

以單分子 IL-12 核酸載體在過敏性氣喘的動物模式中進行基因治療

Application of single-chain IL-12 DNA plasmid for gene therapy in animal model of bronchial asthma (第一年)

計畫編號：NSC 88-2314-B002-220

執行期限：民國 87 年 08 月 01 日起至民國 88 年 07 月 31 日

計畫主持人姓名：蔡銘哲

執行機構：台大醫院小兒部

E Mail: [tmj@ha.mc.ntu.edu.tw](mailto:tmj@ha.mc.ntu.edu.tw)

## 中文摘要

過敏性氣喘的特徵是臨床上表現呼吸道過度反應 (hyperresponsiveness) 及肺部呈慢性發炎的病理變化。這組織病理變化主要為呼吸道黏膜有嗜酸性白血球，肥胖細胞及單核球浸潤，活化的輔助型 T 細胞增加。這些變化都與第二型輔助 T 細胞活化有密切關係。針對 Th2 vs Th1 理論，許多新的免疫療法就被開發出來。非過敏原特異性的免疫療法中，就包括了以 interleukin 12 來誘發細胞免疫反應，增進 Th1 細胞激素的產生，尤其是 IFN- $\gamma$ ，並降低 Th2 的反應。

已有動物實驗，證明以腹腔內注射、或以霧化器吸入 (nebulization) IL-12 能減輕過敏原引起的呼吸道敏感及發炎反應。它可以減少實驗動物肺泡沖洗液中嗜酸性白血球的量，減少肺泡沖洗液中 IL-4、IL-5 的量；而增加 interferon- $\gamma$  的量。惟注射、或以霧化器吸入 IL-12 維持時間短暫，須重複注射、或吸入給予方能奏效，基因治療恰可彌補這一缺點。

本計畫的目標是，建立以 ovalbumin 致敏的動物模式，以便將來以之作為研究 IL-12 DNA 對氣道敏感狀態長期影響。

我們成功地在 BALB/c 老鼠上建立一個 Th2 為主的發炎反應。在以 intra-peritoneal 加上 intra-tracheal 合併致敏模式中，在 2nd challenge 後 24 小時，實

驗動物的肺泡沖洗液中，可以出現 interleukin 5 這個 Th2 的 cytokine，eosinophil count 也會上升。血液中的 OVA-specific IgE 也可以偵測到。

經由不同路徑將 *lux*-pCMV 核酸載體給予實驗動物，利用 luciferase assay 的方法，經由偵測 reporter gene 在黏膜組織細胞中的表現，評估 gene therapy 之最佳給予路徑的實驗中，我們可以在 intravenous route 組的動物中，發現 lung 及 liver 有表現。可是 intratracheal route 組，卻無法偵測到其表現。顯示以將老鼠的舌頭拉出，讓動物吸入 DNA 的方法，仍須在精進。用 nebulization 方法 deliver cationic lipid:DNA complex 是個值得嘗試的方法。Size 較小的 chamber，或利用 plethysmography 的 main chamber 的 inlet 為之，也許能更經濟且有效率。luciferase 的活性測定過程中，如、老鼠肺臟組織的研磨取樣方法也應再改進。

## 英文摘要

Bronchial asthma is characterized by chronic inflammatory process in the airways, which translates to bronchial hyper-responsiveness clinically. The preferential activation of type 2 helper (Th2) cells play a key role in the pathogenesis. Hence the treatment modality aimed at reversing the Th2 response has been eagerly sought for.

Interleukin 12 (IL-12), a heterodimeric cytokine, has been demonstrated to have

beneficial effect in animal models of atopic asthma in terms of its effect to inhibit antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation and Th2 cytokine expression. Its potential therapeutic use, however, is limited by the short-lived effect of injected cytokine. Therefore we try to establish an animal model of atopic asthma on which efficacy of IL-12 plasmid gene therapy can be tested.

In this year's project, we succeed in establishing an animal model of atopic asthma. The combination of intra-peritoneal and intra-tracheal route of OVA administration makes a good model of Th2 inflammation in the lung. The cytokine profile in broncho-alveolar lavage (BAL) was of Th2 in pattern. There was eosinophilia in the BAL. The serum IgE specific to OVA can be demonstrated in animals. Unfortunately we were not able to perform pulmonary function test in this model since the only pulmonary function machine in our facility has too much dead space for such a small animal to be tested.

On the other hand, we also intended to determine to expression of introduced plasmid in order to define the best route of DNA delivery. The reporter gene expression could be detected in the lung and spleen in the IV group. However, the intratracheal route was unsuccessful in this experiment. The problem may lie in the technical difficulties per se or the methodology of detecting reporter gene's expression. Delivery of plasmid DNA via nebulization is worth trying since it may be superior to intratracheal route in terms of fewer techniques required and more economic and efficient if smaller chamber is employed.

## 計畫緣由及目的

過敏性氣喘的特徵是臨床上表現呼吸道過度反應 (hyperresponsiveness) 及肺部呈慢性發炎的病理變化。這組織病理變化主要為呼吸道黏膜有嗜酸性白血球, 肥胖細胞及單核球浸潤, 活化的輔助型 T 細胞增加。這些變化都與第二型輔助 T 細胞活化有密切關係。針對 Th2 vs Th1 理論, 許多新的免疫療法就被開發出來。非過敏原特異性的免疫療法中, 就包括了以 interleukin 12 來誘發細胞免疫反應, 增進 Th1 細胞激素的產生, 尤其是 IFN- $\gamma$ , 並降低 Th2 的反應。

已有動物實驗, 證明以腹腔內注射、或以霧化器吸入 (nebulization) IL-12 能減輕過敏原引起的呼吸道敏感及發炎反應。它可以減少實驗動物肺泡沖洗液中嗜酸性白血球的量, 減少肺泡沖洗液中 IL-4、IL-5 的量; 而增加 interferon- 的量。惟注射、或以霧化器吸入 IL-12 維持時間短暫, 須重複注射、或吸入給予方能奏效, 基因治療恰可彌補這一缺點。

第一年的實驗目的分為兩部份, 第一是建立 OVA 致敏動物模式。第二、經由不同路徑將攜帶報導基因 (reporter gene) lux (luciferase) 的核酸載體 lux-pCMV 給予 BALB/c 老鼠, 以 luciferase 活性分析方法, 經由偵測報導基因 lux 在黏膜組織細胞中的分佈及表現, 評估 DNA vaccine 之最佳給予路徑。

## 結果及討論

### 一、以 ovalbumin 建立致敏動物模式

為達到較明顯的肺功能變化, 採用不同路徑 (route) 之組合達到致敏目的 (1) IP + IH protocol

BAL eosinophil (%)  $33.9 \pm 15$ , IgE\*  $7.1 \pm 2.4$ , IgG1\*  $9.3 \pm 0.5$ , IgG2a\*  $6.3 \pm 2.5$

IP protocol

BAL eosinophil (%) $42.5\pm 20$ , IgE\*  
 $1.13\pm 0.23$ , IgG1\* $9.3\pm 0.54$ , IgG2a\*  
 $6.2\pm 2.7$

\* The anti-OVA specific antibody was expressed as ELISA unit compared to a standard serum, which was designated as 10 EU. All serum samples in a given experiment were assayed in parallel.

\* The BAL fluid was obtained 24 hours after challenge with OVA. The serum was collected prior to obtaining the BAL. 實驗動物的肺功能原先擬以氣管切開術，置放 tracheal cannula，以 Pulmonary monitoring system (Numed limited, UK) 記錄 tracheal flow, 及 transpulmonary pressure。發現該機器及 Physiological recorder (PR800) 的 dead space 對二十公克左右的動物仍嫌太大，老鼠常是一接上機器就發生呼吸困難。吾人覺得應建立 Non-invasive，測量動物肺部氣道反應度的方法，如以單一艙室之 whole body plethysmography (Buxco, Troy, NY) 為之。如此不受約束、自然呼吸的小鼠將被置於 plethysmography 的 main chamber 中，respiratory cycle 中不同的 phase、tidal volume 及 enhanced pause (Penh) 可被估算出來。其中 Penh 值已被報告可以當作 airway obstruction 的一種指標(2)。它與實驗動物的 IgE 產生、肺部組織的嗜酸性白血球浸潤、及以食道插管所測得之 intrapleural pressure 有相關。相信這種 noninvasive 方法來評估致敏動物的 airway hyperresponsiveness 可以讓我們完整的追蹤實驗動物在將來給予 gene therapy 之後，airway hyperresponsiveness 隨時間的變化。此結果將可與以其他方法 (如，reporter gene、或 single chain IL-12 DNA plasmid) 所得之 DNA delivery 到肺部之後，sustained existence 的情況做 correlation。

二、Reporter gene (luciferase) delivery to

lung

Intravenous route

Dose:  $100\mu\text{g}$  *lux*-pCMV DNA in  $50\mu\text{l}$  PBS +  $100\mu\text{l}$  LipofectAMINE as delivery vehicle (Animal Nos. 1 to 4) or  $100\mu\text{l}$  LipofectAMINE Plus as delivery vehicle (Animal Nos. 5 to 8)

Route: 尾靜脈注射

DNA delivery 48 小時後，將肺部組織取下，以液態氮冷凍後，研磨成粉狀，加入適量 luciferase extraction buffer，於室溫下作用 20 分鐘，以 14000rpm 離心 10 分鐘，收集上清液。4. 將所收集的上清液以 1:5 的比例與 luciferase 的受質 (substrate) (Promega) 作用，以 TD-20E luminometer (Turner Inc., Sunnyvale, CA) 讀取讀值。可以在肺臟得到 0.069~0.387 的讀值。反之，Intratracheal route 的動物則全數無法在肺部測得 luciferase 之 activity。

原來 Intratracheal DNA delivery 方法為 IT 吸入 (Intratracheal, IT)：使用劑量為  $100\text{mg}$  plasmid DNA in  $50\mu\text{l}$  normal saline。為了使過敏原能有效的進入到肺部，IT 給予時，將老鼠的舌頭拉出，以利吸入。從初步結果得知，IT 並無法可靠地將 DNA 送到肺部。已有報告指出用 nebulization 方法 deliver cationic lipid:DNA complex 在實驗動物的肺部中，可以發現 reporter gene 的表現 (3)。為了有效率、經濟地 delivery，我們擬採用 size 較小的 chamber，或利用 plethysmography 的 main chamber 的 inlet 為之。

計畫結果自評

本計畫是在氣喘的動物模式中進行基因治療的前置準備工作。以 OVA 在 BALB/c 建立氣喘的動物模式並無太大困難。肺部的發炎反應，表現在肺泡沖洗液中 IL-4、IL-5，及嗜酸性白血球的

量。血液中的 OVA-specific IgE 也有上升的現象。

Reporter gene 表現的偵測，如老鼠肺臟組織的研磨取樣方法，應再改進。DNA delivery 的方法，以將老鼠的舌頭拉出，讓動物吸入的方法，並不十分可靠。用 nebulization 方法，以 size 較小的 chamber，或利用 plethysmography 的 main chamber 的 inlet 為之，也許能更經濟且有效率。

Non-invasive 測量肺部 hyperresponsiveness 的方法應該建立。如此可以讓我們完整的追蹤實驗動物在將來給予 gene therapy 之後，airway hyperresponsiveness 隨時間的變化。並將之與以其他方法(如，reporter gene、或 single chain IL-12 DNA plasmid )所得之 DNA delivery 到肺部之後，sustained existence 的情況做 correlation。

## 參考文獻

1. Wayne Y.Z., Richard E.L., Albert R.K., et al. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *Am J Respir Crit Care Med* 155:661-9, 1997
2. Hamelmann E, Schwartz J, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156:766-775, 1997
3. Eastman SJ, Tousignant JD, et al. Optimization of formulation and conditions for aerosol delivery of functional cationic lipid:DNA complexes. *Human Gene Therapy* 8:313-322, 1997