

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.012

· 基础研究 ·

Apoptin 对肝癌细胞的体内、外抑制效应

刘立明^{1,2}, 金宁一^{1*}, 李霄¹, 田明尧¹, 杨恩成^{1,3,4}, 刘妍^{1,3}, 赵翠青¹, 张金双¹, 钱爱东² (1. 军事医学科学院 全军基因工程实验室, 吉林 长春 130062; 2. 吉林农业大学 动物科学技术学院, 吉林 长春 130118; 3. 吉林大学第一医院, 吉林 长春 130021; 4. 黑龙江省医院消化病院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

[摘要] 目的: 探讨 Apoptin 对人肝癌细胞株 HepG-2 及 C57BL/6 小鼠 H22 移植瘤的抑制作用。方法: 应用脂质体转染法将重组质粒 pVAX1-Apoptin 转染 HepG-2 细胞, 应用 Western blotting 检测 Apoptin 蛋白在转染后 HepG-2 细胞中的表达, 应用 MTT 检测 Apoptin 对 HepG-2 细胞生长的抑制作用, 通过 AO/EB 染色法检测 pVAX1-Apoptin 致肿瘤细胞凋亡作用。建立 C57BL/6 小鼠 H22 荷瘤模型, 瘤内注射 pVAX1-Apoptin, 观察 pVAX1-Apoptin 对体内肿瘤的抑制作用。结果: Apoptin 基因可在 HepG-2 细胞中有效表达, pVAX1-Apoptin 能够诱导 HepG-2 细胞凋亡, 并显著地抑制其生长, 48 h 抑制率为 69.28%。pVAX1-Apoptin 瘤内注射能够有效抑制移植肿瘤的生长, 抑制率为 46.71%; 治疗后 39 d 小鼠生存率为 40%, 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。结论: Apoptin 转染可抑制 HepG-2 细胞的生长, 重组质粒 pVAX1-Apoptin 瘤内注射对移植肿瘤有显著的抑制作用。

[关键词] 肝肿瘤; Apoptin; H22 荷瘤模型; HepG-2; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0161-04

Anti-tumor effects of Apoptin gene against hepatoma cells *in vivo* and *in vitro*

LIU Li-ming^{1,2}, JIN Ning-yi^{1*}, LI Xiao¹, TIAN Ming-yao¹, YANG En-cheng^{1,3,4}, LIU Yan^{1,3}, ZHAO Cui-qing¹, ZHANG Jin-shuang¹, QIAN Ai-dong^{2*} (1. Key Laboratory of Genetic Engineering of PLA, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, Jilin, China; 2. College of Animal Science and Technology, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, Jilin, China; 3. First Clinical Hospital, Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China; 4. Department of Digestive Diseases, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-tumor effects of Apoptin against human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells and implanted H22 tumors in C57BL/6 mice. **Methods:** C57BL/6 mice were used to establish H22-bearing models. pVAX1-Apoptin was intra-tumorally injected and the inhibition of tumor growth was observed. Recombinant plasmid pVAX1-Apoptin was transfected into HepG-2 cells by Lipofectamine. The expression of Apoptin protein in HepG-2 cells was examined by Western blotting. Anti-tumor effect of pVAX1-Apoptin on HepG-2 cells was measured by MTT assay, and the apoptosis of HepG-2 cells after transfected with pVAX1-Apoptin was observed by AO/EB staining. **Results:** Apoptin gene was effectively expressed in HepG-2 cells after transfection with pVAX1-Apoptin. pVAX1-Apoptin induced apoptosis of HepG-2 cells and inhibited the growth of HepG-2 cells, with the suppression rate being 69.28% at 48 h after transfection. Intra-tumoral injection of pVAX1-Apoptin significantly inhibited tumor growth, with tumor inhibition rate being 46.71% and mice survival rate being 40% at 39 d after injection. **Conclusion:** pVAX1-Apoptin can inhibit the proliferation of HepG-2 cells, and intra-tumoral injection of pVAX1-Apoptin can greatly inhibit tumor growth *in vivo*.

[Key words] liver neoplasms; Apoptin; H22 bearing mice model; HepG-2; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 161-164]

肿瘤基因治疗药物的应用前景已不仅取决于其杀伤肿瘤细胞的有效性, 而更加侧重于制剂的抑瘤特异性^[1]。来源于鸡贫血病毒(chicken anemia virus, CAV)的凋亡素(Apoptin)基因能够特异性诱导肝癌、淋巴瘤、胆管癌、黑素瘤、乳腺癌、肺癌和结肠癌等人源肿瘤细胞发生凋亡, 而对成纤维细胞、角

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(No. 2007AA021004)。Supported by the National High Technology Research and Development Program (863) of China (No. 2007AA021004)

[作者简介] 刘立明(1984-), 男, 吉林通化人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤治疗性基因工程疫苗的研究。E-mail: aliuiliming1984@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: ningyij@yahoo.com.cn

质化细胞和平滑肌细胞等正常细胞没有影响^[2-3]。另外,Apoptin 的凋亡诱导功能不依赖 p53 分子,而且 Bcl-2、BAG-1 和 Bcr-abl 等凋亡抑制分子不仅对 Apoptin 的功能没有影响,反而会增强其作用^[4,5]。因此,与依赖上述途径的传统放化疗相比,存在凋亡基因突变或含有凋亡抑制分子的肿瘤细胞对 Apoptin 仍然敏感。而且 Apoptin 基因较小,可以插入多种载体,具有成为新的肿瘤基因治疗研究靶点的潜力^[6]。本研究以肝癌细胞为对象,探讨了 Apoptin 基因的体内、外抑瘤作用。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

脂质体 Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司, RPMI 1640 培养液、胎牛血清购自 Gibco 公司, MTT 购自 SIGMA 公司。鼠抗 CAV 阳性血清由本室保存,碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 IgG 购自 Santa Cruz 公司, NBT/BCIP 购自 Promega 公司, pVAX1 和 pVAX1-Apoptin 质粒由本室保存^[5]。人肝癌细胞 HepG-2 购自中科院上海生命科学研究院,鼠肝癌细胞 H22 购自吉林大学实验动物中心。荧光显微镜及成像系统为日本 Olympus 产品。6 至 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心,实验动物合格证号为 SCXK-(军)2007-004。

1.2 细胞培养和质粒转染

通过脂质体介导法^[7]将 10 μg 重组质粒 pVAX1-Apoptin 和空载体质粒 pVAX1 分别转染 HepG-2 细胞,同时设空白细胞对照。

1.3 Western blotting 检测转染肿瘤细胞的 Apoptin 蛋白表达

收集质粒转染 48 h 的 HepG-2 细胞,提取总蛋白并定量。取 50 μg 蛋白进行 15% SDS-PAGE 电泳,蛋白移至硝酸纤维素膜。膜经 5% 脱脂乳封闭 2 h 后,先后与鼠抗 CAV 阳性血清和碱性磷酸酶标记羊抗鼠 IgG 于 37 °C 条件下作用 2 h 后,于 NBT/BCIP 溶液中显色。

1.4 MTT 检测转染后肿瘤细胞的存活率

质粒转染的 HepG-2 细胞培养 12、24、48、60 和 72 h 后,于 96 孔细胞培养板中加入 20 μl/孔 MTT (5 mg/ml),置 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 4 h,吸去培养液,加入二甲基亚砜(200 μl/孔),待紫色结晶充分溶解后,于 490 nm 波长检测光密度值(D),通过公式^[8]计算细胞生存率:细胞生存率(%) = 实验孔平均 D 值/对照孔平均 D 值 × 100%。

1.5 AO/EB 染色检测肿瘤细胞凋亡

收集质粒转染 48 h 的 HepG-2 细胞,细胞计数并调整细胞密度至 1 × 10⁶ 个/ml。取上述细胞悬液 25 μl,加入 2 μl AO/EB 溶液(AO 和 EB 的 PBS 溶液,质量浓度均为 100 μg/ml),振荡混匀,取 10 μl 上述细胞悬液置于显微载玻片上,加盖玻片,荧光显微镜下观察细胞形态。

1.6 小鼠荷瘤模型的建立及 pVAX1-Apoptin 治疗实验

建立 C57BL/6 小鼠荷 H22 肝癌移植瘤模型^[8]荷瘤后第 8、15、22 天小鼠分组并进行瘤内注射治疗。分组情况如下:第一组为 pVAX1-Apoptin 治疗组(100 μg/只),第二组为 pVAX1 治疗组(100 μg/只),第三组为生理盐水组(100 μl/只)。每实验组 10 只小鼠,注射剂量为 100 μl/次。首次治疗 39 d 后处死小鼠,并计算抑瘤率和生存率。肿瘤体积 = 0.52 × (肿瘤短径)² × (肿瘤长径)。根据肿瘤体积计算抑瘤率,抑瘤率(%) = (对照组肿瘤体积 - 实验组肿瘤体积)/对照组肿瘤体积 × 100%。

1.7 统计学处理

组间差异统计分析采用双尾 t 检测,生存率分析采用 SPSS10.1 软件分析,P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Apoptin 基因在 HepG-2 细胞中的表达

Western blotting 检测 pVAX1-Apoptin 转染的 HepG-2 细胞裂解物,结果显示在分子质量约 13 000 处有一特异性的蛋白条带(图 1),说明 Apoptin 基因可在 HepG-2 细胞中有效表达。

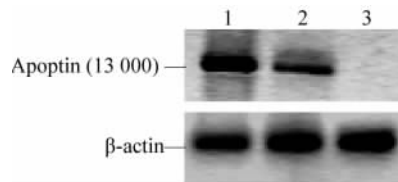


图 1 Western blotting 检测转染后 HepG-2 细胞中 Apoptin 蛋白的表达

Fig. 1 Apoptin expression in transfected HepG-2 cells as detected by Western blotting

1: pVAX1-Apoptin transfected cells; 2: Positive control; 3: Negative control

2.2 pVAX1-Apoptin 对 HepG-2 细胞增殖的抑制

如图 2 所示,重组质粒 pVAX1-Apoptin 对 HepG-2 细胞的增殖具有显著的抑制作用(P < 0.01),转染 48 h 后抑制率为 69.28%。由于脂质体

的细胞毒性作用, pVAX1 转染组在转染后呈现一定杀伤作用, 但随后细胞逐渐恢复旺盛生长。

2.3 pVAX1-Apoptin 转染对 HepG-2 细胞的致凋亡作用

应用 AO/EB 染色法鉴定细胞状态时, 正常细胞的细胞膜完整, AO/EB 染色呈现均匀的绿色荧光(图 3A); pVAX1 转染的 HepG-2 细胞因胞膜遭到破坏, AO/EB 染色后呈现桔红色的坏死形态(图 3B); pVAX1-Apoptin 转染的 HepG-2 细胞发生凋亡, 其膜完整性遭到破坏, 染色质凝聚, 细胞膜被 AO 染色呈现绿色荧光的同时, 核酸被 EB 染色呈现桔红色荧光, 表现出凋亡特征(图 3C)。

2.4 pVAX1-Apoptin 抑制荷瘤小鼠移植瘤的生长

pVAX1-Apoptin 治疗组肿瘤体积小于生理盐水治疗组和 pVAX1 治疗组。以最后一次测量的肿瘤

体积计算各组抑瘤率, pVAX1-Apoptin 治疗组的抑瘤率为 46.71%, 与生理盐水治疗组相比, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

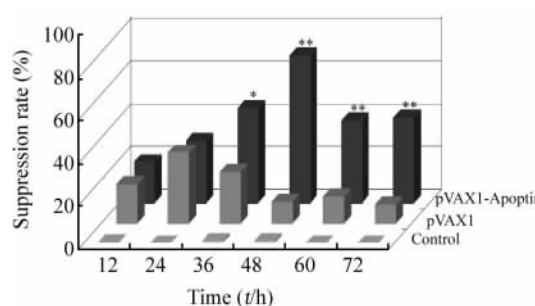


图 2 pVAX1-Apoptin 对 HepG-2 细胞增殖的抑制(× 100)
Fig. 2 pVAX1-Apoptin inhibited proliferation of HepG-2 cells(× 100)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pVAX1 or control

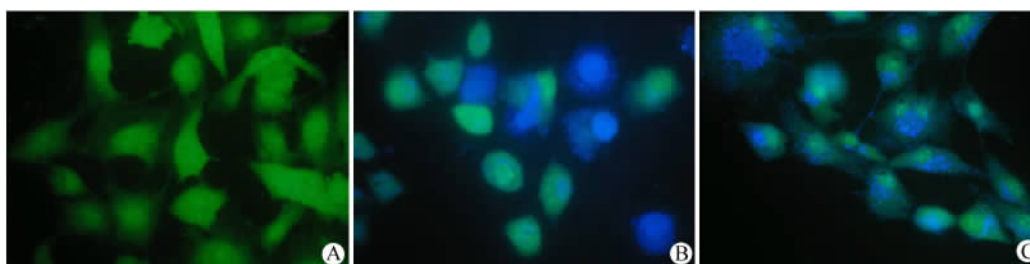


图 3 pVAX1-Apoptin 对 HepG-2 细胞的致凋亡作用(× 100)

Fig. 3 pVAX1-Apoptin induced apoptosis of HepG-2 cells(× 100)

A: Negative control; B: pVAX1-Apoptin transfected cells; C: pVAX1 transfected cells

2.5 pVAX1-Apoptin 延长荷瘤小鼠的生存期

如图 4 所示, 首次治疗后 39 d, 生理盐水治疗组荷瘤小鼠全部死亡, pVAX1 治疗组荷瘤小鼠生存率仅为 20%, 而 pVAX1-Apoptin 治疗组荷瘤小鼠生存率为 40%。结果表明, pVAX1-Apoptin 可延长荷瘤小鼠生存期($P < 0.05$)。

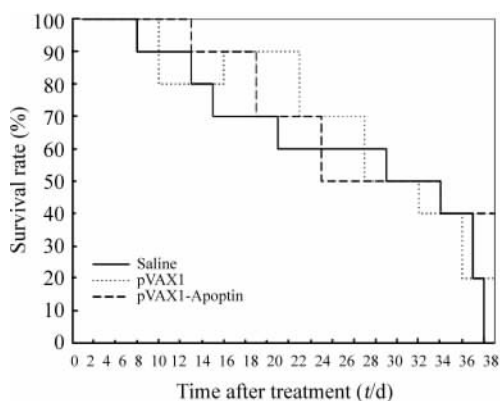


图 4 pVAX1-Apoptin 治疗后荷瘤小鼠的生存曲线

Fig. 4 Survival curves of mice after pVAX1-Apoptin treatment

3 讨论

肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 总体疗效差、病死率高^[9]。据世界卫生组织统计, 全球每年新发肝癌病例 100 万至 150 万例, 其中 42.5% 发生在我国。近 20 年我国肝癌病死率增加至 41.17%, 在城市仅次于肺癌, 在农村则次于胃癌, 成为我国第二位“癌症杀手”^[10]。传统手术治疗只能去除原发病灶, 不能杜绝其复发和转移; 化疗虽能有效杀伤肿瘤细胞, 但常伴随严重的毒性作用^[7]。随着分子生物学和基因工程技术的发展, 特别是基因工程治疗性疫苗概念的提出, 为肝癌的生物治疗提供了新的思路。

细胞凋亡是机体清除恶变细胞的一种主动程序化生理过程。许多细胞凋亡诱导因子依赖 p53 信号转导途径。研究^[11]表明, 利用腺病毒表达 p53 可有效抑制实体肿瘤的生长, 并且 p53 达到抑瘤剂量时并不对正常细胞构成严重威胁。但很多肿瘤在其发生过程中常伴随 p53 突变, 表达外源 p53 的方法只

对 p53 功能缺陷的肿瘤细胞产生明显作用, 而对 p53 功能健全的肿瘤细胞没有显著影响^[5]。而且在缺乏导向载体的情况下, 这种基因介入方式会对正常组织细胞造成一定程度的损伤。目前, 肿瘤生物治疗药物的应用前景已不仅取决于其有效性, 而更加侧重于特异性^[12-13]。研究^[2]表明, 来源于 CAV 的 Apoptin 能够以非 p53 依赖性途径特异性诱导肝癌、淋巴瘤、胆管癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌和结肠癌等多种人源肿瘤发生凋亡, 而对成纤维细胞、角质化细胞、平滑肌细胞等正常细胞没有影响, 且其凋亡诱导作用不受 Bcl-2 等凋亡抑制因子的制约^[3]。Apoptin 识别恶性转化细胞的确切机制有待进一步探讨, 但有研究^[14]表明 Bcl-2 家族成员能够促进 Apoptin 的功能而非抑制其作用, 说明 Apoptin 诱导肿瘤细胞凋亡的途径与经典凋亡通路存在差异, 具有应用于包括肝癌在内的多种肿瘤治疗的潜力。

本研究以表达 Apoptin 基因的真核表达质粒 pVAX-Apoptin 为载体, 通过脂质体转染和瘤内注射等方式, 将 Apoptin 基因导入体外培养的人肝癌细胞 HepG-2 和荷瘤小鼠移植瘤体内, 探讨了 Apoptin 基因对体内、外肝癌的抑制作用。实验结果表明, 虽然空载体脂质体转染对肝癌细胞 HepG-2 细胞呈现一定细胞毒性作用, 但 24 h 后肿瘤细胞便可逐渐恢复旺盛生长; 而 Apoptin 转染对 HepG-2 肿瘤细胞具有显著抑制作用, 转染 36 h 后 pVAX1-Apoptin 实验组肿瘤细胞抑制率显著高于 pVAX1 转染对照组, 说明体外转染 pVAX1-Apoptin 能够有效抑制 HepG-2 细胞增殖。AO/EB 检测结果表明, 重组质粒 pVAX1-Apoptin 主要通过诱导 HepG-2 细胞凋亡发挥其抑瘤作用。动物体内实验结果显示, pVAX-Apoptin 治疗后 39 d 抑瘤率为 46.71%, 生存率为 20%, 与对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。综上, Apoptin 具有广泛应用于包括肝癌在内的肿瘤治疗的潜力。

[参 考 文 献]

- [1] Fischer U, Schulze-Osthoff K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease[J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(2): 187-215.
- [2] Oro C, Jans DA. The tumour specific pro-apoptotic factor apoptin

(Vp3) from chicken anaemia virus[J]. *Curr Drug Targets*, 2004, 5(2): 179-190.

- [3] De Smit MH, Noteborn MH. Apoptosis-inducing proteins in chicken anemia virus and TT virus[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 331(2): 131-149.
- [4] Zhuang SM, Shvarts A, van Ormondt H, *et al*. Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(3): 486-489.
- [5] Noteborn MH. Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms[J]. *Vet Microbiol*, 2004, 98(2): 89-94.
- [6] Oorschot AA, Zhang Y, Erkeland SJ, *et al*. The effect of Bcl-2 on Apoptin in 'normal' vs transformed human cells[J]. *Leukemia*, 1999, 13(Suppl 1): S75-S77.
- [7] Danen-Van Dorschot AA, Zhang Y, Erkeland SJ, *et al*. Anti-tumor effects of a recombinant fowlpox virus expressing Apoptin *in vivo* and *in vitro*[J]. *Int J Cancer*, 2006, 120(12): 2948-2957.
- [8] 连海, 金宁一, 李霄, 等. 新城疫病毒 HN 基因诱导人肺癌细胞 SPC-A1 凋亡的作用机制[J]. *中国生物化学和分子生物学报*, 2006, 22(3): 222-227.
- [9] Berasain C, Castillo J, Peruqorria MJ, *et al*. Inflammation and liver cancer: new molecular links[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1155(19): 206-221.
- [10] 李霄, 金宁一, 连海, 等. 表达新城疫病毒血凝素-神经氨酸酶基因重组禽痘毒的构建及其抑瘤作用[J]. *科学通报*, 2006, 51(19): 2724-2730.
- [11] Lian H, Jin N, Li X, *et al*. Induction of an effective anti-tumor immune response and tumor regression by combined administration of IL-18 and apoptin[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(2): 181-192.
- [12] Van der MM, Pietersen AM, Speetjens FM, *et al*. Gene therapy with apoptin induces regression of xenografted human hepatomas[J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(1): 53-61.
- [13] Prasetvo AA, Kamahora T, Kuroishi A, *et al*. Replication of chicken anemia virus (CAV) requires apoptin and is complemented by VP3 of human torque teno virus (TTV)[J]. *Virology*, 2009, 385(1): 85-92.
- [14] Chada S, Ramesh R. Apoptin studies illuminate intersection between lipidomics and tumor suppressors[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(1): 7-9.

[收稿日期] 2009-01-19

[修回日期] 2009-02-11

[本文编辑] 徐红梅