维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0302－03

脂质体－c－raf－1 反义寡核苷酸治疗人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤

吴永忠[1]，任庆兰[2]，李少林[2]

(1.重庆医科大学临床学院肿瘤科，重庆 400016；2.重庆医科大学核医学教研室，重庆 400016)

【摘 要】目的：探讨 c－raf－1 反义寡脱氧核苷酸(ASODN)对人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤的治疗作用。方法：将 15 只裸鼠建立人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤模型，然后随机分成 3 组予以不同条件处理：对照组(腹腔注射转染液和脂质体)、正义治疗组(腹腔注射脂质体－c－raf－1－SODN)、反义治疗组(腹腔注射脂质体－c－raf－1－ASODN)。治疗期间定期观测裸鼠体重并测量肿瘤体积，计算抑瘤率及肿瘤缩小率。结果：反义治疗组与正义治疗组的抑瘤率分别为 68.1％和 6.8％，反义治疗组肿瘤缩小率为 16.7％，与正义治疗组相比较有明显的差别。各组裸鼠体重变化无明显差别。结论：脂质体－c－raf－1－ASODN 对人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤有一定的治疗价值，可能成为日后基因治疗的重要方向。

【关键词】反义寡脱氧核苷酸；c－raf－1 基因；人卵巢上皮癌；裸鼠皮下移植瘤

【中国图书分类法分类号】R730.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－10－09

Effect of liposome－c－raf－1 antisense oligodeoxynucleotides on human ovarian carcinoma transplanted subcutaneously in nude mice

WU Yongzhong, et al

(*Department of Oncology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of c－raf－1 antisense oligodeoxynucleotides (ASODN) treatment in the human ovarian epithelial cancer transplanted subcutaneously in nude mice. *Methods*: The models of human ovarian epithelial cancer transplanted subcutaneously were established in 15 nude mice, then divided randomly into 3 groups and different treatment were given respectively (control group, senseexperimental group and antisense experimental group). The weight of nude mice and tumor volume were observed, the tumor growth inhibitory rate and the tumor response rate calculated, too. *Results*: The growth inhibitory rate in sense experimental group and antisense experimental group were 6.8% and 68.1%, respectively, the tumor response rate of antisense experimental group was 16.7%. There was no statistical difference in nude mice weight among the 3 groups. *Conclusion*: The results suggest that there is a positive value in the human ovarian epithelial cancer transplanted subcutaneously in nude mice treated by c－raf－1 antisense oligodeoxynucleotides, which will be an important gene therapeutic strategy for the ovarian epithelial carcinoma in the future.

【Key words】Antisense oligodeoxynucleotides; c－raf－1 gene; Ovarian epithelial carcinoma; Tumor transplanted subcutaneously in nude mice

卵巢癌是严重威胁妇女健康的恶性肿瘤，据报道美国每年新发病例达到 23,000 例左右，5 年生存率不到 30％[2]，有作者指出生物学治疗在卵巢癌的治疗中将起到关键性的作用[3]，而肿瘤反义基因治疗技术又成为其中的热点之一[4,5]。选用靶向于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)介导的肿瘤信号转导系统(signal transduction system)上的其中的一个关键基因 c－raf－1 的反义寡脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)治疗 EGFR 高表达的人卵巢上皮癌细胞株 $SKOV_3$[6]的裸鼠皮下移植瘤，以观察其对皮下移植瘤治疗作用。

作者介绍：吴永忠(1968－)，男，副教授，博士，
主要研究方向：肿瘤放疗敏感性与基因治疗研究。

1 材料与方法

1.1 材料

$SKOV_3$ 细胞株购自重庆医科大学基础医学院肿瘤研究室。阳离子脂质体(Lipofectin)购自 Sigma 公司。BALB/C 遗传背景的裸鼠购自四川抗生素研究所并由重庆医科大学实验动物中心饲养。c－raf－SODN(正义寡脱氧核苷酸)序列为 5'－AATGCATGTCACAGGCGGGA－3'，c－raf－

维普资讯 http://www.cqvip.com

1ASODN 序列为 5' - TCCCGCCTGTGACATGCATT - 3'[7])。所有 SODN 与 ASODN 均由上海生物工业公司合成并全部经硫代磷酸化修饰。RPMI - 1640 培养基、小牛血清为 Hyclone 产品。

1.2 细胞培养与裸鼠皮下移植瘤模型建立

$SKOV_3$ 细胞在 37℃、5% CO_2 条件下，在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中培养。将处于对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶消化后，制成 2×10^7/ml 的细胞悬液备用。本研究选用裸鼠共 15 只(每组 5 只)均为 4～6 周龄雌鼠，体重 17.5～22.5g，每只裸鼠 1 个注射点位于背侧靠左后肢处，每点接种细胞数 4.0×10^6 个。接种后每天观察注射点有无破溃红肿，按规定时间测量肿瘤体积大小和裸鼠体重。

1.3 腹腔注射

皮下接种 15 天后，15 只荷瘤裸鼠被随机分成 3 组，每组 5 只。称重并测量瘤体大小，然后根据不同组别进行腹腔注射：Ⅰ组，正常对照组，lipofectin 10μg + 转染液(无血清无抗生素培养液)总量 600μl；Ⅱ组，c - raf - 1 SODN 40μg + lipofectin10μg + 转染液总量 600μl；Ⅲ组，c - raf - 1 ASODN 40μg + lipofectin 10μg + 转染液总量 600μl。以后每隔 5 天注射 1 次共 3 次。腹腔注射前，脂质体先溶于转染液中室温静置 45min 再与寡核苷酸混合包裹并室温静置 15min。

1.4 瘤体测量

用游标卡尺测量瘤体最长径(a)与最短径(b)，肿瘤体积为 $V(mm^3)=\frac{\pi ab^2}{6}$，抑瘤率 $=\frac{V_{对}-V_{观}}{V_{对}}\times100\%$[8]。肿瘤缩小率 $=\frac{V_{治疗前}-V_{治疗后}}{V_{治疗前}}\times100\%$。第 1 次腹腔注射第 0 天、第 5 天、第 10 天、第 15 天均要称重并测量瘤体大小。

1.5 统计分析

采用 t 检验和 χ^2 检验

2 结 果

所有 15 只裸鼠均成活并有肿瘤形成，接种点无红肿破溃表现。治疗前各组裸鼠体重及肿瘤体积无差别。

随着治疗时间的延长，各组肿瘤体积及抑瘤率的差别逐渐显现出来。从表 1 可以看出，Ⅰ与Ⅱ组的肿瘤体积进行性长大，Ⅲ组的肿瘤体积进行性缩小，与对照组有明显的区别。反义组疗效较好，在治疗结束后，抑瘤率与肿瘤缩小率分别为 68.1% 与 16.7%，差异有极显著性($P<0.01$)，见表 1～3。

不同时间裸鼠体重比较无差别，见表 4。

表 1 不同治疗时间肿瘤体积(mm^3)比较

组别	不同治疗时间(d)			
	0	5	10	15
Ⅰ	123.0±24.5	160.7±40.8	225.1±71.1	321.4±67.1
Ⅱ	116.3±20.6	146.5±39.2[c]	199.0±66.3[c]	297.1±59.8[c]
Ⅲ	122.8±25.9	120.5±41.9[a]	110.4±24.1[b]	102.6±34.7[b]

[a] $P<0.05$ [b] $P<0.01$ [c] $P>0.05$

表 2 不同不治疗时间抑瘤率比较

组别	不同治疗时间(d)		
	5	10	15
Ⅰ	—	—	—
Ⅱ	5.7%	9.7%	6.8%
Ⅲ	25.0%	51.0%	68.1%

表 3 各观察组治疗前后抑瘤缩小率比较

组别	治疗前体积	治疗后体积	肿瘤缩小率
Ⅱ	116.3±20.3	297.1±59.8	—
Ⅲ	122.8±25.9	102.6±34.7	16.7%

表 4 治疗前后裸鼠体重变化

组别	裸鼠体重(g)	
	治疗前	治疗后
Ⅰ	20.1±1.2	21.5±1.3
Ⅱ	19.7±1.0	20.9±1.4
Ⅲ	19.0±1.3	20.5±1.3

3 讨 论

3.1 研究表明[9]，表皮生长因子受体(EGFR)在许多恶性肿瘤中呈高表达，并与肿瘤的发生、转移、预后等有密切关系。通过反义调控技术，封闭有害基因，使其不表达或低表达，以干预 EGFR 介导的信号转导系统上的不正常的信号转导，逆转肿瘤恶性表型，从而达到抑制肿瘤生长的目的。c - raf - 1 可被 ras 基因激活之外还存在独立的激活途径：可被酪氨酸激酶 src 与 JAK_1、蛋白激酶 C_α、神经酰胺活化的蛋白激酶等激活。因而 c - raf - 1 是 EGFR 介导的信号转导系统上的关系基因之一[7]，c - raf - 1 是理想的基因治疗靶点。c - raf - 1 在信号转导系统上的位置见图 1。

本文首次针对 c - raf - 1 基因采用反义调控技术，在体内观察它对人卵巢癌 $SKOV_3$ 细胞裸鼠皮下移植瘤的治疗作用。寡核苷酸经硫代磷酸化修饰后可明显增强其核酶稳定性。阳离子脂质体与寡核

维普资讯 http://www.cqvip.com

苷酸片段通过静电吸引力结合，使其包裹率达100%，脂质体通过与细胞的融合和内吞作用将寡核苷酸导入细胞内，大大提高了细胞内的浓度。脂质体包裹的寡核苷酸避免了与核酶的直接接触进一步提高了寡核苷酸的稳定性。

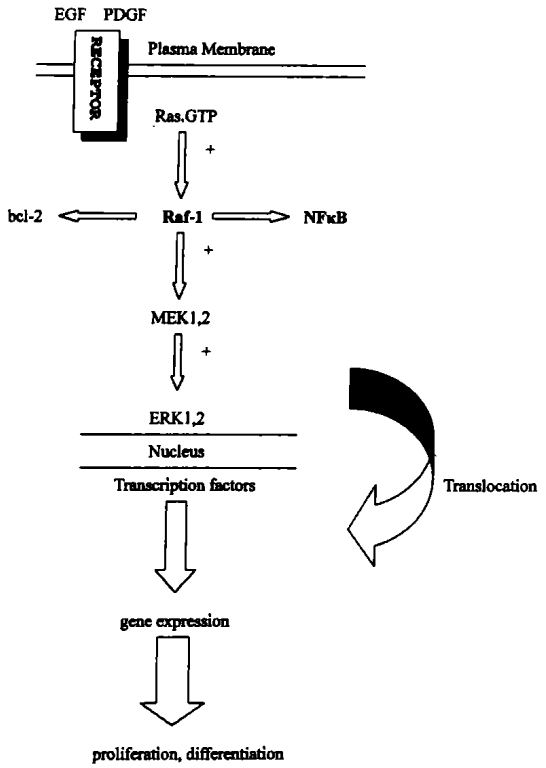


Fig1. Raf－1 in the Ras－Mapkinase signaling pathway[7]

3.2 反义寡核苷酸的作用机制，目前还未完全明确。可能有三方面的作用[10]：ASODN 与翻译起始位点杂交形成稳定的双链结构阻碍翻译起始；ASODN 与 RNA 通过碱基互补形成 RNA－DNA 双链，其中 RNA 部分可被 RNaseH 酶切割降解；非特异性与非反义效应。目前对于反义机制研究的热点是 RNA 干扰(RNAi)。

研究中选用的 c－raf－1ASODN 是与 c－raf－1mRNA 3'端非编译区互补"[7]。本组资料显示，反义治疗组与正义治疗组的抑瘤率及肿瘤缩小率有显著性差异，反义治疗组治疗效果更好，SODN 对皮下移植瘤也有轻微的治疗作用，这是由于寡核苷酸本身具有的非特异性非反义效应所致[10]。所用阳离子脂质体 lipofectin 与脱氧寡核苷酸的比例为 1∶4，是经过反复的摸索而得出的结论，与最近 Kim[11]的报道相符。本研究采用 c－raf－1ASODN 经阳离子脂质体 lipofectin 包裹采用腹腔注射治疗人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤的方法尚未有相关的文献报道。

3.3 ASODN 抑制异常表达基因的同时，不存在外源基因整合到宿主细胞 DNA 分子中的过程；往往只有肿瘤细胞才有这种异常基因的高表达，故反义基因治疗本身就有一定的靶向性；脂质体用量小对细胞的毒副作用小，为了排除脂质体的干扰，对照组也给予了等剂量的脂质体。本组资料中各组裸鼠体重没有明显减轻，表明 ASODN 治疗具有一定的安全性。

参 考 文 献

[1] Wadler S. New developments in treatment of ovarian cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2001; 10(6): 1167－1172.

[2] Harries M, Kaye SB. Recent advances in the treatment of epithelial ovarian cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2001; 10(9): 1715－1724.

[3] Ozols, Robert F. Future directions in the treatment of ovarian cancer[J]. Semin Oncol, 2002; 29(1 suppl): 32－42.

[4] Guha C, Guha U, Tribius S, et al. Antisense ATM gene therapy: a strategy to increase the radiosensitivity of human tumors[J]. Gene Ther, 2000; 7(10): 852－858.

[5] Pietras K, Ostman A, Sjioquist M, et al. Inhibition of platelet－derived Growth Factor Receptor reduces interstitial hypertension and increase transcapillary transport in tumor[J]. Cancer Res, 2001; 61: 2929－2934.

[6] King Bl, Carter D, Foellmer HG, et al. Neu proto－oncogene amplification and expression in ovarian adenocarcinoma cell lines[J]. Am J pathol, 1992; 140: 23－31.

[7] O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Gallagher M, et al. C－raf－1 depletion and Tumor Responses in Patients Treated with the C－raf－1 Antisense oligodeoxynucleotide IsIs5132 (CGP 68936A)[J]. Clin Cancer Res, 1999; 5(12): 3977－3982.

[8] 沈 梅，丰有吉，周先荣，等. 脂质体－c－erbB－2 反义寡核苷酸对人卵巢上皮癌裸鼠皮下移植瘤的作用[J]. 现代妇产科进展, 1998; 7(4): 314－316.

[9] Eppenberger Castori S, Kueng W, Benz C, et al. Prognostic and predictive significance of erbB－2 breast tumor levels measured by enzyme immunoassay[J]. J clin oncol, 2001; 19(3): 645－656.

[10] Marcusson EG, yacyshyn BR, shanahan WJ, et al. Preclinical and clinical pharmacolgy of antisense oligonucleotides [J]. Mol Biotechnol, 1999; 12(1): 1－11.

[11] Kim CK, Haider KH, Choi CU. Nonviral vector for efficient gene transfer to human ovarian adenocarcinoma cells. Gyneol Oncol, 2002; 84(1): 85－93.