文章编号:1000-5404(2006)01-0053-03

论著

EWS-FLI 1介导DTA基因在尤文肉瘤移植瘤裸鼠模型体内特异表达研究

赵忠全,冯 岗,王东林 (第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037)

提 要:目的 观察EWS-FLI1介导的白喉毒素A链基因(diphtheria toxin A chain gene, DTA)在尤文肉瘤裸鼠移植瘤模型体内特异表达情况。**方法** 采用尾静脉注射给药,将含有EWS-FLI1特异结合序列ACCGGAAGT和白喉毒素A链基因的真核表达载体pS2-DTA导入尤文肉瘤裸鼠移植瘤模型体内,通过免疫组化及RT-PCR检测DTA的表达情况。**结果** DTA在肿瘤组织中有高表达,肝组织中有弱表达,心肌组织中表达结果为阴性。**结论** EWS-FLI1介导的DTA可在尤文肉瘤裸鼠移植瘤内特异表达。

关键词: 尤文肉瘤;白喉毒素A链(DTA);裸鼠;基因治疗
中图法分类号: R394.2; R73-354; R730.262 **文献标识码:** A

Specific expression of the diphtheria toxin A chain gene regulated by the EWS-FLI 1 fusion gene in Ewing's sarcoma nude mouse models

ZHAO Zhong-quan, FENG Gang, WANG Dong-lin (Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the specific expression of diphtheria toxin A chain gene (DTA) in Ewing's sarcoma nude mice models. **Methods** pS2-DTA plasmid was constructed by the Lus gene in pS2 plasmid was replaced with the DTA gene in pIBI30 plasmid, and transformed into DH5α, then amplified. Five nude mice were injected with 2.4×10^7 SK-ES-1 cells, sacrificed on week 6, and the tumor tissues were implanted onto the back of another 20 nude mice. Till 6 weeks later the diameter of the tumor up to 0.8 – 1.0 cm, the Ewing's sarcoma nude mice models were successfully established and randomly assigned to receive the injection of 300 μg lipidosome + 100 μl normal saline (control group) or 300 μg lipidosome + 100 μl normal saline + 100 μg pS2-DTA (experimental group) once a day for 5 d. On day 4 after the therapy finished, 4 nude mice of each group were randomly sacrificed and the DTA expression in the tissue of tumor, liver and myocardium was detected by the immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** The immunochemical results showed DTA expression in the tissues of control group was all negative while the DTA expression in the experimental group was negative in the tissues of myocardium and liver, positive in tumor tissue. RT-PCR showed DTA expression in control group was negative in all tissues while strongly positive in tumor tissue, weakly positive in liver tissue and negative in myocardiac tissue. **Conclusion** The pS2-DTA regulated by the EWS-FLI1 fusion gene has a specific expression in transplanted Ewing's sarcoma in mice.

Key words: Ewing's sarcoma; diphtheria toxin A chain; nude mice; gene therapy

尤文肉瘤是一种好发于青少年的恶性软组织肿瘤,易在患病早期出现转移。尽管常规治疗方案可改善患者5年生存率。但在出现复发或转移的情况下,这部分患者的治疗仍较为困难。肿瘤基因治疗是目前比较活跃的领域,备受人们的关注,恶性肿瘤基因治疗的研究为患者带来了新的希望。经研究证实,95%以上的尤文肉瘤家族中有染色体易位现象,即t(11;22)(q24;q12)[1],形成EWS-FLI1融合基因。此融合基因

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100189);全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA174)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100189) and the "Tenth Five-Year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (01MA174)

作者简介: 赵忠全(1975-),男,吉林市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究,现在南京军区福州总医院肿瘤科。电话:(0591)22859444
通讯作者: 王东林,电话:(023) 68774701

收稿日期: 2005-07-04;**修回日期:** 2005-12-25

只存在于肿瘤组织中，并且具有很强的转录、激活作用[2]，可促进其下游特定基因的高表达。该融合基因的存在为尤文肉瘤基因治疗提供了一个重要线索。

1 材料与方法

1.1 材料

尤文肉瘤细胞系 SK-ES-1 由奥地利 Kovar 教授惠赠，虫荧光素酶报告质粒 pS2 由美国 Ladanyi 教授惠赠，质粒 pIBI30-DTA 由美国 Maxwell 教授惠赠。裸鼠 BALB/c-nu/nu 6 周龄大，雌雄各半，购于四川大学实验动物中心。F12 培养基及胎牛血清均为 Hyclone 产品，阳离子脂质体 DOTAP 购于 ROCH 公司，工程菌 DH5α 由新桥医院肿瘤中心引进并保存，质粒小量提取试剂盒购于 Promega 公司，白喉毒素 A 链单克隆抗体购于吉泰公司，免疫组化试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。RT-PCR 试剂盒购于 MBI 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒 pS2-DTA 的构建及扩增 经双酶切，以 pIBI30-DTA 质粒中的 DTA 基因置换 pS2 质粒中的 Luc 基因，构建 pS2-DTA 质粒，详细过程见参考文献[3]。将 pS2-DTA 质粒转化感受态 DH5α 后，挑取单个克隆菌落扩增，以质粒小量抽提试剂盒进行多次提取，提取后于 -20 ℃保存备用。

1.2.2 细胞培养及裸鼠饲养 尤文肉瘤 SK-ES-1 细胞株接种于含 15% 胎牛血清的 F-12 培养基中，于 37 ℃，5% CO_2，饱和湿度下培养。裸鼠于第三军医大学新桥医院实验动物中心 SPF 级饲养室层流架内饲养。

1.2.3 裸鼠移植瘤模型的复制及分组 首次选取 5 只裸鼠，雌雄各半，每只裸鼠于背部皮下注射约 2.4×10^7 个 SK-ES-1 细胞[4]，4 周后成瘤，第 6 周处死裸鼠，取肿瘤组织，无菌条件下切成 2 ~ 3 mm^3 大小组织块，将肿瘤组织块接种于第 2 批裸鼠背部皮下，第 6 周，移植瘤直径达 0.8 ~ 1.0 cm 大小。已成瘤裸鼠随机分成对照组与实验组两组，每组 10 只。治疗前将 pS2-DTA 质粒与阳离子脂质体按质量比 1∶3 混合，于室温下孵育 30 min。对照组给予脂质体 300 μg + 生理盐水 100 μl 治疗，实验组给予脂质体 300 μg + 生理盐水 100 μl + pS2-DTA 100 μg 治疗，两组均每天注射 1 次，连续给药 5 d。治疗结束后第 4 天，每组随机选取 4 只裸鼠，断颈法处死，取其肿瘤、肝、心肌组织进行检测。

1.2.4 DTA 表达免疫组化检测 采用 S-P 法，DAB 染色，免疫组化具体操作按试剂盒说明书进行，白喉毒素 A 链单克隆抗体工作浓度为 1∶100。

1.2.5 DTA 表达 RT-PCR 检测 取各组裸鼠模型肿瘤、肝、心肌组织，制成细胞匀浆，按 Trizol 试剂盒说明提取 RNA，提取的 RNA 经逆转录用于 PCR 扩增。白喉毒素 A 链基因引物以 Primer5.0 设计，由上海生工生物工程有限公司合成。

DTA 的引物（563 bp）：上游引物：5′-GGTTATGTAGATTCCATTC-3′；下游引物：5′-CTGTAGGTAGTTTGTCCAA-3′。β-Actin 序列（540 bp）：上游引物：5′-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3′；下游引物：5′-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3′。

1.3 统计学处理

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件，组间比较行 t 检验。

2 结果

2.1 DTA 表达免疫组化检测结果

对照组裸鼠肿瘤、心肌、肝组织的免疫组织化学检测结果为阴性。治疗组心肌、肝组织的免疫组化检测结果为阴性，肿瘤组织内可见有胞质染棕黄色的阳性肿瘤细胞，靠近细胞核区染色略深（图 1）。

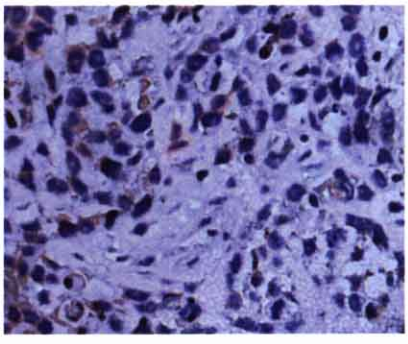
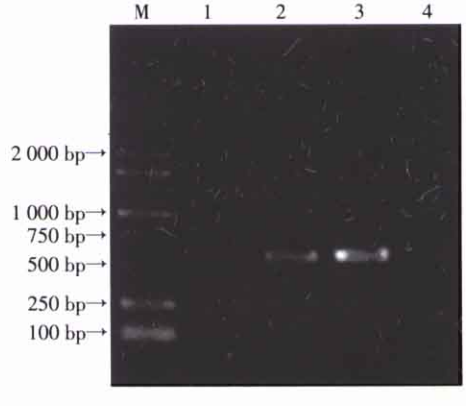


图 1 实验组模型 DTA 表达免疫组化检测结果 （S-P×400）

2.2 DTA 表达 RT-PCR 检测结果

对照组裸鼠心肌、肝、肿瘤组织 RT-PCR 检查结果为阴性（图 2）。治疗组裸鼠肿瘤、心肌、肝组织经 RT-PCR 检测，β-Actin 样品扩增出 540 bp。治疗组裸鼠肿瘤组织强阳性表达，肝组织 RT-PCR 检测呈弱阳性表达，电泳图像经 Quantity One 软件测定各条带光密度值，肿瘤组织 RT-PCR 相对光密度值（0.28 ±0.08）显著高于肝组织相对光密度值（0.12 ± 0.02）（$P<0.05$），而其心肌组织 RT-PCR 检测结果为阴性。



M：标准；1：心肌；2：肿瘤；3：β-Actin；4：肝

图 2 治疗组裸鼠肿瘤、心肌、肝组织 RT-PCR 检测结果

3 讨论

由于生物毒素对肿瘤有较强的杀伤用，因而受到

了广泛的研究，其中白喉毒素应用的最多，白喉毒素是由 535 个氨基酸组成的单链多肽，立体结构为 Y 字型，两臂为催化区（N 端）和结合区（C 端）[5]，中间为穿膜区。在胰蛋白酶的作用下，白喉毒素可降解为 A、B 两个片段[6]，其中 A 片段为其毒性作用区，A 片段进入细胞质后，使肽链延长因子Ⅱ（EF-Ⅱ）失活，从而使细胞内蛋白质合成受阻，引起细胞功能损伤、坏死或发生凋亡[7]。白喉毒素的这种毒性作用具有剂量依赖性和不可逆性的特点。既往的研究中，多数以融合蛋白的形式，将白喉毒素或其 A 片段导入肿瘤细胞内，以达到选择性杀伤肿瘤细胞的作用，但这种方式选择性不高。并可引起机体免疫反应，重复性不好[8,9]。同时由于白喉毒素本身毒性大，副反应重，使其应用受到限制[8]。pS2 质粒是在 Promiger PGM-L3 质粒的基础上构建的，于虫荧光素基因上游插入了 EWS-FLI1 特异结合序列：ACCGGAAGT，本实验中以白喉毒素 A 链基因替换了 pS2 质粒中的虫荧光素基因，新构建 pS2-DTA 质粒中仅含有一个 SV40 启动子，不含增强子，从而可减少白喉毒素 A 链基因在正常组织中的表达，而于尤文肉瘤细胞中，利用其 EWS-FLI1 融合基因可明显增强特异结合序列下游基因表达的特性，使白喉毒素 A 链于肿瘤组织中达到高表达。因正常组织中不含有 EWS-FLI1 融合基因，DTA 基因在正常组织中处于低表达状态，从而使 DTA 基因在肿瘤细胞内产生特异性表达。由于脂质体在体内转染效率相对较低，体内不同组织的分布亦有所不同，对各组织内的表达情况可能有一定的影响[10]，但考虑其较高的安全性及可重复性好等众多优势[11]，同时，既往报道中有成功应用的研究[12]，因此在研究中，我们仍选它作为基因传递系统。

从实验中对照组模型检测结果我们可知，对照组裸鼠体内 DTA 呈阴性表达，脂质体和生理盐水这一治疗体系未带来阳性的 DTA 表达，从而排除了内源性及外源性 DTA 表达的可能性，同时也证实了，治疗组裸鼠体内的 DTA 阳性表达，是由我们引入的 pS2-DTA 表达所带来的阳性表达结果，既 pS2-DTA 这个真核表达载体可以在裸鼠体内得到表达。而治疗组中，经免疫组织化学检测证实，白喉毒素在肿瘤细胞中有较强的阳性表达，肿瘤组织 RT-PCR 检测也证实了这一点。虽然治疗组裸鼠肝组织 RT-PCR 检测出现了弱阳性表达，但肿瘤组织与肝组织两者的表达强度有着显著的差异，而其心肌组织中表达结果为阴，所以我们认为，pS2-DTA 这个真核表达载体在肿瘤组织中确实有较好的特异性表达。由于脂质体在不同的组织中代谢及分布存有一定的差异，也许改进基因导入系统会使结果更理想。同时，实验中治疗剂量的大小，对表达结果有较大的影响，因此，适当的治疗剂量还有待进一步的探讨。综上所述，把尤文肉瘤融合基因作为尤文肉瘤基因靶向治疗的切入点，值得进行深入的研究。

参考文献：

[1] DE ALAVA E, GERALD W L. Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family[J]. J Clin Oncol, 2000, 18(1): 204 - 213.

[2] MAY W A, ARVAND A, THOMPSON A D, *et al*. EWS/FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic[J]. Nat Genet, 1997, 17(4): 495 - 497.

[3] 冯　岗，赵忠全，王东林. 携带尤文肉瘤 EWS-FLI-1 结合序列的 DTA 表达载体构建及其对尤文肉瘤细胞杀伤作用的研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(5)：382 - 385.

[4] BUSTO R, SCHALLY A V, BRACZKOWSKI R, *et al*. Expression of mRNA for growth hormone-releasing hormone and splice variants of GHRH receptors in human malignant bone tumors[J]. Regul Pept, 2002, 108(2 - 3): 47 - 53.

[5] FUJII G, CHOE S H, BEMETT M J, *et al*. Crysallizatin of diphtheria toxin[J]. J Mol Biol, 1991, 222(4): 861 - 864.

[6] WAWRZYNCZAK E J. Systemic immunotoxin therapy of cancer: advances and prospects[J]. Br J Cancer, 1991, 64(4): 624 - 630.

[7] PASSADOR L, IGLEWSKI W. ADP-ribosylating toxins [J]. Methids Enzymol, 1994, 235: 617 - 631.

[8] VALLERA D A, SEO S Y, PANOSKALTSIS MORTARI A, *et al*. Targeting myeloid leukemia with a DT (390)-mIL-3 fusion immunotoxin: ex vivo and in vivo studies in mice[J]. Protein Eng, 1999, 12(9): 779 - 785.

[9] HALL P D, WILLINGHAM M C, KREITMAN R J, *et al*. DT388-GM-CSF, a novel fusion toxin consisting of a truncated diphtheria toxin fused to human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, prolongs host survival in a SCID mouse model of acute myeloid leukemia [J]. Leukemia, 1999, 13(4): 629 - 633.

[10] LEE R J, HUANG L. Lipidic vector systems for gene transfer[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1997, 14(2): 173 - 206.

[11] PARK J, RIES J, GELSE K, *et al*. Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes[J]. Gene Ther, 2003, 10(13): 1089 - 1098.

[12] LESOON WOOD L A, KIM W H, KLEINMAN H K, *et al*. Systemic gene therapy with p53 reduces growth and metastases of a malignant human breast cancer in nude mice[J]. Hum Gene Ther, 1995, 6(4): 395 - 405.

（编辑　龙　亮）