

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2002 )04-0233-04

## 白细胞介素 12 及白细胞介素 2 对大鼠肝癌的联合基因治疗研究

杨家和, 范瑞芳, 钱其军, 尤天庚, 薛惠斌, 苏长青, 曹惠芳, 吴孟超( 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438 )

[ 摘要 ] **目的:** 研究利用小鼠白细胞介素 12( mIL-12 )和人白细胞介素 2( hIL-2 )基因对大鼠肝癌进行联合基因治疗的可行性和疗效。**方法:** 构建携带 mIL-12 和 hIL-2 基因的逆转录病毒载体, 转染包装细胞后对实验性肝癌大鼠进行肝癌局部注射, 观察对肝癌细胞的生长抑制作用及其对大鼠的免疫功能变化、毒性反应。**结果:** 携带 mIL-12/hIL-2 基因的重组逆转录病毒在肿瘤内局部注射明显抑制了肝肿瘤的生长。肝癌接种后第 1, 3, 5, 7 天治疗组大鼠 35 d 生存率分别为 100%, 100%, 30%, 10%。IL-12 + IL-2 治疗组平均生存时间明显高于生理盐水对照组(  $P < 0.01$  )、逆转录病毒空载体对照组(  $P < 0.01$  )、IL-2 治疗组(  $P < 0.01$  )和 IL-12 治疗组(  $P < 0.05$  )。治疗后肝癌组织中浸润的淋巴细胞明显增多。**结论:** 肝癌局部注射携带 mIL-12 和 hIL-2 基因的逆转录包装细胞株可明显抑制肝癌细胞的生长, 早期治疗优于晚期治疗。

[ 关键词 ] 白细胞介素 12; 白细胞介素 2; 肝肿瘤; 基因治疗; 肝内注射

[ 中图分类号 ] R73-36 [ 文献标识码 ] A

## Combined Interleukin 12 and Interleukin 2 Gene Therapy for Hepatocellular Carcinoma in A Rat Model

YANG Jia-he, FAN Rui-fang, QIAN Qi-jun, YOU Tian-geng, XUE Hui-bin, SU Chang-qing, CAO Hui-fang, WU Meng-chao( Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China )

[ Abstract ] **Objective:** To determine the feasibility and efficacy of combined murine interleukin 12 ( mIL-12 ) and human interleukin 2 ( hIL-2 ) gene therapy for hepatocellular carcinoma in a rat model. **Methods:** The retroviral vector encoding mIL-12/hIL-2 gene was constructed and then transfected into packaging cell line. The cells were injected into rats in the established hepatoma at different time points. The therapeutic effect, immune function and toxicological response were evaluated. **Results:** Intratumoral injection of recombinant retroviral vector encoding mIL-12/hIL-2 gene resulted in marked hepatoma regression. The 35 d survival rates of the subgroups treated on the first, third, fifth and seventh day after tumor implantation were 100%, 100%, 30% and 10% respectively. The average survival time of the IL-12 + IL-2 treatment group was superior to those of the physiological saline group(  $P < 0.01$  ), retroviral empty vector group(  $P < 0.01$  ), IL-2 treatment group(  $P < 0.01$  ) and IL-12 treatment group(  $P < 0.01$  ). The immunological study showed that the number of hepatoma infiltrating lymphocytes was increased in the IL-12 + IL-2 treatment group. **Conclusion:** The retroviral packaging cell line encoding mIL-12 and hIL-2 gene via intratumoral injection inhibits the growth of hepatocellular carcinoma significantly. The therapeutical effects of early administration is superior to that of later one.

[ Key words ] interleukin 12; interleukin 2; liver neoplasms; gene therapy; intrahepatic injection

\* 原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一。外科手术切除仍是治疗首选方案, 但疗效并不理想。基因治疗是近年来兴起的新的治疗手段。联合基因治疗是很有前景的治疗方案, 通过各基因不同的作用机制来增强对肿瘤的杀伤作用<sup>[1]</sup>。IL-12 与 IL-2 之间提供了互补的免疫调节信号, 具有免疫协同作用<sup>[2-3]</sup>。为此, 我

们建立了同时表达小鼠 mIL-12 和人 hIL-2 基因的逆转录病毒载体, 对大鼠接种肝癌进行局部注射, 观察其疗效。

\* [ 基金项目 ] 国家自然科学基金( 39870760, 39970838 )资助  
[ 作者简介 ] 杨家和( 1956- ), 男, 江苏人, 副教授, 医学博士, 主要从事肝癌基因治疗方面的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大鼠肝癌细胞株 CBRH<sub>3</sub> 由中国科学院细胞研究所谢弘教授惠赠。带有 mL-12 p40 和 p35 亚基的质粒 pGCp35IRESp40SN 由中国科学院生物化学研究所刘新垣教授惠赠。小鼠抗大鼠单克隆抗体 OX8 由吴金全博士惠赠。PE501, PA317 和 NIH3T3 细胞本室常规保存。逆转录病毒载体 GCXEXPXN、带有 hIL-2 基因的质粒 pLIL2SN 均为本室自建。ELISA 检测试剂盒 Human IL-2 DuoSet 和 Mouse IL-12 p70 DuoSet 购于 R&D Systems 公司。

### 1.2 逆转录病毒载体的构建

以 pGCp35IRESp40SN 为模板, PCR 扩增 p35 和 p40 亚基基因, 电泳回收 PCR 产物。采用 p40 上游引物和 p35 下游引物(两引物具有互补序列, 前者同时带有 Linker 序列)再次 PCR, 电泳回收 mL-12 融合基因。以 pLIL2PN 为模板同法扩增和回收 hIL-2 基因。将 mL-12 和 hIL-2 基因片段经 T4 连接酶(Boehringer Mannheim 公司)分别与 pGEM<sup>TM</sup>-Teasy 载体(Promega 公司)进行连接。经克隆筛选、酶切及鉴定后, 构建入具有多克隆位点的逆转录病毒 GCXEXPXN, 产生携带 mL-12 基因的 GCIL12EXPXN、携带 hIL-2 基因的 GCXEIL2PN 和携带 mL-12 与 hIL-2 基因的 GCIL12EIL2PN。

### 1.3 逆转录病毒的包装、鉴定

逆转录病毒载体经电穿孔法转染 PE501, 48 h 后 G418 完全培养基筛选克隆, 2 周左右上清过滤感染 PA317, G418 克隆筛选, 每组挑取 6 个单克隆进行扩增, 收集上清, 细胞 -80℃ 冻存。RT-PCR 进行重组逆转录病毒载体鉴定。采用 NIH3T3 细胞对上述各病毒上清进行病毒滴度测定。并将具有最高病毒滴度的携带有 GCIL12EXPXN, GCXEIL2PN 和 GCIL12EIL2PN 包装细胞株分别命名为 PA317-GCIL12EXPXN, PA317-GCXEIL2PN 和 PA317-GCIL12EIL2PN。应用 mL-12 和 hIL-2 蛋白 ELISA 检测试剂盒对上述包装细胞株进行 mL-12 和 hIL-2 蛋白表达量检测。

### 1.4 建立大鼠肝癌模型

雄性 Wistar 大鼠, 体重 200 ~ 250 g, 购于中科院动物中心。腹腔注入 CBRH<sub>3</sub>, 7 ~ 9 d 大鼠腹腔形成肿瘤, 断颈处死, 剖腹取出肿瘤组织, 剪碎成 0.05 cm × 0.1 cm × 0.1 cm 大小, 用肝脏穿刺针吸出一块接种于肝脏一叶或双叶, 接种成功率 100%。约 7 d 后肿瘤形成。

### 1.5 治疗方法

分生理盐水对照组、空载体对照组、IL-12 治疗组、IL-2 治疗组及 IL-12 + IL-2 治疗组。生理盐水对照组及空载体对照组均在肝癌接种后第 1 天肝癌局部分别注射生理盐水 0.8 ml 和 PA317-GCXEXPXN  $1 \times 10^7$  细胞。IL-12 治疗组、IL-2 治疗组及 IL-12 + IL-2 治疗组即为肝癌接种后第 1, 3, 5, 7 天肝癌局部分别注射包装细胞 PA317-GCIL12EXPXN, PA317-GCXEIL2PN 或 PA317-GCIL12EIL2PN。每组为 10 只大鼠。注入的包装细胞数为  $1 \times 10^7$  细胞。双侧接种肝癌均对一侧进行治疗。对生存期超过 2 个月的大鼠定为长期生存。

### 1.6 观察方法

肝癌基因治疗前后行肝脏常规 MRI 检查。观察大鼠生存期及毒性反应。每组于治疗后 5 d 及 7 d 剖腹取切取肝癌组织, 行常规病理检查及 OX8 免疫组化染色, 观察肿瘤细胞及局部淋巴细胞浸润情况。大鼠肝癌治疗前 1 d、治疗后 3 d、治疗后 7 d、1 个月及 2 个月 ELISA 法检测血清和肝癌组织 mL-12 和 hIL-2 水平。按盒内说明进行操作。

1.7 统计学处理采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 包装细胞株的鉴定

对经过包装的 3 组逆转录病毒载体进行 RT-PCR 反应, 扩增产物经基康公司序列测定, 证明为 mL-12 及 hIL-2 序列。目的基因均已整合入病毒基因组。包装细胞株最高病毒滴度分别为: PA317-GCIL12EXPXN  $2 \times 10^6$  CFU/ml, PA317-GCXEIL2PN  $2.4 \times 10^6$  CFU/ml 和 PA317-GCIL12EIL2PN  $1.4 \times 10^6$  CFU/ml。并取该病毒滴度的包装细胞株作治疗用。ELISA 蛋白表达量检测: (1) mL-12 融合蛋白: PA317-GCIL12EXPXN  $150.05 \text{ ng} \cdot 10^{-6} \cdot 48 \text{ h}^{-1}$ , PA317-GCIL12EIL2PN  $45.8 \text{ ng} \cdot 10^{-6} \cdot 48 \text{ h}^{-1}$ ; (2) hIL-2 蛋白: PA317-GCXEIL2PN  $7.5 \text{ ng} \cdot 10^{-6} \cdot 48 \text{ h}^{-1}$ , PA317-GCIL12EIL2PN  $6.7 \text{ ng} \cdot 10^{-6} \cdot 48 \text{ h}^{-1}$ 。

### 2.2 治疗结果

各组 35 d 生存率见表 1。平均生存时间见表 2。生理盐水对照组及逆转录病毒空载体对照组大鼠均于肝癌接种后 15 d 内死亡。IL-12 + IL-2 治疗组平均生存时间明显优于生理盐水对照组 ( $P < 0.01$ )、空载体对照组 ( $P < 0.01$ )、IL-2 治疗组 ( $P < 0.01$ ) 和 IL-12 治疗组 ( $P < 0.05$ )。早期治疗(第 1, 3 天治疗)明显优于晚期治疗(第 5, 7 天治疗) ( $P < 0.01$ )。60 d 以上长期生存的大鼠剖腹活检病理切片检查未发现肿瘤细胞。在双侧接种的肝癌进行早期治疗中发现, 治疗侧肝癌局部肿块消退, 另一侧肿瘤明显缩小。

表 1 大鼠 35 d 生存率(%)

Tab. 1 The 35 d survival rates of rats

| Groups  | day 1 | day 3 | day 5 | day 7 |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| PS      | 0     | —     | —     | —     |
| REV     | 0     | —     | —     | —     |
| IL-2    | 70    | 50    | 8     | 2     |
| IL-12   | 98    | 95    | 24    | 6     |
| IL-12/2 | 100   | 100   | 30    | 10    |

PS: Physiological saline control group; REV: Retroviral empty vector control group; IL-2: IL-2 treatment group; IL-12: IL-12 treatment group; IL-12/2: IL-12 + IL-2 treatment group

表 2 大鼠平均生存时间( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 The average survival time of rats

| Groups  | day 1       | day 3       | day 5      | day 7      |
|---------|-------------|-------------|------------|------------|
| PS      | 9.8 ± 1.6   | —           | —          | —          |
| REV     | 10.1 ± 1.2  | —           | —          | —          |
| IL-2    | 38.0 ± 2.8  | 34.0 ± 1.7  | 17.7 ± 2.1 | 14.0 ± 2.5 |
| IL-12   | 2 rats > 60 | 1 rat > 60  | 23.0 ± 2.8 | 20.8 ± 2.1 |
| IL-12/2 | 3 rats > 60 | 2 rats > 60 | 26.5 ± 2.9 | 23.1 ± 1.8 |

### 2.3 病理学及影像学检查

肝癌局部接种后第 7 天, MRI 可见明显肿瘤形成(图 1)。治疗组长期生存大鼠治疗后 1 个月, 可见肿瘤阴影消退(图 2)。病理学检查发现, 经 IL-12 + IL-2 治疗后 5 d, 肿瘤局部有大量淋巴细胞浸润。治疗后 7 d 可见血管壁增厚, 增生血管减少。血清 mIL-12 和 hIL-2 水平检测发现, 治疗前血清检测不到 mIL-12 和 hIL-2, 治疗后 3 d 明显增高, 2 个月后仍维持在较高水平(表 3)。肝癌组织 mIL-12 和 hIL-2 检测发现, 尽管联合基因治疗组产生的 mIL-12 或 hIL-2 水平低于单基因治疗组, 但仍能维持在较高水平(表 4)。

### 3 讨论

肝癌的发生是多因素作用的结果, 单基因治疗往往很难达到理想的治疗效果。应用 IL-12 或 IL-2 基因治疗可增加肿瘤组织内 NK 细胞和 CD8<sup>+</sup> 细胞的数量, 提高肿瘤组织内  $\gamma$ -干扰素的产生<sup>[4]</sup>。IL-12 和 IL-2 联合基因治疗产生了稳定的细胞毒 T 淋巴细胞和 NK 细胞的抗肿瘤杀伤活性<sup>[5]</sup>。有效的抗肿瘤免疫反应的产生依赖于 IL-12 和 IL-2 的协同作用和有效浓度, 同时产生了长期的抗肿瘤免疫记忆<sup>[6-7]</sup>。在以前的研究中, 研究者分别构建表达 IL-12 或 IL-2 的载体进行基因治疗<sup>[8]</sup>。我们构建的逆转录病毒载体同时表达 mIL-12 和 hIL-2 基因产物。实验结果显示, IL-12 + IL-2

治疗组治疗效果明显优于单基因治疗组。

图 1 肝肿瘤接种 7 d 大鼠 MRI 成像

Fig. 1 Magnetic resonance imaging of rats seven days after liver tumor implantation

图 2 IL-12 和 IL-2 联合基因治疗后 1 月大鼠 MRI 成像

Fig. 2 Magnetic resonance imaging of rats one month after combined interleukin 12 and interleukin 2 gene therapy

表 3 联合基因治疗后大鼠血清 mIL-12 和 hIL-2 水平检测结果(ng/ml)

Tab. 3 Assay of mIL-12 and hIL-2 levels in serum of rats treated with combined gene therapy

|                      | mIL-12     | hIL-2      |
|----------------------|------------|------------|
| non-treatment        | < 0.8      | < 0.8      |
| 3 d after treatment  | 23.4 ± 2.1 | 18.1 ± 1.9 |
| 7 d after treatment  | 16.2 ± 1.3 | 12.9 ± 1.8 |
| 30 d after treatment | 14.3 ± 0.9 | 10.5 ± 1.1 |
| 60 d after treatment | 11.8 ± 1.3 | 8.5 ± 0.9  |

表 4 肿瘤内注射治疗后 3 d 肿瘤组织 mIL-12 和 hIL-2 水平检测 (ng/ml)

Tab. 4 Assay of mIL-12 and hIL-2 levels in tumor 3 d after intratumoral injection

| Groups  | mIL-12     | hIL-2      |
|---------|------------|------------|
| PS      | <0.8       | <0.8       |
| REV     | <0.8       | <0.8       |
| IL-2    | <0.8       | 10.2 ± 1.3 |
| IL-12   | 15.8 ± 1.8 | <0.8       |
| IL-12/2 | 10.4 ± 1.5 | 8.0 ± 0.7  |

我们研究发现,肝癌早期治疗的疗效明显优于晚期。在使用 IL-12 + IL-2 联合早期治疗中,共有 5 只大鼠(占 25%)长期存活,影像学检查和病理学检查发现肿瘤完全消退。35 d 生存率早期治疗组明显高于晚期治疗组。表明肿瘤免疫基因治疗早期应用的重要性。病理学检查和 MRI 检查进一步证实了疗效。IL-12 + IL-2 治疗后 5 d,肿瘤局部有大量淋巴细胞浸润,OX8 免疫组化发现 NK 细胞及细胞毒 T 淋巴细胞数明显增加。大鼠血清 IL-12 和 IL-2 检测结果表明,肝癌联合免疫基因治疗后 3 d,IL-12 和 IL-2 达最水平,2 个月后仍维持在较高水平。我们在对一侧肿瘤进行局部注射基因治疗后,发现治疗侧肿瘤消退,而未注射侧肿瘤明显缩小。对长期生存的大鼠再次接种肝癌细胞,未发现肿瘤生长。所以,联合基因治疗后能提高大鼠的整体免疫功能,且能维持在稳定水平。对于晚期治疗大鼠,进行联合基因治疗后也能获得一定的疗效,治疗效果明显优于单基因治疗组。IL-12 和 IL-2 联合基因治疗肿瘤的疗效远大于应用单一基因治疗,而且这种治疗作用不是简单的叠加,而是比单个基因作用的总和

还在强的协同作用。在我们实施的肿瘤局部注射治疗的大鼠中,无一例发生急性毒性反应,也没有发生出血休克等并发症。以上结果表明,如果尽早应用不同基因进行联合基因治疗,不仅可以大大增强治疗效果,并有可能使肝癌完全消退。

#### [参考文献]

- [1] Gillies SD, Lan Y, Brunkhorst B, *et al.* Bi-functional cytokine fusion proteins for gene therapy and antibody-targeted treatment of cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51(8): 449-460.
- [2] Wigginton JM, Wiltout RH. IL-12/IL-2 combination cytokine therapy for solid tumours: Translation from bench to bedside[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2002, 2(5): 513-524.
- [3] Sobota V, Bubenik J, Simova J, *et al.* Intratumoral IL-2 gene transfer improves the therapeutic efficacy of IL-12 but not IL-18[J]. *Folia Biol*, 2000, 46(5): 191-193.
- [4] Dow SW, Elmslie RE, Fradkin LG, *et al.* Intravenous cytokine gene delivery by lipid-DNA complexes controls the growth of established lung metastases[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(18): 2961-2972.
- [5] 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.
- [6] Tanaka M, Saijo Y, Sato G, *et al.* Induction of antitumor immunity by combined immunogene therapy using IL-2 and IL-12 in low antigenic Lewis lung carcinoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(11): 1481-1490.
- [7] Pappo I, Tahara H, Robbins PD, *et al.* Administration of systemic or local interleukin-2 enhances the anti-tumor effects of interleukin-12 gene therapy[J]. *J Surg Res*, 1995, 58(2): 218-226.
- [8] Addison CL, Bramson JL, Hitt MM, *et al.* Intratumoral coinjection of adenoviral vectors expressing IL-2 and IL-12 results in enhanced frequency of regression of injected and untreated distal tumors[J]. *Gene Ther*, 1998, 5(10): 1400-1409.

[收稿日期] 2002-08-05

[修回日期] 2002-10-10

## 《肿瘤防治杂志》2003 年改月刊及征订启事

《肿瘤防治杂志》由中华人民共和国卫生部主管,系中华预防医学会系列杂志。“以防为主(三级预防),防治并举”为本刊的办刊宗旨;以从事肿瘤基础研究与临床工作者以及医学院校师生为主要对象。主要栏目有:流行病学与预防医学、基础研究、临床研究、综述与讲座、短篇与病案报道、简讯等。本刊为国家新闻出版署“双效期刊”、“中国生物医学核心期刊”、“中国科技核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊”及“ABSTRACT JOURNALS 来源期刊”。

2003 年由双月刊改为月刊,112 页码不变。国际标准 A4 开本,每月底出版,每期定价 10 元,全年订价 120 元。刊号 CN 37-1355/R,ISSN 1009-4571,国内邮发刊号 24-145,国际代号 4917BM。欢迎读者在当地邮局订阅,漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

联系地址:山东省济南市济兗路 440 号山东省肿瘤医院内《肿瘤防治杂志》编辑部

电话:(0571)7984777-82516

传真:(0531)7984783

E-mail: zgzlx@public.jn.sd.cn

邮编:250117