

# 肿瘤靶向性载体介导的 IL-12 基因增强裸鼠抗骨肉瘤免疫

叶树楠, 杨述华, 杨操, 许伟华

A Tumor-targeted Vector for Interleukin-12 Gene Therapy to Enhance the Anti-osteosarcoma Immunity in Nude Mouse

YE Shun-nan, YANG Shu-hua, YANG Chao, XU Wei-hua

Department of orthopaedics, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

**Abstract :Objective** To determine whether transferrin-polyethylenimine (Tf-PEI), a tumor-targeted DNA carrier, can be used to deliver the IL-12 gene into the nude mouse model of human osteosarcoma, and to observe the effect of gene therapy. **Methods** Using Tf-PEI as the vector, deliver murine interleukin-12 (mIL-12) gene into human osteosarcoma cells. Free transferrin was used to inhibit Tf-PEI, and the influence was observed. Tf-PEI-mIL12 plasmid complexes were introduced into the nude mouse model of human osteosarcoma by direct intratumor gene injection. Lactic dehydrogenase (LDH) assay was used to evaluate the activity of natural killer (NK) cells. **Results** Tf-PEI can effectively and specifically deliver murine interleukin-12 gene into human osteosarcoma. We also demonstrated that treatment using Tf-PEI-mIL-12 plasmid complexes resulted in significant IL-12 expression in the tumor. Greater activity of NK was also observed in the therapy group as compared with the controls. **Conclusion** Tf-PEI is a high efficiency and low cytotoxicity tumor-targeted vector. It can successfully introduce mIL-12 gene into nude mouse model of human osteosarcoma, and IL-12 gene therapy is able to induce the host antitumor immune response efficiently.

**Key words :**Polyethylenimine; Transferrin; Tumor-targeted; Osteosarcoma; Interleukin-12

**摘要:**目的 观察以转铁蛋白-多聚乙烯亚胺(Transferrin-polyethylenimine, Tf-PEI)为靶向性载体,体内转染小鼠白细胞介素12(murine interleukin-12, mIL-12)基因,治疗裸鼠骨肉瘤模型的疗效。方法 以Tf-PEI为载体,体外转染mIL-12基因入人骨肉瘤细胞,并以游离转铁蛋白竞争性拮抗Tf-PEI,观察基因表达情况。将Tf-PEI包裹mIL-12基因直接注入荷瘤裸鼠的肿瘤局部,检测此基因在肿瘤细胞中的表达情况和小鼠脾脏自然杀伤细胞(NK)活性。结果 Tf-PEI可以靶向性的将mIL-12基因导入人骨肉瘤细胞。在Tf-PEI/DNA治疗组小鼠的肿瘤局部,mIL-12蛋白水平明显升高,小鼠脾细胞NK活性增强。结论 Tf-PEI是一种高效率的肿瘤靶向性基因转染载体,它可以成功的将mIL-12基因导入裸鼠骨肉瘤模型,mIL-12基因治疗可提高机体的抗肿瘤免疫应答。

**关键词:**多聚乙烯亚胺;转铁蛋白;肿瘤靶向;骨肉瘤;白细胞介素12

中图分类号:R738.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)05-0305-03

## 0 引言

转铁蛋白-多聚乙烯亚胺(Transferrin-polyethylenimine, Tf-PEI)是多聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)与转铁蛋白(Transferrin, Tf)偶联形成的复合物。它通过转铁蛋白与恶性肿瘤细胞表面过度表达的转铁蛋白受体结合,可特异性的将外源基因导入靶细胞,从而明显增强PEI针对恶性肿瘤细胞的转染效率和靶向性,增强恶性肿瘤基因治疗的疗效。我们使用Tf-PEI介导mIL-12基因治疗裸

鼠骨肉瘤模型。以了解Tf-PEI靶向性介导基因转染的作用,以及IL-12在裸鼠骨肉瘤中的基因表达和免疫功能增强情况。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂 PEI分子量25KD购自Sigma公司(Aldrich, Milwaukee, WI)。将PEI溶于PBS中,制成4.3mg/mL的储存液(含有0.1M的氮原子),用1mol/L的HCL调pH值至7.0,经0.2μm的微孔滤膜除菌,4℃保存备用<sup>[1]</sup>。Tf-PEI购于美国Bender Medsystems公司。人转铁蛋白、焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)购于Sigma

收稿日期:2004-04-19;修回日期:2004-07-14

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科

公司。DMEM 培养基、新生牛血清、TRIZOL 试剂盒、两步法逆转录-聚合酶链反应试剂盒均为 GIBCO BRL 公司产品。DNA marker、重组 TaqDNA 聚合酶、T4DNA 连接酶均为 Takara 宝生物工程有限公司产品。mIL-12 p70 的 ELISA 蛋白定量检测试剂盒购于 Endogen 公司。大鼠抗小鼠 mIL-12 p70 单克隆抗体为 Biosource 公司产品。广谱即用型 SP 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购于北京中山生物技术有限公司。

1.2 质粒 质粒 pORF-mIL-12elasti (4.8 Kb) 购于 Invivogen 公司。按照常规碱裂解法提取 DNA, 制成 1g/L 的水溶液, -20℃ 保存备用。

1.3 细胞系及实验动物 人骨肉瘤细胞系 MG63 (来源于 ATCC) 购于武汉大学典型培养物保藏中心。YAC-1 细胞为 NK 敏感细胞株, 用于检测 NK 活性, 来源于中国科学院上海细胞生物学研究所。BALB/cA-nude 裸鼠 30 只, 为 7~8 周龄的雄性, 体重 18~24g, 购于华中科技大学同济医学院实验动物中心。

#### 1.4 试验方法

1.4.1 基因转染及竞争拮抗试验 转染复合物的 N/P 比值对转染效率的影响很大。N/P 比值指的是转染复合物中 PEI 分子所含的 N 原子与 DNA 分子中所含的 P 原子的摩尔比<sup>[2]</sup>。1μg 的 DNA 分子中含有 3nmol 的 P 原子。按照不同的 N/P 比值调整 PEI 溶液 (4.3mg/ml) 及 Tf-PEI 的使用量, 见表 1。

表 1 不同 N/P 比值的 PEI 及 Tf-PEI 溶液的使用量

溶液	N/P = 4	N/P = 5	N/P = 6
DNA(μg)	5	5	5
PEI(μL)	0.6	0.8	0.9
Tf-PEI(μL)	2.5	3.1	3.8

注: 上表指的是转染六孔板中一个孔所需要试剂量。

使用质粒 pORF-mIL-12elasti 进行转染。将 5μgDNA 溶于 200μL 的 HBS 缓冲液中, 并将溶液混匀, 此为溶液 A; 将相应体积的 PEI 及 Tf-PEI 溶于 200μL 的 HBS 缓冲液中, 并将溶液混匀, 此为溶液 B; 将溶液 B 加入到溶液 A 中, 混匀后室温静置 20~30min, 此为溶液 C; 在溶液 C 中加入 1mL 无血清 DMEM 培养基, 并将其移入单层培养 MG63 细胞的六孔板内, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱内 4~6 小时; 更换培养基, 加入含 10% 小牛血清的 DMEM 完全培养液 2mL, 继续培养 48h<sup>[3]</sup>。

竞争拮抗试验方法同体外转染实验, 只是在加入转染试剂之前, 先加入 100μL 50mg/mL 人转铁

蛋白, 混匀后再加入 DNA 复合物<sup>[4]</sup>。

1.4.2 逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription PCR, RT-PCR) 按照 TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒说明书步骤提取转染 mIL-12 基因 MG63 细胞的总 RNA, 根据试剂盒说明书步骤, 以此为模板进行两步法逆转录-聚合酶链反应。10μL 逆转录产物用于 PCR。mIL-12 p35 正义引物: 5'-ACACGGGACCAAAACCA GCACAT; 反义引物: 5'-GCT-GAA GGC GTGAA GCA GGA TG。mIL-12 p40 正义引物: 5'-CA GGGACA TCA TCAAACCA GAC; 反义引物: 5'-ACTTGCTGCA TGA GGA ATTGTA。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5min、94℃ 变性 50s、扩增 p35 于 65℃ 退火 60s, 扩增 p40 于 59℃ 退火 60s、72℃ 延伸 70s, 循环 35 次, 72℃ 总延伸 7min。反应完毕后各取 10μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外光凝胶成像系统分析。

1.4.3 mIL-12 p70 蛋白的表达鉴定 按照 mIL-12 p70 的 ELISA 蛋白定量检测试剂盒说明操作, 测定培养液上清中 mIL-12 p70 蛋白的含量。

1.4.4 免疫组化 免疫组化染色用 SP 法, 操作方法按照 SP 试剂盒说明书进行, DAB 染色, 普通显微镜下观察。

1.4.5 裸鼠骨肉瘤模型的建立及治疗观察 将生长旺盛的细胞经消化后, PBS 洗 3 次, 制成 5 × 10<sup>6</sup>/mL 细胞悬液, 给每只小鼠左侧腋下接种 0.2mL。当肿瘤结节长至 5 × 5 × 5mm 时 (接种后第 15 天), 将小鼠随机分成 3 组进行治疗: Tf-PEI 治疗组: 按 N/P = 5, 将 120μg DNA 溶于 300μL HBS 缓冲液中, 将 74.4μL Tf-PEI 溶于 226μL HBS 缓冲液中, 然后将两者混合, 静置 30min, 每只小鼠肿瘤内注射 100μL Tf-PEI/DNA 混合液; Tf-PEI 空载体对照组: 将 74.4μL Tf-PEI 溶于 526μL HBS 缓冲液中, 每只小鼠肿瘤内注射 100μL Tf-PEI 空白对照液; 空白对照组: 不予治疗<sup>[5]</sup>。

每周注射 2 次, 剂量同上, 连续治疗 4 周。第 45 天处死小鼠, 取肿瘤及脾脏标本。

1.4.6 体内基因表达的检测 将肿瘤组织制成细胞悬液培养, 取其上清用 ELISA 法检测 IL-12 蛋白水平。

1.4.7 细胞杀伤活性检测 采用 LDH 乳酸脱氢酶法测定。即荷瘤小鼠经不同治疗后, 切除小鼠脾脏, 制成单细胞悬液作为效应细胞, 靶细胞用 YAC-1 (测定 NK 细胞)。将效应细胞和靶细胞在 96 孔培养板中按不同比例混合, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中过夜, 取每孔上清 100μL 置入平底 96 孔板中, 加入 LDH 基质液 100μL, 室温 10min, 加 0.1mol/L

柠檬酸 50μL/ 孔终止反应, 用酶联检测仪于 570nm 测定各孔吸光度值 (A 值)。NK 细胞杀伤活性计算公式如下: 细胞杀伤率 (%) = (样品释放 A 值 - 靶细胞自然释放 A 值) / (最大释放 A 值 - 靶细胞自然释放 A 值) × 100 %

## 2 结果

2.1 RT-PCR 结果 如图 1 所示, 转染后的 MG63 细胞可检测到 p35mRNA 片段及 p40mRNA 片段, 空载体的 MG63 细胞阴性对照均未检测到 p35mRNA 片段及 p40mRNA 片段。

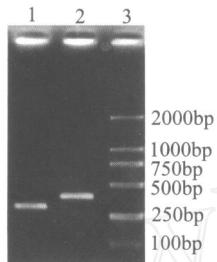


图 1 RT-PCR 分析 mIL-12 基因修饰的 MG63 细胞中基因的表达

1 为 mIL-12p40 产物, 295bp; 2 为 mIL-12p35 产物, 386bp; 3 为 DNA marker

2.2 ELISA 法检测体外转染及竞争性拮抗的结果 由图 2 可以看出, Tf-PEI 转染组 mIL-12 蛋白表达效率显著高于 PEI。同时, 在竞争性拮抗的试验中, 由于游离的转铁蛋白的存在, Tf-PEI 转染组的表达效率显著降低。当 N/P = 5 时, Tf-PEI 的转染效率最高, mIL-12 的表达量为 783ng/mL。

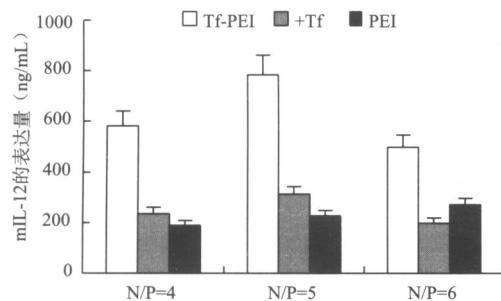


图 2 转染 48 小时后 mIL-12 的表达量

2.3 免疫组化法检测 mIL-12 p70 蛋白的表达 如图 3 所示, 在 400 × 普通光镜视野下可见细胞浆中存在大量粗大棕褐色颗粒的阳性细胞。

2.4 肿瘤组织 mIL-12 的表达 由上表可见, 在裸鼠骨肉瘤模型基因治疗的试验中, Tf-PEI/DNA 治疗组 mIL-12 蛋白水平明显升高; 而未注射基因者, 则相应的 mIL-12 蛋白水平很低 (< 30pg/mL)。

表 2 肿瘤组织 mIL-12 的表达量

组别	mIL-12 表达量 (pg/mL)
空白对照组	27 ± 2.9
Tf-PEI 对照组	23 ± 3.2
Tf-PEI/DNA 治疗组	81 ± 3.4

2.5 NK 细胞杀伤活性 由图 4 可见, 空载体和空白对照组小鼠 NK 活力均较低, Tf-PEI/DNA 治疗组其 NK 杀伤活性明显升高。

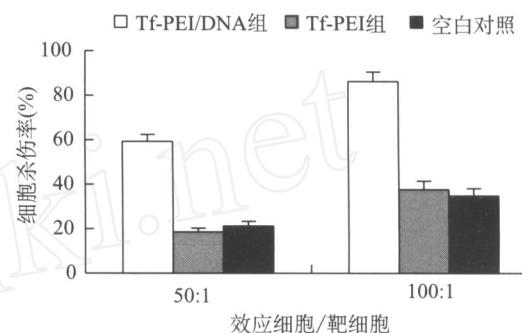


图 4 NK 细胞杀伤活性

## 3 讨论

PEI 是一种新的多聚阳离子型的 DNA 载体, PEI 偶联上配体, 通过受体介导的内吞途径进入靶细胞, 可以显著增加转染效率和靶向性<sup>[5]</sup>。Kircheis 等针对恶性肿瘤细胞表面过度表达转铁蛋白受体的特点, 使用 Tf-PEI 为载体, 将 DNA 传递到皮下生长肿瘤, 并发现用 Tf-PEI 在肿瘤中的基因表达约是裸 DNA 的 10~100 倍, 应用空间稳定的 PEG 接枝的 Tf-PEI/DNA 复合物, 经全身系统给药后, 能将目的基因转运到皮下生长瘤体<sup>[6]</sup>。在体外转染实验中, Tf-PEI 转染组 mIL-12 蛋白表达效率显著高于 PEI。同时, 由于游离的转铁蛋白的存在, Tf-PEI 转染组的表达效率显著降低。这说明 PEI 与转铁蛋白偶联, 通过转铁蛋白与细胞表面表达的转铁蛋白受体结合, 可特异性和高效地将外源基因导入靶细胞。而游离的转铁蛋白竞争性地封闭了骨肉瘤细胞表面的转铁蛋白受体, 从而拮抗了 Tf-PEI 与骨肉瘤细胞表面的转铁蛋白受体特异性的结合, 显著地降低了 Tf-PEI 的转染效率。在体内转染实验中, Tf-PEI/DNA 治疗组肿瘤局部 mIL-12 蛋白水平明显升高, 而 Tf-PEI 对照组和空白对照组相应的 mIL-12 蛋白水平则很低, 提示 Tf-PEI 将 mIL-12 基因高效地、靶向性地转入到体内骨肉瘤组织。

细胞因子基因疗法是目前肿瘤基因治疗研究中的重要方法之一。本实验将 mIL-12 基因直接导入肿瘤组织, 使其自行分泌 mIL-12, 并在肿瘤局部形

(下转第 310 页)

小,同时具备这三个因素的 24 例患者非 SLN 均无转移。

总之,SLN 活检的应用使我们用微创的方法就可以了解腋窝淋巴结的转移状况,对于转移仅局限于 SLN 的患者,虽然找到了一些指标与这类患者相关,但尚需寻找更好的预测方法,从而使治疗更加有的放矢。

#### 参考文献:

- [1] Czerniecki B, Scheff A, Callans L, et al. Immunohistochemistry with pancytokeratin improves the sensitivity of sentinel node biopsy in patients with breast cancer[J]. *Cancer*, 1999, 85 (5): 1098-1003.
- [2] Turner RR, Ollila DW, Krasne DL, et al. Histopathological validation of the sentinel node hypothesis in breast cancer[J]. *Ann Surg*, 1997, 226 (3): 271-278.
- [3] Giuliano AE, Haigh PI, Brennan MB, et al. Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel node negative breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18 (13): 2553-2559.
- [4] Blanchard DK, Donohue J, Reynolds C, et al. Relapse and

morbidity in patients undergoing sentinel lymph node biopsy alone or with axillary dissection for breast cancer [J]. *Arch Surg*, 2003, 138 (5): 482-487.

- [5] Smillie T, Hayashi A, Rusnak C, et al. Evaluation of feasibility and accuracy of sentinel node biopsy in early breast cancer [J]. *Am J Surg*, 2001, 181 (5): 427-430.
- [6] Hwang RF, Krishnamurthy S, Hunt KK, et al. Clinicopathologic factors predicting involvement of nonsentinel axillary nodes in women with breast cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2003, 10 (3): 248-254.
- [7] Travagli JP, Atallah D, Malthieu MC, et al. Sentinel lymphadenectomy without systematic axillary dissection in breast cancer patients: predictors of non-sentinel lymph node metastasis [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2003, 29 (4): 403-406.
- [8] Sachdev U, Murphy K, Derzie A, et al. Predictors of nonsentinel lymph node metastasis in breast cancer patients [J]. *Am J Surg*, 2002, 183 (3): 213-217.
- [9] Weiser RR, Montgomery KK, Tan L K, et al. Lymphovascular invasion enhances the prediction of non-sentinel node metastases in breast cancer patients with positive sentinel nodes [J]. *Ann Surg Oncol*, 2001, 8 (2): 145-149.

[编辑: 刘红武; 校对: 周永红]

#### (上接第 307 页)

成高浓度聚积,不仅可避免全身应用 mIL-12 带来的毒副作用,又可使 mIL-12 在局部获得持久表达,有利于免疫反应的激发和维持。另外,经 mIL-12 基因修饰的肿瘤细胞,其免疫原性增强,细胞表面某些黏附分子和 MHC 抗原的表达也增强,可以诱导机体产生较强的免疫应答。本试验中,在注射 Tf-PEI/DNA 的治疗组,其小鼠脾脏 NK 细胞活性明显高于空载体对照组和空白对照组。提示 mIL-12 可有效提高 NK 细胞活性,增强机体的抗肿瘤免疫功能。

所以我们得出结论:Tf-PEI 可以高效的、向性地将 mIL-12 基因导入裸鼠骨肉瘤模型,mIL-12 可以显著地提高裸鼠脾 NK 细胞的抗肿瘤活性。

(本文图 3 见 324 页)

#### 参考文献:

- [1] Jia SF, Worth LL, Densmore CL, et al. Eradication of osteo-

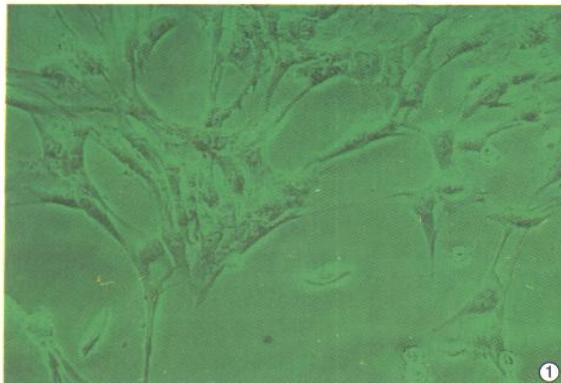
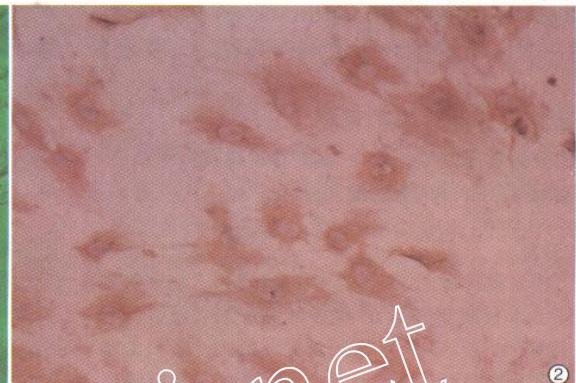
sarcoma lung metastases following intranasal interleukin-12 gene therapy using a nonviral polyethylenimine vector [J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9 (3): 260-266.

- [2] Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, et al. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (13): 7507-7511.
- [3] Godbey WT, Barry MA, Saggau P, et al. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery [J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51 (3): 321-328.
- [4] Kircheis R, Kichler A, Wallner G, et al. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery [J]. *Gene Ther*, 1997, 4 (5): 409-418.
- [5] Kircheis R, Wightman L, Kursa M, et al. Tumor-targeted gene delivery: an attractive strategy to use highly active effector molecules in cancer treatment [J]. *Gene Ther*, 2002, 9 (11): 731-735.
- [6] Kircheis R, Schuller S, Brunner S, et al. Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery *in vivo* [J]. *J Gene Med*, 1999, 1 (2): 111-120.

[编辑: 安凤; 校对: 周永红]

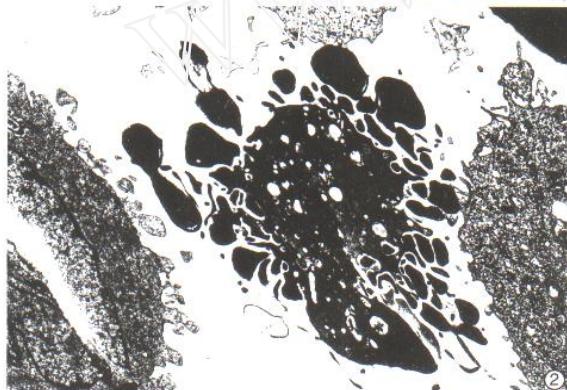
## 钙通道阻滞剂对体外培养的脑膜瘤细胞信号转导及增殖的影响

(正文见 263 页)

图 1 培养早期的脑膜瘤细胞 ( $\times 400$ )图 2 脑膜瘤细胞 Vimentin 抗原阳性表达 (SP  $\times 400$ )

## 三氧化二砷对人卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞增殖抑制的影响

(正文见 287 页)

图 2  $\text{As}_2\text{O}_3$  对 SKOV3 细胞超微结构的影响 (SP  $\times 400$ )

## 肿瘤靶向性载体介导的 IL-12 基因增强裸鼠抗骨肉瘤免疫

(正文见 305 页)

图 3 免疫组化法检测 mIL-12 基因修饰的 MG63 细胞中基因的表达, 在 400 $\times$ 普通光镜视野下可见 mIL-12 阳性细胞

## 纯系 LEW 大鼠及裸小鼠膀胱灌注给药方式的探讨

(正文见 296 页)

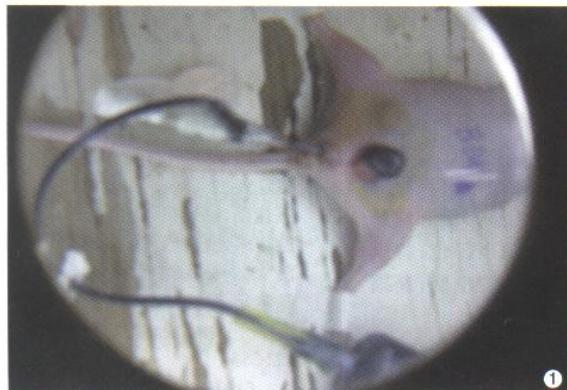


图 1 裸小鼠膀胱灌注示意图

图 2 套管针置入裸小鼠膀胱内图 ( $\times 13$ )