

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )01-0053-06

## 小鼠结肠癌 RNA 转染 *mIL-12* 修饰的树突状细胞诱发抗肿瘤活性

褚晓源<sup>1,2</sup>, 王杰军<sup>2</sup>, 陈龙邦<sup>1</sup>, 王靖华<sup>1</sup>, 管晓翔<sup>1</sup>, 耿怀成<sup>1</sup>, 张 群<sup>1</sup>, 宋海珠<sup>1</sup>, 汪 灏<sup>1</sup>( 1. 南京军区南京总医院肿瘤内科, 南京 210002; 2. 第二军医大学长征医院 肿瘤内科, 上海 200003 )

[ 摘 要 ] **目的:** 研究以小鼠结肠癌细胞 CT-26 RNA 作为抗原体外转染经 *mIL-12* 基因修饰的树突状细胞( dendritic cells, DC ), 观察其诱导特异性抗肿瘤的效应。**方法:** 小鼠骨髓细胞体外以 rmGM-CSF、rmIL-4 诱导培养获取树突状细胞, 流式细胞术检测纯度; 293 细胞扩增携带 *mIL-12* 基因的重组腺病毒, 体外转染树突状细胞; Trizol 法提取 CT-26 细胞总 RNA, 应用 TransMessenger 体外转染 *mIL-12* 基因修饰的树突状细胞, 免疫接种小鼠。ELISA 法检测细胞上清及小鼠血液中 *mIL-12* 水平, LDH 释放法检测小鼠体内细胞毒性 T 淋巴细胞( CTL )杀伤活性。**结果:** 小鼠骨髓细胞经诱导培养后, 获得大量高纯度的树突状细胞, 流式细胞术检测 CD11c<sup>+</sup> 的树突状细胞 > 90%; 提取的 CT-26 细胞总 RNA 体外经 TransMessenger 介导, 转染 *mIL-12* 基因修饰的树突状细胞后, 回输小鼠, 可以诱导体内生成较高水平的特异性 CTL 活性, 亲本肿瘤接种后小鼠 100% 长期存活, 而以该 RNA 转染 Ad-LacZ 修饰 DC 后的对照组及 RNA 转染 DC 的对照组, 诱导机体生成的特异性 CTL 活性显著低于实验组(  $P < 0.01$  ), 亲本肿瘤接种后小鼠 60% 长期存活, DC、PBS 对照组则均未诱导机体生成特异性 CTL 活性, 小鼠无长期存活。**结论:** 树突状细胞经小鼠结肠癌 CT26 细胞 RNA 转染和 *mIL-12* 基因修饰后免疫接种小鼠, 可在体内有效提呈肿瘤抗原, 诱导机体产生高水平的 CTL, 更有效地诱发特异性抗肿瘤效应。

[ 关键词 ] RNA; 白细胞介素-12; 树突状细胞; 基因治疗; 结肠癌; 细胞毒性 T 淋巴细胞

[ 中图分类号 ] R392.1 [ 文献标志码 ] A

## Specific antitumor-immunity induced by *mIL-12* gene modified dendritic cells transfected with murine colon carcinoma RNA

CHU Xiao-yuan<sup>1,2</sup>, WANG Jie-jun<sup>2</sup>, CHEN Long-bang<sup>1</sup>, WANG Jing-hua<sup>1</sup>, GUAN Xiao-xiang<sup>1</sup>, GENG Huai-cheng<sup>1</sup>, ZHANG Qun<sup>1</sup>, SONG Hai-zhu<sup>1</sup>, WANG Hao<sup>1</sup>( 1. Department of Oncology, General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002, China; 2. Department of Oncology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China )

[ Abstract ] **Objective:** To investigate the specific anti-tumor effect of *mIL-12* gene modified dendritic cells ( DC ) transfected with the total RNA of CT-26 murine colon carcinoma. **Methods:** DC were cultured from murine bone marrow in the presence of rmGM-CSF and rmIL-4. The purity of DC was detected by flow-cytometry. Adenovirus carrying *mIL-12* gene was proliferated in 293 cells and was transfected into DC. The total RNA of CT-26 was extracted by Trizol reagent and was introduced into *mIL-12* gene modified DC by TransMessenger *in vitro*. The modified DC were used to immunize mice. The *in vitro* and *in vivo* levels of *mIL-12* and the *in vivo* activity of cytotoxic T lymphocyte( CTL ) were examined by ELISA assay and modified LDH release assay, respectively. The tumor growth and animal survival time of immunized mice were estimated after they were challenged with parental tumor cells. **Results:** DC were successfully obtained from the culture of murine bone marrow, with CD11c<sup>+</sup> accounting for over 90%. Vaccination with *mIL-12* gene modified DC transfected with the total RNA of CT-26 induced strong specific CTL activity *in vitro*. All the immunized mice survived for a long term. Vaccination with Ad-LacZ modified DC and DC transfected with the total RNA induced moderate specific CTL activity *in vitro*(  $P < 0.01$  ), and 60% of the immunized mice survived for a long time. There was no specific CTL activity in the

[ 基金项目 ] 江苏省“六大人才高峰”资助项目( No. 2005A4 ); 南京军区南京总医院院管基金重点资助项目( No. 2006006 )

[ 作者简介 ] 褚晓源( 1969- ), 男, 浙江省嘉兴市人, 副主任医师, 博士研究生, 主要从事肿瘤内科学方面的研究

[ 通讯作者 ] 褚晓源, E-mail: chuxiaoyuan\_6906@tom.com

mice immunized with DC and PBS and all the mice died. **Conclusion:** *mIL-12* gene modified DC transfected with the total RNA of CT26 can effectively present endogenous tumor antigen and induce strong CTL activity, thus inducing more specific anti-tumor immune response.

[ **Key words** ] RNA; interleukin 12; gene therapy; dendritic cells; colon carcinoma; cytotoxic T lymphocyte

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14( 1 ): 53-58 ]

树突状细胞 ( dendritic cell, DC ) 是目前已知功能最强的抗原提呈细胞, 以 DC 介导的特异性抗肿瘤免疫治疗主要依赖于细胞毒性 T 淋巴细胞 ( CTL ) 介导的细胞免疫, 现已应用于 I、II 期临床试验。该疗法对某些实体瘤 ( 如恶性黑色素瘤、前列腺癌和肾癌 ) 的治疗已取得满意疗效, 但对抗原性较弱的结肠癌、肝癌等实体瘤则疗效欠佳。究其原因主要是这些肿瘤抗原性弱, 且肿瘤患者体内 DC 存在提呈功能缺陷<sup>[1]</sup>。利用肿瘤细胞 mRNA 转染 DC 是一种装载肿瘤抗原的有效方法, 可以改善结肠癌等抗原性弱的缺陷<sup>[2]</sup>。白细胞介素-12 ( interleukin-12, IL-12 ) 在肿瘤免疫治疗方面具有毒副作用小、抗肿瘤生成及转移活性高的优点, 利用基因转染技术将 IL-12 基因体外修饰 DC 后可促进 DC 的成熟并优化 DC 对抗原的提呈功能<sup>[3-4]</sup>。本研究以小鼠结肠癌细胞 CT-26 RNA 作为抗原, 体外转染经 *IL-12* 基因修饰的 DC, 回输小鼠后, 观察其体内激发特异性抗肿瘤免疫应答的能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料

BALB/c 小鼠为雄性, 6~8 周龄, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [ 实验动物合格证号: SCXK( 沪 ) 2003-0003 ]。293 细胞购自上海细胞生物研究所, 小鼠结肠癌细胞 CT-26 株为南京总院肿瘤内科实验室常规传代。非增殖型重组腺病毒 Ad-mIL-12、Ad-Lac-Z 为上海医元生物基因科技公司惠赠。RPMI 1640、DMEM 培养液购自 Gibco 公司, 新生牛血清购自杭州四季青公司, rmIL-4 和 rmGM-CSF 购自 Sigma 公司, TransMessenger 转染试剂购自 Qiagen 公司, 抗 CD11c-FITC 荧光素标记抗体购自 Pharmingen 公司, 小鼠 mIL-12 ( p70 ) 酶联免疫吸附反应 ( ELISA ) 检测试剂盒购自晶美公司, 乳酸脱氢酶 ( LDH ) 检测试剂盒购自南京建成生物试剂公司。流式细胞仪 ( FACS ) 购自 Calibur BD 公司。

### 1.2 小鼠骨髓树突状细胞的培养

无菌取小鼠股骨, 冲洗出骨髓细胞, Tris-NH<sub>4</sub>Cl 溶去红细胞, 磷酸盐缓冲液 ( PBS ) 洗 2 次后, 加入含

10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 调节密度为  $1 \times 10^6$ /ml, 再加入 rmGM-CSF 10 ng/ml、rmIL-4 3 ng/ml, 置培养瓶培养。之后每隔 3 d 吸弃培养液及悬浮细胞, 重新加入新鲜培养液及 rmGM-CSF 10 ng/ml、rmIL-4 3 ng/ml, 体外培养至第 9 天, 吸取培养上清及悬浮细胞, 调整密度, 以  $6 \times 10^6$ /孔加入 6 孔板, 各孔补加新鲜培养液 3 ml 及 rmGM-CSF 10 ng/ml、rmIL-4 3 ng/ml, 培养过夜, 轻轻吹吸后吸取全部培养液及悬浮细胞, 即获得树突状细胞。

### 1.3 树突状细胞表面分子的 FACS 分析

取培养获取的树突状细胞, 加入含 5  $\mu$ g/ml 异硫氰酸荧光素 ( FITC ) 抗 CD11c 的单抗标记液 100  $\mu$ l, 置 4  $^{\circ}$ C 暗处孵育 45 min, PBS 洗 2 遍, 行流式细胞分析。

### 1.4 重组 Ad-mIL-12 的扩增、纯化和滴度测定

293 细胞培养至 80% 融合, 换液 24 h 培养后, 加入重组腺病毒 Ad-mIL-12 ( MOI 为 100 ), 继续培养 48 h, 收集 293 细胞培养上清和病变的 293 细胞, 反复冻融释放病毒, 聚乙二醇 ( PEG ) 法纯化, 半数细胞感染量 ( TCID<sub>50</sub> ) 微量滴定法测定病毒滴度。对照重组腺病毒 Ad-LacZ 同法扩增制备。

### 1.5 重组 Ad-mIL-12 体外修饰树突状细胞

将树突状细胞以  $1 \times 10^6$ /ml 接种于 6 孔板, 贴壁后, 用 DMEM 培养液将细胞洗 2 遍, 加入 MOI 为 100 的腺病毒悬液 ( Ad-mIL-12, Ad-Lac-Z ) 400  $\mu$ l, 设无病毒组对照, 置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养 1 h 后, 加入 DMEM 完全培养液继续培养, 收获不同时间 ( 12、24 和 48 h ) 的培养上清, 按照 ELISA 检测试剂盒说明检测 mIL-12 p70 蛋白的含量。

### 1.6 转染效率测定

参考文献 [ 5 ] 采用 X-gal 染色方法测定。

### 1.7 CT-26 细胞总 RNA 提取与鉴定

CT-26 细胞传代培养 24 h 后, 细胞生长至 80% 融合, 加入总 RNA 提取试剂 ( Trizol ) 提取获得总 RNA, 用分光光度计测定其  $D_{260}$ 、 $D_{280}$  值, 甲醛变性电泳检测其纯度及完整性。

### 1.8 CT-26 细胞 mRNA 体外转染 mIL-12 修饰后的树突状细胞

参照 TransMessenger 使用说明操作, 树突状细胞以 PBS 洗 2 次备用。含 94  $\mu\text{l}$  Buffer EC-R 的 EPP 管中加入 4  $\mu\text{l}$  Enhancer R, 再加 2  $\mu\text{l}$  RNA (RNA 质量浓度为 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 翻转混匀 10 s, 置室温 5 min, 离心 5 s, 弃上清, 加入 8  $\mu\text{l}$  TransMessenger 转染试剂, 翻转混匀 10 s, 置室温 10 min, 加 900  $\mu\text{l}$  不含牛血清和抗生素的 RPMI 1640 培养液, 振荡 2 次, 迅速将 mRNA-TransMessenger 复合物滴入备用的树突状细胞中, 轻微晃动培养板, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  中培养 3 h 后, 吸弃所有上清, 加含牛血清的 RPMI 1640 培养液 2 ml/孔, 置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养 24 h, 加 10 ml EDTA 室温消化 5 min, 轻轻吹打后收集树突状细胞, PBS 洗 2 次, 加等渗盐水调节树突状细胞密度为  $5 \times 10^7/\text{ml}$ , 立即予小鼠腹腔注射 100  $\mu\text{l}$ 。

### 1.9 体内抗肿瘤实验

将小鼠随机分为 5 组 (每组 8 只): PBS 组、DC 组、RNA-DC 组、RNA-LacZ-DC 组、RNA-*mIL-12*-DC 组。除 PBS 组外, 其余各组分别以 DC  $5 \times 10^6$ /只腹腔注射。免疫回输 10 d 后, 在小鼠右肋侧皮下接种 CT-26 肿瘤细胞  $2 \times 10^5$ /只, 观测各组小鼠肿瘤的生长情况及小鼠的生存期。

### 1.10 血清中 *mIL-12* 表达量的测定

接种前自每只小鼠尾动脉或尾静脉采血 0.1 ml, 接种后每只小鼠于不同时间 (12、24 和 48 h) 采血 0.3 ml, 室温自然凝固 20 min, 2 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, 按照 ELISA 试剂盒中操作说明检测血清中 *mIL-12* 的水平。

### 1.11 细胞毒活性的检测

采用 LDH 释放法<sup>[6]</sup>。小鼠经树突状细胞回输 8 d 后, 各组随机取 3 只小鼠, 取脾脏制备细胞悬液, 取  $2 \times 10^7$  脾细胞, 加入  $2 \times 10^6$  经丝裂霉素 C 灭活 40 min 的 CT-26 细胞, 10 ml RPMI 1640 培养液 (含 10% 新生牛血清、50 U/ml *mIL-2*) 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱培养 5 d 后, 收集活细胞用作效应细胞, 以效靶比 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1 与 CT-26 靶细胞混合, 加入 96 孔圆底培养板, 总体积 200  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵育 4 h, 各孔加冷 9 g/L NaCl 终止效靶反应, 1 500 r/min 离心 5 min, 取 100  $\mu\text{l}$  上清测 LDH 释放率, CTL 对肿瘤细胞的杀伤活性按下式计算:

$$\text{杀伤活性}(\%) = \frac{(\text{样品释放组 } D \text{ 值} - \text{自然释放组 } D \text{ 值})}{(\text{最大释放组 } D \text{ 值} - \text{自然释放组 } D \text{ 值})} \times 100\%$$

### 1.12 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组内前后不同时间比较采用两因素方差分析, 组间比较采用单因素方差分析, 组

间方差不齐时两两组间比较采用 Tamhane's *t* 检验。使用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 体外培养获取树突状细胞

小鼠骨髓细胞体外加入 rmGM-CSF 10 ng/ml、rmIL-4 3 ng/ml 培养 3~5 d 后, 出现大量的贴壁增殖性细胞集落, 上清中有死亡的 T、B 细胞、红细胞、粒细胞, 换液后被去除。培养 9 d 后, 大量增殖的细胞开始散落在培养上清中, 重新贴壁培养过夜后, 树突状细胞悬浮在上清中。1 只小鼠骨髓经体外培养 9 d 可以获得大量 ( $2 \times 10^7$  个细胞以上) DC。FACS 鉴定树突状细胞特异性标志 CD11c<sup>+</sup> 细胞 > 90%, 表明培养获得的 DC 具有极高的纯度 (图 1)。

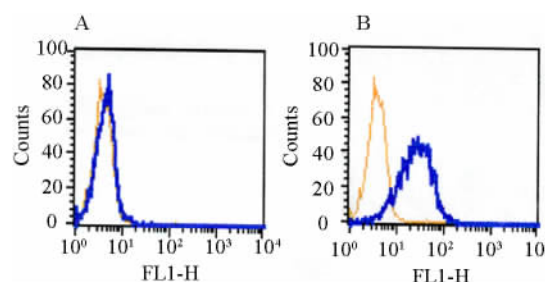


图 1 FACS 检测骨髓来源树突状细胞表面分子 CD11c  
Fig. 1 Detection of surface marker CD11c on dendritic cells derived from bone marrow by FACS

A: Control; B: CD11c<sup>+</sup>

### 2.3 腺病毒转染 DC 的效率

携带 *mIL-12* 基因腺病毒通过 293 细胞体外扩增培养 (图 2), 获得大量复制后的腺病毒, 进一步经 PEG 纯化后用于后继实验。X-gal 染色法检测显示, 腺病毒对 DC 的转染效率 > 99%。

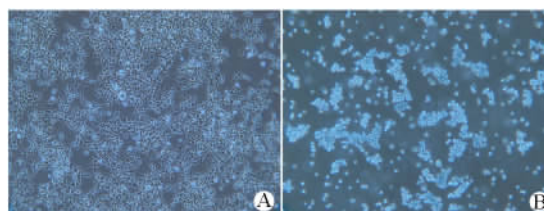


图 2 293 细胞扩增携带 *mIL-12* 基因的腺病毒  
Fig. 2 Amplification of adenirus with *mIL-12* gene in 293 cells

A: Before amplification; B: After amplification

### 2.3 提取的 CT-26 肿瘤 RNA 的质量

Trizol 法提取获得的 CT-26 肿瘤总 RNA, 分光光度计测定其  $D_{260/280}$  为 1.83, 表明 RNA 纯度较高,  $1 \times 10^7$  细胞得率约 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。甲醛变性电泳检测显示提取获得的总 RNA 无基因组 DNA 污染, 有 28S 和 18S 两条明亮的条带, 量约 2:1, 无降解条带(图 3), 表明 RNA 降解少, 完整性好。

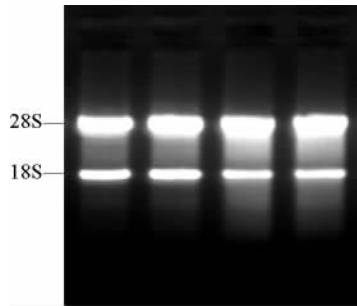


图 3 提取的 CT-26 肿瘤细胞总 RNA 的凝胶电泳分析

Fig. 3 Gel electrophoresis of total RNA isolated from CT-26 tumor cells

### 2.4 转染 DC 上清液中 mIL-12 的表达

细胞数为  $2 \times 10^5/\text{ml}$ 、培养不同时间的 Ad-mIL-12-DC 培养上清液中 mIL-12 蛋白水平, 均显著高于 Ad-Lac-Z 转染的 DC 及单纯 DC 上清液中 mIL-12 的含量 ( $P < 0.01$ , 表 1)。提示携带 mIL-12 基因的重组腺病毒转染 DC 细胞后, 能表达较高水平的 mIL-12。

表 1 转染 Ad-mIL-12 的 DC 上清液中 mIL-12 的表达 ( $\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $n = 3$ )

Tab. 1 Expression of mIL-12 in the supernatant of DC transfected with Ad-mIL-12

Groups	Culture time( t/h )		
	12	24	48
PBS	0	0	0
DC	2.05 $\pm$ 0.46	3.48 $\pm$ 0.32	3.35 $\pm$ 0.58
RNA-DC	2.53 $\pm$ 0.79	3.15 $\pm$ 0.65	2.28 $\pm$ 0.41
RNA-LacZ-DC	2.18 $\pm$ 0.35	2.46 $\pm$ 0.38	3.55 $\pm$ 0.73
RNA-mIL12-DC	78.25 $\pm$ 18.95*	78.96 $\pm$ 23.42*	81.15 $\pm$ 20.36*

\*  $P < 0.01$  vs PBS, DC, RNA-DC and RNA-LacZ-DC respectively

### 2.5 免疫小鼠血清中 mIL-12 的表达

免疫接种小鼠后, RNA-mIL12-DC 组小鼠不同时间血清中 mIL-12 蛋白水平均显著高于 RNA-LacZ-DC 组、RNA-DC 组、DC 组及 PBS 组的 mIL-12 含量 ( $P < 0.01$ , 表 2)。提示携带 mIL-12 基因腺病

毒转染 DC 细胞后回输小鼠, 能明显提高小鼠体内 mIL-12 的水平。

表 2 各组小鼠免疫接种后血清中 mIL-12 的表达 ( $\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $n = 3$ )

Tab. 2 Expression of mIL-12 in mice serum after immunization in all groups

Groups	Immunization time( t/h )		
	12	24	48
PBS	4.05 $\pm$ 0.28	3.88 $\pm$ 0.23	4.12 $\pm$ 0.65
DC	3.97 $\pm$ 0.55	4.32 $\pm$ 0.49	5.06 $\pm$ 0.72
RNA-DC	4.32 $\pm$ 0.84	3.83 $\pm$ 0.66	4.28 $\pm$ 0.59
RNA-LacZ-DC	3.63 $\pm$ 0.80	16.08 $\pm$ 0.42	5.73 $\pm$ 0.76
RNA-mIL-12-DC	24.06 $\pm$ 5.35*	28.08 $\pm$ 6.22*	28.52 $\pm$ 5.41*

\*  $P < 0.01$  vs PBS, DC, RNA-DC and RNA-LacZ-DC respectively

### 2.6 免疫小鼠体内诱导的特异性 CTL 活性

如图 4 所示, 以 Trizol 提取的 CT-26 肿瘤总 RNA 经 TransMessenger 体外转染 DC 回输小鼠体内后 (RNA-DC 组), 可以诱导机体生成较高水平的特异性 CTL 活性; RNA-mIL12-DC 组可以诱导机体生成更高水平的特异性 CTL 活性; 而 RNA-LacZ-DC 组诱导机体生成的特异性 CTL 活性与 RNA-DC 组相近; DC、PBS 组均未诱导机体生成特异性 CTL 活性。表明 mIL-12 基因修饰可以进一步增强肿瘤抗原冲击的 DC 疫苗在体内激活 CD8<sup>+</sup> CTL 的能力。

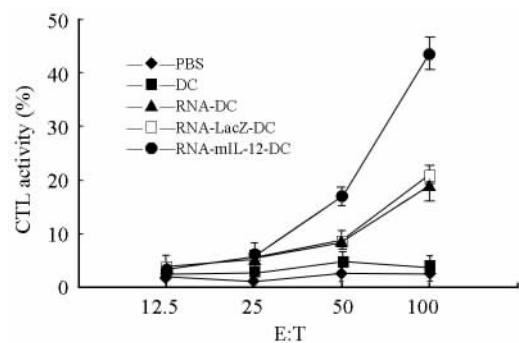


图 4 肿瘤 RNA 转染的树突状细胞免疫小鼠后体内诱导的特异性 CTL 活性

Fig. 4 Induction of specific CTL activity *in vivo* by vaccination with tumor RNA-transfected dendritic cells

### 2.7 免疫小鼠体内的抗肿瘤效应

如图 5 所示, 提取的 CT-26 肿瘤总 RNA 转染的 DC 经 Ad-mIL-12 进一步修饰后免疫小鼠 (RNA-mIL12-DC 组), 可产生较强的保护性免疫力, 可以抵

抗其后接种的亲本 CT-26 肿瘤细胞攻击, 100% 小鼠长期存活, 产生完全保护效应; 而 RNA-DC 组及 RNA-LacZ-DC 组, DC 回输后虽也都产生了保护性效应, 但弱于 RNA-mIL12-DC 组, 仅有 60% 小鼠长期存活; DC 和 PBS 组则均未诱导机体生成特异性 CTL 活性, 小鼠无长期存活。

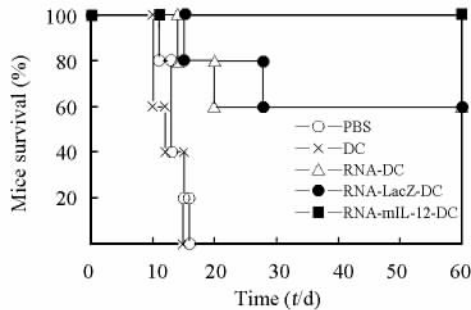


图 5 肿瘤 RNA 转染的树突状细胞免疫对肿瘤细胞攻击的抵抗作用

Fig. 5 Immune protective effect of tumor RNA-transfected dendritic cells on subsequent challenge with parental tumor cells

### 3 讨论

白细胞介素 12, 又称自然杀伤细胞刺激因子 (natural killer cell stimulation factor, NKSF), 其主要来源于两大类细胞: 一类是参与先天免疫的细胞, 另一类是抗原提呈细胞, DC 是后一类中重要的分泌细胞之一, 其分泌量受 DC 的成熟状态及某些刺激信号的影响。IL-12 具有广泛的免疫调节功能: 显著增强 NK 细胞及 CTL 细胞毒作用, 促进 T 细胞、NK 细胞的增殖, 诱导 Th1 淋巴细胞增殖、分化; 抑制肿瘤血管生成, 抑制肿瘤的生长和转移; 刺激 T 细胞及活化的 NK 细胞产生多种细胞因子 (如 IFN- $\gamma$ ) 等, 这些细胞因子又能以一种正反馈旁分泌的方式活化 DC, 上调其 CD80、CD86 等多种共刺激因子的表达, 从而增强 DC 提呈抗原、活化 T 淋巴细胞产生抗原特异性免疫应答的能力<sup>[7-8]</sup>。DC 被 CD40 配体激活后就能分泌 IL-12, 刺激并致敏初始 T 细胞, 诱导 Th1 细胞分化和启动早期免疫反应, 而肿瘤患者体内的 DC 功能上往往都发生缺陷, 其自然分泌的 IL-12 不能有效拮抗 IL-4 和 IL-10 的作用, 影响 Th1 的分化。利用 IL-12 基因修饰 DC, 一方面能通过外源表达 IL-12 来诱导间接促进 DC 的分化、成熟, 另一方面成熟的 DC 表达 IL-12 受体, 促进分泌内源性 IL-12, 两者互相协同有利于肿瘤抗原呈递给 T 细

胞, 提高机体特异性抗肿瘤能力。目前以 IL-12 基因或联合肿瘤抗原修饰的 DC 作为疫苗在治疗多种肿瘤的实验中均产生了明显的治疗效果<sup>[4,9-12]</sup>。

先前的实验已经证实, 通过 Trizol 提纯出的肿瘤细胞总 RNA 经 TransMessenger 体外转染抗原提呈细胞, 回输小鼠后, 可以诱导机体产生较强的特异性抗肿瘤免疫保护力, 反映了 Trizol 提取的肿瘤 RNA 具有很好的抗原性及其体外冲击的抗原提呈细胞可以刺激机体生成显著的抗肿瘤能力。与其他形式的肿瘤抗原相比, RNA-DC 疫苗具有其独特优越性: (1) 可以避免肿瘤抗原性弱的缺点, 致敏 DC 后可诱导产生肿瘤特异性细胞免疫; (2) 可以在不需具体了解肿瘤类型、所涉及的抗原基因谱和 HLA 型别的情况下有效杀伤肿瘤细胞; (3) RNA 半衰期短, 不会整合入宿主基因组, 因此无致癌性。此外, 通过转染介导的方法可以使肿瘤细胞 RNA 被 DC 内源性表达为肿瘤抗原, 更好地提呈抗原, 从而更有效地诱导抗肿瘤效应。

本研究探讨以 IL-12 基因修饰肿瘤抗原冲击 DC, 以进一步增强其抗肿瘤免疫功能。实验表明, 利用携带 mIL-12 基因的重组腺病毒转染小鼠骨髓来源的 DC, 可使 DC 获得可表达 mIL-12 的基因, 在呈递肿瘤抗原的同时, 能够内源性表达 mIL-12, 并能明显提高 mIL-12 的表达量, 进而促进 DC 的分化、成熟; CT-26 细胞总 RNA 体外经 TransMessenger 介导, 转染 mIL-12 基因修饰的 DC 后, 回输小鼠, 可以进一步诱导体内生成较高水平的特异性 CTL 活性, 亲本肿瘤接种后小鼠 100% 长期存活, 而以 RNA 转染 Ad-LacZ 修饰 DC 后的对照组及 RNA 转染 DC 的对照组, 诱导机体生成的特异性 CTL 活性显著低于实验组, 亲本肿瘤接种后小鼠 60% 长期存活, DC、PBS 对照组则均未诱导机体生成特异性 CTL 活性, 小鼠无长期存活。结果说明作为携带肿瘤抗原信息的总 RNA 能有效地被 mIL-12 修饰的 DC 噬入, 并促使其成熟, 启动初始型 T 细胞诱导产生 CTL, 进而产生强大的特异性抗肿瘤效应。

总之, IL-12 基因修饰 DC 可提高 IL-12 的表达, 并能进一步增强肿瘤 RNA 抗原冲击 DC 在体内激活 CD8<sup>+</sup> CTL 的能力, 可以抵抗其后接种的亲本肿瘤细胞攻击, 产生完全保护效应, 表明该方法具有较好的抗肿瘤应用前景。

### [参考文献]

[1] Iwashita Y, Tahara K, Goto S, et al. A phase I study of autolo-

gous dendritic cell-based immunotherapy for patients with primary liver cancer[ J ]. *Cancer Immunol Immunother*,2003,52( 3 ):155-161.

[ 2 ] Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Beneman ZN. Cancer immunotherapy using RNA-loaded dendritic cells[ J ]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 134( 3 ): 378-384.

[ 3 ] Miller G, Bleier JI, Antonescu C, *et al*. Natural killer cell depletion confounds the antitumor mechanism of endogenous IL-12 overexpression[ J ]. *Int J Cancer*,2004,110( 3 ):395-402.

[ 4 ] Satoh Y, Esche C, Gambotto A, *et al*. Local administration of IL-12 transfected dendritic cells induces antitumor immune responses to colon adenocarcinoma in the liver in mice [ J ]. *J Exp Ther Oncol*, 2002, 2( 6 ): 337-349.

[ 5 ] Mittal SK, Bett AJ, Prevec L, *et al*. Foreign gene expression by human adenovirus type-5 based vectors studied using firefly luciferase and bacterial beta-galactosidase gene as reporters [ J ]. *Virology*, 1995, 210( 1 ): 226-230.

[ 6 ] 陈丙莺, 马建吟, 黄钦田, 等. 简易自然杀伤实验——LDH 释放改良法[ J ]. *上海免疫学杂志*,1989, 9( 4 ): 218

[ 7 ] Wigginton J, Gruys E, Geiselhart L. IFN-gama and Fas/FasL are required for the antitumor and antiangiogenic effects of IL-12/pulse IL-2 therapy[ J ]. *J Clin Invest*, 2001, 108( 1 ): 51-62.

[ 8 ] Zitvogel L, Tahara H, Cai Q, *et al*. Construction and characterization of retroviral vectors expression biologically active human interleukin-12 [ J ]. *Hum Gene Ther*,1994,5( 12 ):1493-1506.

[ 9 ] Ribas A, Amarnani SN, Buga GM, *et al*. Immunosuppressive effects of interleukin-12 coexpression in melanoma antigen gene-modified dendritic cell vaccines[ J ]. *Cancer Gene Ther*,2002,9( 11 ):875-883.

[ 10 ] Alves A, Vibert E, Tajceviski S, *et al*. Adjuvant interleukin-12 gene therapy for the management of colorectal liver metastases [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11( 12 ): 782-789.

[ 11 ] Weber SM, Qi C, Neal Z, *et al*. IL-12 cDNA direct injection: Antimetastatic effect from a single injection in a murine hepatic metastases model[ J ]. *J Surg Res*, 2004, 122( 2 ): 210-217.

[ 12 ] Heiser A, Coleman D, Dannull J, *et al*. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors[ J ]. *J Clin Invest*, 2002, 109( 3 ): 409-417.

[ 收稿日期 ] 2007 - 01 - 06 [ 修回日期 ] 2007 - 01 - 19  
[ 本文编辑 ] 韩 丹

· 书 讯 ·

《表观遗传学原理、技术与实践》简介

本书主要阐述了表观遗传学的基本概念、发展历史、表观遗传现象及其分子机制,并对表观遗传学在生物医学中的运用及从事表观遗传研究常用的技术做了广泛而系统的介绍。

全书共分 22 章,主要包括染色质的结构与功能、真核细胞的基因表达调控、表观遗传现象、DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑、染色质区室化和隔离子与基因簇调控、siRNA 和 miRNA 介导的调控、细胞核基质分子对基因表达的调控、疾病形成过程中表观遗传调节、癌症的表观遗传学、免疫系统中的表观遗传学调控、个体发生过程中的表观遗传学、表观遗传学与进化、表观遗传学与衰老、细胞分化的表观遗传学、表观遗传学与干细胞、表观遗传学与环境、表观遗传治疗和基因治疗、植物表观遗传学、表观遗传学研究技术等。

本书可供从事生命科学研究的科研人员作为研究表观遗传学的人门参考书,也可作为高等院校遗传学的研究生教材。

本书主编:薛京伦;定价:65 元;16 开、精装;出版社:上海科学技术出版社;出版日期:2006 年 12 月

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中需要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

- ( 1 )生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori*。
- ( 2 )各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。
- ( 3 )限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam*H I、*Sal* I 等。
- ( 4 )各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数  $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。
- ( 5 )各种物理量的量符号应斜体( pH 用正体除外),例如长度 *L*、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M<sub>r</sub>*、物质的量浓度 *c<sub>B</sub>* 等。
- ( 6 )化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基位等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。
- ( 7 )数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。
- ( 8 )英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *et al*、*vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)