论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1036-03

腺病毒介导凋亡素基因对裸鼠种植性人胆管癌的治疗研究

陈 健,李大江,王曙光 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨腺病毒介导凋亡素基因对裸鼠种植性人胆管癌的治疗。**方法** 建立裸鼠皮下种植性人胆管癌模型,观察肿瘤内注射含凋亡素基因的重组腺病毒后种植瘤的体积变化、毒副作用和组织学变化,同时计算抑瘤率。**结果** 在治疗12 d后含凋亡素基因的腺病毒治疗组的种植瘤体积为(92.31±28.31)mm,较空病毒组(288.86±113.13)mm和生理盐水组(344.86±113.87)mm相比具有显著差别($P<0.01$)。同时抑瘤率达到72.10%,明显高于空病毒治疗组11.9%($P<0.01$)。在治疗期间没有观察到毒副作用。组织学结果也提示凋亡素基因是通过引发胆管癌细胞的凋亡来抑制肿瘤生长的。**结论** 含凋亡素基因的重组腺病毒对胆管癌具有治疗作用。

关键词:凋亡素基因;腺病毒载体;基因治疗;人胆管癌

中图法分类号:R73-354;R730.59;R735.8 **文献标识码**:A

Therapy for xenograft human bile duct cancer in mice mediated by adenovirus containing Apoptin gene

CHEN Jian, LI Da-jiang, WANG Shu-guang (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the therapy for xenograft human bile duct cancer in mice mediated by adenovirus containing Apoptin gene. **Methods** Subcutaneous human bile duct cancer was established in nude mice. Variations of tumor volume and histomorphology, side effects were observed after intratumoral injection of adenovirus containing Apoptin gene. Finally the mice were sacrificed for calculating the ratio of antitumor. **Results** Twelve days after treatment, the mean volume of the xenograft human bile duct cancer in the group of intratumoral injection of adenovirus containing Apoptin gene was (92.31±28.31) mm, which was reduced significantly compared with that of adenovirus infection without apoptin gene(288.86±113.13)mm and control group(344.86±113.87)mm. The ratio of antitumor was 72.10%, which was significantly higher than that in control group(11.9%). During the whole experimental course, no side effect was observed. The histological results demonstrated that the reduction of tumor growth was the result of apoptosis in bile duct cells, which was reduced by transfection of Apoptin gene. **Conclusion** The adenovirus vectors containing Apoptin gene may constitute a safe tool for the treatment of cholangiocarcinoma.

Key words: Apoptin gene; adenovirus vector; gene therapy; human bile duct cancer

目前,胆管癌的发病率逐年增加,但手术根治率低、预后差。近年来,随着分子生物学的迅猛发展,肿瘤基因治疗这门新兴领域正在形成。胆管癌的治疗有望在此途径取得突破。腺病毒由于本身的优越性被选择为常见的基因载体,并且美国FDA已批准其作为基因治疗载体应用于临床试验。而凋亡素是外来物质,它具有特异的抗肿瘤和转化细胞的作用,同时对正常细胞不具有明显的毒性作用[1],所以对它的进一步研究,特别是体内研究,能证实其在肿瘤的治疗上是否具有临床价值。我们用构建好的含凋亡素基因的腺病毒来治疗裸鼠种植性人胆管癌,以期了解凋亡素能否抑制胆管癌的生长,同时观察腺病毒介导的凋亡素基因的副作用,为以后的临床应用积累经验。

1 材料与方法

1.1 材料

健康纯种SPF级BALB/c 4周龄裸鼠22只,雌雄各半,体质量(20±3)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。在第三军医大学大坪医院野战外科研究所清洁级动物实验室饲养。人

基金项目:重庆市科委资助项目(2002012)
Supported by the Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2002012)

作者简介:陈 健(1970-),男,云南省陆良县人,博士,讲师,主要从事胆管癌方面的研究。电话:(023)68752879,E-mail:chenjian2000425@yahoo.com.cn

通讯作者:王曙光,电话:(023)68754181

收稿日期:2007-01-18;**修回日期**:2007-03-09

胆管癌细胞株 QBC_{939} 由本校全军肝胆外科研究所王曙光教授建株；含凋亡素基因的腺病毒和空病毒已经构建成功并纯化好[2]。TUNEL 试剂购自德国 Roche 公司。

1.2　方法

1.2.1　裸鼠皮下种植性人胆管癌模型的建立[3]　取对数期的生长胆管癌细胞 QBC_{939}，实验前 1 d 换液，当天用 0.25% 胰酶消化，培养液吹打细胞制备成细胞悬液，100 × g 室温下离心 10 min，弃上清，PBS 重悬细胞，调整细胞数 5×10^8/ml。将裸鼠无菌操作，肿瘤细胞液摇匀后，每只裸鼠皮下接种 0.2 ml 细胞悬液。恒温、通风、无菌条件下饲养。待种植性人胆管癌长到 7 mm 长径时进行下一步实验。分组：用系统抽样法分为 3 组，分别为：含凋亡素基因腺病毒治疗组（A 组，8 只）、空病毒治疗组（B 组，7 只）和生理盐水治疗组（C 组，7 只）。

1.2.2　重组腺病毒对裸鼠皮下种植性人胆管癌的治疗　用 1 ml 注射器 18 号针头抽取调整滴度为 10^9 pfu/ml 的重组腺病毒 100 μl，在肿瘤长径注射点多方向瘤内注射，共注射 1 次。分别在注射前、注射后 3、6、9、12 d 裸鼠称量和测量肿瘤的长、短径以计算肿瘤体积，肿瘤体积（V）= L × S^2 × 0.5（L：肿瘤长径；S：肿瘤短径[4]）。在 12 d 时断颈处死裸鼠并称种植瘤质量，计算抑瘤率。公式为：抑瘤率（%）=（对照组瘤质量 − 实验组瘤质量）/对照组瘤质量 × 100%。

1.2.3　种植瘤的 TUNEL 染色　将种植瘤制备成石蜡切片，TUNEL 染色严格按照试剂盒说明书进行。

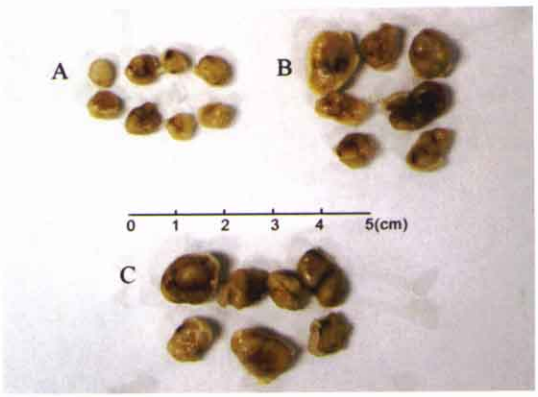
1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　含凋亡素基因腺病毒对裸鼠种植性人胆管癌体积的影响

一次性瘤内注射含凋亡素基因的腺病毒后裸鼠种植性胆管癌的生长受到了抑制，在第 6 天获得了最大的抑制，此时种植瘤体积最小，为（82.56 ± 30.14）mm^3，而空病毒治疗组和生理盐水治疗组分别为（146.50 ± 57.07）mm^3 和（186.86 ± 75.74）mm^3，前者和后两者相比较具有非常明显差异（$P < 0.01$）。以后随着时间的推移，种植瘤有长大的趋势，但在 12 d 处死裸鼠后取出人胆管癌标本体积分别为（92.31 ± 28.31）mm^3、（288.86 ± 113.13）mm^3 和（344.86 ± 113.87）mm^3（图 1），重组腺病毒治疗组较其他两组仍具有明显差异（$P < 0.01$），说明重组腺病毒的作用在 6 d 左右出现最大效应，其作用可持续到 12 d。提示重组腺病毒能明显抑制了人胆管癌的生长，对裸鼠种植性人胆管癌具有治疗作用。



A：重组腺病毒治疗组；B：空病毒治疗组；C：生理盐水治疗组

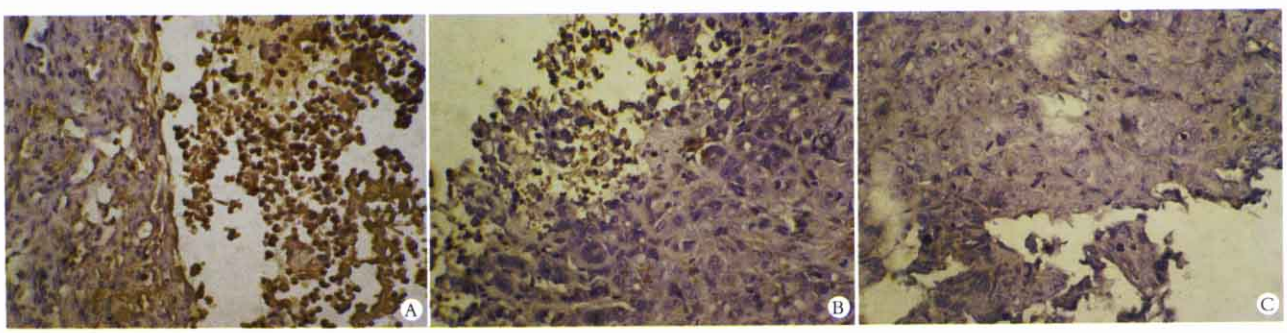
图 1　裸鼠皮下种植性人胆管癌标本肉眼观察

2.2　含凋亡素基因腺病毒对裸鼠种植性人胆管癌生长的影响

我们在 12 d 时断颈处死裸鼠并称种植瘤质量，重组腺病毒治疗组的种植瘤质量为（83.43 ± 21.74）mg，而空病毒治疗组为（263.46 ± 118.22）mg，可看出含凋亡素基因腺病毒能明显抑制人种植性胆管癌的生长（$P < 0.01$），在第 12 天的抑瘤率为 72.10%，与空病毒治疗组（11.9%）相比有明显差异（$P < 0.01$），提示凋亡素对裸鼠种植性人胆管癌具有治疗作用。

2.3　含凋亡素基因腺病毒对种植性人胆管癌作用效果的观察

运用 TUNEL 染色结果显示：含凋亡素基因腺病毒感染裸鼠种植性人胆管癌后能引发大面积的胆管癌细胞凋亡，此时细胞结构消失，代之以棕色的碎片状结构，并且这种结构开始渗入正常的胆管癌组织中。而空病毒治疗组仅能诱发少量的细胞凋亡，并且大量细胞只是表现为细胞的缩小，并不被染成棕色核，提示未凋亡。生理盐水治疗组仅表现为胆管癌组织因机械力量导致的组织分离，并未见细胞的凋亡。见图 2。综上所述，含凋亡素基因的腺病毒能通过引发种植性人胆管癌细胞的凋亡来抑制其生长。



A：重组腺病毒治疗组；B：空病毒治疗组；C：生理盐水治疗组

图 2　裸鼠皮下种植性人胆管癌瘤组织的 TUNEL 检测　（× 400）

2.4 含凋亡素基因腺病毒对裸鼠的毒副作用

在接受腺病毒注射治疗后到处死称取瘤质量期间，裸鼠进食量无变化，未见消瘦、体质量下降，裸鼠皮毛光泽度也不丢失。在第6天时观察到含凋亡素基因腺病毒注射组裸鼠的种植性瘤的生长较空病毒治疗组和生理盐水治疗组明显变慢。在整个过程中无1只裸鼠死亡。

3 讨论

有人提出肿瘤生长的原因不是肿瘤细胞的大量增殖的结果，而是肿瘤细胞凋亡抑制导致转化细胞的生存期限延长所致。正是基于此点，肿瘤的化疗和放疗就是通过诱导细胞的凋亡而起治疗作用。但是在临床实践中往往能观察到大量耐受现象的发生。目前的研究已证实。一些与细胞凋亡抑制有关的癌基因如：p53、Bcl-2和erbB2等，它们的表达产物能阻断或阻碍多种因素如：化疗药物、γ-射线等，诱导细胞的凋亡，使肿瘤获得耐受性。基于此点，如果一种新的治疗药物能突破这种局限，那它的疗效就会得到很好的保证。

凋亡素是来源于鸡贫血病毒的蛋白质，对它的深入研究表明它只引发肿瘤细胞和转化细胞的凋亡，而对正常细胞无此效应，并且对正常细胞无毒副作用[5]。同时发现凋亡素基因的转染对于p53基因高表达的细胞同样能导致明显的凋亡，说明凋亡素基因诱导的凋亡是不受p53基因影响的。那么将其运用于肿瘤的临床治疗其效果必然高于目前的放疗和化疗[6]。

Bcl-2是原癌基因，其过量表达可抑制凋亡，也是肿瘤耐药的主要原因之一。对凋亡素研究发现，即使Bcl-2过表达的细胞，凋亡素同样能诱导他们的凋亡[7]。而且Bcl-2的过表达不仅不抑制反而能促进凋亡素诱导骨肉瘤来源的SaoS-2细胞、白血病细胞和淋巴细胞的凋亡[8]，充分说明凋亡素独特的致凋亡特性。

目前在胆管癌的治疗上，治疗措施比较单一，加之其对放疗和化疗不敏感，所以治疗效果难尽人意。在对胆管癌标本的研究中发现其存在着自发性凋亡现象，并且凋亡与胆管癌的生物学行为密切相关。恶性程度高的凋亡率偏低[9]，说明在胆管癌的发生过程中高的凋亡率能使胆管癌向良性方向发展。那么运用基因工程技术将外来基因——促凋亡基因导入胆管癌中能起到治疗作用就顺理成章了，而且QBC_{939}细胞株也存在自发性凋亡，虽然存在凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达，但并不影响凋亡素的功能，反而能促进其致凋亡活性，更好地起到治疗作用。

综上所述，凋亡素引发肿瘤和转化细胞的凋亡是不受p53、Bcl-2基因干扰的，那么将它应用到肿瘤的治疗上其疗效能得到充分的保证，它的凋亡效应将远远高于放疗和化疗。我们前期已经发现凋亡素基因的转染可以导致胆管癌细胞的凋亡，由于受到转染效率的影响，其对胆管癌的凋亡效应并不高，不能起到治疗作用[10]，所以我们构建了含凋亡素基因的腺病毒来观察它对胆管癌是否具有作疗作用。结果提示在一次剂量后第6天开始发挥作用，在12 d时其抑瘤率达到72.10%，能明显地抑制种植瘤的生长。可以推测，如果每1周注射1次含凋亡素基因腺病毒，同时再提高病毒含量，那么在有限的时间内肉眼就可能无法观察到肿瘤的大小。但是否能治愈胆管癌，还需进一步的研究。

我们在整个动物实验过程中未见到明显的毒副作用，说明腺病毒的运用是安全有效的。目前腺病毒为载体进行基因治疗已经开始应用于临床了，吴沛宏等[11]构建了含p53基因的腺病毒并运用它来治疗临床上的晚期肿瘤患者。它采用介入手段将腺病毒注射到肿瘤的血管中，只观察到流感样等轻微症状，患者并未出现肝、肾、心等脏器的受损，并且没有出现与腺病毒剂量相关的毒副作用。与同期的化疗患者相比，明显优于化疗患者。提示腺病毒为载体的基因治疗在临床运用的前景是乐观的。那么应用含凋亡素基因的腺病毒来治疗胆管癌相信能取得令人鼓舞的效果。

参考文献：

[1] Rohn J L, Noteborn M H. The viral death effector Apoptin reveals tumor-specific processes[J]. Apoptosis, 2004, 9(3): 315-322.

[2] 陈 健，李大江，王曙光. 凋亡素基因重组腺病毒的构建[J]. 消化外科, 2006, 5(4): 269-273.

[3] 雷 新，韩本立. Tuftsin的合成及对裸鼠胆管癌模型的作用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 75-77.

[4] 李 立，吴沛宏，黄嘉凌，等. 重组人内皮抑素腺病毒抑制肝癌裸鼠移植瘤生长[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(9): 542-545.

[5] Alvisi G, Poon I K, Jans D A. Tumor-specific nuclear targeting: promises for anti-cancer therapy? [J]. Drug Resist Updat, 2006, 9(1-2): 40-50.

[6] Maddika S, Mendoza F J, Hauff K, *et al*. Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(1): 10-19.

[7] Burek M, Maddika S, Burek C J, *et al*. Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent[J]. Oncogene, 2006, 25(15): 2213-2222.

[8] Heilman D W, Green M R, Teodoro J G. The anaphase promoting complex: a critical target for viral proteins and anti-cancer drugs[J]. Cell Cycle, 2005, 4(4): 560-563.

[9] 张丰深，何振平，马宽生，等. 胆管癌组织中自发性细胞凋亡现象的研究[J]. 中国肿瘤临床, 2002, 29(6): 381-383.

[10] 陈 健，王曙光. 凋亡素基因转染对人胆管癌细胞凋亡作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(15): 1593-1595.

[11] 吴沛宏，罗彗玲，刘然义，等. 介入导向下AD-p53基因治疗晚期恶性肿瘤的临床安全性初步观察[J]. 癌症, 2001, 20(1): 57-60.

（编辑 龙 亮）