

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0111-05

多聚乙烯基亚胺介导的 pOSP1-HSVtk 基因对卵巢癌的抗瘤研究

金平¹, 孔北华¹, 邱健², 路慧丽², 徐宇虹²(1. 山东大学齐鲁医院妇产科, 济南 250012; 2. 上海交通大学药学院, 上海 200030)

[摘要] **目的:** 研究多聚乙烯基亚胺(PEI)介导的卵巢特异性启动子调控下的自杀基因对卵巢癌的抗肿瘤作用。**方法:** (1)将卵巢特异性启动子调控下的真核表达质粒 pOSP1-HSVtk 利用 PEI 导入人卵巢癌细胞 SKOV3, 人肺癌细胞 NCI-H460 和人肝癌细胞 HepG2, MTT 法测定 GCV 对三种肿瘤细胞的杀伤作用;(2)建立卵巢癌移植瘤模型, 瘤周注射 PEI/pOSP1-HSVtk 复合物, 通过 HPLC 监测体内 GCV 浓度的变化来评价 TK 基因在肿瘤组织中的表达效率;同时记录裸鼠的体重、瘤体大小及瘤重, 计算体积和重量抑瘤率, 并进行肿瘤组织的病理学和 TUNEL 检测。**结果:** (1)GCV 仅对 SKOV3 细胞具有杀伤作用;(2)与对照组相比, GCV 的浓度在转染 pOSP1-HSVtk 的肿瘤组织局部显著降低 ($0.05 > P > 0.01$);治疗组的肿瘤体积和瘤重显著减小 ($P < 0.01$), 体积抑瘤率与重量抑瘤率分别为 63.66% 和 58.98%。组织学示治疗组肿瘤细胞有出血及坏死, TUNEL 证实了细胞的凋亡。**结论:** 多聚乙烯基亚胺介导的卵巢特异性启动子调控下的自杀基因对卵巢癌有靶向杀伤作用。

[关键词] 聚乙烯基亚胺; 自杀基因; 卵巢癌; 基因治疗

[中图分类号] R731.31 [文献标识码] A

Anti-Tumor Study of pOSP1-HSVtk Gene Therapy by Polyethylenimine Mediated Transfection in Ovarian Cancer

JIN Ping¹, KONG Bei-hua¹, QIU Jian², LU Hui-li², XU Yu-hong²(1. Department of Gynecology and Obstetrics, Qilu Hospital of Shandong University, Ji'nan 250012, China; 2. School of Pharmacy of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor effects of suicide gene therapy using an ovarian-specific promoter and polyethylenimine(PEI) mediated transfection. **Methods:** (1) The pOSP1-HSVtk plasmids containing an ovarian-specific promoter were transfected using PEI into the Human ovarian carcinoma cell SKOV3, Human lung carcinoma cell NCI-H460 and Human hepatocellular carcinoma cell HepG2. The cytotoxicities resulted from GCV were evaluated using the MTT assay. (2) Ovarian cancer xenograft model was established and the PEI/pOSP1-HSVtk complex were injected around the xenograft. The expressed TK activities were estimated by monitoring the GCV concentration change using a HPLC assay. The weight of the nude mice, the tumor volumes and tumor weights were all recorded to calculate the tumor inhibition rates by weight and by volume. Histopathological analysis and TUNEL method were also performed. **Results:** (1) GCV was shown to be toxicity only in SKOV3 cells. (2) Compared with the control group, GCV concentrations in tumor tissues transfected pOSP1-HSVtk were shown to be significantly lower ($0.05 > P > 0.01$). The tumor volume and the tumor weight were also significantly decreased in the treated group ($P < 0.01$). The tumor volume inhibition rate and the tumor weight inhibition rate were estimated to be 63.66% and 58.98% respectively. Histological examination revealed heavy haemorrhage and necrosis in the tumor tissues, and TUNEL confirmed substantial cell apoptosis in the treated group. **Conclusion:** The suicide gene therapy system using an ovarian-specific promoter by polyethylenimine mediated transfection has a targeting killing activity on human ovarian cancer.

[Key words] polyethylenimine; suicide gene; ovarian cancer; gene therapy

卵巢恶性肿瘤是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一, 超过 70% 的患者就诊时已为临床晚期, 美国晚期卵巢癌的 5 年生存率仅为 15% ~ 30%^[1]。目前基因治疗已成为肿瘤研究领域的热点, 自杀基因是国内外研

[作者简介] 金平(1968-), 河北人, 女, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤方面的研究

[通讯作者] 孔北华 E-mail: kongbeihua@yahoo.com.cn
徐宇虹 E-mail: yhxu@situ.edu.cn

究较多的方法之一^[2],具有潜在的临床应用前景和价值,有望成为临床治疗恶性肿瘤的新型模式。近年来一种新的多聚阳离子化合物——多聚乙烯基亚胺(polyethylenimine, PEI)为基因转移提供了一条有效的新技术途径。而卵巢特异性启动子 OSP-1 调控下的自杀基因 HSVtk 专一的作用于卵巢癌,实现了基因治疗的组织特异性。本研究将有效的 PEI 新型载体与专一的组织特异性启动子调控下的自杀基因相结合,探讨其对卵巢癌的抗癌效应。

1 材料与方 法

1.1 质粒与载体

卵巢特异性的启动子 OSP-1 调控下的自杀基因 pOSP1-HSVtk 由美国卵巢癌研究中心 Hamilton 教授惠赠。PEI 载体由上海交通大学药学院分子药剂学实验室研制。

1.2 细胞与试剂

人卵巢癌细胞株 SKOV3 来源于上海肿瘤研究所;人肺癌细胞株 NCI-H460 和人肝癌细胞株 HepG2 来源于上海交通大学药学院分子药剂学实验室;限制性核酸内切酶为 TaKaRa 公司产品;胎牛血清、DMEM 和 RPMI-1640 细胞培养基为 Gibco 公司产品;GCV 为 Sigma 公司产品;质粒提取试剂盒为北京博大泰克基因公司产品;原位细胞凋亡检测试剂盒为华美生物工程公司产品。Balb/c 裸鼠由中国科学院上海实验动物中心提供,6~8 周龄,雌性,体重 14.0~15.8 g,在 SPF 环境下饲养。

1.3 质粒的提取与酶切鉴定

按照碱裂解法常规提取质粒 pOSP1-HSVtk,由 EcoR I 酶切鉴定,紫外分光光度计测量其 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0,计算其浓度。

1.4 PEI 介导 pOSP1-HSVtk 转染 3 种不同肿瘤细胞后 GCV 作用的检测

SKOV3, NCI-H460 细胞常规培养在 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, HepG2 细胞常规培养在 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。将 SKOV3, HepG2, NCI-H460 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,吹打成单细胞悬液,计数细胞并调节细胞悬液的浓度为 1.0×10^4 /ml,接种于 96 孔板。37℃, 5% CO₂ 培养箱孵育 24 h 后,用新鲜的含血清培养基给细胞换液。PEI 载体与 pOSP1-HSVtk 按 5:1 的质量比混合,室温放置 10 min 后等量加入每孔,每孔 pOSP1-HSVtk 剂量为 0.6 μg。转染液孵育 4 h 后更换为新鲜的培养基,次日分别加入不同浓度的 GCV (0, 0.1, 1, 10, 50, 100, 1000 μg/ml),设 4 个复孔,继续孵育 72 h,根据常规 MTT

法,测量各孔 570 nm 波长的吸光度(A)值,然后根据下列公式计算不同 GCV 浓度下的细胞杀伤率:细胞杀伤率(%) = $A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}} \times 100\%$

1.5 人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤模型的抑癌效果

将 SKOV3 细胞消化,吹打成单细胞悬液,1 000 r/min,离心 4 min, PBS 洗涤 2 次,调节细胞浓度为 2×10^7 /ml,于每只 Balb/c 裸鼠的背部皮下接种 0.2 ml,建立卵巢癌皮下移植瘤模型。接种裸鼠全部成瘤,第 6 天接种部位可见平均直径约 3 mm 的瘤体。随机分为 4 组,每组 6 只。①空白对照组:皮下种瘤后不进行干预;②生理盐水(NS) + GCV 对照组:瘤周注射 NS,腹腔注射 GCV;③PEI/pOSP1-HSVtk + NS 对照组:瘤周注射 PEI/pOSP1-HSVtk,腹腔注射 NS;④PEI/pOSP1-HSVtk + GCV 治疗组:瘤周注射 PEI/pOSP1-HSVtk,腹腔注射 GCV。PEI 载体与 pOSP1-HSVtk 质粒均按 5:1 的质量比混合,室温放置 10 min 后瘤周注射。治疗周期为 12 d,第 1,4,8 天注射 PEI/基因复合物,每次 pOSP1-HSVtk 导入剂量为每只 50 μg。从第 2 天(基因导入后 24 h)起每天 1 次腹腔内注射 GCV 或 NS 0.3 ml, GCV 按每只裸鼠 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量给药,持续 12 d。给药期间观察裸鼠的一般状况和肿瘤的生长,隔日测量体重及肿瘤的最长径(L)和最短径(W),按下列公式计算肿瘤体积 $V = LW^2 \times 0.5$ 。12 d 治疗结束后再观察 5 d,处死裸鼠,剥离瘤体并称重。按下列公式计算肿瘤重量抑制率和肿瘤体积抑制率。肿瘤重量抑制率(%) = $(\text{空白对照组平均瘤重} - \text{治疗组平均瘤重}) / \text{空白对照组平均瘤重} \times 100\%$ 。肿瘤体积抑制率计算同肿瘤重量抑制率。

1.6 高效液相色谱法(HPLC)检测 GCV 在体内的转化

取体重基本相同($20.76 \pm 0.6 \text{ g}$)且已建立人卵巢癌皮下移植瘤的裸鼠 6 只,待瘤体平均直径约为 10 mm 时,随机分为①治疗组:瘤周注射 PEI/pOSP1-HSVtk,腹腔注射 GCV;②对照组:瘤周注射 PEI/对照质粒,腹腔注射 GCV。pOSP1-HSVtk 导入剂量为 50 μg/只,24 h 后开始腹腔注射 GCV($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),连续 2 d。第 2 天在 GCV 给药后 2 h,先取动物眼眶血 0.5 ml,抗凝处理,离心取上清,加入 65% 的三氯乙酸沉淀蛋白,离心,取 100 μl 上清进行 HPLC 检测血液中 GCV 的浓度。随即处死动物剥离肿瘤组织,称重每只约 $300 \pm 10.2 \text{ mg}$,匀浆破碎组织,加入 PBS 缓冲液至 1 ml,12 000 r/min,4℃,离心 10 min 后取上清,其余步骤同前,检测肿瘤组织中 GCV 的浓度。具体 HPLC 条件为:色谱柱 C18,150 mm × 4.6 mm;柱温 25℃;检测波长 254

nm; 流动相 0.01 mol/L, pH3.0 的磷酸二氢钠缓冲液和甲醇体系(97:3); 流速 1 ml/min。

1.7 肿瘤组织的病理学和 TUNEL 检测

于治疗周期结束当日(第 12 天)每组处死一只动物, 剥离肿瘤组织, 冰冻切片, 5 μl 厚, 取切片分别行 HE 染色和 TUNEL 检测。TUNEL 检测按原位凋亡检测试剂盒说明书操作。光镜下凋亡细胞核呈棕黄色, 阴性细胞核呈蓝色。

1.8 毒性实验

治疗结束处死裸鼠后, 对注射 PEI/基因复合物的裸鼠进行大体解剖, 并取腹腔内各脏器进行组织学检查, 观察 PEI/自杀基因治疗系统对全身的毒副作用。

1.9 统计学分析

结果以均数 ± 标准差表示, 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 GCV 对转染 pOSP1-HSVtk 的 3 种不同肿瘤细胞的杀伤作用

在 PEI/pOSP1-HSVtk 的用量一致, 接种细胞的密度相同以及 PEI/pOSP1-HSVtk 与 3 种细胞孵育时间均为 4 h 等相同条件下, GCV 对不同组织来源的细胞产生不同的杀伤效应。GCV 仅对 SKOV3 细胞具有明显的杀伤作用, 且与 GCV 的剂量相关。而对人肺癌细胞 NCI-H460 和人肝癌细胞 HepG2 没有明显的杀伤作用(图 1)。

图 1 GCV 对转染 PEI/pOSP1-HSVtk 3 种肿瘤细胞的毒性作用
Fig. 1 The cytotoxicity resulted from GCV for three kinds of tumor cells transfected by PEI/pOSP1-HSVtk

2.2 PEI/pOSP1-HSVtk 对卵巢癌移植瘤模型的药效观察

如图(2)所示, 给药期间各个对照组的肿瘤体积均呈较快增长趋势, 而治疗组的肿瘤生长受到明显抑制, 停止给药后治疗组的肿瘤又逐渐恢复生长。

治疗结束后肿瘤组织的平均体积(mm³)和重

量(mg)如表(1)所示, 与各对照组相比, 治疗组的肿瘤体积和瘤重明显较小, 有显著的统计学差异。肿瘤体积抑制率和肿瘤重量抑制率分别为 63.66%, 58.98%。

图 2 不同治疗时间各组肿瘤体积的比较
Fig. 2 Comparison of tumor volume of the different groups in different treatment time

表 1 治疗结束后裸鼠肿瘤体积和瘤重的比较
Tab. 1 Tumor mass volume and weight after the treatment

Groups	Tumor volume (mm ³)	Tumor weight (mg)
Control	164.12 ± 12.23	322.76 ± 23.39
NS + GCV	175.35 ± 10.39*	350.8 ± 31.68**
PEI/pOSP1-HSVtk + NS	169.80 ± 6.13#	341.32 ± 19.73##
PEI/pOSP1-HSV + GCV	59.64 ± 6.43▲	132.4 ± 6.72▲▲

* Compared with control group *P* > 0.05; ** Compared with control group *P* > 0.05

Compared with control group *P* > 0.05; ## Compared with control group *P* > 0.05

▲ Compared with each other *P* < 0.01; ▲▲ Compared with each other *P* < 0.01

2.3 HPLC 表征 GCV 的体内转化

根据 GCV 在裸鼠 SKOV3 皮下移植瘤组织和血液中的浓度曲线, 在选定色谱条件下, GCV 峰的保留时间约为 6.607 min, 以该峰面积(*Y*)对其浓度(*X*)进行线性回归, 得肿瘤组织中的回归方程: *Y* = 322.43*X* + 13.162, 线形拟和 *r* = 0.9995; 血液中的回归方程: *Y* = 290.16*X* - 11.142, 线形拟和 *r* = 0.9996。取实验组在相同位置的样品峰, 峰形类似(图 3), 计算峰面积并换算其浓度。结果: 转染 pOSP1-HSVtk 的治疗组肿瘤组织中的 GCV 含量(1.40 ± 1.02 μg/ml)明显低于对照组(7.08 ±

2.14 μg/ml),约为对照组的 20%,统计学分析有显著性差异(0.05 > P > 0.01)。而血液中治疗组(5.79 ± 2.78 μg/ml)和对照组(6.13 ± 2.57 μg/ml)的 GCV 含量基本相同。

图3 卵巢癌移植瘤中的 GCV 色谱图

Fig.3 Chromatograms of GCV in ovarian carcinoma xenografts

A: Stadar sample of GCV; B: GCV curve in the treated group

2.4 治疗后肿瘤组织的病理学和 TUNEL 检测

HE 染色对照组和治疗组均可见肿瘤细胞核大、深染,核质比大并有核分裂相。治疗组出现灶性出血、坏死,有少量炎性细胞浸润(图4)。

图4 裸鼠肿瘤组织病理学观察 HE 染色(×100)

Fig.4 Pathological observation of tumor tissue in the nude mice stained with hematoxylin and eosin(×100)

A: Treated group; B: Control group

TUNEL 检测显示治疗组有大量凋亡细胞,核呈棕

黄色染色,染色质分布不均,染色深浅不一(图5)。而对照组均未见凋亡细胞。

2.5 PEI/自杀基因治疗系统对裸鼠的毒副作用

在治疗过程中密切观察各组裸鼠的体重变化,各组的体重无统计学差异。治疗结束后取注射 PEI/基因复合物的裸鼠腹腔内各脏器(肝、肾、脾、胰、心、肺等)进行组织学检查,均未发现明显的肉眼和镜下病理改变。

图5 治疗组的肿瘤细胞 TUNEL 检测(×400)

Fig.5 The result of TUNEL assay of tumor cells in the treated group(×400)

3 讨论

目前用于基因治疗的载体主要有病毒载体和非病毒载体,非病毒载体由于其操作简单、安全、免疫原性低及目的基因容量大等优点近年来倍受人们关注。1995 年 Boussif 等^[3]首次报道了 PEI 作为非病毒载体可以有效地将 DNA 转移到神经元细胞,此后 PEI 成为研究最为活跃的一个多聚阳离子 DNA 载体。PEI 的最大特点是在 pH4 左右有较强的缓冲能力,PEI/DNA 复合物内吞进入溶酶体后能够避免外源 DNA 在酸性条件下被降解,使 DNA 逃脱溶酶体的机率得以增加,从而提高了表达效率。外源基因导入肿瘤细胞的效率与肿瘤细胞的类型、PEI 的结构、形状以及 PEI/DNA 的质量比等因素有关^[4]。为了解 SKOV3 细胞对 PEI 转染的敏感性并优化转导条件,我们曾将荧光素酶报告基因分别利用 PEI 和脂质体 DOTAP 转染 SKOV3 细胞,通过对荧光素酶活性的检测发现 PEI 对 SKOV3 细胞的转染效率比 DOTAP 明显增高。并且通过反复摸索实验发现,我们使用的 PEI 载体在含有血清的培养基中孵育比无血清的培养基孵育转染效率更高,这种不受血清影响的转染方法更接近于体内微环境,适用于体内转染。与传统的脂质体相比,PEI 载体有较高的转染效率和较低的细胞毒性^[5]。在实验中我们使用的 PEI/DNA 多聚复合物粒径为 80 ~ 100

nm, PEI 与 DNA 的质量比为 5:1。本动物实验显示,通过瘤周注射 PEI/DNA 复合物,可以将基因有效地导入肿瘤细胞。其中治疗基因 TK 的表达效率虽然由于缺乏检测手段不能直接表征,我们通过 HPLC 测量 GCV 在肿瘤组织中的浓度变化,在给予 GCV 总量相同、治疗时间相同的情况下治疗组肿瘤组织局部的 GCV 浓度明显低于对照组,间接地说明了 TK 在肿瘤组织中能够有效表达, GCV 在 TK 的作用下得以有效转化。而对照组的肿瘤组织由于没有转染 pOSP1-HSVtk,其 GCV 维持在较高的水平。所以, PEI 载体可以较为有效地介导体内肿瘤细胞的基因导入,是肿瘤基因治疗的一个有效工具。

同时,我们也在特定的动物实验中研究了应用 HSV-tk/GCV 自杀基因系统治疗卵巢癌的效果。HSV-tk/GCV 被认为是最具有临床应用前景的基因疗法之一,应用腺病毒载体 Ad-HSVtk 治疗卵巢癌的方案目前已进入临床试验阶段^[6]。通过转染肿瘤细胞使 tk 基因在肿瘤细胞中表达,可以使无毒性的前体药物 GCV 转化为有细胞毒性的磷酸化的 GCV 产物,抑制 DNA 聚合酶活性,阻止 DNA 的合成,从而杀灭肿瘤细胞。但如何实现针对肿瘤细胞的特异性转染和表达机制,既起到治疗目的,又避免对正常组织的损害,是基因治疗的另一个关键。

近年来人们在基因靶向导入方面进行了大量的努力,除了研制具有靶向作用的基因导入载体外,组织或细胞特异性启动子调控外源基因表达的思路也受到了极大的重视^[7]。有一系列的组织特异性转录因子被报道,如肝癌中的 AFP 启动子、乳腺癌中的 hALA(human alpha-lactalbumin)启动子以及前列腺癌中的 PSA(prostate specific antigen)启动子^[8]等。OSP1(ovarian-specific promoter-1)是 Selvakumaran 等^[9]从小鼠卵巢中提取的 462 bp 的卵巢特异性启动子,可以激活正常卵巢细胞、卵巢癌细胞的基因表达。pOSP1-HSVtk 使自杀基因 TK 处于 OSP1 启动子的转录调控之下有选择的表达,以此增强自杀基因在卵巢组织肿瘤细胞中表达的特异性,降低对其他组织的毒性。在我们的体外实验中, GCV 仅对 SKOV3 细胞表现出较强的杀伤作用,而在 NCI-H460 和 HepG2 细胞中未能产生毒性。这是由于 GCV 只有在 tk 基因有效表达的 SKOV3 细胞

中才能转化为有毒性的 GCV 产物,从而发挥细胞毒作用。说明 pOSP1-HSVtk 仅在卵巢癌细胞特异地表达,在非卵巢细胞不表达,有较明确的组织特异性。而在动物实验中,转染了 pOSP1-HSVtk 质粒的卵巢癌移植瘤,在 GCV 的作用下被明显抑制生长。TUNEL 的检测进一步表明了 GCV 转化产物的细胞毒性作用,确实导致了卵巢癌细胞的大量凋亡。

通过研究,我们相信应用 PEI 载体结合组织特异性的 pOSP1-HSVtk 基因表达机制,具有组织专一性以及较强的自杀基因治疗效果。体内治疗相对安全,而且有效,为卵巢癌基因治疗的临床应用提供了一种可能性。

[参考文献]

- [1] Casado E, Nettelbeck DM, Gomez-Navarro J, *et al.* Transcriptional targeting for ovarian cancer gene therapy[J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 82(2): 229-237.
- [2] 贾雪梅. 卵巢癌的自杀基因治疗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, 10(3): 216-218.
- [3] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(16): 7297-7301.
- [4] Choosakoonkriang S, Lobo BA, Koe GS, *et al.* Biophysical characterization of PEI/DNA complexes[J]. *J Pharm Sci*, 2003, 92(8): 1710-1722.
- [5] Forrest ML, Koerber JT, Pack DW. A degradable polyethylenimine derivative with low toxicity for highly efficient gene delivery [J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14(5): 934-940.
- [6] Alvarez RD, Gomez-Navarro J, Wang M, *et al.* Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer[J]. *Mol Ther*, 2000, 2(5): 524-530.
- [7] Kircheis R, Wightman L, Wagner E. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 53(3): 341-358.
- [8] Lee SJ, Kim HS, Yu R, *et al.* Novel prostate-specific promoter derived from PSA and PSMA enhancers[J]. *Mol Ther*, 2002, 6(3): 415-421.
- [9] Selvakumaran M, Bao R, Crijns AP, *et al.* Ovarian epithelial cell lineage-specific gene expression using the promoter of a retrovirus-like element[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1291-1295.

[收稿日期] 2004-11-08

[修回日期] 2005-01-10

[本文编辑] 韩丹