

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0018-04

腺病毒介导的小鼠内皮抑素治疗胃癌的研究

姜明红, 聂明明, 方国恩, 崔贞福, 吴红平, 李琳芳, 吴孟超, 钱其军 (第二军医大学东方肝胆医院 基因及病毒治疗实验室, 上海 200438)

[摘要] **目的:** 研究腺病毒介导的鼠内皮抑素基因对胃癌的治疗作用。**方法:** 利用病毒重组技术将内皮抑素克隆入增殖缺陷型腺病毒基因组中, 观察体外转染表达后的生物学活性。通过建立荷人胃癌的裸鼠动物模型, 分析基因转导后动物肿瘤细胞中内皮抑素的表达情况及对肿瘤的抑制作用。**结果:** 构建了表达内皮抑素的重组腺病毒载体 pCA13-mEndo; 检测到内皮抑素在体外的 mRNA 水平和蛋白质水平均有表达; 鸡胚绒毛尿囊膜实验表明其对血管生长起抑制作用; 荷瘤裸鼠体内肿瘤生长抑制明显。**结论:** 所构建的 pCA13-mEndo 重组腺病毒载体可有效表达具有生物学活性的内皮抑素, 使得肿瘤内微血管生成减少, 肿瘤细胞增殖减慢, 为抗血管生成方法治疗实体瘤的临床应用奠定基础。

[关键词] 内皮抑素; 血管生成抑制剂; 腺病毒; 胃癌

[中图分类号] R730.54; Q784 [文献标识码] A

Inhibitory Effect of Gastric Cancer by Adenoviral Transduction of Mouse Endostatin Gene

JIANG Ming-hong, NIE Ming-ming, FANG Guo-en, CUI Zhen-fu, WU Hong-ping, LI Lin-fang, WU Meng-chao, QIAN Qi-jun (Laboratory of Virus and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai, 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effects on gastric cancer by adenoviral transduction of mouse endostatin gene. **Methods:** Mouse endostatin gene was cloned into the genome of replication-defective adenovirus specific for the tumor cells by virus recombination technology, and then its biological activities were surveyed in vitro. Animal model of gastric cancer bearing nude mice were established to assay the expression of mouse endostatin and inhibition for tumor cell in vivo. **Results:** To construct the recombinant adenovirus vector pCA13-mEndo and explore its expression in the levels of both mRNA and protein. The protein appearing the anti-angiogenesis activity was tested by chicken chorio-allantoic membrane assay. It can also inhibit tumor to grow and induce tumor cell to apoptosis significantly in vivo of animal. **Conclusions:** The recombination adenovirus can express biologically active mEndostatin effectively, which results in inhibiting the growth of micro-blood vessels and proliferation slowly. This lays the foundation for the angiogenesis therapy of the solid tumor in clinical application.

[Key words] endostatin; angiogenesis inhibitor; adenovirus; gastric cancer

* 实体瘤的生长取决于肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞的数量, 两者相互依存, 互为消长^[1]。目前的治疗方法有针对前者的细胞毒药物为主的化学疗法, 但具有无法解决的严重毒副作用和耐药性; 针对后者的则是抗血管生成疗法(antiangiogenic therapy), 在动物实验中已显示出强大的抗肿瘤疗效^[2]。内皮细胞抑制素(endostatin)就是其中一种血管生成抑制剂, 它能有效地抑制血管形成和肿瘤生长。我们构建了携带小鼠的

内皮细胞抑制素(mouse Endostatin, mEndo)基因的复制缺陷型重组腺病毒, 通过体外实验和荷人胃癌裸鼠

[基金项目] 国家自然科学基金国际合作重大项目资金 (30120160823) 及国家“863”计划重点项目资助 (2001A217031)

[作者简介] 姜明红(1976-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤的增殖病毒和基因治疗的研究

[通讯作者] 钱其军, E-mail: qianqj@ yahoo. com

的治疗研究,为胃癌的基因治疗及抗新生血管生成的临床治疗提供了新的途径。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞株、动物

质粒 pBlast-mEndostatin 购于美国 InvitroGen 公司;腺病毒载体 PUC19, pCA13, pBGHE3 及腺病毒 E1 区转化人胚胎肾 293 细胞株, 购于加拿大 Microbix Biosystems 公司;携带 LacZ 基因 E1 缺陷腺病毒 Ad-LacZ 为本室保存;人胃癌细胞株 SGC-7901 购于中科院细胞库;BALB/c 裸鼠, 4~6 周龄, 由中国科学院上海实验动物中心提供。

1.2 载体 PUC19-mEndo, pCA13-mEndo 的构建

在 pBlast-mEndostatin 的 mEnd 基因上下游分别合成引物, 引物由基康基因公司合成。上游引物 P1: 5'-CTG CTC AGT CTG GTC CTT GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC GCT CAT ACT CAT CAG GAC TTT CA 3'; 下游引物 P2: 5'GCG GGA TTC TTA CTA TTT GGA GAA AGA GGT CA 3'。对 mEndo 基因进行聚合酶链式反应(PCR), 获得 500 bp 大小的 mEndo 基因片段。再在其 PCR 片段 5'端引入 M-成瘤蛋白的信号肽, 合成引物 P3: 5'GGG GAA TTC ACC ATG GGG GAT CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT GCA CTC 3'。利用引物 P3, P2 进行重叠 PCR 反应, 获取 650 bp 的目的片段, 再用 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 克隆到应用同样内切酶线性化的 PUC19 载体上(缺失 396~420 bp), 进行 DNA 测序, 命名为 PUC19-mEndo。PUC19-mEndo 和 pCA13 应用内切酶 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 电泳回收 mEndo 片段和线性化的腺病毒载体 pCA13(缺失 764~788 bp), 进行连接, 酶切及 PCR 鉴定正确者命名为 pCA13-mEndo。

1.3 腺病毒 Ad-mE 的重组及鉴定

将质粒 pCA13-mEndo 与含有 5 型腺病毒右臂的质粒 pBGHE3(包含除了 5 型腺病毒 188~1339 bp 以外的整个 5 型腺病毒基因)通过 Lipofectamine2000(GIBCO BRL 公司)共转染至 293 细胞, 通过两质粒间的同源重组, mEndo 被插入到腺病毒基因组的 E1 区。转染后 9~14 d 出现病毒空斑, 经过 3 次病毒空斑纯化, 应用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 提取腺病毒 DNA(其具体方法参见 QIAGEN 公司操作说明), 应用引物 P1 和 P2 进行 PCR 鉴定。该腺病毒命名为 Ad-mE, 即携带 mEndo 基因的非增殖型腺病毒。

1.4 重组腺病毒的扩增、纯化及滴度测定

腺病毒的扩增及纯化采用 293 细胞及氯化铯纯化常规方法, 病毒滴度测定采用 Qbiogene 公司的 TCID50

法。

1.5 重组腺病毒感染细胞表达 mEndo 的鉴定

RT-PCR: 从 mRNA 水平检测 mEndostatin 的表达。利用 TRIzol 试剂(GibcoBRL 公司), 按操作说明, 分别从感染 Ad-mE 和 Ad-LacZ 的人胃癌细胞株 SGC-7901 提取总 RNA, 用 TaKaLa 公司的 One Step RNA PCR 试剂盒完成 RT-PCR 反应, 引物为 P1 和 P2, 质粒 pCA13-mEndo 为阳性对照。

Western blot 印迹杂交: 从蛋白质水平检测 mEndostatin 的表达。I 抗为 1:1000 稀释的大鼠抗小鼠 mEndostatin 单克隆抗体, II 抗为 1:1000 稀释的 HRP 标记的羊抗大鼠 IgG 多克隆抗体, 二者均购于美国 R&D Systems 公司。以 Ad-mE 和 Ad-LacZ 分别感染人胃癌细胞株 SGC-7901, 48 h 后收上清。SDS-PAGE 电泳、电转移、斑点杂交及显影采用常规方法。

1.6 检测细胞表达蛋白活性

鸡胚绒毛尿囊膜实验(CAM)。7 d 胚龄受精罗曼褐种鸡蛋, 生化孵箱孵育 1 d, 小心剥开气室处蛋壳约 1 cm², 剪去壳膜, 加样器针头刺破尿囊膜(须保持尿囊膜完整), 在尿囊膜上靠近血管丰富的一侧注入 100 μl Ad-mE 病毒感染后的细胞培养液, 空白对照组加入 100 μl 生理盐水, 阳性对照组加入 100 μl 浓度为 20 μg/100 μl 的小鼠内皮抑素。用无菌胶膜覆盖气室。在生化孵箱孵育 3 d 后, 气室内加入固定液(甲醇:丙酮为 1:1)3 ml, 固定 15 min。剪下气室处壳膜及深面粘附的尿囊膜, 生理盐水漂洗后置于小培养皿, 相差倒置显微镜观察小血管形成情况。

1.7 Ad-mE 对荷 SGC-7901 细胞实体瘤裸鼠的治疗

于裸鼠右背部皮下接种 5×10^{10} /ml 对数生长期 SGC-7901 细胞 0.1 ml/只, 待 4 d 后皮下长出 5~7 mm 直径肿瘤以后, 随机分为对照组 A、B 和治疗组共 3 组, 每组 11 只。Ad-mE 治疗组的裸鼠隔天瘤内多点注射 Ad-mE 病毒纯化液 2×10^8 PFU, 共 5 次; 对照组 A 注射等剂量的 Ad-LacZ 病毒纯化液; 对照组 B 注射等体积的病毒保存液(Ad-buffer)。各组治疗动物分别于注射当天及注射后 3, 7, 14, 21, 28 d 用游标卡尺测量肿瘤大小, 计算肿瘤体积及抑瘤率。肿瘤体积计算按公式: 肿瘤体积(mm³) = $a \times b^2 / 2$ (a, b 为肿瘤的最大径和最小径), 抑瘤率(%) = $(1 - \text{治疗组体积} / \text{对照组 B 体积}) \times 100\%$ 。应用 SPSS11.0 统计软件, 进行 t 检验。

2 结果

2.1 基因-病毒载体 Ad-mE 的构建、重组及鉴定

PUC19-mEndo 中的 mEndo 片段测序结果与已知序列完全一致; 插入到 pCA13 后, 经酶切及 PCR 鉴定

正确的阳性克隆命名为 pCA13-mEndo。pCA13-mEndo 与腺病毒右臂的质粒 pBGHE3 在 293 细胞中进行同源重组,9 ~ 14 d 可见明显病毒空斑,进行 PCR 鉴定正确,腺病毒命名为 Ad-mE。Ad-mE 经氯化铯密度梯度离心纯化,病毒滴度达 2.5×10^{10} PFU/ml。

2.2 SGC-7901 细胞上清中 mEndo 的检测

RT-PCR: 分别抽提 SGC-7901(Ad-mE)和 SGC-7901(Ad-LacZ)2 组细胞的总 RNA,进行 RT-PCR。从 SGC-7901(Ad-mE)扩增的 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,可见一条 500 bp 的特异性条带,与 PCA13-mEndo 质粒扩增大小一致,说明 mEndo 基因在此细胞株中有表达,而 SGC-7901(Ad-LacZ)未扩出条带(图 1)。

图 1 RT-PCR 检测 mEndo 基因的表达

Fig. 1 Transcription of mEndo gene tested by RT-PCR
 M: λ DNA/EcoR I + Hind III Marker; 1: ddH₂O(control);
 2: SGC-7901 transfected with Ad-LacZ; 3: PCA13-mEndo plasmid; 4: SGC-7901 transfected with Ad-mE

Western blot 结果显示:在 Ad-mE 感染 SGC-7901 细胞的上清中可检测到 20 kD 大小的内皮抑素蛋白杂交带,表明在细胞培养液中有内皮抑素蛋白的表达;对照 Ad-LacZ 感染后无阳性条带(图 2)。

图 2 mEndo 蛋白的 Western blot 分析

Fig. 2 Western blot analysis of the mEndostatin protein

1: mEndostatin standard protein(control);
 2: SGC-7901 infected with Ad-LacZ;
 3: SGC-7901 infected with Ad-mE

2.3 鸡胚绒毛尿囊膜检测(CAM)实验

生理盐水处理的尿囊膜中,血管纹理清晰,结构完整,呈叶脉状;内皮抑素处理的尿囊膜中,显微镜下发现小血管明显扭曲、变形,血管纹理杂乱无序,主干末梢中断,可见大片的无血管区;Ad-mE 感染后的胃癌细胞培养液上清处理组,尿囊膜中血管密度明显降低,可见血管稀疏区,结构紊乱,小血管扭曲、变形,且无新生血管形成(图 3)。

图 3 鸡胚绒毛膜尿囊膜检测实验(CAM)

Fig. 3 Chicken chorio-allantoic assay

A: Treated with Ad-mE; B: Treated with Saline (negative control); C: Treat with endostatin protein (positive control)

2.4 动物实验结果

裸鼠瘤细胞皮下注射后 4 ~ 5 d,可观察到约 5 ~ 7 mm 大小皮下肿瘤结节,成瘤率为 100%。随后观察到两组对照组裸鼠瘤体均呈进行性增大,而经携带内皮抑素基因的腺病毒治疗后,肿瘤生长抑制明显,瘤体增

长速度减缓(表 1 及图 4)。用方差分析比较不同时间各组裸鼠瘤体大小,组间有显著性差异($P < 0.05$)(以上数据经过正态性检验及方差齐性检验)。

至第 7 天开始,治疗组肿瘤体积明显小于对照组($P < 0.05$),其抑瘤率为 34.6%。

表 1 治疗组和对照组不同时间肿瘤体积比较(mm³)

Tab. 1 The tumor volumes of mice in the therapeutic groups compared with the control groups in different duration

Groups	0 d	3 d	7d	14 d	21 d	28 d
Ad-mE *	376.0163	502.4698	702.0271	842.6532	1028.9830	1402.8250
A(Ad-LacZ) **	370.0161	514.7121	1130.4460	1370.4452	1470.3241	2000.6780
B(Ad-buffer) **	375.0430	526.0097	1127.9570	1427.6310	1539.5490	2145.8820

* : Therapeutic group; ** : Control groups

图 4 Ad-mE 对裸鼠成瘤体积的影响

Fig. 4 The Antitumor Efficacy of Ad-mE on tumor-bearing mice

3 讨论

内皮抑素是迄今为止动物实验中抗新生血管生成最有效的抑制剂之一,其本身不是细胞所表达和分泌的,而是肿瘤细胞内或基质内的组织蛋白酶和金属蛋白酶水解内源性 XVIII 型胶原蛋白 C 末端的降解产物^[3],不具有免疫原性。它通过抑制内皮细胞迁移和增生,拮抗肿瘤的新生血管生成,从而阻断肿瘤的血供,“饥饿”的肿瘤生长受到抑制,进入“休眠状态”并诱导凋亡^[4]。在荷瘤鼠体内开展的内皮抑素研究表明,内皮抑素的抗肿瘤效果具有高效性、无毒副作用和无耐药性^[1],但必须进行长期应用,一旦停药肿瘤又会迅速增长,而且人体用量要比动物实验大得多,大量制备具有一定难度,使得治疗费用昂贵,限制了临床的推广^[5]。

基因治疗则可克服上述问题。利用腺病毒载体系统将内皮抑素转入瘤细胞,使其高效表达,不仅降低了治疗成本,而且局部药物浓度高,增强了药物疗效。本实验选择小鼠的内皮抑素基因作为治疗基因,将内皮

抑素与信号肽融合起来,以引导 mEndo 的出胞,提高其分泌水平^[6]。将其克隆入增殖缺陷型腺病毒中,经同源重组得到了具有感染活力的复制缺陷型腺病毒 Ad-mE。感染了 Ad-mE 的胃癌 SGC-7901 细胞及上清分别通过 RT-PCR, Western blot 检测到 mEndo 蛋白的表达。CMV 和动物实验方法证实, mEndo 可抑制血管生长,肿瘤增长缓慢。

就目前水平来说,单独应用内皮抑素不足以治愈肿瘤,但由于其作用靶点在肿瘤组织的新生血管的内皮细胞,与放、化疗的作用机理不同,对提高化疗、放疗的敏感性、减少肿瘤的复发和转移起促进作用,故其在肿瘤的综合治疗中占有举足轻重的地位。目前内皮抑素已进入 II 期临床验证阶段,而和其它传统抗肿瘤方法的协同治疗也已成为肿瘤研究的热点。

致谢 上海新霖生物科技有限公司提供腺病毒重组技术

[参考文献]

- [1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.
- [2] O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, *et al.* Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice [J]. *Nat Med*, 1996, 2(6): 689-692.
- [3] Zatterstrom UK, Felbor U, Fukai N, *et al.* Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis [J]. *Cell Struct Funct*, 2000, 25(2): 97-101.
- [4] Boehm T, Folkman J, Browder T, *et al.* Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [J]. *Nature*, 1997, 390(6658): 404-407.
- [5] Kong HL, Hecht D, Song W, *et al.* Regional suppression of tumor growth by *in vivo* transfer of a cDNA encoding a secreted form of the extracellular domain of the flt-1 vascular endothelial growth factor receptor [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(6): 823-833.
- [6] Cao Y. Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer [J]. *Haematologica*, 1999, 84(7): 643-650.

[收稿日期] 2003 - 06 - 20

[修回日期] 2003 - 08 - 20