

IL-12 基因修饰瘤苗联合 CpG-ODN 治疗小鼠眼内黑色素瘤的研究

赵 军¹, 黄丽娜¹, 成洪波¹, 张翼飞², 李 辰²

基金项目: 中国广东省自然科学基金资助项目(No. 5300864)
作者单位:¹(518040) 中国广东省深圳市, 暨南大学附属深圳眼科医院 深圳市眼科医院;²(510632) 中国广东省广州市, 暨南大学附属第一医院眼科
作者简介: 赵军, 副主任医师, 医学博士。
通讯作者: 赵军. doctorzhaojun@163.com
收稿日期: 2009-03-17 修回日期: 2009-04-08

Study on treating intraocular melanoma in mice with IL-12 gene modified tumor cell vaccine combined with CpG-ODN

Jun Zhao¹, Li-Na Huang¹, Hong-Bo Cheng¹, Yi-Fei Zhang², Chen Li²

Foundation item: Natural Science Research Foundation of Guangdong Province, China (No. 5300864)

¹Shenzhen Eye Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China; ²The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Correspondence to: Jun Zhao. Shenzhen Eye Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China
Received: 2009-03-17 Accepted: 2009-04-08

Abstract

• **AIM:** To observe the therapeutic effect of interleukin-12 (IL-12) gene modified tumor cell vaccine combined with CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) on intraocular melanoma.

• **METHODS:** Model mice bearing tumor were divided into 3 groups, respectively phosphate-buffered saline (PBS) treatment group, IL-12 gene modified tumor cell vaccine (GTV) treatment group and GTV combined with CpG-ODN (GTVC) treatment group. 30mL PBS, 30mL (3.0 × 10⁶ cells) inactivated GTV and GTVC containing 20mg CpG-ODN were respectively injected into subconjunctiva of mice bearing tumor 3 days and 10 days after bearing tumor mouse model had been established. The time of cornea diabrosis, metastases into cervical lymph nodes and lung, survival time and ratio of CD₄⁺ and CD₈⁺ T cells in peripheral blood were observed.

• **RESULTS:** The time of cornea diabrosis in GTVC group or GTV group was later than that in PBS group, but no statistical difference between GTVC group and GTV group. Metastatic incidence in cervical lymph nodes of GTVC group mice or GTV group mice was lower than that in PBS group 18 days after the model had been established. There was no statistical difference in metastatic incidence between GTV group and GTVC group. Meta-

static incidence in lungs of GTVC group mice was lower than that in PBS group or in GTV group 28 days after the model had been established. There was statistical difference in metastatic incidence respectively between PBS group and GTV group. Compared with negative control (NC) group, the ratio of CD₄⁺ and CD₈⁺ T cells in peripheral blood was lower in PBS group and GTV group. There was no statistical difference on the ratio between GTVC group and NC group. The survival time in GTVC group was longer than that in PBS group and GTV group, but no difference between PBS group and GTV group.

• **CONCLUSION:** CpG-ODN can enhance the therapeutic effect of IL-12 gene modified tumor cell vaccine on intraocular melanoma.

• **KEYWORDS:** Interleukin 12; gene modified tumor vaccine; CpG-ODN; intraocular melanoma; immunotherapy

Zhao J, Huang LN, Cheng HB, et al. Study on treating intraocular melanoma in mice with IL-12 gene modified tumor cell vaccine combined with CpG-ODN. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(6):1066-1068

摘要

目的: 观察白细胞介素-12 (Interleukin-12, IL-12) 基因修饰瘤苗联合含非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸 (CpG) 基序的寡脱氧核苷酸 (oligodeoxynucleotide, ODN) 即 CpG-ODN 治疗小鼠眼内黑色素瘤的疗效。

方法: 将荷瘤模型鼠分为磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 治疗组, IL-12 基因修饰肿瘤细胞疫苗 (gene modified tumor cell vaccine, GTV) 治疗组及 GTV 联合 CpG-ODN (GTVC) 治疗组; 鼠荷瘤模型建立后的第 3d 及第 10d 分别在各组鼠结膜下注射 30μL PBS, 30μL (3.0 × 10⁶ 个细胞) 灭活的 GTV 及含 20μg CpG-ODN 灭活的 GTV, 进行角膜溃破时间、淋巴结和肺部转移瘤发生率、生存时间及外周血 CD₄⁺ 和 CD₈⁺ T 细胞比例的观测。

结果: GTV 组及 GTVC 组角膜溃破晚于 PBS 组时间, 前两组间差异无统计学意义; 鼠荷瘤模型建立后的第 18d, GTV 组及 GTVC 组颈部淋巴结转移瘤发生率低于 PBS 组, 前两组组间差异无统计学意义; 鼠荷瘤模型建立后的第 28d, GTVC 组鼠肺转移瘤发生率低于 PBS 组及 GTV 组, 后两组组间差异无统计学意义; PBS 组及 GTV 组的外周血中 CD₄⁺ 与 CD₈⁺ T 细胞比值下降, GTVC 组与阴性对照组组间差异无统计学意义; GTVC 组小鼠生存时间长于另两组。

结论: 新型免疫佐剂 CpG-ODN 可增强 IL-12 基因修饰瘤苗的抗眼内黑色素瘤效应。

关键词: 白细胞介素 12; 基因修饰瘤苗; 胞嘧啶鸟嘌呤寡脱氧核苷酸; 眼内黑色素瘤; 免疫治疗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2009. 06. 016

赵军, 黄丽娜, 成洪波, 等. IL-12 基因修饰瘤苗联合 CpG-ODN 治疗小鼠眼内黑色素瘤的研究. 国际眼科杂志 2009; 9(6): 1066-1068

0 引言

在本研究组系列研究中发现白细胞介素-12(Interleukin-12, IL-12) 基因修饰瘤苗抗肿瘤效应优于野生型瘤苗, 表现在应用 IL-12 基因修饰瘤苗治疗小鼠眼内黑色素瘤的早期具有一定的疗效即使眼内移植性黑色素瘤溃破角膜的时间延长及淋巴结转移率瘤发生率降低, 但晚期疗效欠佳, 不能使荷瘤鼠生存时间延长等^[1], 因此有必要寻求更为有效的治疗方法。在此研究基础上本研究组应用 IL-12 基因修饰瘤苗联合新型免疫佐剂 CpG 对小鼠眼内黑色素瘤进行治疗观察。

1 材料和方法

1.1 材料 黑色素瘤细胞系 B16F10(本研究室冻存); 健康 C57BL/6 小鼠(南方医科大学动物中心提供); CpG-ODN 1668(序列: TCCATGACGTCCTGATGCT, 全链磷酸硫代修饰, 上海申友生物技术有限责任公司合成)。

1.2 方法

1.2.1 瘤苗的获取 应用黄丽娜等^[2] 系列研究中获取的逆转录病毒表达载体 pLXmIL-12SN 感染的 B16F10 细胞, 即获取的小鼠 IL-12(mouse IL-12, mL-12) 基因修饰的 B16F10(B16F10-mIL-12) 细胞。收集对数生长期 B16F10 及 B16F10-mIL-12 细胞, PBS 洗涤 2 次, 调整细胞密度为 1.0×10^8 /mL, 溶于 PBS 中, 上述两种细胞分别应用 ^{60}Co 照射(根据预实验的结果确定剂量) 制备这两种细胞的灭活瘤苗。

1.2.2 动物分组 每治疗组各 24 只荷瘤 C57BL/6 小鼠。PBS 治疗组即结膜下注射 PBS 组; 基因修饰肿瘤细胞疫苗(gene modified tumor cell vaccine, GTV) 治疗组即结膜下注射灭活的 B16F10-mIL-12 细胞组; GTV 联合含非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(CpG) 基序的寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN) 即 CpG-ODN(GTV + CpG-ODN, GTVC) 治疗组即结膜下注射灭活的 B16F10-mIL-12 细胞及 $20\mu\text{g}$ CpG-ODN 组。非治疗组 8 只健康的 C57BL/6 小鼠, 未经任何处置, 作为行流式细胞仪检查外周血 CD_4^+ 和 CD_8^+ T 细胞数量时的阴性对照(negative control, NC) 组。

1.2.3 治疗过程 (1) 小鼠前房内移植 B16F10 细胞复制小鼠前房内移植性黑色素瘤模型, 参照本研究组赵军等^[3] 报道的方法。(2) 鼠荷瘤模型建立后第 3, 10d, 在乙醚吸入麻醉下分别于每组荷瘤模型鼠结膜下注射 $30\mu\text{L}$ PBS, $30\mu\text{L}$ 灭活的 GTV 及含 $20\mu\text{g}$ CpG-ODN 灭活的 GTV。

1.2.4 指标观测 (1) 角膜溃破时间即小鼠前房内移植性黑色素瘤溃破角膜全层的初始天数。(2) 肿瘤的颈部淋巴结及肺部转移的观察: 小鼠前房内移植黑色素瘤后 18d 及 28d 分别处死每组 8 只荷瘤鼠, 解剖颈部淋巴结及肺部, 手术显微镜下观察淋巴结及肺部有无黑点或黑块, 并结合病理切片证实, 以出现黑点或黑块定为转移。(3) 生存时间的观察: 常规食水喂养每组荷瘤鼠, 直至每组鼠全部死亡, 记录其从荷瘤到死亡的天数。

1.2.5 外周血中 CD_4^+ 与 CD_8^+ T 细胞的检测 分别于每组小鼠前房内移植性黑色素瘤模型建立后 4wk 断尾取血 $40\mu\text{L}$, 分别加入 PE 标记的 CD_4 单抗及 FITC 标记的 CD_8

表 1 各组角膜溃破时间及荷瘤鼠生存时间 ($\bar{x} \pm s, d$)

分组	角膜溃破时间	生存时间
PBS	11.83 ± 0.29	33.00 ± 0.93
GTV	13.96 ± 0.25	35.38 ± 1.03
GTVC	14.58 ± 0.22	39.38 ± 1.53

表 2 各组淋巴结及肺部转移瘤发生情况 $n(\%)$

分组	淋巴结转移瘤发生率	肺部转移瘤发生率
PBS	8(100)	8(100)
GTV	2(25)	6(75)
GTVC	2(25)	1(13)

表 3 外周血 CD_4^+ 和 CD_8^+ T 细胞数量比值 ($\bar{x} \pm s$)

分组	CD_4/CD_8
NC	1.45 ± 0.06
PBS	1.15 ± 0.05
GTV	1.20 ± 0.07
GTVC	1.41 ± 0.08

单抗 $5\mu\text{L}$ 和 $20\mu\text{L}$, 常规方法处理标本并进行流式细胞术分析, 计数 1 万个细胞中的染色阳性细胞百分数。

统计学分析: 全部数据使用 SPSS 11.0 统计软件包进行处理, 角膜溃破时间及生存时间采用 Kaplan-Meier 法的生存分析, 淋巴结及肺转移瘤阳性率比较采用列联表费歇尔精确检验法分析, 外周血淋巴细胞亚群细胞数量比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同治疗方案对角膜溃破时间和生存时间的影响 GTV 组及 GTVC 组角膜溃破时间晚于 PBS 组 ($P < 0.05$), GTV 组及 GTVC 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。GTVC 组小鼠生存时间长于另两组 ($P < 0.05$), GTV 组荷瘤小鼠生存时间和 PBS 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

2.2 不同治疗方案对颈部淋巴结及肺部转移瘤发生率的影响 鼠荷瘤模型建立后第 18d, PBS 组 100% 小鼠, GTV 组及 GTVC 组均为 25% 小鼠出现移植肿瘤细胞眼同侧的颈部淋巴结肿大, 出现黑点或小黑块, 并结合病理切片证实, 即出现淋巴结转移瘤, 前一组及后两组间差异分别具有统计学意义 ($P < 0.05$), 后两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。鼠荷瘤模型建立后第 28d, PBS 组所有小鼠, GTV 组 75% 小鼠及 GTVC 组 13% 小鼠肺表面均可见散在黑点, 并结合病理切片证实, 即出现肺部转移瘤, GTVC 组与另两组间肺部转移瘤发生率的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), PBS 组及 GTV 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

2.3 不同治疗方案对外周血淋巴细胞亚群的影响 小鼠眼内移植黑色素瘤 B16F10 细胞后采取了不同的治疗, 4wk 后断尾取血, 应用流式细胞术分析 CD_4^+ 与 CD_8^+ T 细胞的比值变化。结果显示: PBS 组及 GTV 组与 NC 组分别比较, $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 比值均下降 ($F = 25.54, P < 0.05$), GTVC 组与 NC 组间差异无统计学意义 ($F = 25.54, P > 0.05$, 表 3)。

3 讨论

葡萄膜黑色素瘤是成人眼内最常见的恶性肿瘤, 易转

移致使患者死亡,至今仍无特别有效的治疗方法。免疫治疗是目前对其进行探索性治疗的方法之一。但眼部黑色素瘤细胞免疫原性低和/或机体的免疫功能的受到障碍,免疫系统不能有效地对肿瘤细胞进行免疫监视及排斥。鉴于此,可通过对增强肿瘤细胞免疫原性的方法提高免疫疗效。措施之一即在体外对肿瘤细胞进行基因修饰,以增强肿瘤细胞的免疫原性,提高瘤苗的疗效。IL-12 基因修饰瘤苗在一些实验性肿瘤治疗上获得了较佳的疗效,同时避免了直接应用 IL-12 所产生的毒副作用,引起了越来越多的关注^[1,4,6]。另一种有效地提高瘤苗免疫原性的方法是应用适宜的免疫佐剂。黑色素瘤特异性主动免疫治疗要求佐剂的参与^[7]。免疫佐剂的种类较多,如弗氏佐剂和生物性的佐剂如卡介苗等,都起到了不同程度的免疫增强作用。而含非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸即基序的寡脱氧核苷酸 CpG-ODN 具有更高的免疫增强活性,无明显的毒副作用,作为一种新型佐剂倍受关注^[8,9]。CpG-ODN 可活化巨噬细胞、树突状细胞和自然杀伤细胞、间接激活 T 细胞、刺激 B 细胞的分化以及刺激细胞因子 IL-12、干扰素- γ 等表达的作用,形成免疫调节网络,但其调控的精确分子机制尚不清楚^[10-14]。CpG-ODN 作为佐剂,可有多种不同的序列选择,本实验选用的是 CpG-ODN 1668,是已被实验证实具有佐剂作用的一种^[11,15,16]。我们所检测的指标范围内,IL-12 基因修饰瘤苗联合佐剂 CpG-ODN 治疗起到了更为明显的治疗作用,不仅在早期使肿瘤溃破角膜的时间延长及淋巴结转移率降低,而且在晚期使荷瘤鼠肿瘤肺转移率下降以及荷瘤鼠生存时间的延长,这提示 CpG-ODN 增强了 IL-12 基因修饰瘤苗的抗肿瘤效应。CD₄⁺ 和 CD₈⁺ T 细胞是免疫细胞中最重要的调节成分,CD₄⁺ 和 CD₈⁺ T 细胞数量的变化原因较为复杂。通常情况下,CD₄/CD₈ 之比升高或下降提示机体免疫应答的正调节或免疫功能低下。各组小鼠荷瘤 4wk 后外周血 CD₄/CD₈ 比值显示:PBS 治疗组和 GTV 治疗组 CD₄/CD₈ 比值低于对照组,提示这两组免疫功能低下,而 GTVC 治疗组 CD₄/CD₈ 比值下降不明显,提示该组在此时间点免疫功能下降不明显,这与各组的疗效一致。

IL-12 基因修饰瘤苗及基因修饰瘤苗联合佐剂 CpG-ODN 治疗,均未使荷瘤小鼠肿瘤完全消退而无瘤生存,所有荷瘤小鼠最终均因该肿瘤而死亡,因此寻找更佳的瘤苗治疗方案及其它更为有效的治疗方案有待进一步的研究。

参考文献

- 1 赵军,黄丽娜,成洪波,等. IL-12 基因修饰瘤苗治疗小鼠眼内移植性黑色素瘤疗效观察. 眼科研究 2007;25(3):190-192
- 2 黄丽娜,赵军,孙奋勇,等. 携带 mL-12 基因逆转录病毒载体的构建与表达. 中国病理生理杂志 2005;21(6):1177-1181
- 3 赵军,李辰,狄静芳,等. 小鼠眼内移植三种黑色素瘤细胞系的比较研究. 中国病理生理杂志 2003;19(8):914-916
- 4 Lucas ML, Heller L, Coppola D, et al. IL-12 plasmid delivery by *in vivo* electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16F10 melanoma. *Mol Ther* 2002;5(6):668-675
- 5 Lee SC, Wu CJ, Wu PY, et al. Inhibition of established subcutaneous and metastatic murine tumors by intramuscular electroporation of the interleukin-12 gene. *J Biomed Sci* 2003;10(1):73-86
- 6 Sangro B, Melerol I, Qian C, et al. Gene therapy of cancer based on interleukin 12. *Curr Gene Ther* 2005;5(6):573-581
- 7 Mitchell MS, Harel W, Kempt RA, et al. Active specific immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol* 1990, 8(5):856-869
- 8 Qin W, Jiang J, Chen Q, et al. CpG ODN enhances immunization effects of hepatitis B vaccine in aged mice. *Cell Mol Immunol* 2004;1(2):148-152
- 9 Kodama S, Abe N, Hirano T, et al. Safety and efficacy of nasal application of CpG oligodeoxynucleotide as a mucosal adjuvant. *Laryngoscope* 2006;116(2):331-335
- 10 Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;374(6522):546-549
- 11 Lipford GB, Bauer M, Blank C, et al. CpG-containing synthetic digonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol* 1997;27(9):2340-2344
- 12 Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, et al. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998;28(6):2045-2054
- 13 Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, et al. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(7):2879-2883
- 14 Krieg AM, Love-Homan L, Yi AK, et al. CpG DNA induces sustained IL-12 expression *in vivo* and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 1998;161(5):2428-2434
- 15 Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 1996;157(5):1840-1845
- 16 Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, et al. CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997;186(10):1623-1631