

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0153-05

靶向性非病毒载体 GE7 系统治疗人脑胶质瘤的体内外研究

陈永新¹, 许秀兰², 张光霁¹, 王 韦², 赵瑞皎², 金海英², 卢亦成¹, 顾健人²(1. 第二军医大学附属长征医院神经外科, 上海 200003; 2. 上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室)

[摘要] 目的: 研究 EGF-R 介导的靶向性非病毒载体 GE7 系统治疗人脑胶质瘤的体内外效应。方法: 组建 GE7 基因转移系统, 分别与 β -gal 报道基因、p21^{WAF-1/CIP1} 基因组成复合物, 体外转导 U251MG 细胞, 分析 GE7 系统导入效率; MTS 法观察细胞生长曲线; FACS 分析细胞周期变化。建立裸鼠皮下荷瘤模型, 分别经瘤内和尾静脉注射导入 DNA 载体复合物, 观察肿瘤生长抑制率。结果: GE7 系统体外导入率最高达 70%, 细胞生长曲线呈低平型, 细胞周期阻滞于 G₁ 期, 平均凋亡指数为 25.2%; 瘤内注射和尾静脉注射抑瘤率分别为 56.5% 和 60.2%。结论: GE7 系统具有较高效率和靶向性, 经肿瘤局部和全身途径导入 p21^{WAF-1/CIP1} 基因, 均可诱导凋亡, 抑制肿瘤生长。

[关键词] 脑胶质瘤; 表皮生长因子受体; 靶向性非病毒载体; p21^{WAF-1/CIP1} 基因; 细胞凋亡; 动物模型

[中图分类号] R730.264 **[文献标识码]** A

in vitro and *in vivo* Effects of the Targeted Non-Viral Vector GE7 System on Growth of Human Gliomas

CHEN Yong-xin, XU Xiu-lan, ZHANG Guang-ji, WANG Wei, ZHAO Rui-jiao, JING Hai-ying, LU Yi-cheng, GU Jian-ren (Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate *in vitro* and *in vivo* effects on growth of human gliomas mediated by the EGF-R targeting non-viral vector GE7 system. **Methods:** To construct GE7 system, U251MG cell line was transfected *in vitro* with β -galactosidase gene and p21^{WAF-1/CIP1} gene mediated by GE7 system. By means of X-gal staining, MTS, FACS, the transferring rate of exogenous gene and the apoptosis rate of tumor cells were examined. The animal model was established by implanting U251 cells subcutaneously in nude mouse. The U251MG glioma-bearing animals were injected with GE7/DNA/HA20 complexes subcutaneously and intravenously. One week later animals were killed, observed the average weight of each group and tumor inhibitory rate in different groups. **Results:** The highest transferring rate of GE7 system *in vitro* was 70%, and the expression of p21^{WAF-1/CIP1} gene could induce the apoptosis of the glioma cell and inhibit its growth. The average apoptosis rate was 25.2%. The subcutaneous and intravenous injection of GE7 system had the same therapeutic effect on human gliomas with the tumor inhibitory rate of 56.5% and 60.2%. **Conclusion:** This study provides a more effective way to improve the efficiency of glioma gene therapy.

[Key words] glioma; EGF-R; targeted non-viral vector; p21^{WAF-1/CIP1}; apoptosis; animal model

* 脑胶质瘤是原发性颅内肿瘤中最常见的恶性肿瘤, 手术、放射治疗和化疗等常规治疗常难以进一步提高疗效, 近年脑胶质瘤的基因治疗逐渐成为热点。国际上现有 18 项脑胶质瘤基因治疗方案, 其中 11 个项目应用 HSV-tK/GCV 系统, 包括我国参与的一项(参加单位为上海长征医院、上海市肿瘤研究所和北京天坛医院)。该系统在动物实验中对脑胶质瘤有明显生长

抑制作用, 然而, 在临床试验中却显示其局限性, 国外已完成第三期临床试验, 国内长征医院已完成 25 例 I

* [基金项目] 本课题受国家“863”高科技项目(102-12-02-05)资助

[作者简介] 陈永新(1968-), 男, 安徽省霍邱县人, 主治医师, 博士, 主要从事脑胶质瘤基因治疗的研究。

期临床试验,结果显示胶质瘤患者的预后改善有限。其原因主要是逆转录病毒载体导入效率低下,缺乏靶向性;载体生产细胞只能作瘤周局部注射,作用范围有限等。开发更为有效的目的基因和转运载体,探讨更为简便、高效的导入途径,有望提高基因治疗的效果。脑胶质瘤细胞膜表面存在表皮生长因子受体(EGF-R)的过度表达。本实验对 EGF-R 介导的脑胶质瘤靶向性基因治疗进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞株、动物和质粒

人恶性脑胶质细胞瘤株 U251MG,许秀兰教授惠赠。4~6 周龄纯种雄性 BALB/c 裸小鼠,体重 20~30 g,由上海市肿瘤研究所动物实验中心提供。pCMV-21^{WAF-1/CIP1}质粒,pCMV- β -gal 质粒,上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室提供。

1.2 试剂

小鼠抗人 EGF-R 单抗,小鼠抗人 p21^{WAF-1/CIP1}单抗,HRP 标记羊抗小鼠 IgG 二抗,DAB 显色试剂盒,均为 DAKO 公司产品。EGF-R 配体寡肽 GE7(NPVVGY-IGERPQYRDL),流感病毒血凝素 N 端 20 肽 HA20(GLFEAIAEFIEGGWHEELIEG),上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室合成。硫氰酸胍(SPDP),为 Serva 公司产品。二硫苏糖醇(DTT)、多聚赖氨酸 Poly-L-lysine(P. L.),为 Sigma 公司产品。

1.3 GE7/DNA/HA20 载体复合物的制备

1.3.1 非病毒载体 GE7-Polyline, HA20-Polyline 合成

将 GE7,HA20 与 P. L. 分别溶解于 PBS 中,使其终浓度为 20 mmol/L,3 组溶液与 SPDP 分别以摩尔比 1:5,25℃ 反应 2 h;PL-PDP 溶液与过量的 DTT 反应生成 PL-SH,PL-SH 分别与 GE-PDP,HA20-PDP 按摩尔比 1:3,25℃ 反应 24 h,反应完毕通过透析去除未反应的 GE-PDP,HA20-PDP。将 PL-GE7 及 PL-HA20 溶解于水至终浓度为 1 mg/ml,以质量比 1:1 混合 PL-GE7 及 PL-HA20,即为非病毒载体。

1.3.2 GE7/DNA/HA20 四元复合物制备

DNA 与非病毒载体分别以 1:1,1:2 和 1:3 的质量比例相混合,25℃ 静置 30 min 后在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳,观察 DNA 阻滞情况。

1.4 GE7 基因转移系统体外导入效率分析

U251MG 细胞按 2×10^4 /孔的密度接种于 6 孔板,培养 24 h 后,弃原培养液,加入含 GE7/pCMV- β -gal/HA20 转染复合物的培养液(DNA 浓度为 1 μ g/ml DMEM),对照组分别加入等浓度的质粒 DNA 和 PBS。常规培养 24 h 后,弃转染液,更换完全培养液继续培

养。于转染后 1,3,5,7 d, U251MG 细胞行 X-gal 染色。光镜下观察,3 个视野中蓝染细胞数占总细胞数的百分比即 β -gal 基因的导入率。

1.5 体外效应实验

1.5.1 细胞生长曲线

U251MG 细胞以 2×10^3 /孔密度接种于 96 孔板,加入含有 GE7/pCMV-21^{WAF-1/CIP1}/HA20(以下简称 GE7/p21/HA20)转染复合物的培养液,转染后 24,48,72,96,120,144,168 h,每孔细胞加入 20 μ l MTS 试剂,37℃ 下保温 3 h,以酶标仪于波长 490 nm 处检测吸光度 OD₄₉₀,每组设置 3 个平行孔,作细胞生长曲线。

1.5.2 流式细胞仪分析细胞周期变化

U251MG 细胞于转染后 48,96 h PI 染色,用流式细胞仪法分析细胞周期变化。

1.5.3 免疫组化法检测 p21^{WAF-1/CIP1} 表达

U251MG 细胞转染后 96 h,免疫组化法检测 p21^{WAF-1/CIP1} 表达。

1.6 体内效应实验

1.6.1 裸鼠荷人胶质瘤动物模型的建立

将生长状态良好的 U251MG 细胞合并,台盼蓝染色显示细胞成活率大于 95%,以无血清培养液稀释,制备为浓度约 5×10^6 /ml 的细胞悬液。以微量注射器将 100 μ l 细胞悬液注射于裸小鼠腋部皮下,2 周后处死,取肿瘤组织常规固定、包埋、切片,免疫组化法分析皮下瘤块组织 EGF-R 表达。

1.6.2 荷瘤动物分组

U251MG 细胞接种后 1 周,皮下可触及肿瘤(直径 3~4 mm),将动物随机分为 3 组:PBS 对照组,单纯质粒组和 GE7/p21/HA20 组。每组 10 只动物,平均分为 2 组,每组 5 只。

1.6.3 载体复合物体内疗效观察

治疗组分别经尾静脉注射和经肿瘤腔内注射导入载体复合物,量约 100 μ l/只,其中 DNA 的浓度为 1 μ g/ml DMEM,治疗每周 1 次,延续 4 周。其它 2 组分别注射等体积 PBS 和单纯质粒。治疗结束后 1 周,处死动物,称取肿瘤重量,计算抑瘤率:抑瘤率(%) = (对照组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$

1.6.4 肿瘤组织病理学检查

皮下肿瘤称重后,常规固定、包埋、切片,HE 染色,观察肿瘤组织病理改变。

2 结果

2.1 GE7/DNA/HA20 载体复合物构建

与多肽 Poly-L-lysine 共价连接物形成复合物的

p21^{WAF-1/CIP1}, β -gal 质粒分别以 1:2, 1:3 的比例相混合时阻滞在点样孔中, 形成稳定的载体复合物。

2.2 GE7 基因转移系统体外导入效率分析

转染后 24 h 可观察到少量外源基因的表达(9%), 72 h 外源基因表达达到高峰(72%), 随后逐渐下降, 168 h 基本消失。单纯质粒组, 仅见微弱外源基因的转入(4%); 对照组未见外源基因的转入(见图 1, 2)。

缓, 细胞数明显减少, 而对照组与单纯质粒组的生长曲线上上升趋势明显, 细胞生长迅速, 无明显生长抑制(见图 3)。

图 2 GE7 基因转移系统体外导入效率曲线

Fig. 2 Expression rate of β -gal gene transfected with GE7 gene delivery system

图 3 U251MG 细胞生长曲线

Fig. 3 U251MG glioma cells growth curve

图 1 体外转染后 U251MG 细胞 X-gal 染色

Fig. 1 Expression of β -gal in U251MG glioma cells after transfected with GE7/pCMV- β -gal/HA20

- A: Cells transfected with GE7/pCMV- β -gal/HA20 (200 \times);
B: Cells transfected with lasmid pCMV- β -gal DNA (200 \times);
C: Cells transfected with PBS (200 \times)

2.3 细胞生长曲线

转染组细胞生长曲线为低平型, 细胞生长明显迟

2.4 流式细胞仪分析细胞周期变化

转染组在 G₁ 峰左侧出现亚二倍体凋亡峰, 凋亡百分率最低为 18.4%, 最高为 31%, 平均为 25.2%, 而对照组及单纯质粒组未见细胞凋亡峰型; 对照组和单纯质粒组细胞周期无明显变化, 转染组 G₁ 期细胞数明显增多 ($P < 0.05$), G₂ 期细胞数明显减少或完全缺失 ($P < 0.001$)。

2.5 免疫组化检测 p21^{WAF-1/CIP1} 表达

p21^{WAF-1/CIP1} 表达产物 WAF-1 蛋白主要定位于细胞浆中, 经转染的细胞胞浆内出现染色深浅不一的棕黄色颗粒, 染色阳性细胞呈弥漫性分布, 而对照组则染色阳性细胞稀少, 染色较浅(见图 4)。

2.6 裸鼠皮下肿瘤组织外源基因表达检测

荷瘤裸鼠的皮下肿瘤组织中可见大量胞浆黄染的

细胞,EGF-R 组化染色阳性的细胞呈弥漫性分布,染色阳性率约 50% ~ 70%(见图 5)。

表 1 经肿瘤瘤内注射及尾静脉注射后抑瘤率比较
Tab. 1 Comparision inhibitory rate of tumor growth after tail vein injection (T. V.) and subcutaneous injection(S. C.)

Groups	Average weight(g)	Inhibitory rate(%)
PBS (S. C.)	2. 117 ± 0. 961	/
Plasmid DNA (S. C.)g	1. 756 ± 0. 859▲	/
GE7/p21/HA20 (S. C.)	0. 920 ± 0. 206▲▲	56. 5% *
PBS (T. V.)	2. 033 ± 0. 625	/
Plasmid DNA (T. V.)	2. 273 ± 1. 109■	/
GE7/p21/HA20 (T. V.)	0. 809 ± 0. 154■■	60. 2% **

* * vs * $P > 0. 05$; ▲ vs PBS (S. C.) $P > 0. 05$;
▲▲ vs PBS (S. C.) $P < 0. 01$; ■ vs PBS (T. V.) $P > 0. 05$;
■■ vs PBS (T. V.) $P < 0. 01$

图 4 U251MG 细胞 p21^{WAF-1/CIP1}免疫组化染色
Fig. 4 Expression of p21^{WAF-1/CIP1} in U251MG glioma cells
A: Cells treated with PBS;
B: Cells treated with GE7/p21^{WAF-1}/HA20

2.8 肿瘤组织病理学检查

对照组肿瘤细胞和组织形态无明显变化,其病理形态接近于 Kernohan III 级。治疗组可见大范围出血、坏死,肿瘤组织中心坏死区细胞裂解,肿瘤新生血管明显狭窄或部分闭塞(见图 6)。

3 讨 论

表皮生长因子受体(EGF-R)是原癌基因 c-erbB-1 的表达产物,是一种细胞膜受体,文献报道在 40% ~ 70% 的胶质瘤中有 EGF-R 基因的扩增和过度表达^[1-2]。EGF-R 表达水平与脑胶质瘤病理级别呈正相关^[3],可能作为分子标志物参与脑胶质瘤的发生、发展和浸润等生物学行为。

GE7 系统是我国顾健人研究室构建的一种可溶性非病毒载体基因转移系统^[4]。该系统包含针对人 EGF-R 结合位点的 16 肽 GE7(EGF-R 配体寡肽)及流感病毒血凝素 N 端 20 肽 HA20(内吞小泡释放寡肽)。GE7 和 HA20 经过化学偶联剂 SPDP 的作用分别与多聚(L)赖氨酸连接,后者与 DNA 以静电作用相结合,形成四元复合物。复合物通过受体介导的内吞途径进入靶细胞,首先定位在细胞核内体中,随后, DNA 被转运到细胞核表达外源基因或进入溶酶体, HA20 可破坏含有 DNA 的核内体,防止内吞小泡释放的载体复合物被溶酶体降解,以提高目的基因的表达。受体介导的基因转移与病毒性载体相比,具有转导效率高、靶向性强、可同时携带多种外源基因、可经静脉途径导入外源基因等优点。

图 5 肿瘤组织 EGF-R 免疫组化检测
Fig. 5 Immunohistochemical analysis of EGF-R in nude mouse glioma tissues (100 ×)

2.7 皮下肿瘤生长抑制率观察

对照组和单纯质粒组肿瘤生长迅速,两组间肿瘤重量无显著差异($P > 0. 05$);治疗组肿瘤生长缓慢,两种途径注射后肿瘤重量均显著低于对照组($P < 0. 01$);经瘤腔内及尾静脉两种途径注射后的抑瘤率无显著差别($P > 0. 05$)。结果见表 1。

本实验首次将非病毒载体系统应用于脑胶质瘤基因治疗的研究,实验设立载体复合物组、单纯质粒组和 PBS 对照组,以报告基因^[5]转导分析基因导入率,结果显示载体复合物组细胞转染后 24 h 即有少量外源基因的表达,72 h 基因表达达到高峰,随后逐渐下降,

168 h 基本消失;单纯质粒组仅有微量外源基因的表达;对照组无明显表达。GE7 系统介导的基因转移和裸 DNA 的基因转移,机制均是通过胞饮作用,裸 DNA 通过 DNA 分子的随机碰撞进入细胞,其基因转移效率低下;而 GE7 系统通过受配体的特异结合,靶向性地转导 EGF-R 高表达的 U251MG 细胞,能够实现较高水平的目的基因表达,表达产物定位于细胞质,避免了目的基因进入细胞核随机整合的可能。

p21^{WAF-1/CIP1} 是目前已知的具有最广泛激酶抑制作用的细胞周期抑制蛋白^[6],有研究表明,恶性肿瘤中 p21^{WAF-1/CIP1} 表达水平降低,此现象可能与肿瘤的发生、发展、浸润性生长、转移以及预后不良等生物学行为有关^[7-8]。本研究中,选择 p21^{WAF-1/CIP1} 作为治疗基因,研究表明 GE7 系统介导 p21^{WAF-1/CIP1} 可通过细胞周期阻滞,诱导肿瘤细胞凋亡;外源基因转导后有稳定的表达。

为证实 GE7 系统用于脑胶质瘤动物模型的可行性,分别经瘤腔内注射和经尾静脉注射导入载体复合物,两种途径给药后对照组肿瘤生长迅速,而治疗组肿瘤生长均明显受抑,两种途径之间生长抑制效果无显著差异。病理检查显示治疗组肿瘤组织出血及坏死明显,新生血管狭窄或部分闭塞。GE7 系统经静脉注射给药较瘤内注射更为安全、简便,符合临床用药的规律,具有可行性。本实验为脑胶质瘤靶向性基因治疗的临床应用提供了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] Berger F, Laine M, Hoffmann D, *et al.* The EGF receptor pathway in human cerebral tumors [J]. Neurochirurgie, 1992, 38 (5): 257-266.
- [2] Di-Carlo A, Mariano A, Macchia PE, *et al.* Epidermal growth factor receptor in human brain tumors [J]. J Endocrinol Invest, 1992, 15(1): 31-37.
- [3] Van-der-Valk P, Lindeman J, Kamphorst W, *et al.* Growth factor proliferates of human gliomas. Do non-tumor cells contribute to tumor growth in glioma? [J]. Ann Oncol, 1997, 8(10): 1023-1029.
- [4] 田培坤,任圣俊,任常春,等.一种新的以细胞表面受体为靶向的基因导入系统 [J]. 中国科学(C 辑), 1999, 28(6): 554-557.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning [M], 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 804-809.
- [6] Kokunai T, Izawa I, Tamaki N, *et al.* Overexpression of p21WAF1/CIP1 induces cell differentiation and growth inhibition in a human glioma cell line [J]. Int J Cancer, 1998, 75(4): 643-648.
- [7] Yasui W, Akama Y, Yokozaki H, *et al.* Expression of p21WAF1/CIP1 in colorectal adenomas and adenocarcinomas and its correlation with p53 protein expression [J]. Pathol Int, 1997, 47: 470-477.
- [8] Gomyo Y, Ikeda M, Osaki M, *et al.* Expression of p21 (waf1/cip1/sdi1), but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma [J]. Cancer, 1997, 79 (11): 2067-2072.

图 6 基因治疗后肿瘤组织病理学观察

Fig. 6 Histopathological analysis of transplanted U251MG glioma cells in nude mouse injected with p21^{WAF-1/CIP1} complex surrounding the tumor

A: Animal injected with PBS(200 ×);

B: Animal injected with p21^{WAF-1/CIP1} complex

(necrosis area)(100 ×); C: Animal injected with p21^{WAF-1/CIP1} complex(hemorrhage area)(100 ×)