

## 表达人 IL-21 的细胞因子诱导的杀伤细胞对裸鼠肝癌的治疗研究

陈晚华<sup>1</sup>, 刘 辉<sup>1</sup>, 王延春<sup>2</sup>, 朱洋洋<sup>2</sup>, 曲平波<sup>1</sup>, 钱其军<sup>1,2\*</sup>

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院基因-病毒治疗实验室, 上海 200438

2. 浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018

**[摘要]** **目的** 探讨细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK 细胞)作为人 *IL-21* (*hIL-21*) 基因的载体治疗肝癌的可行性。**方法** 构建携带 *hIL-21*、*CopGFP* 基因的质粒 pDC759-*hIL-21*、pDC759-*CopGFP* 并分别与 pAd5、pAd5F35 共转染 HEK293 细胞, 包装表达 *hIL-21*、*CopGFP* 蛋白的 Ad5、Ad5F35 病毒。分离培养 CIK 细胞并绘制生长曲线, 将携带 *CopGFP* 基因的 Ad5、Ad5F35 病毒以不同 MOI (0、1、5、10、50、100、1 000) 感染 CIK 细胞; 将携带 *hIL-21* 基因的 Ad5、Ad5F35 病毒以不同 MOI (0、1、5、10、20、50) 感染 SMMC-7721 细胞 48 h 后检测 *hIL-21* 蛋白的表达; 将携带 *hIL-21* 基因的 Ad5F35 病毒以不同 MOI (0、1、5、10、50、100) 感染 CIK 细胞 48 h 后检测 *hIL-21* 蛋白的表达。皮下注射 SMMC-7721 细胞致裸鼠成瘤, 以表达 *hIL-21* 的 CIK 细胞治疗荷瘤裸鼠, 评价疗效。**结果** 成功构建出用于 Ad5、Ad5F35 病毒的质粒; 构建的质粒与 pAd5、pAd5F35 脂质体共转染 HEK293 细胞, 包装出表达 *hIL-21* 及 *CopGFP* 蛋白的 Ad5、Ad5F35 病毒。携带 *CopGFP* 基因的 Ad5、Ad5F35 病毒对 CIK 细胞的感染实验表明 Ad5F35 腺病毒感染率更高; 携带 *hIL-21* 基因的 Ad5、Ad5F35 病毒对 SMMC-7721 细胞的感染实验表明 *hIL-21* 表达量差异无统计学意义; 携带 *hIL-21* 基因的 Ad5F35 病毒以 50 MOI 感染 CIK 细胞后 *hIL-21* 的表达量较高; 动物实验统计分析说明表达 *hIL-21* 的 CIK 细胞对荷瘤裸鼠疗效较好。**结论** *hIL-21* 与 CIK 细胞在荷瘤小鼠体内联合发挥抗肿瘤作用。

**[关键词]** 白介素 21; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 腺病毒; 肝肿瘤

**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)10-1045-06

### Effect of cytokine-induced killer cells expressing *hIL-21* on hepatocellular carcinoma in nude mice

CHEN Wan-hua<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, WANG Yan-chun<sup>2</sup>, ZHU Yang-yang<sup>2</sup>, QU Ping-bo<sup>1</sup>, QIAN Qi-jun<sup>1,2\*</sup>

1. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the feasibility of using cytokine-induced killer (CIK) cells as targeted vehicle to deliver *hIL-21* gene for hepatocellular carcinoma (HCC) treatment. **Methods** We constructed pDC759-*hIL-21* and pDC759-*CopGFP* for cotransfection of HEK293 cells with pAd5 and pAd5F35 which can express *hIL-21* and *CopGFP* proteins for viral packaging. We isolated CIK cells and plotted the growth curve. Then Ad5/AAV-*CopGFP* and Ad5F35/AAV-*CopGFP* of different MOIs (0, 1, 5, 10, 50, 100, and 1 000) were used to infect CIK cells; Ad5/AAV-*hIL-21* and Ad5F35/AAV-*hIL-21* of different MOIs (0, 1, 5, 10, 20, and 50) were used to infect SMMC-7721 cells and the *hIL-21* protein levels were examined by ELISA assay 48 h after infection. Ad5F35/AAV-*hIL-21* of different MOIs (0, 1, 5, 10, 50, and 100) was used to infect CIK cells and *hIL-21* protein levels were also examined 48 h after infection. SMMC-7721 cells were subcutaneously injected to nude mice for tumor forming, and then the tumor-bearing mice were treated with CIK cells carrying *hIL-21* and the therapeutic effects were observed. **Results** Plasmids for viral packaging were constructed. After cotransfection of HEK293 cells, Ad5 and Ad5F35 which can express *hIL-21* and *CopGFP* proteins were successfully packaged. Ad5 and Ad5F35 which can express *CopGFP* were used in this study. It was found that Ad5F35 was superior to Ad5 in CIK infection, with the suitable MOI being 50. Ad5/AAV-*hIL-21* and Ad5F35/AAV-*hIL-21* had similar effect on *IL-21* expression in SMMC-7721 cells. Results of animal study showed that mice in group CIK/*hIL-21* had a better curative effect. **Conclusion** *hIL-21* and CIK cells have synergistic anti-tumor effect in nude mice bearing HCC.

**[收稿日期]** 2012-03-31

**[接受日期]** 2012-08-29

**[基金项目]** 国家杰出青年科学基金(30925037). Supported by National Foundation for Distinguished Young Scholars (30925037).

**[作者简介]** 陈晚华, 硕士生. E-mail: awan521@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-35030677, E-mail: qianqj@163.com

[Key words] interleukin-21; cytokine-induced killer cell; adenovirus; liver neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(10): 1045-1050]

肝癌是一种恶性程度高、预后差的恶性肿瘤。目前许多治疗手段并不能从根本上改善肝癌患者的预后。基因-病毒治疗成为一种新的治疗手段开始应用于肝癌的治疗。白介素(IL)在免疫应答和调节中起到重要的作用,其中 IL-21 主要由活化的 CD4<sup>+</sup> T 细胞分泌,能增强效应 T 细胞及活化的自然杀伤(NK)细胞的功能,从而有效增强机体的固有免疫以及特异性免疫反应<sup>[1-5]</sup>,对肝癌具有一定的治疗效果<sup>[6-8]</sup>。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK 细胞)是一种 NK 样非主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制性细胞,同时兼具 T 细胞的杀瘤作用。故本课题选择具有促进 T 细胞增殖、抗肿瘤作用的 IL-21 基因,利用腺病毒携带该基因并以 CIK 细胞为溶瘤病毒载体对肝癌进行治疗研究。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人 IL-21(*hIL-21*)、*CopGFP* 基因模板质粒 pDC318-*hIL21*、pKCDNA-EF1-*GFP*,载体质粒 pDC759,腺病毒骨架质粒 pAd5、pAd5F35,感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  均由第二军医大学东方肝胆外科医院基因-病毒治疗实验室构建保存。Lipofectamine 2000 转染试剂盒、细胞培养血清、培养液购于 Gibco 公司;人胚肾细胞 HEK293、肝癌细胞 SMMC-7721 由第二军医大学东方肝胆外科医院基因-病毒治疗实验室保存备用;hIL-21 ELISA 检测试剂盒购于 eBioscience 公司;初步处理的外周血白细胞由第二军医大学长海医院血库提供。4~6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠购于中国科学院实验动物中心(动物合格证号:2007000522139)。

1.2 载体质粒构建 以质粒 pDC318-*hIL21*、pKCDNA-EF1-*GFP* 为模板分别克隆 *hIL-21*、*CopGFP* 基因,引物如下:*hIL-21* 上游引物 5'-ACG CGT CGA CAC CAT GAG ATC CAG TCC TGG C-3',下游引物 5'-CGC GGA TCC CTA GGA ATC TTC ACT TCC-3';*CopGFP* 上游引物 5'-CGC GAA TTC ACC ATG GAG AGC GAC GAG AGC-3',下游引物 5'-GCG TCG ACT TAG CGA GAT CCG GTG GAG C-3'。对 pDC759 和 *hIL-21* 进行 *Sal* I 与 *Bam* H I 酶切反应,电泳回收 6 260 bp 和 489 bp 的片段做连接反应;对 pDC759 和 *CopGFP* 进行 *Eco* R I 与 *Sal* I 酶切反应,电泳回收 6 254 bp 和 759 bp 的片段做连接反应。连接体系经转化后

挑取阳性克隆,抽提质粒进行酶切鉴定,鉴定正确的质粒送北京六合华大基因有限公司测序;命名正确的质粒为 pDC759-*hIL-21*、pDC759-*CopGFP*。

1.3 病毒包装、扩增和鉴定 利用 Lipofectamine 2000 将质粒 pDC759-*hIL-21*、pDC759-*CopGFP* 与腺病毒骨架质粒 pAd5、pAd5F35 共转染 HEK293 细胞,获得所需病毒颗粒。用 Qiagen DNA Kit 提取重组腺病毒 DNA,对病毒基因组进行 PCR 鉴定,阳性对照为质粒 pDC759-*hIL-21*、pDC759-*CopGFP* 和 Ad35-RC。鉴定正确的重组病毒分别命名为 Ad5/AAV-*hIL-21*、Ad5F35/AAV-*hIL-21*; Ad5/AAV-*CopGFP*、Ad5F35/AAV-*CopGFP*。病毒扩增纯化后,采用 TCID<sub>50</sub>(半数组织培养感染剂量)法测定病毒滴度。

1.4 CIK 细胞培养及生长曲线的绘制 50 ml 外周血白细胞经淋巴细胞分离液(Ficoll 配制)分离获得外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)后于含 2%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 GT-T551 培养液中培养,在 IL-2、抗 CD3 单克隆抗体、rIFN- $\gamma$ 、纤维连接蛋白诱导刺激下促进其向 CIK 细胞分化。培养至第 4 天,转入 GT-T610 细胞培养袋中培养,转袋后每隔 1 d 对 CIK 细胞计数,通过增减培养液体积调节细胞生长密度,加入 IL-2 使其终浓度为 500 IU/ml。SMMC-7721、HEK293 细胞均采用添加 10%FBS 的 DMEM 培养液培养。所有细胞于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。记录转袋后细胞密度、袋内体积变化参数并绘制 CIK 细胞生长曲线。

1.5 病毒感染实验 用 Ad5F35/AAV-*CopGFP*、Ad5/AAV-*CopGFP* 感染 CIK 细胞对比两者感染效率。收集培养 7~9 d 的 CIK 细胞,锥虫蓝染色法计数。用 GT-T551 培养液调节细胞密度,使初始每孔的液体量为 200  $\mu$ l,1 $\times$ 10<sup>6</sup>/孔铺 6 孔板。随后按感染复数(multiplicity of infection, MOI) 1、5、10、50、100、1 000 分别进行感染,饥饿感染 2 h 后,每孔补加 2%FBS GT-T551 培养液至终体积为 3 ml。荧光显微镜下观察感染 48、96 h 时的荧光强度。

1.6 ELISA 法检测 hIL-21 蛋白的表达 分别用 RPMI 1640 培养液、GT-T551 细胞培养液调节感染后的 SMMC-7721 细胞和 CIK 细胞密度,以 1 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔铺 24 孔板,200  $\mu$ l/孔;Ad5F35/AAV-*hIL-21*、Ad5/AAV-*hIL-21* 分别感染 SMMC-7721 细胞,MOI 分别为 0、1、5、10、20、50;Ad5F35/AAV-*hIL-21* 感染 CIK 细胞,MOI 分别为 0、1、5、10、50、100;

每组设 3 个复孔, 十字法摇匀; 37°C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养 2 h 后, SMMC-7721 细胞补加 5% FBS RPMI 1640 培养液, CIK 细胞补加含 2% FBS 的 GT-T551 培养液至每孔终体积为 1 ml; 37°C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养, 于培养 48 h 吸取上清, ELISA 法检测 hIL-21 蛋白的表达量。

1.7 荷瘤小鼠肿瘤治疗 给小鼠皮下注射肿瘤细胞, 7 d 后即成瘤。将荷瘤小鼠随机分为 5 组, CIK+hIL-21 组 5 只, 其余组均 4 只。(1) PBS 对照组: 尾静脉注射 PBS 液; (2) CIK 组: 尾静脉注射 CIK 细胞, 剂量 10<sup>7</sup>/只; (3) Ad5/AAV-hIL-21 组: 瘤内注射病毒, 剂量为 2×10<sup>8</sup> pfu/只; (4) CIK+hIL-21 组: 尾静脉注射 CIK 细胞, 剂量为 10<sup>7</sup>/只, 瘤内注射 Ad5/AAV-hIL-21, 剂量为 2×10<sup>8</sup> pfu/只; (5) CIK-hIL-21 组: 尾静脉注射 Ad5F35/AAV-hIL-21 (MOI=50) 感染 2 h 的 CIK 细胞, 剂量为 10<sup>7</sup>/只。两次治疗间隔 1 d, 共治疗 5 次; 治疗后每周 1 次记录肿瘤的长、短径。计算肿瘤体积, 记录 8 周数据。同时记录小鼠生存数据。实验结束后绘制肿瘤增长

曲线、生存分析图, 评价疗效。肿瘤体积按照公式  $(a \times b^2)/2$  估算 (其中  $a$  为最长直径,  $b$  为最短直径), 肿瘤体积单位为 cm<sup>3</sup>。计算肿瘤生长抑制率, 肿瘤抑制率 (%) = (对照组肿瘤体积增长平均值 × 治疗组肿瘤体积增长平均值) / 对照组肿瘤体积增长平均值 × 100%; 治疗完成后计算生命延长率, 生命延长率 (%) = (治疗组平均生存时间 - 对照组平均生存时间) / 对照组平均生存时间 × 100%。

1.8 统计学处理 统计处理应用 SPSS 18.0 统计软件包完成, 采用方差分析进行组间差异性检验, 最小显著差 (LSD)  $t$  检验进行两两比较, 检验水平 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 质粒鉴定结果 电泳结果表明 pDC759-hIL-21 经 *Eco*R I, *Xma* I, *Nhe* I + *Nco* I, *Age* I + *Pst* I, *Age* I + *Nco* I 分别酶切后条带大小均正确 (图 1A)。pDC759-CopGFP 经 *Pst* I, *Xma* I, *Nco* I, *Kpn* I, *Xho* I 分别酶切后条带大小均正确 (图 1B)。

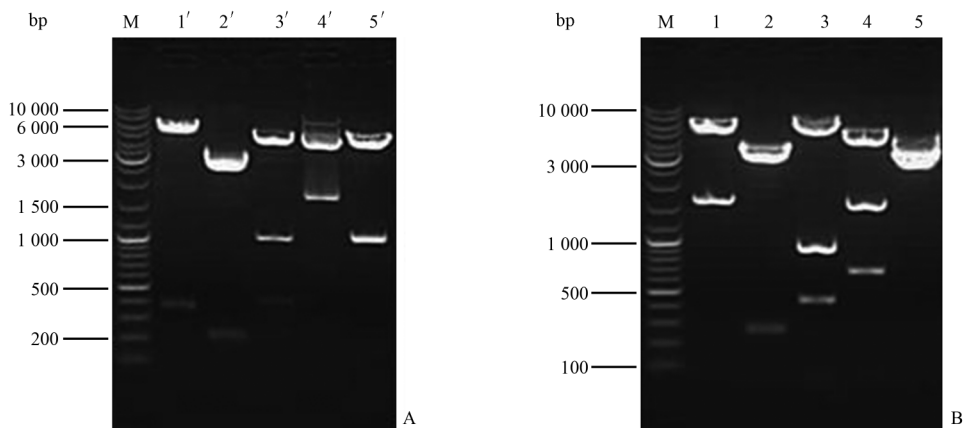


图 1 质粒酶切电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of plasmid restriction enzyme digestion products

A: pDC759-hIL-21 restriction enzyme digestion; B: pDC759-CopGFP restriction enzyme digestion. M: Marker; 1': Digested by *Eco*R I (429 bp+6 329 bp); 2': Digested by *Xma* I (11 bp+261 bp+3 027 bp+3 448 bp); 3': Digested by *Nhe* I + *Nco* I (1 091 bp+5 667 bp); 4': Digested by *Age* I + *Pst* I (1 811 bp+4 997 bp); 5': Digested by *Age* I + *Nco* I (1 085 bp+5 673 bp); 1: Digested by *Pst* I (1 501 bp+5 521 bp); 2: Digested by *Xma* I (11 bp+261 bp+3 291 bp+3 446 bp); 3: Digested by *Nco* I (30 bp+423 bp+900 bp+5 669 bp); 4: Digested by *Kpn* I (637 bp+1 539 bp+4 846 bp); 5: Digested by *Xho* I (2 885 bp+4 137 bp)

2.2 病毒滴度测定结果 鉴定正确的 Ad5/AAV-hIL-21、Ad5F35/AAV-hIL-21、Ad5/AAV-CopGFP、Ad5F35/AAV-CopGFP 在 HEK293 细胞中反复扩增纯化, TCID<sub>50</sub> 法测定病毒滴度分别为 1.05×10<sup>10</sup>、2.65×10<sup>10</sup>、5.15×10<sup>9</sup>、7.1×10<sup>9</sup> pfu/ml。

2.3 CIK 细胞生长曲线 选取 5 个正常人 (A~E) 的白细胞进行 PBMCs 分选培养, 绘制 CIK 细胞生长曲线 (图 2), 可见 CIK 细胞在培养的第 10 天以后

开始快速增殖, 细胞状态良好, 增殖速度可出现倍增现象, 培养至 20 d 以后细胞数目增长停滞, 以后开始出现细胞死亡现象。

2.4 Ad5F35/AAV-CopGFP 和 Ad5/AAV-CopGFP 对 CIK 细胞的感染能力 由图 3 可见 Ad5F35/AAV-CopGFP 对 CIK 细胞的感染能力远大于 Ad5/AAV-CopGFP 对 CIK 细胞的感染能力。随着 MOI 值的增加, Ad5F35/AAV-CopGFP 对 CIK

细胞的感染能力逐渐增强,荧光强度有所下降,MOI为50的条件下 Ad5F35/AAV-CopGFP 对 CIK 细胞的感染率较好。

2.5 ELISA 法检测不同 MOI 感染细胞后 hIL-21 蛋白的表达 Ad5/AAV-hIL-21、Ad5F35/AAV-hIL-21 对 SMMC-7721 细胞株的感染能力差异无统计学意义,在 MOI 为 20 时 hIL-21 蛋白的表达量较高(图 4A)。Ad5F35/AAV-hIL-21 感染 CIK 细胞时随着 MOI 的增加表达量逐渐升高,当 MOI 为 50 时, hIL-21 蛋白的表达量较高(图 4B)。

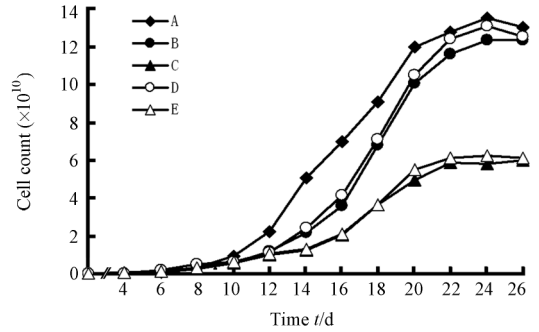


图 2 CIK 细胞生长曲线

Fig 2 CIK cell growth curves

A-E indicate CIK cells from five different individuals

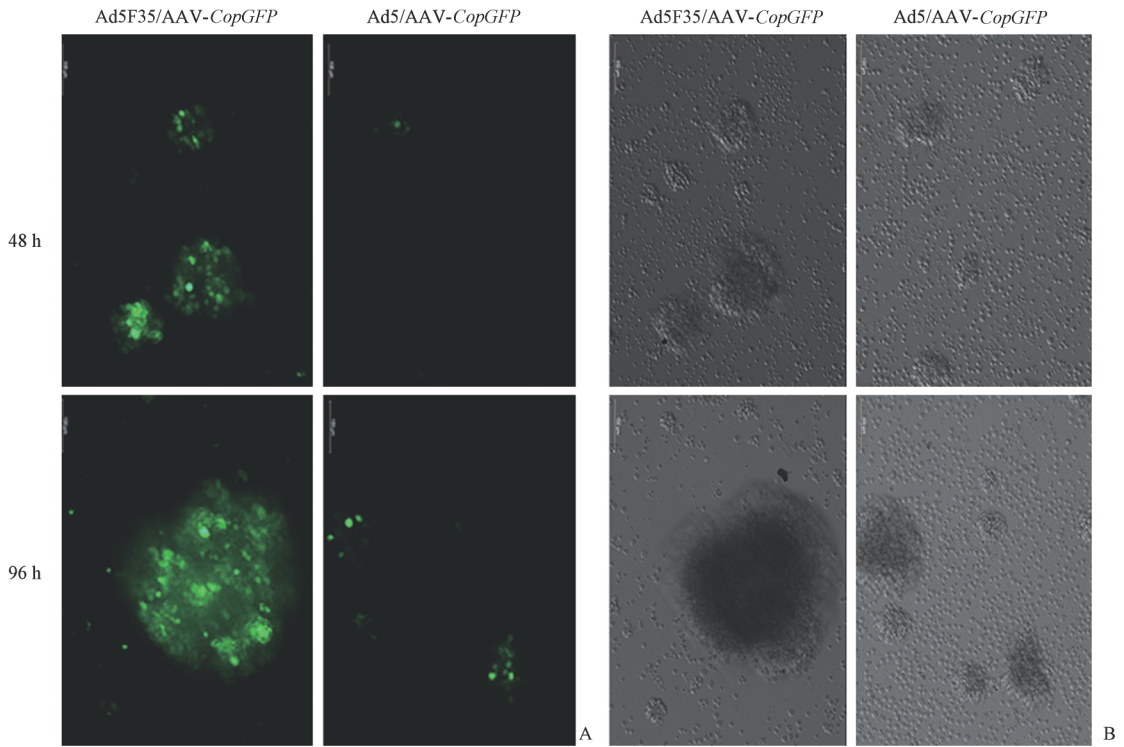


图 3 Ad5F35 及 Ad5/AAV-CopGFP 感染 CIK 细胞的绿色荧光(A)与明视野(B)图对比

Fig 3 Comparison of green fluorescent images (A) and bright-field images(B) between Ad5F35 and Ad5/AAV-CopGFP in CIK cell infection

MOI=50; MOI: Multiplicity of infection. Original magnification:  $\times 200$

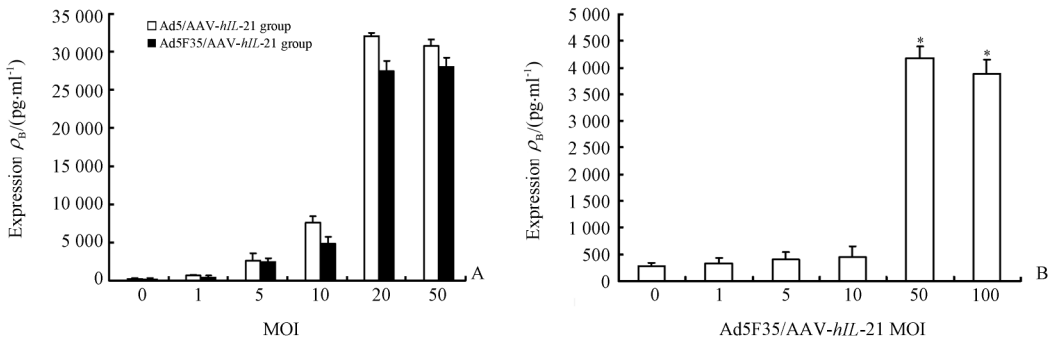
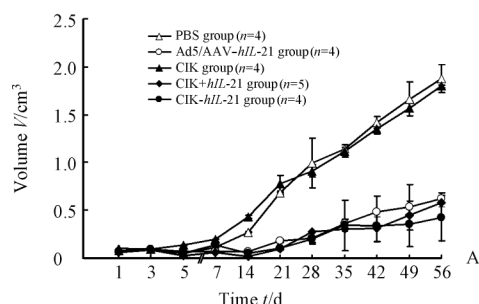


图 4 ELISA 法检测不同 MOI 下 SMMC-7721(A)和 CIK(B)细胞中 hIL-21 蛋白的表达量

Fig 4 ELISA assay of hIL-21 protein levels in SMMC-7721(A) and CIK (B) cells at different MOIs

MOI: Multiplicity of infection. \*  $P < 0.05$  vs MOI=0,1,5 or 10 groups;  $n=2, \bar{x} \pm s$

2.6 CIK-*hIL*-21 对荷瘤裸鼠的治疗效果 肿瘤体积生长曲线见图 5A, 第 8 周较第 1 周的体积增加均值分别为: PBS 对照组 ( $1.770 \pm 0.147$ )  $\text{cm}^3$ 、CIK 组 ( $1.598 \pm 0.012$ )  $\text{cm}^3$ 、Ad5/AAV-*hIL*-21 组 ( $0.561 \pm 0.055$ )  $\text{cm}^3$ 、CIK + *hIL*-21 组 ( $0.516 \pm 0.045$ )  $\text{cm}^3$ 、CIK-*hIL*-21 组 ( $0.284 \pm 0.237$ )  $\text{cm}^3$ 。统计分析表明, 5 组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),



说明携带治疗基因 *hIL*-21 的治疗组与 CIK 组、PBS 组相比具有更强的肿瘤抑制能力。在各个处理对裸鼠的生存期的影响中, 5 组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 5B)。同 PBS 组相比各治疗组均能延长生存期, 各组生命延长率: CIK 组 22.6%, Ad5/AAV-*hIL*-21 组 5.0%, CIK + *hIL*-21 组 13.4%, CIK-*hIL*-21 组 39.0%, CIK-*hIL*-21 组的效果更明显。

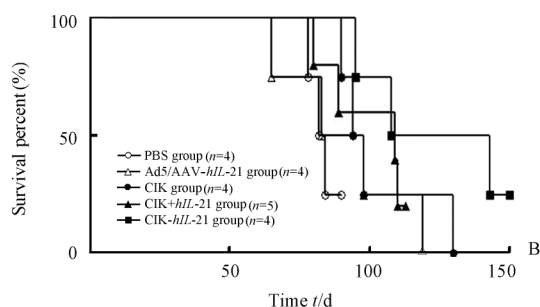


图 5 肿瘤生长曲线(A)与裸鼠生存期分析(B)

Fig 5 Analysis of tumor growth curve (A) and survival of nude mice (B)

$P < 0.05$  among the 5 groups

### 3 讨论

近年来,随着对 IL 抗肿瘤作用的深入研究,人们发现在 IL 家族众多成员中,IL-15、IL-21、IL-7 等能够起到一定的抗肿瘤作用<sup>[9-12]</sup>;IL-15 能够刺激 T 细胞的快速增殖<sup>[13]</sup>;IL-7 能够维持 T 细胞干性,在保持记忆性杀伤 T 细胞的增殖作用中起到重要作用<sup>[14]</sup>。目前对 IL-21 的抗肿瘤作用研究较多,IL-21 能够刺激不同时期的 B 细胞、T 细胞、NK 细胞的增殖,促进 IFN- $\gamma$  的释放,从而起到对肿瘤细胞的杀伤作用<sup>[15-20]</sup>。与此同时,IL-21 与 IL-2 具有较高的同源性,其本身也具备直接抑制肿瘤细胞增殖的作用<sup>[21]</sup>。CIK 细胞是一种 NK 样的杀伤细胞<sup>[22]</sup>,细胞因子的刺激对其抗肿瘤机制起到重要作用。相对于基因治疗来讲,CIK 细胞治疗所能够带来的生存期延长比较理想<sup>[23-25]</sup>。

本实验成功构建包装了携带 *hIL*-21 及 *CopGFP* 基因的腺病毒质粒 pDC759-*hIL*-21、pDC759-*CopGFP*,通过携带 *CopGFP* 基因的 Ad5、Ad5F35 病毒对 CIK 细胞的感染,发现 Ad5F35 病毒对 CIK 有良好的感染能力;实验用携带 *hIL*-21 基因的 Ad5、Ad5F35 病毒感染 SMMC-7721 细胞,*hIL*-21 的表达量差异无统计学意义。因此在后续裸鼠 SMMC-7721 细胞移植瘤实验中,选用携带 *hIL*-21 基因的 Ad5 病毒进行基因治疗,而用携带 *hIL*-21

基因的 Ad5F35 病毒感染的 CIK 细胞 (CIK-*hIL*-21) 进行细胞治疗。

裸鼠 SMMC-7721 细胞移植瘤实验肿瘤体积生长数据结果显示,CIK-*hIL*-21 组抑瘤效果较好。肿瘤体积生长最快为 PBS 对照组,其次为 CIK 组、Ad5/AAV-*hIL*-21 组、CIK + *hIL*-21 组、CIK-*hIL*-21 组。CIK-*hIL*-21 组肿瘤生长相对其余 4 组较慢,且出现荷瘤小鼠肿瘤消退的现象。CIK-*hIL*-21 组效果较 CIK + *hIL*-21 组强,可能是 *hIL*-21 在 CIK 细胞表达,刺激 CIK 增殖,联合并增强 CIK 杀伤肿瘤细胞。CIK + *hIL*-21 组效果较 Ad5/AAV-*hIL*-21 组强说明联合治疗效果较好。Ad5/AAV-*hIL*-21 组效果较 CIK 组好,可能是局部范围基因治疗可集中杀伤肿瘤细胞,而注射 CIK 细胞需克服血液循环到达肿瘤位置,加上 CIK 细胞数目有限导致疗效较弱。

肿瘤生长曲线与生存曲线显示 PBS 对照组生存率很低,短期内即出现荷瘤小鼠死亡,Ad5/AAV-*hIL*-21 组疗效在控制肿瘤生长上较好,但生存率相对较低,故携带治疗基因的腺病毒基因治疗虽可减小肿瘤体积但其延长生存期并不明显。肿瘤生长曲线与生存曲线显示使用携带治疗基因的腺病毒,即 Ad5F35/AAV-*hIL*-21 以 50 MOI 感染的 CIK 细胞的治疗方案对肿瘤生长有明显的抑制作用,与此同时延长了荷瘤裸鼠的生存时间,肯定了

CIK 细胞联合携带治疗基因的治疗对于肿瘤治疗的作用和意义。

目前,腺病毒作为基因治疗载体<sup>[26]</sup>存在的问题包括:静脉注射会被血清的抗体中和、免疫相关细胞对其进行免疫清除反应、血液循环路程遥远很难到达肿瘤靶点;瘤内直接注射虽然能够直接达到靶点但是只能存在于注射部位的肿瘤而不能发生肿瘤浸润。溶瘤病毒细胞载体的研究为高效靶向肿瘤部位提供了新的途径,可能会弥补腺病毒的不足,具有更好的前景。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Onoda T, Rahman M, Nara H, Araki A, Makabe K, Tsumoto K, et al. Human CD4<sup>+</sup> central and effector memory T cells produce IL-21: effect on cytokine-driven proliferation of CD4<sup>+</sup> T cell subsets[J]. *Int Immunol*, 2007, 19: 1191-1199.

[2] Sarra M, Pallone F, Macdonald T T, Monteleone G. Targeting interleukin-21 in immune-mediated pathologies[J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11: 645-649.

[3] Yoon J S, Newton S M, Wysocka M, Troxel A B, Hess S D, Richardson S K, et al. IL-21 enhances antitumor responses without stimulating proliferation of malignant T cells of patients with Sézary syndrome[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128: 473-480.

[4] Asao H. [Analysis of gammac-dependent cytokines-mediated immunoregulation][J]. *Rinsho Byori*, 2007, 55: 51-58.

[5] Nurieva R, Yang X O, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos A D, Ma L, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells[J]. *Nature*, 2007, 448: 480-483.

[6] Pang Y L, Zhang H G, Peng J R, Pang X W, Yu S, Xing Q, et al. The immunosuppressive tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58: 877-886.

[7] 程明荣, 李清, 洪晓武, 叶桃, 何乘, 程志俭, 等. 重组质粒 pIRES-GM-CSF-IL-21 的构建及其治疗小鼠肝癌移植瘤的疗效[J]. *中华肿瘤杂志*, 2011, 33: 661-665.

[8] Cheng M, Li Q, Wan T, Hong X, Chen H, He B, et al. Synthesis and efficient hepatocyte targeting of galactosylated chitosan as a gene carrier *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011, 99: 70-80.

[9] Kinter A L, Godbout E J, McNally J P, Sereti I, Roby G A, O'Shea M A, et al. The common  $\gamma$ -chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands[J]. *J Immunol*, 2008, 181: 6738-6746.

[10] Steel J C, Waldmann T A, Morris J C. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer[J]. *Trends Pharmacol*

*Sci*, 2012, 33: 35-41.

[11] Andersson A, Srivastava M K, Harris-White M, Huang M, Zhu L, Elashoff D, et al. Role of CXCR3 ligands in IL-7/IL-7R alpha-Fc-mediated antitumor activity in lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 3660-3672.

[12] Lai L, Jin J, Goldschneider I. *In vivo* antitumor activity of a recombinant IL-7/HGFbeta hybrid cytokine in mice [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 61-67.

[13] Lodolce J P, Boone D L, Chai S, Swain R E, Dassopoulos T, Trettin S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation [J]. *Immunity*, 1998, 9: 669-676.

[14] Wang J, Pae M, Meydani S N, Wu D. Epigallocatechin-3-gallate inhibits expression of receptors for T cell regulatory cytokines and their downstream signaling in mouse CD4<sup>+</sup> T cells [J]. *J Nutr*, 2012, 142: 566-571.

[15] Liu Z, Yang L, Cui Y, Wang X, Guo C, Huang Z, et al. IL-21 enhances NK cell activation and cytolytic activity and induces Th17 cell differentiation in inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2009, 15: 1133-1144.

[16] Spolski R, Wang L, Wan C K, Bonville C A, Domachowske J B, Kim H P, et al. IL-21 promotes the pathologic immune response to pneumovirus infection [J]. *J Immunol*, 2012, 188: 1924-1932.

[17] Hsieh C L, Hsu S C, Shen C R, Chen M Y, Liu S J, Chong P, et al. Increased expression of IL-21 reduces tumor growth by modulating the status of tumor-infiltrated lymphocytes [J]. *J Immunobiol*, 2011, 216: 491-496.

[18] Bhawe N S, Carson W E 3rd. Immune modulation with interleukin-21 [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1182: 39-46.

[19] Sondergaard H, Skak K. IL-21: roles in immunopathology and cancer therapy [J]. *Tissue Antigens*, 2009, 74: 467-479.

[20] Spolski R, Leonard W J. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 57-79.

[21] 陈国兵, 窦骏, 陈峻崧, 赵枫妹, 褚莉莉, 唐权. 瘤体内直接注射 *mIL-21* 基因抑制小鼠实验性淋巴瘤生长及其机制的初步研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24: 631.

[22] Linn Y, Hui K M. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44: 1457-1462.

[23] 刘洋, 包尔宁, 杨波, 卢学春, 朱宏丽, 韩为东, 等. 自体 CIK 细胞输注治疗老年骨髓增生异常综合征的临床研究 [J]. *中国血液学杂志*, 2011, 19: 787-792.

[24] Kim H M, Kang J S, Lim J, Kim J Y, Kim Y J, Lee S J, et al. Antitumor activity of cytokine-induced killer cells in nude mouse xenograft model [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32: 781-787.

[25] 王少扬, 刘海周, 马卫闽, 谢志红. CIK 细胞治疗慢性乙型肝炎的疗效观察 [J]. *传染病信息*, 2011, 24: 103-105.

[26] Issa P C, MacLaren R E. Non-viral retinal gene therapy: a review [J]. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2012, 40: 39-47.