DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.004
第26卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 5
382 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)05-0382-04

# 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

冯 岗,赵忠全,王东林 (第三军医大学新桥医院肿瘤科,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 研究尤文氏肉瘤 EWS-FLI-1 融合蛋白的特异结合序列与 DTA 基因融合后的表达及对尤文肉瘤细胞的杀伤作用,为肿瘤基因治疗探索新的治疗方法。方法 构建含有 EWS-FLI-1 特异结合序列和白喉毒素 A 链基因的表达载体 pS2-DTA。转染尤文肉瘤细胞以及对照细胞后检测 DTA 表达及其对细胞的杀伤作用。结果 表达载体 pS2-DTA 在尤文肉瘤细胞系中高表达并产生强烈的杀伤作用。结论 pS2-DTA 可以对尤文肉瘤细胞产生选择性杀伤作用,抑制其生长,对尤文肉瘤的治疗有潜在的应用价值。

关键词:尤文肉瘤;融合基因;白喉毒素 A 链(DTA);基因治疗
中图法分类号:Q781;R394-33;R730.262 文献标识码:A

# Construction of an Ewing's sarcoma specific expression vector of diphtheria toxin and observation of the killing effect on cultured Ewing's sarcoma cell line

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

**Abstract:** **Objective** To construct an expression vector containing Ewing's sarcoma EWS-FLI-1 specific binding sequence and diphtheria toxin A chain (DTA) gene sequence to investigate the killing effect of DTA on cultured Ewing's sarcoma cells so as to provide proof for the exploration of new methods for gene therapy for cancer. **Methods** Expression vector (pS2-DTA) containing EWS-FLI-1 specific binding sequence and DTA gene sequence was constructed by replacing the luciferase gene in pS2 with DTA gene at the points of *Nco* Ⅰ and *Xba* Ⅰ by molecular technique. After transfection of pS2-DTA into Ewing's sarcoma cells and the control cells, DTA expression and its killing effect on cells were detected. **Results** pS2-DTA was highly expressed in Ewing's sarcoma cell line, and the killing effect of DTA was much higher than that in the control cells. **Conclusion** pS2-DTA has selective killing effect on Ewing's sarcoma cells and can inhibit the growth of Ewing's sarcoma cells. So pS2—DTA has potential value in the treatment of Ewing's sarcoma.

**Key words:** Ewing's sarcoma; fusion gene; diphtheria toxin A chain; gene therapy

肿瘤基因治疗是目前较为活跃的研究领域,近年进展迅速。利用基因工程技术把天然毒素受体区基因替换为抗体或细胞因子基因,制备出了许多具有特异靶向作用的新毒素分子。与天然毒素分子相比它们具有选择性识别、杀伤过量表达某种分子的肿瘤细胞,而对正常细胞的损害减少到最小[1]。白喉毒素(diphtheria toxin, DT)由于其强大的细胞毒性作用因而倍受关注。它是由 535 个氨基酸残基组成的可分泌型蛋白,在胰蛋白酶作用下可以降解为 A(1-193 残基)、B(194-535 残基)片段[2],起杀伤作用的是 A 片段。白喉毒素 A 片段通过阻止链延长因子 2(elongation factor 2, EF-2)在核糖体内促进多肽链延长,而抑制蛋白质合成造成细胞死亡[3]。

95%的尤文肿瘤家族(Ewing family of tumor, EFT)具有特异性的 t(11;22)(q24;q12)染色体易位[4],形成的 EWS-FLI1 融合基因,是尤文肿瘤家族发生、进展的主要原因[5],也是诊断、预后的标志物[6]。EWS-FLI-1 是一个比正常细胞的 FLI-1 活性强许多倍的新转录因子,而且可以与一段特异基因结合[7]。Mao 等[2]确定,ACCGGAAGT 基因序列是 FLI-1 的最佳结合序列。Rachel 等[5]把该结合序列插入到虫荧光素酶报告质粒中,转染到 7 种不同尤文肉瘤细胞系及对照细胞,检测

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100189)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100189)
作者简介:冯 岗(1973-),男,四川省彭州市人,硕士研究生,主要从事软组织恶性肿瘤基因治疗方面的研究。现在四川省绵阳市中心医院,电话:(0816)2223315
通信作者:王东林,电话:(023)68774622
收稿日期:2003-03-31;修回日期:2003-12-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

荧光强度, 证实所有尤文肉瘤细胞系的荧光强度都比对照组有显著升高($P<0.01$)。

本研究中, 我们构建了含有 ACCGGAAGT 基因序列的 DTA 表达载体 pS2-DTA。转染细胞后显示, DTA 尤文肉瘤细胞中高表达, 该表达载体具有特异性杀伤尤文肉瘤细胞的作用。我们的研究也为肿瘤基因治疗提供了新的思路。

## 1　材料和方法

### 1.1　材料

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。尤文肉瘤细胞 RD-ES、SK-ES 奥地利 Kovar 教授惠赠, 对照 NIH3T3 细胞、工程菌 DH5α 由新桥医院肿瘤中心朱波博士惠赠, 对照 Hela 细胞由新桥医院肿瘤中心王卫东博士惠赠。限制性内切酶 *NCO* Ⅰ、*Xba* Ⅰ 购于 NEW England 公司, λDNA/ *Eco*R Ⅰ + *Hind* Ⅲ Marker(125、564、831、947、1 375、1 584、1 904、2 027、3 530、4 268、4 973、5 148、21 227 bp)购于华美生物工程公司, 胶回收试剂盒、DTAP Liposomal Transfection Reagent、In situ cell death detection kit 购于 ROCH 公司, 质粒小量提取试剂盒、$T_4$DNA 连接酶购于 promega 公司, 白喉 A 链单克隆抗体购于吉泰公司, HistostainTM-Plus 免疫组化试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。

### 1.2　方法

1.2.1　DTA 表达载体的构建及鉴定　质粒 pS2 和 pIBI30-DTA 分别用 *NCO*Ⅰ、*Xba*Ⅰ进行双酶切, 电泳后切下目的片段, 按胶回收试剂盒说明进行回收。在 $T_4$DNA 连接酶的作用下, 用 DTA 片段取代 pS2 中的虫荧光素酶基因, 构建质粒 pS2-DTA(图 1)。转化工程菌 DH5α 后, 挑取单个克隆进行质粒小量提取, 再用 *NCO*Ⅰ、*Xba*Ⅰ进行双酶切验证, 并且由上海生工公司测序验证。

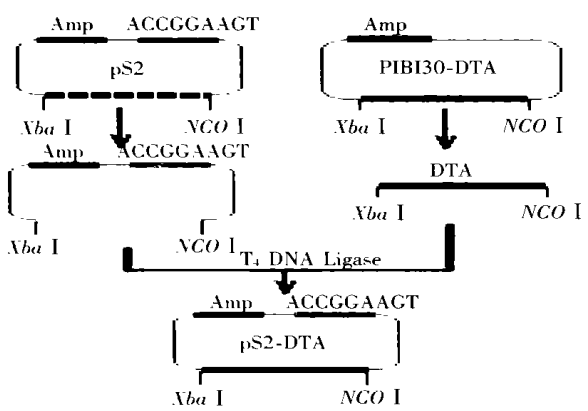



图 1　pS2-DTA 构建过程

**Fig 1　Construction of pS2-DTA**

1.2.2　细胞培养及脂质体转染　在研究中分为试验组(尤文肉瘤 RD-ES、SK-ES 细胞)以及对照组(Hela、$NIH_3T_3$ 细胞), 二者在含 10%小牛血清的 1640 培养液, 于 37 ℃, 5%$CO_2$, 饱和湿度下培养。转染前 1 天, 在 12 孔培养板内以 $1\times10^5$ 的密度接种细胞到多聚赖氨酸处理后的盖玻片上, 每种细胞作 3 个复孔。待细胞长到 70%～80%融合时, 以含 0.5 μg pS2-DTA、2.5 μl DOTAP 和 1 ml 1640 培养液进行混合转染。另取一个 12 孔培养板作为质粒的阴性对照组, 仅给予 2.5 μl DOTAP 和 1 ml 1640 培养液。4 h 后全部用 1 ml 新鲜的 1640 培养液取代。

1.2.3　DTA 表达的免疫组织化学检测　转染后 48 h, 弃培养液, PBS 清洗, 95%乙醇固定 10 h, PBS 清洗, 3% $H_2O_2$ 浸泡 10 min, 正常羊血清封闭 20 min, 1∶100 稀释的鼠抗 DTA 单克隆抗体溶液, 湿盒中 4 ℃下孵育过夜。第 2 天用 PBS 清洗标本, 滴加生物素化二抗工作液, 室温孵育 15 min, PBS 清洗, 再滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液, 室温孵育 15 min, PBS 清洗 DAB 显色, 自来水冲洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。用柯达 200 D 感光片进行拍照记录。

1.2.4　原位细胞凋亡检测　细胞培养及转染的剂量、方法同上。转染后 48 h, 弃细胞培养基, PBS 清洗, 4%多聚甲醛在 15～25 ℃下固定 1 h, PBS 清洗, 0.1% TritonX-100 在 2～8 ℃中浸泡 2 min, 根据试剂盒说明配制 500 μl TUNEL 反应液。加 50 μl TUNEL 反应液到细胞上, 置于湿盒中 37 ℃孵育 1 h, PBS 清洗, 载玻片上加 1 滴 PBS, 放上培养细胞的盖玻片, 打开荧光显微镜在发射光为 450～500 nm 吸收光为 515～565 nm 的条件下观察并且照相, 阳性部位为绿色荧光。

1.2.5　细胞存活率比较　在 24 孔培养板内以 $1\times10^4$ 接种上述细胞, 转染方法同上。转染后 1～6 d 消化细胞、记数, 绘制生长曲线。转染后 96 h, 取 9 滴细胞悬液、1 滴 0.4%台盼蓝进行拒染试验, 计算细胞存活率。

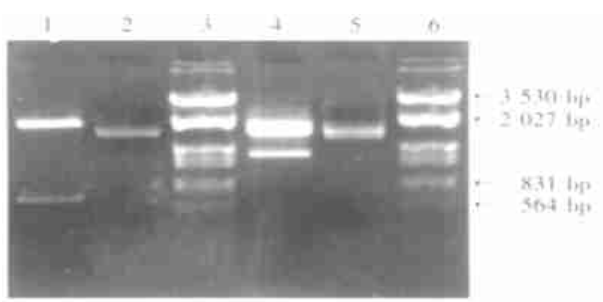
### 1.3　统计学分析

数据用 SPSS11.0 软件进行统计分析, 组间行配对 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　质粒鉴定

pS2、pIBI30-DTA 经 *NCO*Ⅰ、*Xba*Ⅰ双酶切后, 分别得到3 357 bp 的载体片段及 579 bp 的 DTA 片段, 图 2。二者在 T4DNA 连接酶作用下, 构建的新质粒 pS2-DTA 再次经 *NCO*Ⅰ、*Xba*Ⅰ双酶切证实, 含有 DTA 片段和载体片段, 图 3。上海生工公司的测序结果与 Maxwell 教授提供的 DTA 基因序列完全相同, 同时在其上游检测到特异结合序列 ACCGGAAGT。

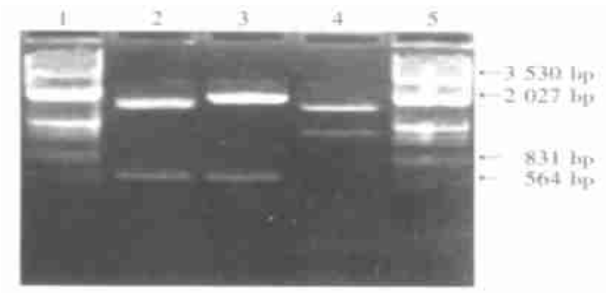



1 and 4: λDNA/ *Eco*R Ⅰ + *Hind* Ⅲ marker (125, 564, 831, 947, 1 375, 1 584, 1 904, 2 027, 3 530, 4 268, 4 973, 5 148, and 21 227 bp); 2: Plasmid pS2; 3: pS2 digested by *NCO*Ⅰ and *Xba*Ⅰ; 5: Plasmid pIBI30-DTA; 6: pIBI30-DTA digested by *NCO*Ⅰ and *Xba*Ⅰ

图 2　pS2、pIBI30-DTA 酶切电泳图

**Fig 2　Electrophoregram of the digestion of pS2 and pIBI30-DTA**

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net




1 and 5: λDNA/ *Eco*RⅠ + *Hind* Ⅲ marker (125, 564, 831, 947, 1 375, 1 584, 1 904, 2 027, 3 530, 4 268, 4 973, 5 148, and 21 227 bp); 2: $pS_2$ digested by *NCO*Ⅰ and *Xba*Ⅰ; 3: PIBI30-DTA digested by *NCO*Ⅰ and *Xba*Ⅰ; 4: $pS_2$-DTA digested by *NCO*Ⅰ and *Xba*Ⅰ

图3 pS2-DTA 酶切鉴定图

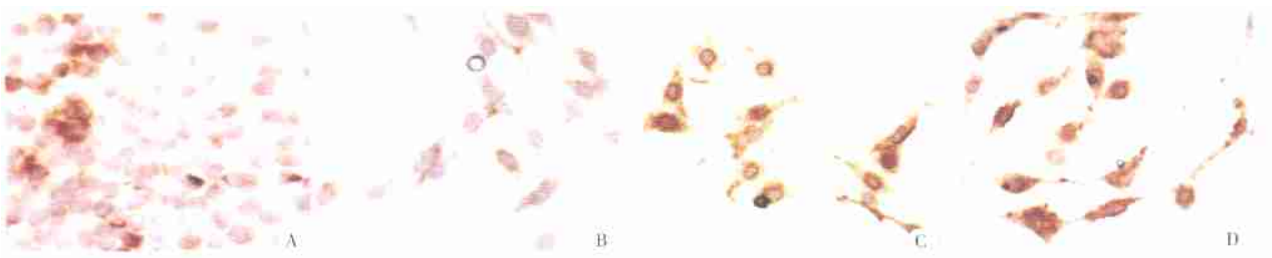
**Fig 3 Digestion of pS2-DTA**

### 2.2 转染 pS2-DTA 后, DTA 表达的检测

由免疫组化结果, 见图 4。可以看出转染 pS2-DTA 后阳性细胞都是胞浆染棕色, 以近细胞核周围更显著, 尤文肉瘤细胞染色的阳性率(RD-ES, 73%和 SK-ES, 69%)显著高于对照细胞(Hela, 15%和 $NIH_3T_3$, 17%), 而且阳性部位染色深。

### 2.3 DTA 对细胞的杀伤作用

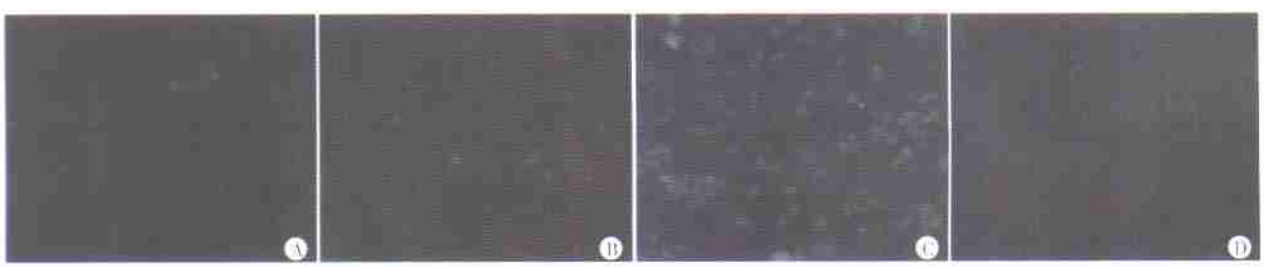
尤文肉瘤细胞转染 pS2-DTA 后, 分裂相少见、生长缓慢而且有较多的皱缩、溶解细胞, 发生调亡细胞的数量比对照细胞多, 见图 5。尤文肉瘤细胞的存活率(RD-ES, 23%; SK-ES, 17%)明显比对照细胞(Hela, 80%; NIH3T3, 85%)低($P<0.01$)。细胞生长曲线, 见图 6, 可以看出, Hela、NIH3T3 细胞经短暂的抑制后迅速进入对数生长期, 而 RD-ES、SK-ES 细胞的生长显著受抑制, 直到第 6 天还没有恢复。此结果表明, pS2-DTA 对尤文肉瘤细胞有特异性杀伤作用, 而对照细胞中这种杀伤作用明显降低。




A: Hela cell; B: NIHST3 cell; C: RD-ES cell; D: SK-ES cell

图 4 白喉毒素 A 链表达的免疫组织化学检测 (S-P× 400)

**Fig 4 Expression of DTA by immunohistochemistry** (S-P×400)




A: Hela cell; B: NIHST3 cell; C: RD-ES cell; D: SK-ES cell

图 5 TUNEL 法原位凋亡检测结果

**Fig 5 Detection of cell death by TUNEL method**

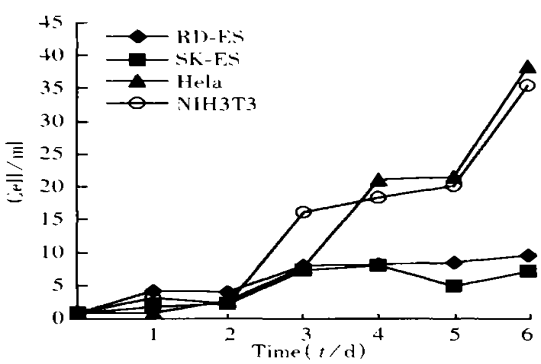



图 6 转染 pS2-DTA 细胞生长曲线(单位 $1\times 10^4$)

**Fig 6 Cell growth curve after transfection of pS2-DTA**

## 3 讨论

生物毒素, 如白喉毒素、假单胞菌外毒素、蓖麻毒素及眼镜蛇毒素等, 由于其强大的细胞毒作用而受到关注, 近年来已开始用于恶性肿瘤治疗研究[3]。众多生物毒素中, DT 是应用较多的一种[8]。利用 DTA 片段于不同载体结合就可以拼接成各种免疫毒素, 能对表达一些特异性受体或蛋白的细胞产生杀伤作用, 尤其是一些肿瘤细胞[9]。但免疫毒素存在以下缺陷: ①免疫毒素为蛋白产物, 机体会产生抗免疫毒素抗体。②免疫毒素在作用于肿瘤细胞之前, 对正常组织特别是重要脏器血管内皮细胞(静脉给药)造成损伤, 导致

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

血栓形成和出血等[4]。③由于肿瘤细胞缺乏特异性抗原等原因, 免疫毒素对肿瘤的特异性相对较差。如何使 DT 等生物毒素基因在肿瘤细胞特异、高效地表达是生物毒素靶向基因治疗的关键。一些恶性肿瘤特征性的染色体易位形成的融合基因, 为开展生物毒素靶向基因治疗提供了重要线索[10]。

本研究中, 我们在 DTA 基因上游插入尤文肉瘤 EWS-FLI-1 的特异结合序列, 构建了一个新的 DTA 表达载体, 酶切和基因测序结果证实该载体构建与试验设计一致。脂质体是一种人工制备的携有双层包膜的磷脂质小囊, 可作为各类治疗药剂的人工膜和赋形剂, 目前广泛用于细胞的转染。无论对悬浮还是贴壁细胞, 脂质体的转染效率都是比较高的, 据记载较其他方法高 10 倍以上[11]。脂质体法转染还具有重复性好、不含其他离子和操作方便以及可以通过多种途径给药(静脉注射、肌肉注射、腹腔注射及靶区注射)的优点。用脂质体把 pS2-DTA 转入细胞后发现, 尤文肉瘤细胞的 EWS-FLI-1 特异性地识别了结合序列, 并促进下游 DTA 高表达。

免疫组化染色可见: ①阳性部位胞浆染棕色, 以近胞核处更显著, 说明白喉毒素 A 链蛋白表达在胞浆, 这与它在核糖体内发生作用的特点一致。②尤文肉瘤细胞的染色细胞数量多, 染色强度深, 说明, 转染 pS2-DTA 后 DTA 在尤文肉瘤细胞中高表达。DTA 高表达, 引起细胞死亡, 从而抑制生长。原位调亡检测结果表明, 在尤文肉瘤细胞中发生调亡的细胞数量显著高于对照细胞。台盼蓝拒染试验显示, 尤文肉瘤细胞存活率显著低于对照细胞($P<0.01$)。这两个结果相互印证, 共同说明 pS2-DTA 对尤文肉瘤细胞的杀伤作用显著强于对照细胞。细胞生长曲线进一步说明, 尤文肉瘤细胞的生长受到抑制, 直到第 6 天还没有进入对数生长期。我们认为 pS2-DTA 之所以选择性杀伤尤文肉瘤细胞, 可能是由于尤文肉瘤特异性的染色体易位形成 EWS-FLI-1 融合基因, 它产生的融合蛋白识别 DTA 基因上游的结合序列, 然后利用自身强大的转录活性使白喉毒素 A 链基因高表达。

参考文献:


[1] Panchal R G. Novel therapeutic strategies to selectively kill cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 1998, 55(3): 247—252.

[2] Mao X H, Miesfeldt S, Yang H, *et al*. The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoprotein display similar DNA binding specificities[J]. J Biol Chem, 1994, 269(27): 18216—18222.

[3] Wawzrynczak E J. Systemic immunotoxin therapy of cancer: advances and prospects[J]. Br J Cancer, 1991, 64(5): 624—630.

[4] Yu D, Chen D, Chiu C, *et al*. Prostate-specific targeting using PSA promoter-based lentiviral vectors[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(9): 628—635.

[5] Lin P P, Brody R I, Hame Lin A C, *et al*. Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma[J]. Cancer Res, 1999, 59(7): 1428—1432.

[6] Folpe A L, Hill C E, Parham D M, *et al*. Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: a study of 132 round cell tumors with emphasis on CD99-positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor[J]. Am J Surg Pathol, 2000, 24(12): 1657—1662.

[7] May W A, Lessnic S L, Braun B S, *et al*. The Ewing's sarcoma EWS-FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1[J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(12): 7393—7398.

[8] Kreitman R J. Immunotoxins in cancer therapy[J]. Curr Opin Immunol, 1999, 11(5): 570—578.

[9] Keppler H A, Brinkmann V, Pastan I. Role of caspases in immunotoxin-induced apoptosis of cancer cells[J]. Biochemistry, 1998, 37(48): 16934—16942.

[10] Hagihara N, Walbridge S, Olson A W, *et al*. Vascular protection by chloroquine during brain tumor therapy with Tf-CRM107[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 230—234.

[11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 82.


(编辑　张大春)

(上接 381 页)

## 3　讨论

慢性乙型肝炎病程长, 探讨治疗过程中病毒量的变化与干扰素的临床关系, 对深入研究乙型肝炎的临床过程和指导治疗有着重要意义。大多数患者(82.1%)血清 HBV-DNA 与 ALT 有关, 而仅少数患者血清 HBV-DNA 与 ALT 无关。即在 ALT 波动过程中, HBV-DNA 始终处于相对稳定水平[1]。有关干扰素应答和病毒含量相关的问题。国外学者认为两者密切相关[2]。本研究中, 治疗前病毒含量, 经治疗后显著下降, 且大多数患者在停药 6 个月仍能维持疗效。血清病毒含量与干扰素应答的关系显示: 病毒含量教低者, 其对干扰素的生化和病毒应答率均较高。研究结果支持干扰素应答和病毒含量相关的观点。

关键词: HBV-DNA; PCR; 干扰素; 肝损伤
中图法分类号: R393.21; R977.6　　文献标识码: B

参考文献:


[1] 杨　湛, 黄　海, 冼　超. 血清乙型肝炎病毒核酸定量检测与临床的关系[J]. 中华传染病杂志, 1999, 17(1): 52.

[2] Yamada G, Takatunt M, Kishi F, *et al*. Efficacy of interferon alfa therapy in chronic hepatitis C patients depends primarily on hepatiis C virus RNA level[J]. Hepatology, 1995, 22(5): 1351—1354.


(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net