

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )01- 0030- 04

## 可调控自杀基因的 SCID 小鼠乳腺癌基因治疗的研究

曾赵军, 胡维新, 陈 迁, 易伟峰, 罗赛群 ( 中南大学湘雅医学院分子生物学研究中心, 湖南 长沙 410078 )

[ 摘 要 ] **目的:** 探讨经强力霉素( Dox )诱导后, 丙氧鸟苷( GCV )对 SCID 小鼠乳腺癌的调控性治疗作用。**方法:** 重组逆转录病毒载体 pRevTRE/HSVtk 与 pRevTet-On 共转染乳腺癌细胞 MCF-7, 接种 SCID 小鼠成瘤后, 腹腔内分别注射生理盐水( NS )、GCV 及 Dox + GCV 治疗 15 d。观测肿瘤体积和组织病理改变及用 RT-PCR 分析肿瘤组织有无 HSVtk 的表达。**结果:** 乳腺癌 SCID 小鼠经 Dox + GCV 治疗 15 d 后, 肿瘤体积明显减小, 生长受抑, 组间比较有显著性差异(  $P < 0.05$  ); HE 染色发现治疗组肿瘤有局部坏死, 炎性细胞浸润。RT-PCR 结果显示 Dox 诱导后肿瘤组织 HSVtk 表达较明显。**结论:** 在 Dox 的诱导作用下, GCV 对可调控性自杀基因乳腺癌 SCID 小鼠有显著治疗作用。

[ 关键词 ] Tet-On; 基因治疗; 丙氧鸟苷( GCV ); 乳腺癌; SCID 鼠

[ 中图分类号 ] R730; Q782 [ 文献标识码 ] A

## Treatment of Breast Cancer in SCID Mice with Regulatory Suicide Gene

ZENG Zhao-jun, HU Wei-xin, CHEN Qian, YI Wei-feng, LUO Sai-qun ( *Molecular Biology Research Center of Xiangya Medical College, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China* )

[ **Abstract** ] **Objective:** To explore the ganciclovir( GCV ) therapy on the severe combined immunodeficiency ( SCID ) breast cancer mice after HSVtk gene and Tet-On regulatory gene expression induced by doxycycline( Dox ). **Methods:** Co-transfections of pRevTRE/HSVtk and pRevTet-On were performed on MCF-7 cell line by using modified calcium phosphate precipitation method respectively. After MCF/TRE/tk/Tet-On cell line was established, cells were inoculated into the SCID mice to form the human breast cancer in SCID mice. Regimen ( GCV, GCV + DOX, Normal Saline ) was injected intraperitoneally in SCID mice 15 days. The volume of tumor was measured and the tumor tissues were examined pathologically. HSVtk gene expression was analyzed by RT-PCR. **Results:** The human breast cancer in SCID mice was formed successfully by inoculated MCF/TRE/tk/Tet-On cells into the female SCID mice. In the GCV + DOX-treated group, volume of tumors was shrank remarkably after 15 days' treatment and tumor growth were retarded compared with the control groups. There was significant difference between the GCV + DOX-treated group and the control groups (  $P < 0.05$  ). Infiltrating cells were observed in tumors that injected with doxycycline followed by GCV treatment and cells were profoundly damaged stained with hematoxylin and eosin. The expression of tk gene in SCID mice tumors was also observed by RT-PCR analysis. **Conclusions:** The human breast cancer in SCID mice was formed successfully by implanted MCF/TRE/tk/Tet-On cells. The growth of tumor could be shrank remarkably with GCV treatment in our SCID mice under the doxycycline induction.

[ **Key words** ] Tet-On; gene therapy; ganciclovir( GCV ); breast cancer; SCID mice

\* 单纯疱疹病毒胸苷激酶( HSVtk )能在细胞内将无毒的药物前体丙氧鸟苷( GCV )代谢为毒性产物, 诱导靶细胞产生“自杀”效应, 从而达到清除肿瘤细胞的目的<sup>[1]</sup>。本研究用携带 HSVtk 基因的重组逆转录病毒载体 pRevTRE/HSVtk 与调控因子 Tet-On 基因共转染乳腺癌细胞株 MCF-7 使人乳腺癌 SCID 小鼠成瘤。通过

观察乳腺癌 SCID 小鼠经不同处理后瘤体大小、肿瘤组

[ 基金项目 ] CMB( 美国中华医学会 )基金( 99-698 )资助

[ 作者简介 ] 曾赵军( 1971- ), 男, 湖南长沙人, 博士研究生, 主要从事肿瘤的基因治疗的研究。

[ 通讯作者 ] 胡维新, E-mail: weixinhu@public.cs.hn.cn。

织病理改变及分析肿瘤组织内 HSVtk 表达的变化,探讨在强力霉素(Dox)诱导下,自杀基因对乳腺癌细胞株 MCF/TRE/tk/Tet-On 移植的乳腺癌 SCID 小鼠体外可调控性治疗作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂,动物来源

pRevTRE, pRevTet-On 载体购自美国 Clontech 公司。pRevTet-On 载体含有新霉素抗性基因( Neo<sup>r</sup> ), pRevTRE 载体含有潮霉素抗性基因( Hyg<sup>r</sup> ), 宿主菌为 DH5 $\alpha$ 。限制性内切酶购自 Roche 公司和 Promega 公司。MCF-7 乳腺癌细胞株购自中南大学湘雅医学院细胞研究中心。G418、潮霉素、DMEM、0.25% 胰蛋白酶、RNA-TRIzol 试剂盒均购自 Gibco BRL 公司。GCV、Dox 购自美国 Sigma 公司。质粒 pGEM7Z-tk 由中南大学湘雅医学院肿瘤研究所曹亚教授惠赠;其余试剂购自 Sigma 公司。SCID 小鼠购于中国医学科学院实验动物中心。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组 HSVtk/TRE 逆转录病毒载体的构建

首先设计两端分别带有 BamH I, Hind III 酶切位点的 tk 引物(上游引物: tk1: 5'-TCTA TGG ATC CAG ATC TTG GTG GCG TGA AAC-3', 下游引物 tk2: 5'-TAG CCA AGC TTT ATT GCC GTC ATA GCG C-3')扩增 pGEM7Z-tk 载体的 tk 基因片段,琼脂糖凝胶回收 tk 基因片段, BamH I, Hind III 酶切后,与 BamH I, Hind III 酶切线性化的载体 pRevTRE 连接,获得重组逆转录病毒载体 pRevTRE/tk,转化宿主菌 DH5 $\alpha$ ,挑取单个克隆,提取质粒 DNA,酶切鉴定和 PCR 特异性扩增鉴定。

#### 1.2.2 乳腺癌细胞株的培养和磷酸钙转染

人乳腺癌细胞株 MCF-7 在 DMEM 完全培养基(含 10% 胎牛血清 FBS 及青、链霉素各 100  $\mu$ g/ml), 37 $^{\circ}$ C, 5.0% CO<sub>2</sub> 条件下置于 50 ml/L CO<sub>2</sub> 恒温箱中培养,按 5  $\times$  10<sup>5</sup> 细胞/ml 接种到 60 mm 组织培养板,将 pRevTRE/HSVtk 质粒 DNA 磷酸钙共转染乳腺癌细胞株 MCF-7, 潮霉素 B 400  $\mu$ g/ml 筛选细胞阳性克隆 MCF/TRE/tk。再将 pRevTet-On 质粒 DNA 磷酸钙转染乳腺癌细胞 MCF/TRE/tk, G418 500  $\mu$ g/ml 筛选,得到细胞阳性克隆 MCF/TRE/HSVtk/Tet-On, 200  $\mu$ g/ml 潮霉素 B 和 100  $\mu$ g/ml G418 维持<sup>[2]</sup>。

#### 1.2.3 动物饲养和分组

SCID 小鼠 24 只,雌性,4~6 周龄,平均体重 18~20 g,在 23 $^{\circ}$ C~24 $^{\circ}$ C SPF 环境下饲养于隔离室的生物层流架中,饲以高压灭菌水和饲料。随机分成 NS 组、GCV 组、GCV + Dox 组,每组 8 只。肿瘤细胞接种前 3

d,皮下注射环磷酰胺(cyclophosphamide)100 mg/kg,连续 3 d,以抑制小鼠 T, B 淋巴细胞增殖,降低移植免疫排斥反应。

#### 1.2.4 乳腺癌 SCID 小鼠成瘤

无菌条件下取对数生长中期的 MCF/TRE/tk/Tet-On 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,用 PBS 洗 2 遍,1 000 r/min 离心 2 min,留细胞沉淀,用无血清的 DMEM 培养基重悬细胞,细胞计数使细胞密度达 2  $\times$  10<sup>6</sup> 细胞/ml,以 0.2 ml 细胞悬液注射于 SCID 小鼠左侧近前腋处皮下并作好标记。细胞接种后,每周观察 2 次,测量记录成瘤大小及 SCID 小鼠生长状况。待大部分肿瘤长径长至 0.5 cm 之后,GCV + Dox 组 SCID 小鼠给予腹腔注射 Dox(100 mg/kg),连续 5 d。随后 NS 组给予腹腔注射生理盐水 0.2 ml, GCV 组给予腹腔注射 GCV(100 mg/kg), GCV + Dox 组给予腹腔注射 GCV(100 mg/kg) 各 0.2 ml,每天上下午各 1 次,连续 15 d。治疗前后均用游标卡尺测量肿瘤体长径 a 和短径 b,监测 SCID 小鼠体重及生长状况并拍照。肿瘤体积按  $V = \pi (a^2 \times b) / 6$  (mm<sup>3</sup>) 公式计算。

#### 1.2.5 病理形态学检测

治疗后 SCID 小鼠用 2% 戊巴比妥钠(20 mg/kg) 腹腔内注射麻醉,无菌条件下取出肿瘤组织,去除结缔组织,用生理盐水反复冲洗 3 次,10% 福尔马林固定 24 h,用 30  $\mu$ m 厚度行冰冻切片,HE 染色后,普通显微镜镜下观察并拍照。

#### 1.2.6 RT-PCR 检测 HSVtk 的表达

每组取新鲜的肿瘤组织约 0.1 g,置 5 ml 离心管中,加预冷的 RNA-TRIzol 试剂 1 ml,匀浆。RNA-TRIzol 试剂盒提取肿瘤组织总 RNA,在 0.5 ml Eppendorf 管中加入 RNasin(10 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, Oligo(dT)<sub>15</sub> 引物(0.5 mg/L) 1  $\mu$ l,总 RNA 1.5  $\mu$ g, dNTP(10 mmol/L) 2  $\mu$ l, 5 $\times$  逆转录缓冲液 10  $\mu$ l, AMV 逆转录酶(2.5  $\times$  10<sup>7</sup> U/L) 1  $\mu$ l, 补加无 RNA 酶的 DEPC 水至总反应容积为 50  $\mu$ l,混匀,42 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 94 $^{\circ}$ C 5 min 终止反应,冰浴冷却 5 min, -70 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应在 0.5 ml Eppendorf 管中依次加入灭菌水 32  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) 4  $\mu$ l, dNTP(10 mmol/L) 1  $\mu$ l, 3' 和 5' 端引物(2.5  $\mu$ mol/L) 各 2  $\mu$ l, (上游引物: tk3 5'-GGC ATG CCT TAT GCC GTG ACC GAC-3', 下游引物 tk4 5'-CCA GGT CGC ATA TCG TCG GTA TGG -3') 逆转录产物 5  $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶(5 000 U/L) 1  $\mu$ l, 总反应体积为 50  $\mu$ l, 混匀。覆盖石蜡油,稍加离心,94 $^{\circ}$ C 变性 2 min。设置反应程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s 共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应产物 5  $\mu$ l 加 2  $\mu$ l 载样缓冲液,以 0.5  $\times$  TBE 为电泳缓冲液,在 1.0% 琼脂

糖凝胶上电泳约 1 h(电压 50 V)。电泳完毕后,用图像分析仪进行图像分析。PCR 产物应为 420 bp,以  $\beta$ -actin 为内对照,反应体系同上。

### 1.2.7 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较采用统计软件程序 SPSS (10.0 版本)进行方差分析,  $P < 0.05$  时差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SCID 小鼠体内成瘤情况及治疗前后肿瘤大小的变化

将 MCF/TRE/tk/Tet-On 肿瘤细胞皮下接种 SCID 小鼠后,90% SCID 小鼠能长出肿瘤,平均长出肉眼可见肿瘤的时间为 15 d,各组成瘤时间基本一致。待肿瘤长径长至 0.5 cm 之后,各组分别给予 NS,GCV,GCV + Dox 治疗。GCV + Dox 组 SCID 小鼠腹腔注射丙氧鸟苷加强力霉素(GCV + Dox)后 15 d,与对照组(NS组、GCV 组)相比,肿瘤体积明显减小,生长受到明显抑制,组间比较有显著性差异( $P < 0.05$ );而 NS 组、GCV 组 15 d 后,体积变化组间比较无显著性差异( $P > 0.05$ ,图 1)。

图 1 乳腺癌细胞 MCF/TRE/tk/Tet-On 接种 SCID 小鼠后 NS 组、GCV 组、GCV + Dox 组 SCID 小鼠肿瘤体积的变化  
**Fig. 1 The changes of tumor volume in NS group, GCV group and GCV + Dox group SCID mice after MCF/TRE/tk/Tet-On tumor cells implant**

### 2.2 肿瘤组织病理学观察

GCV + Dox 组 SCID 小鼠的肿瘤经 Dox 诱导 GCV 治疗 15 d 后,经 HE 染色镜下观察发现 GCV + Dox 组的组织切片中有散在小片状坏死区,细胞形态结构模糊,胞核裂解、消失。肿瘤局部有坏死,炎性细胞浸润。对照组(NS 组、GCV 组)肿瘤细胞则生长活跃并可见核分裂相(见图 2)。

### 2.3 RT-PCR 检测 HSV-tk 的表达结果

RT-PCR 获得约 420 bp 的 DNA 片段,以预期片段大小一致。RT-PCR 结果显示强力霉素诱导后的 GCV + Dox 组 SCID 小鼠的肿瘤组织内 HSVtk 表达较明显,而 NS 组、GCV 组肿瘤组织内 HSVtk 没有表达(见图 3)。

图 2 3 组 (NS 组、GCV 组、GCV + Dox 组)SCID 乳腺癌小鼠经治疗 15 d 后肿瘤组织病理学观察 H-E 染色( $\times 400$ )  
**Fig. 2 Pathological observation of the SCID mice bearing MCF/TRE/tk/Tet-On tumors with three treatments were given after 15 days treatment stained with hematoxylin and eosin( $\times 400$ )**  
A: Normal saline control group; B: GCV treatment group; C: Dox + GCV treatment group

## 3 讨论

在细胞内,自杀基因 tk 将核苷类似物 GCV 磷酸化,使其进一步代谢为三磷酸 GCV,后者可抑制细胞的 DNA 聚合酶,并作为 DNA 合成的终结者,导致细胞死亡。通过对载体的选择改建,调控外源基因的有效表达,就能充分发挥自杀基因的杀伤作用及旁观者效应来达到治疗肿瘤的目的<sup>[3]</sup>。将自杀基因 tk 特异性地

导入肿瘤组织,增加有效转染率,使其在肿瘤中表达,可使自杀基因 tk 发挥杀肿瘤作用,且主要集中在肿瘤原发或转移灶内<sup>[4]</sup>。本研究以表达 tk 基因及调控系统 Tet-On 的乳腺癌细胞 MCF/TRE/tk/Tet-On 直接接种 SCID 小鼠成功建立了可调控性自杀基因乳腺癌动物模型,为探讨自杀基因体外调控机制的研究奠定了基础,具有十分重要的意义。将人类肿瘤移植到 SCID 小鼠身上,除有助于了解肿瘤特性与成因,更有助于研发、评估新的治疗策略。借助于分子生物学研究这些肿瘤细胞在活体的转移能力与机制、治疗策略与免疫系统间的交互作用等,已获得初步的成果<sup>[5]</sup>。

四环素可抑制表达。

本研究将调控因子 Tet-On 基因及调控元件 TRE 转入乳腺癌细胞株 MCF-7,并且将胸苷激酶基因 HSVtk 共转染癌细胞 MCF-7,筛选得到细胞阳性克隆 MCF/TRE/tk/Tet-On,再接种 SCID 小鼠成瘤,使得 SCID 小鼠的体内肿瘤能受到外源诱导剂如强力霉素 Dox 的诱导控制,使自杀基因 HSVtk 转录与表达受到 Tet-On 系统的精确调控,并激活前药丙氧鸟苷 GCV,从而在体内发挥杀瘤作用。在 GCV + Dox 组 SCID 小鼠腹腔注射丙氧鸟苷加强力霉素(GCV + Dox)治疗 15 d 后,与对照组(NS 组、GCV 组)相比,肿瘤体积明显减小,生长受到明显抑制,组间比较有显著性差异( $P < 0.05$ );而 NS 组、GCV 组治疗 15 d 后,体积变化在组间比较无显著性差异( $P > 0.05$ )。肿瘤组织病理检查结果表明肿瘤在强力霉素 Dox 的诱导 GCV 治疗后组织中明显出现细胞坏死,炎性细胞浸润和组织结构模糊不清,而对照组的肿瘤细胞组织结构较完整;RT-PCR 结果也显示强力霉素诱导后的 GCV + Dox 组 SCID 小鼠的肿瘤组织内 HSVtk 表达较明显,而 NS 组、GCV 组肿瘤组织内 HSVtk 没有表达。进一步说明强力霉素 Dox 诱导开启 SCID 小鼠体内肿瘤的四环素系统,并激活了体内转 tk 基因的表达,使乳腺癌细胞系统的建立对于今后在体外给予抗生素(如强力霉素等)以达到治疗体内恶性肿瘤的临床基因治疗奠定了实验研究基础。

图3 RT-PCR 检测各组 SCID 小鼠肿瘤治疗 15 d 后 HSV-tk 的表达

Fig. 3 The HSV-tk expression in tumor in all groups was analyzed by RT-PCR after SCID mice 15 days treatment

M: 100 bp Marker; 1: GCV treatment group; 2: Dox + GCV treatment group; 3: Normal saline control group

有效地靶向转录或使目的基因受转录调控元件的精确调控是基因治疗领域的研究热点之一。其基本策略就是将外源基因置于组织特异性启动子的下游,只有特定组织或细胞中的转录因子才能与这些启动子作用并激活转录,从而实现目的基因的选择性表达<sup>[6]</sup>。Gossen 等<sup>[7]</sup>提出的 tet 调控系统就是利用大肠杆菌抗四环素操纵子(tet operon)的阻遏与去阻遏作用来调控基因表达,使目的基因表达受到四环素的精确调控。其中 tet 抑制系统(tet-off)是将 tet 阻遏蛋白与 VP16 的激活域融合表达转录激活蛋白 tTA, tTA 与含 tetO 的启动子(tetOp)作用启动下游基因的表达,四环素关闭基因的转录。tet 激活系统(Tet-On)是突变的 tet 阻遏蛋白与 VP16 的激活域融合表达 rtTA,在强力霉素存在时,rtTA 与 tetOp 结合启动子,可以激活或抑制靶向转录。Ralph 等<sup>[8]</sup>首次报道了一个神经胶质细胞特异性的可抑制的腺病毒表达系统:将 3 个串联的 300 bp 的 GFAP 增强子序列与巨细胞病毒最小启动子相连,指导 tTA 选择性表达于神经胶质瘤细胞,tTA 激活 tetOp 启动子报告基因高水平地表达于胶质细胞中,0.1  $\mu\text{g/ml}$

## [参考文献]

- [1] Todryk S, Melcher A, Bottley G, et al. Cell death associated with genetic prodrug activation therapy of colorectal cancer. *Cancer Lett*, 2001, 174(1): 25-33.
- [2] 罗赛群, 胡维新, 易伟峰, 等. 受强力霉素调节的自杀基因表达载体系统的构建和在乳腺癌细胞株(MCF-7)的表达[J]. *生命科学研究*, 2002, 6(2): 137-141.
- [3] Qiao J, Black ME, Caruso M. Enhanced ganciclovir killing and bystander effect of human tumor cells transduced with a retroviral vector carrying a herpes simplex virus thymidine kinase gene mutant[J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(11): 1569-1576.
- [4] 成诗银, 张惠中, 鱼兵. HSV-tk/重组人 IL-2、TNF- $\alpha$  融合基因对喉癌细胞 Hep-2 杀伤作用的体外研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2002, 9(2): 85-89.
- [5] Buckley RH. Advances in the understanding and treatment of human severe combined immunodeficiency[J]. *Immunol Res*, 2001, 22(2-3): 237-51.
- [6] Spear MA. Gene therapy of gliomas: Receptor and transcriptional targeting[J]. *Anticancer Res*, 1998, 18(5A): 3223-3231.
- [7] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells[J]. *Science*, 1995, 268(5218): 1766-1769.
- [8] Ralph GS, Bienemann A, Harding TC, et al. Targeting of tetracycline-regulatable transgene expression specifically to neuronal and glial cell populations using adenoviral vectors[J]. *Neuroreport*, 2000, 11(9): 2051-2055.