

IL-2 基因和顺铂联合治疗对小鼠 SCC 移植瘤的治疗及免疫功能影响的实验研究

刘世喜 林映荷 唐嗣泉 杨 焕 梁传余

摘要 目的:观察白细胞介素-2(IL-2)基因与顺铂(DDP)联合治疗小鼠头颈鳞癌的疗效。方法:建立小鼠头颈鳞癌动物模型,在荷瘤部位将脂质体包裹的 IL-2 基因或 DDP 直接注入肿瘤中,观察肿瘤大小变化,并检测其自然杀伤细胞(NK)和细胞毒 T 淋巴细胞(CIL)活性。结果:IL-2 基因和 DDP 联合治疗组,肿瘤生长明显受抑制,疗效显著优于单独治疗组和对照组($P < 0.05$),在注射有 IL-2 基因的治疗组中,IL-2 蛋白水平明显升高,小鼠脾细胞 NK 和颈淋巴结 CIL 杀伤活性增强。结论:IL-2 基因治疗可提高肿瘤局部和全身的抗肿瘤免疫应答,能加强 DDP 的抗肿瘤效果。
关键词 头颈肿瘤 白细胞介素-2 基因治疗 顺铂

IL-2 Gene and Cisplatin Combined Therapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Liu Shixi, Tang Siqun, Yang Huan, et al

Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital,
West China University of Medical Sciences

Lin Yinghe

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: The objective of this study is to assess the efficacy of IL-2 gene and cisplatin combined therapy on murine HNSCC models. **Methods**: HNSCC tumors were established in murine models. The sizes of tumors were measured before and after combined IL-2 and cisplatin treatment, and the results were evaluated by comparing different single treatment groups and the control. IL-2 expression was measured after IL-2 gene transfer. Cytotoxic T-lymphocyte (CIL) and natural killer (NK) assays were also performed. **Results**: HNSCC tumor growth was significantly inhibited following combined IL-2 gene and cisplatin therapy, when compared with that of the control. The levels of IL-2 protein expressions were increased in combined and single IL-2 treated groups. The activities of cytotoxic T-lymphocytes and natural killers in both the combined treatment group and the IL-2 treated group are higher than those of the controlled group. **Conclusion**: Combined IL-2 gene and cisplatin therapy can significantly inhibit HNSCC tumor growth in the murine models, and efficiently induces anti-tumor immune reaction of hosts.

Key words: head and neck neoplasms interleukin-2 gene therapy cisplatin

近年来,大量研究表明白细胞介素 2(IL-2)是调节 T 淋巴细胞活性和增殖的主要因子,能显著增强自然杀伤细胞(natural killer, NK)和细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T-lymphocyte, CIL)的活性,激活机体的抗肿瘤免疫反应。但是由于该因子在体内具有半衰期短,需反复、大剂量用药,毒副作用大等缺

点,限制了其临床应用并难以达到满意的疗效。为了达到低毒、高效、持久的更佳的治疗效果,本实验应用 IL-2 基因疗法并联合化疗药物顺铂(cisplatin, DDP)对小鼠头颈鳞癌抑制及免疫功能重建进行了实验研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及动物

DDP 购于 Bristol-Myers Squibb 公司(美国);小鼠头颈鳞

癌细胞株 SCC₉ 携带鼠 IL-2 基因的质粒 mL-2 和未携带 IL-2 基因的质粒 Dotma 均由美国约翰·霍普金斯大学提供, 质粒由优化组合后脂质体包裹; 小鼠为 C3H/HeJ、雌性、6~8 周龄 (由约翰·霍普金斯大学动物中心提供)。

1.2 小鼠头颈肿瘤动物模型的建立及治疗观察

用含有 12.5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 培养小鼠头颈鳞癌细胞株 SCC₉。将生长旺盛的 SCC₉ 细胞经消化后, 用 PBS 洗 3 次制成 1 × 10⁶ 个/ml 细胞悬液, 给每只 C3H/HeJ 小鼠在颈下接种 0.1 ml。当肿瘤结节长至 2 mm × 3 mm × 3mm 时 (接种后第 5 天), 将动物随机分成 5 组进行治疗, 即 mL-2 组、DDP 组、mL-2 和 DDP 联合治疗组、Dotma 组和 PBS 组。

用 Avertin 0.6ml (20mg/ml) 麻醉小鼠, 切开颈下皮肤暴露肿瘤并测量其大小, 按分组直接向肿瘤内分别或联合注射 mL-2 (12.5 μg/50 μl) 50 μl、DDP (5 mg/kg), 对照组分别注射 Dotma (12.5 μg/50 μl) 50 μl 和 PBS 50 μl, 切口用细丝线缝合。治疗后第 4 天, 重复注射相同剂量的 mL-2 或 Dotma 一次, 第 8 天处死小鼠, 测量治疗后肿瘤大小。

肿瘤体积的改变 = 治疗后肿瘤体积 - 治疗前肿瘤体积

1.3 肿瘤细胞 IL-2 基因表达的检测

将肿瘤细胞制成悬液培养, 取其上清用 Elisa 法检测 IL-2 蛋白水平。

1.4 杀伤细胞活性检测

采用 ⁵¹Cr 释放法, 荷瘤小鼠经不同治疗后, 切除荷瘤小鼠脾脏, 检测脾细胞的 NK 活性, 取小鼠颈部淋巴结检测其 CTL 活性。

杀伤活性 (%) =

$$\frac{\text{试验组 cpm} - \text{自然释放组 cpm}}{\text{最大释放组 cpm} - \text{自然释放组 cpm}} \times 100$$

1.5 统计学处理

采用方差分析进行 F 检验和 q 检验。

2 结 果

2.1 各种治疗方法对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

各种治疗方法对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响结果见表 1。

表 1 5 种治疗方法对小鼠头颈鳞癌影响的体内试验结果 (n = 8, mm³)

组别	肿瘤体积 ($\bar{x} \pm s$)
mL-2 组	510.7 ± 44.4
DDP 组	463.0 ± 27.8
mL-2 和 DDP 联合治疗组	261.1 ± 34.4
Dotma 组	1106.3 ± 135.6
PBS 组	1322.6 ± 146.4

mL-2、DDP 及联合治疗组与 Dotma、PBS 对照组比较均有显著差异 (P < 0.05), 并且联合治疗组小鼠肿瘤生长明显受抑制, 与 mL-2 或 DDP 单独治疗组比较亦有显著差异 (P < 0.05), 提示 mL-2 与 DDP 联合治疗具有相加或协同作用。Dotma 与 PBS 组比较无显著差异 (P > 0.05), 提示肿瘤受抑制与质粒载体无关。

2.2 治疗后荷瘤小鼠肿瘤细胞 IL-2 基因的表达

荷瘤小鼠经治疗后, 肿瘤组织中 IL-2 蛋白水平结果见图 1。从图 1 可知, 注射有 mL-2 的治疗组, 其 IL-2 蛋白水平明显升高, 而未注射该基因者则 IL-2 蛋白水平很低, 小于 40pg/ml, 两者间 IL-2 蛋白表达水平有显著差异 (P < 0.01), 提示 mL-2 高效地转入了小鼠头颈鳞癌细胞。

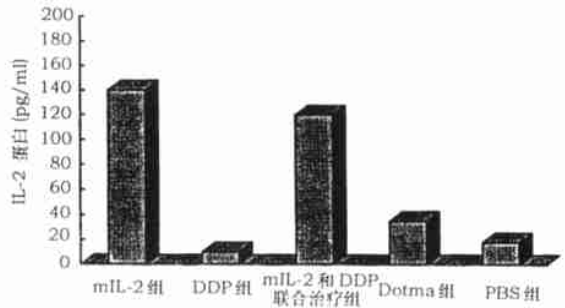


图 1 治疗后荷瘤小鼠肿瘤组织中 IL-2 蛋白水平

2.3 荷瘤小鼠 NK 和 CTL 活性的改变

经不同方法治疗后, 荷瘤小鼠 NK 和 CTL 活性的改变结果见图 2、图 3。PBS、Dotma 及 DDP 单独治疗组小鼠 NK、CTL 活性均较低, mL-2 和 DDP 联合治疗组其 NK 和 CTL 杀伤活性明显升高, 提示 mL-2 激活了机体的抗肿瘤免疫反应。

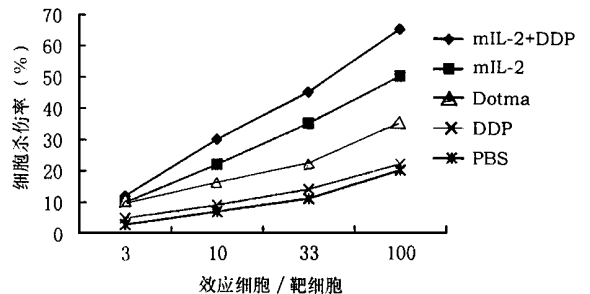


图 2 5 种方法治疗后荷瘤小鼠脾细胞 NK 活性

3 讨 论

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, 其作用一方面可提高肿瘤局部细胞因子的浓度, 改变肿瘤的免疫原性, 同时又可

诱导产生NK、CTL等效应细胞,激活机体的抗肿瘤免疫反应。

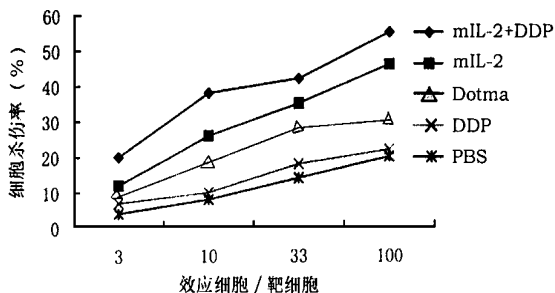


图3 5种方法治疗后荷瘤小鼠颈淋巴结CTL活性

在细胞因子基因治疗中,应用IL-2基因的研究较多。Engel等¹用IL-2基因转染成纤维细胞和黑色素瘤细胞,然后将其制成肿瘤疫苗进行治疗。Bubenik等^{2,3}运用IL-2基因对肺癌和头颈肿瘤进行治疗,均发现机体T淋巴细胞杀伤活性明显增强。Wollenberg等⁴将脂质体包裹的IL-2基因直接注入~期头颈肿瘤包块内,亦取得了一定的疗效。上述研究虽然都不同程度地增强了机体的免疫功能,但是其抑癌效果仍不太理想,这可能与单独采用基因治疗或肿瘤较大、负荷过重等因素有关。DDP是目前治疗头颈肿瘤有效的化疗药物之一,其抗癌作用强,临床应用广泛,为减轻肿瘤负荷,寻找最佳抗肿瘤效果,本实验应用IL-2基因和DDP联合治疗对小鼠头颈鳞癌抑制和免疫功能增强情况进行了研究。结果发现:IL-2基因和DDP联合治疗时肿瘤生长最为缓慢,其抑癌程度明显优于单纯治疗组。对各组肿瘤组织进行分析表明IL-2基因能在小鼠头颈鳞癌细胞中高效表达,并且能显著增强机体的NK和CTL细胞杀伤活性,其抗肿瘤

效果可能与IL-2增强机体的细胞免疫功能有关。因此,作者认为DDP作为一种广泛应用的化疗药物,虽然具有较强的抗肿瘤效果,但同时也可抑制机体的免疫功能,如果将IL-2基因与DDP联合应用,则可避免其缺陷,恢复其免疫应答,并且两者联合应用产生相加或协同作用可增强其抗肿瘤效果,此协同作用与IL-2基因在肿瘤内的高效表达和免疫诱导有关。本实验从基因水平上研究了IL-2的治疗效果和免疫增强机制,为今后细胞因子基因治疗及有效地联合化疗治疗头颈肿瘤奠定了基础。

参考文献

- 1 Engel BC, Laws HJ, Buttlies B, et al. Induction of a CD3 + / CD56 + lymphocyte population following gene therapy with transgenic IL-2 secreting fibroblasts in a child with peripheral neuroectodermal malignancy. *Med & Pediatr Oncol*, 1998, 31(2) : 56 ~ 60
- 2 Bubenik J, Simova J, Hajkova R, et al. Interleukin 2 gene therapy of residual disease in mice carrying tumors induced by HPV 16. *Int J Oncol*, 1995, 6(1) : 45 ~ 50
- 3 Myers JN, Mankseymour A, Zitvogel L, et al. Interleukin 12 gene therapy prevents establishment of SCC squamous cell carcinomas, inhibits tumor growth, and elicits long-term antitumor immunity in syngeneic C3H mice. *Laryngoscope*, 1998, 108(2) : 261 ~ 268
- 4 Wollenberg B, Kastenbauer, Mund H, et al. Gene therapy phase trial for primary untreated head and neck squamous cell cancer (HNSCC) UICC stage - with a single intratumoral injection of hIL-2 plasmids formulated in DOTMA/ chol. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(1) : 141 ~ 147

(2001-03-12 收稿, 2001-05-08 修回)

(本文编辑 刘 怡)

临床流行病学与循证医学在口腔医疗及护理中的应用与进展学习班通知

口腔医疗及护理临床科研设计与评价是提高口腔医疗和护理的科研和教学质量的重要基础,掌握临床科研设计与评价的基本原理和方法,减少和避免科研中的误差和偏倚,善于寻找与评价国内外口腔医疗及护理科研提供的证据,有助于得出高质量的科研成果,与国际先进水平接轨。四川大学华西口腔医学院(原华西医科大学口腔医学院)定于2001年7月在成都举办国家继续教育项目临床流行病学与循证医学在口腔医疗及护理中的应用与进展学习班。2001年7月16~21日为医疗班,招收具有中级职称以上的临床口腔医务人员和科研管理人员及口腔医学杂志编辑。7月23~28日为护理班,招收具有中级职称以上的临床口腔护理人员及护理杂志编辑。结业成绩合格者将授予国家级继续教育项目12学分。培训费均为800元(含资料费)。代安排食宿,费用自理。报名者请与成都人民南路三段十四号四川大学华西口腔医学院教学科联系,邮编610041。电话:028-5501436。