

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.014

· 基础研究 ·

组织特异性 CD/5-FC 系统热化疗对裸鼠结肠癌肝转移的疗效

邹忠东, 张宝明, 黎成金, 王瑜*, 王烈, 涂小煌(南京军区福州总医院普通外科研究所, 福建福州 350025)

[摘要] 目的: 探讨组织特异性胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶(cytisine deaminase/5-fluorocytosine, CD/5-FC)系统热化疗对结肠癌肝转移裸鼠模型的治疗作用。方法: 将含 CEA 启动子调控 CD 基因表达的逆转录病毒载体进行扩增、纯化、包装, 并收集病毒上清。45 只裸鼠经门静脉注射人结肠癌 LoVo 细胞, 成瘤后 2 d 腹腔注射病毒上清(0.2 ml/次, 每天 1 次, 共 5 d)。随机分为对照组、常温化疗组和热化疗组, 分别经腹腔注射生理盐水、室温前药 5-FC 和 43 °C 前药 5-FC[均为 500 mg/(kg·d)]进行治疗。治疗 21 d 后处死裸鼠, 观察肝脏转移率和转移结节数, RT-PCR 检测 CD 基因在肿瘤组织的表达, 光镜及电镜下观察肿瘤病理学的变化。结果: 病毒滴度为 5.6×10^6 CFU/L。CD 基因在移植瘤组织中有效表达。热化疗组的肝转移率与转移结节数均低于常温化疗组[13.3% vs 40.0%, (0.20 ± 0.56)个 vs (0.80 ± 1.01)个; 均 $P < 0.05$]。光镜下见对照组肝转移瘤组织细胞生长活跃, 热化疗组较化疗组肝转移瘤细胞生长受抑制更明显。电镜下见化疗组、热化疗组肝转移瘤细胞有不同程度的凋亡改变。结论: 组织特异性 CD/5-FC 系统热化疗对裸鼠结肠癌肝转移瘤有明显的抑制作用。

[关键词] 结肠肿瘤; 肝转移; 胞嘧啶脱氨酶; 5-氟胞嘧啶; 热化疗

[中图分类号] R735.3⁺5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)04-0387-04

Effectiveness of tissue specific CD/5-FC thermochemotherapy system in treatment of liver metastasis of colon cancer in nude mice

ZOU Zhong-dong, ZHANG Bao-ming, LI Cheng-jin, WANG Yu*, WANG Lie, TU Xiao-huang (Institute of General Surgery, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effectiveness of tissue specific cytosine deaminase/5-fluorocytosine (CD/5-FC) thermochemotherapy system in treatment of liver metastasis of colon cancer in nude mice. **Methods:** CEA promoter-regulated recombinant retroviral vector G1CEACDNa was packaged, propagated and purified, and the viral supernatant was harvested. Human colon cancer LoVo cells were injected into the portal veins of 45 nude mice. Two days after the establishment of liver metastasis model, the viral supernatant was intraperitoneally injected into mice (0.2 ml/d, 5 d). The 45 mice were then randomly divided into 3 groups, namely, the control group (injected with sodium), chemotherapy group (pro-drug/5-FC) and thermochemotherapy group (43 °C pro-drug/5-FC). After treated for 21 d, the mice were sacrificed and liver metastasis rate and liver metastasis nodule numbers were observed. Expression of CD gene in liver metastasis tissues was determined by RT-PCR. Pathological changes of liver metastasis tissues were examined by light microscope and electron microscope. **Results:** The virus titer of G1CEACDNa was 5.6×10^6 CFU/L. CD gene was effectively expressed in the liver metastasis tissues. Liver metastasis rates and number of liver metastasis nodules were significantly lower in the thermochemotherapy group than in the chemotherapy group (13.3% vs 40.0%, [0.20 ± 0.56] vs [0.80 ± 1.01]; all $P < 0.05$). The tumor cells grew well in the control group, and were greatly inhibited in the thermochemotherapy group compared that in the other two groups. The tumor cells showed different degrees of apoptosis in the thermochemotherapy and chemotherapy groups under electron microscope. **Conclusion:** The tissue specific CD/5-FC thermochemotherapy system can inhibit the growth of liver metastasis of colon cancer in nude mice.

[Key words] colorectal neoplasms; liver metastasis; cytosine deaminase; 5-FC; thermochemotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(4): 387-390]

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(No. C0410045)。Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. C0410045)

[作者简介] 邹忠东(1968-),男,江苏省丹阳县人,医学博士,副主任医师,主要从事肿瘤外科方面的研究

*通信作者(Corresponding author)。E-mail: fzptwk@21cn.com

肝脏是结直肠癌转移的主要靶器官。据文献^[1]报道, 约有 10% ~ 20% 的结直肠癌患者在原发肿瘤诊断时即有肝转移, 结直肠癌死亡病例尸检发现肝转移率高达 60% ~ 71%, 因而肝转移成为影响结直肠癌患者生存期最主要的因素。本课题组前期实验^[2-3]已经证实组织特异性自杀基因系统胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶(cytosine deaminase/5-fluorocytosine, CD/5-FC)系统热化疗可靶向性杀伤结肠癌细胞, 而对结肠癌肝转移模型裸鼠的正常组织无损伤作用。本实验进一步观察 CD/5-FC 系统热化疗对裸鼠结肠癌肝转移模型的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

4~6 周龄 BALB/c 裸鼠 45 只, 雌雄各半, 体重 18~22 g, 购自上海实验动物中心[动物合格证号为 SCXK(沪)2007-0005], SPF 级条件下饲养。人结肠癌细胞 LoVo 株购自上海生物细胞研究所。含 CEA 启动子调控 CD 基因表达的逆转录载体 G1CEACDNa、脂质体 lipofectamine™2000(LF2000)购自 Invitrogen 公司。5-FC 购自 Sigma 公司。RNAlater 购自 QIAGEN 公司。TRIzol reagent 购自 Invitrogen 公司。RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司。CD 基因引物由 Sangon 公司合成, 引物序列(扩增产物为 154 bp): 上游 5'-GGAAGTGAAGCAGGAAGTCG-3', 下游 5'-AAATTCAAAATGCGGAATCG-3'。

1.2 质粒扩增、载体的包装、病毒上清的收集及病毒滴度的测定

将质粒 G1CEACDNa 在感受态中大量扩增后, 按质粒抽提试剂盒说明书提取并纯化质粒, 将提取并纯化的质粒 G1CEACDNa 在 PA 317 细胞中包装, 传代培养, 克隆, 收集上清, 鉴定病毒滴度, 主要步骤见文献^[4]。

1.3 人结肠癌细胞裸鼠肝转移模型的建立

将人结肠癌 LoVo 细胞悬液 0.2 ml(细胞量为 1×10^7 个) 经门静脉注射于 45 只 BALB/c 裸鼠体内, 操作步骤见文献^[5]。成瘤 2 d 后, 腹腔内注射病毒上清 0.2 ml, 每天 1 次, 连续 5 d 后进入下一步实验。

1.4 结肠癌肝转移模型裸鼠的治疗

45 只结肠癌肝转移裸鼠模型随机分为 3 组(对照组、常温化疗组、热化疗组), 每组 15 只, 分别经腹腔注射生理盐水、室温前药 5-FC 和 43℃ 前药 5-FC, 剂量均为 500 mg/(kg · d), 连续给药 21 d。治疗结束后处死动物, 剖腹取肝观察肝脏转移瘤结节数与转移率。

1.5 RT-PCR 法检测结肠癌肝转移灶组织中 CD 基因的表达

治疗 21 d 后将裸鼠处死, 肿瘤标本称重后, 取约 20 mg 新鲜肿瘤组织, 采用 Life Technologies Inc 的总 RNA 提取试剂盒 TRIzol reagent 提取组织总 RNA, RT-PCR 反应按 Promega 公司试剂盒说明进行。50 μ l 反应体系。反应条件为: 48℃ 反转录 45 min, 94℃ 酶(AMV) 灭活 2 min, 94℃ 30 s, 57℃ 1 min, 68℃ 2 min, 反应 40 个循环后终止。产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 肝转移肿瘤组织的病理学观察

取肝转移肿瘤组织 10% 甲醛固定, 制成石蜡切片, H-E 染色, 在显微镜下观察肿瘤病理学变化。

1.7 透射电镜观察肝转移瘤组织的超微结构变化

取新鲜肝转移肿瘤组织, 2.5% 戊二醛预固定, 2% 锇酸液后固定, 磷酸液冲洗, 梯度酒精脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片采用醋酸铀及柠檬酸铅双染色, 以 H-600 透射电镜下观察肿瘤组织的超微结构变化。

1.8 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS13.0 统计学软件, 计量资料配对 *t* 检验进行统计学处理, 率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 逆转录病毒包装收获病毒上清的病毒滴度

G1CEACDNa 逆转录病毒载体的病毒滴度为 5.6×10^6 CFU/L。

2.2 结肠癌肝转移瘤组织中 CD 基因的表达

RT-PCR 检测裸鼠结肠癌肝转移瘤组织, 可见 154 bp 电泳条带, 表明 CD 基因在肿瘤组织中能有效表达(图 1)。

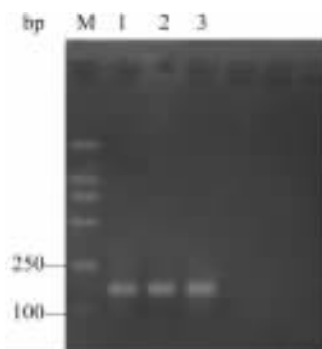


图 1 RT-PCR 检测 CD 基因在肝转移瘤组织中的表达

Fig. 1 Expression of CD gene in liver metastasis tumor tissues as detected by RT-PCR

M: DNA Marker; 1: Control; 2: Chemotherapy;

3: Thermochemotherapy

2.3 CD/5-FC 系统热化疗对裸鼠结肠癌肝转移率及肝转移结节的影响

由表 1 可见,对照组、常温化疗组、热化疗组的肝脏转移率分别为 100.0%(15/15)、40.0%(6/15)和 13.3%(2/15)($P < 0.05$);平均肝脏转移结节数分别为(2.93 ± 1.16)、(0.80 ± 1.01)、(0.20 ± 0.56)个($P < 0.01$)。

表 1 CD/5-FC 系统热化疗对裸鼠结肠癌肝转移率及肝转移结节的影响

Tab.1 Influence of CD/5-FC thermochemotherapy system on liver metastasis rate and number of liver metastasis nodules of colon cancer in nude mice($\bar{x} \pm s$)

Group	Liver metastasis rate(%)	Number of liver metastasis nodules
Control	100.0(15/15)	2.93 ± 1.16
Chemotherapy	40.0(6/15)*	0.80 ± 1.01 *
Thermochemotherapy	13.3(2/15)*▲	0.20 ± 0.56 *▲

* $P < 0.05$ vs control, ▲ $P < 0.05$ vs chemotherapy

2.4 CD/5-FC 系统热化疗治疗后肝转移瘤组织的病理改变

光镜下观察,对照组肿瘤组织见肿瘤细胞生长活跃(图 2A);前药治疗组肿瘤组织见有少量细胞空泡变性,少量淋巴细胞浸润,肿瘤细胞生长受到抑制(图 2B);前药热疗组肿瘤组织可见肿瘤细胞空泡变性,细胞核皱缩,边集甚至消失,仅残留少量肿瘤细胞,并可见散在的成纤维细胞,大量淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润(图 2C)。

2.5 CD/5-FC 系统热化疗治疗后肝转移瘤组织的超微结构改变

电镜下观察,对照组肿瘤组织见细胞膜完整,细胞核呈椭圆形,核膜完整,染色质分布正常,高尔基体及线粒体清晰完整,细胞器无溶解(图 3A);常温化疗组肿瘤组织见细胞结构中破坏,细胞器数目中度减少,高尔基体及线粒体不清晰,核膜断裂,染色质边聚(图 3B);热化疗组肿瘤组织见细胞结构严重破坏,细胞膜和核膜破坏,染色质溶解,可见早、中、晚凋亡小体形成(图 3C)。



图 2 CD/5-FC 系统热化疗治疗 21 d 后肝转移瘤组织的病理变化(H-E, $\times 400$)

Fig.2 Histological change of liver metastasis tumor tissues treated with CD/5-FC thermochemotherapy system for 21 d($\times 400$)

A: Control; B: Chemotherapy; C: Thermochemotherapy

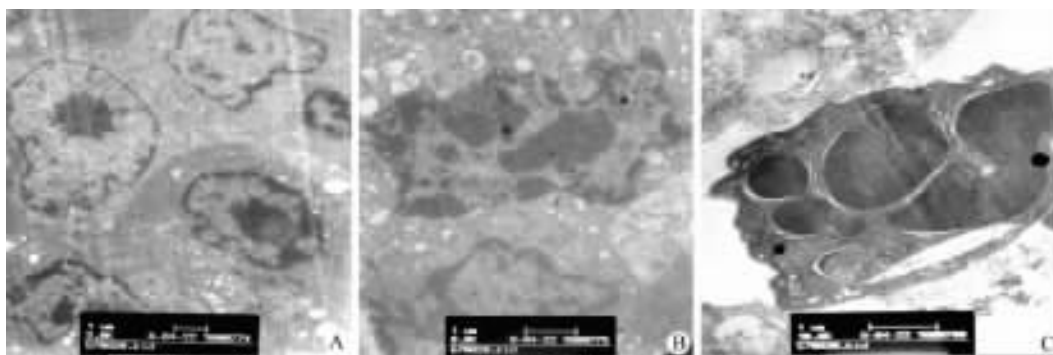


图 3 CD/5-FC 系统热化疗治疗 21 d 后肝转移瘤组织超微结构变化($\times 6000$)

Fig.3 Ultrastructural changes of liver metastasis tumor tissues treated with CD/5-FC thermochemotherapy system for 21 d($\times 6000$)

A: Control; B: Chemotherapy; C: Thermochemotherapy

3 讨论

结肠癌细胞有很强的侵袭性,最易侵入门静脉,发生率高达20%~30%。癌细胞一旦进入血循环,易在肝脏形成微小转移灶,另外手术操作挤压也可促使癌细胞种植或经门静脉转移至肝^[6-7]。本研究经门静脉注射人结肠癌LoVo细胞至裸鼠体内建立的肝转移模型,符合结肠癌细胞发生肝转移的生物学特性和肿瘤转移发生发展的特点。

研究自杀基因对肿瘤细胞的杀伤作用是近年来肿瘤基因治疗的热点。自杀基因中以TK/GCV系统和CD/5-FC系统应用最多。其中,CD基因来源于某些细菌和真菌,其编码的CD酶能将对真核细胞相对无毒的5-FC转换成细胞毒性化疗药氟尿嘧啶,抑制DNA合成,阻断核酸代谢途径,从而杀死肿瘤细胞^[8]。目的基因转染的靶向性是肿瘤基因治疗的关键之一。癌胚抗原(CEA)基因属于组织特异性表达基因,利用CEA基因的转录调控序列来调控CD基因的表达,可特异性杀死CEA分泌阳性的大肠癌细胞^[9],对结肠癌肝转移也有特异性治疗作用及旁观者杀伤效应^[10]。黎成金^[4]等原位建立大肠癌动物模型,CD/5-FC系统治疗有明显效果。本研究中逆转录病毒载体G1CEACDNa是由组织特异性CEA基因顺式转录调控序列调控CD基因的表达,肝转移瘤体内注射质粒G1CEACDNa病毒上清,肝转移瘤组织中CD基因有效表达。

肿瘤热疗是利用物理能量在细胞中集聚而产生热效应,使肿瘤组织温度上升到有效治疗温度,并维持一段时间,杀死肿瘤细胞而又对正常组织无影响,而且与化疗联合应用有协同效应^[11-16]。同时,热疗可以提高LoVo-CEACD细胞对前药5-FC的敏感性^[11]。本研究结果显示:热化疗组的肝转移率和转移结节数显著低于常温化疗组,热化疗组的疗效明显好于常温化疗组。结果提示,组织特异性CD/5-FC系统热化疗对裸鼠结肠癌肝转移有明显的抑制作用,为结肠癌肝转移的预防和治疗提供一个新的途径。

[参考文献]

- [1] Otchy D, Hyman NH, Simmang C, *et al.* Practice parameters for colon cancer [J]. *Dis Colon Rectum*, 2004, 47(8): 1269-1284.
- [2] 李金茂, 黎成金, 赖大年, 等. 温热疗法增强前药氟胞嘧啶对转移结肠癌细胞株的杀伤作用 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2006, 9(3): 234-237.
- [3] 王瑜, 张宝明, 黎成金, 等. 组织特异性CD/5-FC系统热化

疗治疗裸鼠结肠癌肝转移瘤的安全性 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(1): 59-62.

- [4] 黎成金, 马庆久, 涂小煌, 等. 组织特异性CD/5-FC系统对大肠癌的原位基因治疗 [J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 32(4): 206-208.
- [5] 黎成金, 王羊, 张宝明, 等. 裸鼠结肠癌肝转移模型的建立 [J]. *肝胆外科杂志*, 2008, 16(4): 308-310.
- [6] Tachimori A, Yamada N, Amano R, *et al.* Combination therapy of S-1 with selective cyclooxygenase-2 inhibitor for liver metastasis of colorectal carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(2A): 629-638.
- [7] 牛洪欣, 何庆泗, 魏冬, 等. TK/GCV/CD/5-FC系统对结肠癌肝转移抑制作用的实验研究 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2007, 10(3): 203-207.
- [8] Brade AM, Szmitko P, Ngo D, *et al.* Heat-directed suicide gene therapy for breast cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(4): 294-301.
- [9] Shen LZ, Wu WX, Xu DH, *et al.* Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(2): 270-275.
- [10] Humphreys MJ, Ghaneh P, Greenhalf W, *et al.* Hepatic intra-arterial delivery of a retroviral vector expressing the cytosine deaminase gene, controlled by the CEA promoter and intraperitoneal treatment with 5-fluorocytosine suppresses growth of colorectal liver metastases [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(16): 1241-1247.
- [11] Yang Y, Liu BR, Qian XP. Hyperthermia enhances the anti-cancer-drug induced cytotoxicity in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 [J]. *J Nan Med Univ*, 2006, 20(5): 302-306.
- [12] Zhu ZG, Tang R, Yan M, *et al.* Efficacy and safety of intraoperative peritoneal hyperthermic chemotherapy for advanced gastric cancer patients with serosal invasion. A long-term follow-up study [J]. *Dig Surg*, 2006, 23(1-2): 93-102.
- [13] Barnes AP, Miller BE, Kucera GL, *et al.* Cyclooxygenase inhibition and hyperthermia for the potentiation of the cytotoxic response in ovarian cancer cells [J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 104(2): 443-450.
- [14] Corry PM, Armour EP. The heat shock response: role in radiation biology and cancer therapy [J]. *Int J Hyperthermia*, 2005, 21(8): 769-778.
- [15] Riehemann K, Schmitt O, Ehlers EM. The effects of thermochemotherapy using cyclophosphamide plus hyperthermia on the malignant pleural mesothelioma *in vivo* [J]. *Ann Anat*, 2005, 187(3): 215-223.
- [16] 黎成金, 王羊, 王烈, 等. 热化疗对结肠癌LoVo细胞胞嘧啶脱氨酶基因表达的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(5): 606-608.

[收稿日期] 2009-04-18

[修回日期] 2009-06-15

[本文编辑] 王莹