

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.018

· 短篇论著 ·

间皮素 siRNA 慢病毒对卵巢癌裸鼠移植瘤的治疗效果

Treatment effect of chronic lentivirus mediated mesothelin siRNA on xenograft tumor of ovarian carcinoma

李冬秀¹, 吴小华¹, 张 蕾¹, 王 莉²(1. 白求恩国际和平医院 妇产科, 河北省 石家庄市 050082; 2. 河北省人民医院 妇产科 河北省 石家庄市 050021)

[摘要] 目的:探讨间皮素(mesothelin, MSLN)siRNA 慢病毒对人卵巢癌裸鼠腹腔移植瘤的治疗作用。方法:利用人卵巢癌 SKOV3 细胞建立卵巢癌裸鼠腹腔移植瘤模型。实验分为 3 组:治疗组、阴性对照组和空白对照组。治疗组应用携间皮素 siRNA 慢病毒液(LV-MSLN-shRNA)对裸鼠模型进行治疗,阴性对照组采用空载体(LV-MSLN-neg)慢病毒液进行治疗,空白对照组注射 PBS 治疗。从裸鼠生长一般情况、成瘤率、体质量差、瘤体质量和肿瘤转移部位数等方面观察治疗效果,Western blotting 法检测移植瘤组织中间皮素蛋白的表达情况。结果:用间皮素 siRNA 慢病毒液对荷瘤裸鼠进行注射的治疗组裸鼠的成瘤率、体质量差、瘤体质量及肿瘤形成部位数均明显低于空白对照组和空载体 LV-MSLN-neg 治疗组($P < 0.01$)。注射慢病毒液后瘤体组织中间皮素蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。结论:间皮素 siRNA 慢病毒液对卵巢癌腹腔移植瘤的生长有显著抑制作用。

[关键词] 卵巢肿瘤;间皮素;RNA 干扰;慢病毒;基因治疗

[中图分类号] R730.54; R737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)04-0455-03

卵巢癌是发病率第三而病死率为第一的女性生殖道肿瘤。虽然近年来,卵巢癌的诊治取得了一定的进展,但仍是威胁女性健康的第一杀手。间皮素(mesothelin, MSLN)是一种肿瘤细胞表面分化抗原,表达在胸膜、腹膜和心包的正常间皮细胞中,在恶性间皮瘤、卵巢癌、胰腺癌及肺癌等恶性肿瘤中高表达^[1]。已有研究^[2-4]发现,间皮素基因是卵巢癌组织中表达上调最显著的基因,而且由于其具有在少数几种癌组织中高表达而在正常组织或良性肿瘤组织中低表达或不表达的特点,因此有望成为基因治疗的优质靶点。

本研究建立荷人卵巢癌鼠腹腔移植瘤模型,在荷瘤裸鼠体内注射针对间皮素的 siRNA 慢病毒液,观察间皮素靶向的 siRNA 慢病毒对小鼠卵巢癌移植瘤的治疗效果,以期对卵巢癌基因治疗提供一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

雌性 BALB/c 小鼠,4~6 周龄,体重 13.5~16.5 g,购于中科院实验动物研究所,实验动物合格证号为 SCXK(京)2005-0013,饲养于河北医科大学第四医院实验动物中心。

卵巢浆液性乳头状囊腺癌细胞株 SKOV3 购自中科院上海细胞库。慢病毒液 LV-MSLN-neg(TTCTCCGAACGTGTACCGT)、LV-MSLN-shRNA(GCTCTCAACAGAGCAGCTG)为本课题组委托上海

比昂生物公司制备。RPMI 1640 干粉购自 Gibco 公司,胰蛋白酶购自 Sigma 公司。

低分子量蛋白质 Marker 购自 Bio-Rad 公司,蛋白质提取试剂盒购自 Activemotif 公司,考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒购自北京赛百盛生物公司,ECL 反应底物购自 Pierce 公司,间皮素单克隆抗体 2H10 由本课题自制并已经通过鉴定^[5]。

1.2 卵巢癌 SKOV3 细胞培养及鼠卵巢癌腹腔移植瘤模型的建立

SKOV3 细胞在含 10% 胎牛血清的 1640 完全培养液中培养,培养条件为 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱。

取对数生长期的卵巢癌亲本 SKOV3 细胞,配置成细胞悬液,以 5×10^6 个的数量注射于小鼠的腹腔内,14 d 后观察成瘤情况。

1.3 siRNA 慢病毒注射对荷人卵巢癌鼠腹腔移植瘤的治疗作用

将 BALB/c 鼠随机分成 3 组,分别为 PBS 治疗的空白对照组(组 1)、空载体 LV-MSLN-neg 治疗组

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. C30600006);河北省自然科学基金项目(No. C200500804)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. C30600006), and the Key Program of Natural Science Foundation of Hebei Province(No. C200500804)

[作者简介] 李冬秀(1976-),女,河北省石家庄市人,主治医师,博士生,主要从事妇科肿瘤免疫治疗方面的研究

[通信作者] 吴小华,(WU Xiao-hua, corresponding author), E-mail: xiaohuawu65@yahoo.com

(组2)和慢病毒 LV-MSLN-shRNA 治疗组(组3),每组10只。自接种 SKOV3 细胞的首日至接种后14 d,隔日向小鼠腹腔内分别注射 PBS、LV-MSLN-neg 和 LV-MSLN-shRNA 病毒液(病毒颗粒稀释成 5×10^8 /ml)各0.2 ml,14 d后处死小鼠,观察成瘤情况,以成瘤率[成瘤率(%)=(接种后腹腔形成肿瘤的小鼠数/接种小鼠总数)×100%]、小鼠体质量差、腹腔转移瘤总质量、肿瘤分布部位数(大网膜、肠系膜、腹壁、心、肝、脾、肾等有移植瘤的部位)4个指标评价治疗效果。

1.4 Western blotting 法检测 siRNA 慢病毒治疗后移植瘤组织间皮素的表达

处死荷瘤小鼠时,取腹腔移植瘤组织。按照蛋白提取试剂盒操作提取组织中总蛋白,按照 Western blotting 步骤进行实验,加一抗(1:200 稀释),二抗(1:1 000 稀释)。β-action 作为内参照。将显色后的 PVDF 膜进行扫描,使用 Gel-pro 凝胶分析软件,测定

各条带的平均光密度值(D值),间皮素表达量与内参照 β-action 表达量的比值作为该样品蛋白的相对含量。干扰效率(%)=间皮素蛋白表达下调值/空白对照组蛋白表达值×100%。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;对组间均数进行方差分析,并进行方差齐性检验,用 SNK 法进行两两比较;率的比较采用 Fisher's 检验;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 间皮素 siRNA 慢病毒注射对荷人卵巢癌小鼠腹腔移植瘤的治疗效果

注射慢病毒治疗14 d后处死荷瘤小鼠,LV-MSLN-shRNA 组的移植瘤成瘤率、体质量差、瘤体质量、肿瘤分布部位数均明显低于空载体 LV-MSLN-neg 治疗组和空白对照组($P < 0.01$,表1)。

表1 间皮素 siRNA 慢病毒治疗小鼠移植卵巢癌的效果($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	成瘤率 (%)	体质量差 (m/g)	瘤体质量 (m/g)	肿瘤分布部位 (个)
空白对照组	100	3.52 ± 0.74	2.17 ± 0.30	7.80 ± 1.79
LV-MSLN-neg	100	3.14 ± 1.03	2.15 ± 0.34	7.00 ± 1.22
LV-MSLN-siRNA	40	1.49 ± 0.31**	0.21 ± 0.47**	0.40 ± 0.89**
F		10.35	43.2	44.98
P		0	0	0

** $P < 0.01$ vs 空白对照或 LV-MSLN-neg 组

2.2 siRNA 慢病毒抑制移植瘤组织中间皮素蛋白的表达

结果显示,LV-MSLN-shRNA 治疗组、空载体 LV-MSLN-neg 治疗组与空白对照组相对应的间皮素蛋白值分别为 0.282 ± 0.013 、 1.052 ± 0.062 和 1.155 ± 0.061 ,肿瘤组织中间皮素蛋白表达的干扰率分别为 75.6% 和 8.9% (图1)。结果说明,siRNA 慢病毒治疗能显著抑制移植瘤组织中间皮素蛋白的表达。

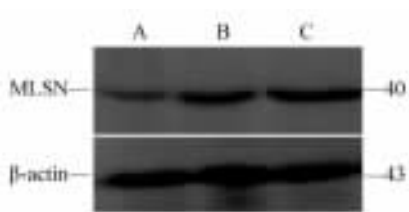


图1 间皮素 siRNA 慢病毒抑制小鼠移植瘤组织中间皮素蛋白的表达
A: LV-MSLN-shRNA 治疗组;B:空载体 LV-MSLN-neg 治疗组;C:空白对照组

3 讨论

卵巢癌在女性生殖系统肿瘤中的病死率最高,5年生存率仅为30%左右。因为卵巢癌治疗方法单一,由于多数患者发现时已是中晚期,寻找新的治疗方法是提高卵巢癌患者生存率的关键环节。

基因治疗作为一种新兴的生物治疗方法,已成为肿瘤治疗研究领域富有希望的方法之一。RNAi 是基因治疗常用的方法之一,通过沉默癌基因而改变肿瘤的恶性行为,从而达到治疗和阻遏肿瘤发展的目的^[6]。但目前基因转移的局限性已成为实现这一目的的最大障碍。以 HIV 为基础构建的慢病毒载体不但可以提供稳定的基因转移,而且在分裂与非分裂细胞都适用,目的基因整合至靶细胞基因组后可以长期表达,产生的免疫反应小,适于体内基因治疗,因此已经成为最具潜力的基因转移载体^[7-8]。体外实验已经证明,慢病毒可以将目的基因高效转移至卵巢癌细胞中,并可以长期表达。

由于间皮素具有在正常组织不表达或者低表达而在恶性间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌以及肺癌等恶性肿瘤组织高表达的特点,所以有望作为基因治疗的理想靶点^[1-2]。本课题组前期试验采用慢病毒介导的RNA,构建短发卡结构表达载体,特异性阻断间皮素mRNA,体外实验证实可以高效地抑制间皮素蛋白表达。基因沉默的卵巢癌细胞增殖能力下降,与基底膜和间皮细胞的黏附侵袭能力下降,说明间皮素基因沉默在体外抑制了卵巢癌细胞的生长、减少了粘附和侵袭^[9]。本实验进一步用慢病毒介导的基因转移卵巢癌小鼠腹腔移植瘤模型,探讨间皮素对卵巢癌细胞腹腔种植的影响和基因治疗的可行性。

体外实验已经证实,间皮素可以增强乳腺癌细胞、前列腺癌细胞增殖,并增强卵巢癌 SKOV3 细胞的侵袭、粘附能力^[9-11],间皮素和 mucin16(CA125) 之间的相互作用介导了卵巢癌细胞的黏附^[12-13]。本研究采用隔日注射慢病毒的方法, LV-MSLN-shRNA 治疗组的小鼠移植瘤的生长明显受到抑制,不仅小鼠体重和腹围增加缓慢,而且腹腔内肿瘤体积较小、个数较少。小鼠腹腔移植瘤成瘤率、瘤体质量、肿瘤数目和肿瘤分布部位明显少于其他两组,表明针对间皮素小干扰的慢病毒注射延缓了小鼠腹腔移植瘤的转移及发展。原因可能是由于携带间皮素 RNAi 的干扰序列沉默了卵巢癌 SKOV3 细胞中的间皮素基因,从而降低了 SKOV3 细胞的增殖能力,进而影响了卵巢癌细胞在小鼠腹腔内的种植转移。

同时, Western blotting 证实, LV-MSLN-shRNA 组的小鼠肿瘤组织中间皮素蛋白表达量明显低于其他两组,其机制可能是慢病毒腹腔注射后,慢病毒携带的间皮素 RNA 干扰序列整合到肿瘤细胞和间皮细胞的基因中去,使肿瘤细胞和间皮细胞的间皮素基因沉默,证实 RNAi 慢病毒液不仅可以降低体外培养细胞的间皮素表达,而且在体内注射携间皮素 RNA 干扰序列的慢病毒也可以降低体内瘤体组织中间皮素的表达,使瘤组织中间皮素表达降低,间皮素/CA125 结合减少,从而影响了肿瘤细胞与间皮细胞的黏附,证实间皮素在卵巢癌的腹腔转移和种植中发挥重要作用,沉默间皮素在卵巢癌组织中的表达可以抑制其腹腔转移。这一结果为利用 RNAi 技术来敲除体内癌基因,从而达到治疗恶性肿瘤的目的提供了实验依据。

本实验利用间皮素作为基因治疗的靶点,能够成功抑制小鼠体内卵巢癌细胞的生长、种植及转移,这为肿瘤的基因治疗,尤其是人卵巢癌等实体恶性肿瘤的基因治疗提供了有力的方法和依据,至少这

种治疗方法可以在一定程度上减少卵巢癌细胞的种植,延缓肿瘤的复发和转移。

[参 考 文 献]

- [1] Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 9, 93(1): 136-140.
- [2] Ordonez NG. Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis [J]. Am J Surg Pathol, 2003, 27(11): 1418-1428.
- [3] Creaney J, van Bruggen I, Hof M, Segal A, Musk AW, de Klerk N, et al. Combined CA125 and mesothelin levels for the diagnosis of malignant mesothelioma [J]. Chest, 2007, 132(4): 1239-1246.
- [4] Hassan R, Williams-Gould J, Steinberg SM, Liewehr DJ, Yokokawa J, Tsang KY, et al. Tumor-directed radiation and the immunotoxin SS1P in the treatment of mesothelin-expressing tumor xenografts [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(16): 4983-4988.
- [5] 陈书成,刘雅坤,吴小华,单保恩,陈兴,孙东霞,等. 抗人可溶性间皮素相关蛋白单克隆抗体的制备及特性的鉴定 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(3): 246-248.
- [6] Numnum TM, Makhija S, Lu B, Wang M, Rivera A, Stoff-Khalili M, et al. Improved anti-tumor therapy based upon infectivity-enhanced adenoviral delivery of RNA interference in ovarian carcinoma cell lines [J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(1): 34-41.
- [7] Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(3): 299-305.
- [8] Breckpot K, Emeagi PU, Thielemans K. Lentiviral vectors for anti-tumor immunotherapy [J]. Curr Gene Ther, 2008, 8(6): 438-448.
- [9] 王莉,李娜,吴小华. 间皮素对卵巢上皮性癌细胞生长、黏附及侵袭能力的影响 [J]. 中华妇产科杂志, 2009, 4(6): 466-468.
- [10] Bharadwaj U, Li M, Chen C, Yao Q. Mesothelin-induced pancreatic cancer cell proliferation involves alteration of cyclin E via activation of signal transducer and activator of transcription protein 3 [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(11): 1755-1765.
- [11] Uehara N, Matsuoka Y, Tsubura A. Mesothelin promotes anchorage-independent growth and prevents anoikis via extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human breast cancer cells [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(2): 186-193.
- [12] Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Savako Minami, Naohiko Umesaki, Masaki Takeuchi, et al. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion [J]. J Biol Chem, 2004, 279(10): 9190-9198.
- [13] Gubbels JA, Belisle J, Onda M, Claudine Rancourt, Martine Migneault, Mitchell Ho, et al. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors [J]. Mol Cancer, 2006, 5(1): 50-65.

[收稿日期] 2010-04-18

[修回日期] 2010-06-14

[本文编辑] 王莹