小鼠生存期。

2.6　双表达质粒载体组 CTL 活性增强

在相同效: 靶比情况下, pDC511hIL2-mIL12 组与单表达质粒载体组和空载体组相比, 小鼠脾 CTL 对 H22 肝癌细胞有较高的杀伤率, 表明质粒 pDC511hIL2-mIL12 治疗组 CTL 活性明显高于空载体组和对照组。

2.7　质粒 DNA 注射后 1 个月瘤体组织病理学比较

如图 4 示。单因子载体组在质粒注射后 1 个月, 血管及肿瘤病灶周围有零星炎性细胞浸润, 可见坏死灶, 肿瘤局限化。pDC511hIL2-mIL12 载体组, 病灶内大量炎性细胞浸润, 坏死更明显, 仅见散在少量肿瘤细胞。



A: pDC511hIL2; B: pDC511mIL12; C: pDC511hIL2-mIL12

图 4　质粒 **DNA** 注射后 **1** 个月瘤体组织病理变化　(HE× 200)

Fig 4　Histopathological changes of tumor tissues after plasmid injection for 1 month　(HE× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

IL-12能诱导T细胞和NK细胞产生多种细胞因子,促进细胞毒性淋巴细胞增殖和功能活化;诱导T细胞向Th1细胞分化;经IL-12诱导产生的IFN-γ能促进趋化因子IFN IP-10产生,其具有强大的抑制肿瘤血管内皮细胞增殖和分化的作用[5,6]。IL-2能作用于T细胞、大颗粒淋巴细胞、单核细胞和B细胞,促进细胞增殖和分泌细胞因子。IL2还能增强CTL细胞毒活性、促进细胞移动,增强细胞间接触和诱导细胞分泌细胞因子(IFN-α、IL-4、TNF和CSF等)[1]。因此,在众多细胞因子治疗中,IL12和IL2被认为是最有效的具有抗肿瘤作用的细胞因子,但由于全身给予重组IL2和IL12能引起机体强烈毒副作用,从而限制了其运用。

在肿瘤发生、发展过程中,机体免疫机能处于一种抑制状态。其中一重要机制即抑制性巨噬细胞、T细胞的产生,T细胞失能;以及产生具有中和作用的蛋白酶对局部分泌细胞因子破坏作用。这种由肿瘤诱发的免疫抑制状态在肿瘤局部以及相应的引流淋巴结尤为显著。在病灶局部直接给予或通过基因修饰肿瘤细胞表达产生一些细胞因子,即使在局部浓度较低情况下,也能诱发强烈的抗肿瘤反应。这种局部产生的细胞因子激发的抗肿瘤反应通常由非特异性免疫细胞介导,但随着病灶内新出现的T细胞不断被激活,机体产生针对肿瘤细胞的特异性T淋巴细胞反应,最终引起瘤体消退[7]。本实验通过构建mIL12和hIL2双表达质粒载体,以瘤内直接注射质粒DNA方式,观察到双表达载体组在瘤内注射质粒后,与单基因治疗组相比,肿瘤生长明显受到抑制,荷瘤小鼠生存期延长,初步表明mIL12和hIL2在抗肿瘤作用中具有协同效应。另外,对各处理组小鼠脾CTL活性进行检测,结果发现质粒pDC511hIL2-mIL12注射组CTL活性明显高于空载体组和对照组,提示其抗肿瘤作用可能与IL12和IL2增强机体细胞免疫功能有关。对双表达载体组及单因子载体组在质粒注射后一月瘤体组织学观察还发现,双表达载体组病灶内早期即可见明显炎性细胞浸润;单因子载体组虽在质粒注射后也可见病灶及血管周围有少量炎性细胞浸润,但不足以杀灭病灶内残存的肿瘤细胞,进一步提示双表达载体组携带外源基因激活的抗肿瘤免疫反应明显优于单表达载体组。

以直接瘤内注射质粒DNA方式导入外源细胞因子基因具有以下优势:①免疫原性较弱,可避免载体本身诱发局部免疫反应对载体的清除;②瘤内注射细胞因子基因,既可提高病灶局部细胞因子相对浓度,产生更好的抗肿瘤效应,又可降低细胞因子引起的全身毒副作用。③携带两种不同细胞因子基因的双表达质粒载体能同时表达两种不同的细胞因子,减少局部DNA的注射剂量。然而,细胞因子的抗肿瘤效应与其在病灶局部的表达量有关,而基因导入效率又是决定细胞因子基因在病灶表达高低的一个重要方面。直接瘤内注射细胞因子DNA技术,与其它高效的基因导入技术相比,在细胞因子的表达量以及抗肿瘤作用方面还不尽人意。特别是近年出现了众多新兴载体,使直接注射"裸"DNA方法一度受到冷落。但Lui等[8]认为直接注射裸质粒DNA方式对于体内评估预选治疗基因的毒副作用及治疗效果,不失为一种简便、廉价方法。另外,Fushun等[9]对比观察了瘤内注射编码mIL12"裸"DNA与脂质体包裹DNA在肿瘤基因治疗中的差异,结果显示这两种基因导入技术在小鼠腺癌和肾细胞癌模型中具有相似的肿瘤消退率。本实验证实了瘤内注射"裸"DNA表达的IL-12和IL-2在抗肝癌中具有协同作用,为进一步运用该共表达质粒通过高效基因导入技术对肝癌进行基因治疗研究提供了初步的实验依据。

参考文献:

[1] Tartour E, Mehtali M, Sastre-Garau X, *et al*. Phase I clinical trial with IL-2-transfected xenogeneic cells administered in subcutaneous metastatic tumours: clinical and immunological findings[J]. Br J Cancer, 2000, 83(11): 1454—1461.

[2] He P, Tang Z Y, Ye S L, *et al*. The targeted expression of interleukin-2 in human hepatocellular carcinoma cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2000, 19(2): 183—187.

[3] Lucas M L, Heller L, Coppola D, *et al*. IL-12 plasmid delivery by *in vivo* electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma[J]. Mol Ther, 2002, 5(6): 668—675.

[4] Li D, Shugert E, Guo M, *et al*. Combination nonviral interleukin 2 and interleukin 12 gene therapy for head and neck squamous cell carcinoma[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2001, 127(11): 1319—1324.

[5] Yamashita Y I, Shimada M, Hasegawa H, *et al*. Electroporation-mediated interleukin-12 gene therapy for hepatocellular carcinoma in the mice model[J]. Cancer Res, 2001, 61(3): 1005—1012.

[6] Kahlil J, Andrews, Antoni R, *et al*. Adenovirus-interleukin-12-mediated tumor regression in a murine hepatocellular carcinoma model is not dependent on CD1-restricted natural killer T cells[J]. Cancer Res, 2000, 60(22): 6457—6464.

[7] Ruiz J, Mazzolini G, Sangro B, *et al*. Gene therapy of hepatocellular carcinoma[J]. Dig Dis, 2001, 19(4): 324—332.

[8] Lui V W, Falo LD Jr, Huang L, *et al*. Systemic production of IL-12 by naked DNA mediated gene transfer: toxicity and attenuation of transgene expression *in vivo*[J]. J Gene Med, 2001, 3(4): 384—393.

[9] Shi F, Rakhmilevich A L, Heise C P, *et al*. Intratumoral injection of interleukin-12 plasmid DNA, either naked or in complex with cationic lipid, results in similar tumor regression in a murine model[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(11): 949—957.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net