DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.016
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1037-02

论著

反义hTR基因瘤内注射对荷瘤鼠肿瘤治疗作用的初步观察

杨金亮,房殿春,杨仕明,罗元辉,罗昆仑,鲁 荣 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察反义人端粒酶RNA(hTR)基因瘤内注射对荷瘤鼠肿瘤的治疗作用。方法 人胃癌细胞株SGC-7901裸鼠背部皮下接种,成瘤后于瘤内多点注射FuGENETM6/反义hTR表达质粒复合物,设FuGENETM6稀释液为对照,观察肿瘤生长情况和肿瘤组织学结构变化。结果 治疗组肿瘤生长速度明显减慢,治疗1月后瘤体较对照组小23%,瘤组织中的瘤细胞排列较稀疏并形成较多的腺样结构,显示有分化倾向。结论 反义hTR基因瘤内注射对荷瘤鼠肿瘤有一定的治疗作用,值得进一步研究。

关键词:胃癌;反义人端粒酶RNA;基因治疗
中图法分类号:R394.2;R73-362;R735.2 文献标识码:A

Preliminary observation on the effect of antisense hTR gene on tumor growth following intratumoral injection of plasmid DNA in mice

YANG Jin-liang, FANG Dian-chun, YANG Shi-ming, LUO Yuan-hui, LUO Kun-lun, LU Rong (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of antisense human telomerase RNA(hTR) gene on murine tumor growth following intratumoral injection of plasmid DNA. **Methods** Human gastic carcinoma cells SGC-7901 were inoculated subcutaneously to BALB/c nude mice and grew to tumor nodules in about 9 d. Multiple direct intratumoral injection of FuGENETM6/plasmid DNA complex was given and was compared with FuGENETM6 dilution groups. The growth of tumor was observed and the histopathological characteristics of tumor tissue were examined. **Results** The speed of growth of tumor treated with antisense hTR gene decreased by 23% as compared with the control group one month after treatment. Furthermore gland-like structure emerged in treated tumors. **Conclusion** Direct intratumoral injection of antisense hTR gene has certain therapeutic value and is worthy of further study.

Key words: gastric carcinoma; antisense hTR (human telomerase RNA components) gene; gene therapy

端粒酶(Telomerase)是近年来发现的一种最为广谱特异的肿瘤标志,与细胞永生化和肿瘤的发生发展有密切关系[1]。它是由起模板作用的RNA(Human telomerase RNA components, hTR)和起催化作用的蛋白质构成的一种特殊的逆转录酶,能合成染色体末端的端粒DNA重复序列以维持染色体的稳定和完整。我们将反义人端粒酶RNA(hTR)转染至人胃癌细胞系SGC-7901,发现转基因肿瘤细胞趋向分化,并丧失了在裸鼠体内的致瘤能力[2]。在此基础上,我们进一步探讨了反义hTR基因瘤内注射对荷瘤鼠肿瘤治疗作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株、动物及质粒

人中分化胃腺癌细胞系SGC-7901,常规培养于RPMI1640培养中[3]。BALB/c裸鼠,雌性,4周龄,购自第三军医大学实验动物中心。反义人端粒酶RNA真核表达载体(pCL-ahTR),其构建及图谱见文献[4]。

1.2 主要试剂

RPMI 1640培养基(Gibco),FuGENETM6(Roche),其余试剂均为分析纯或分子生物学专用。

1.3 质粒DNA的大量制备和纯化

采用碱裂解和聚乙二醇纯化法[5]。

1.4 荷瘤鼠制备及治疗观察

1.4.1 荷瘤鼠制备 消化收集对数生长期7901细胞,无血清RPMI1640培养液洗2次后,以2×10^7个细胞/ml重悬于无血清培养液中,于每只裸鼠(共3只)左右侧背部皮下注射4×10^6个细胞(0.2 ml),待肿瘤结节长至直径0.5 cm时开始治疗。

1.4.2 FuGENETM6/DNA混合物制备 取33 μl pCL-ahTR质粒DNA(约90 μg,2.76 μg/μl),加无血清培养液RPMI1640 67 μl稀释至0.5~2 μg/μl;另取180 μl FuGENETM6加入620 μl无血清培养液中混匀,然后加至已稀释好的DNA溶液或100 μl无血清RPMI1640中混匀,室温放置15 min。

1.4.3 治疗及效果观察 接种7901细胞9 d时,肿瘤结节已长至直径0.5 cm左右,于每只裸鼠左侧瘤内多点注射0.3 ml pCL-ahTR/FuGENETM6混合物(含质粒DNA 30 μg),右侧注射FuGENETM6稀释液作为对照,此后于首次治疗后第4、11、18、25天重复注射。治疗开始后每天观察记录肿瘤生长情况,每隔5 d用游标卡尺精确测量1次肿瘤最大面积处的长径和短径,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770302)
作者简介:杨金亮(1967—),男,山西省平顺县人,博士,主治医师,主要从事消化道肿瘤的免疫和基因治疗研究,发表论文10余篇。电话:(023)65180109
收稿日期:2001-08-06;修回日期:2001-09-04

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

取二者的平均值为肿瘤的直径。鼠死亡后解剖观察肿瘤生长情况，并制备石蜡切片行 HE 染色观察。

2 结果

3 只裸鼠两侧背部各注射 4×10^6 个 7901 细胞(0.2 ml)，第 9 天时肿瘤已长至直径 0.5 cm 左右，经 5 次反义 hTR 表达质粒(总量 150 μg/只)原位多点注射治疗后，治疗组肿瘤生长速度较对照组明显减慢，治疗后 1 月肿瘤体积缩小了 23%，见图 1。

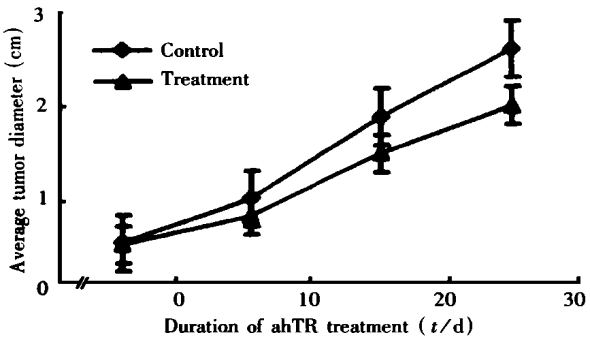


图 1 反义 hTR 基因瘤内注射对荷瘤鼠肿瘤的治疗作用

Fig 1 Therapeutic effects of antisense hTR gene on murine tumor growth after intratumoral injection of plasmid DNA

病理组织学观察：治疗组肿瘤细胞稀疏，排列较为有序，可见较多的腺样结构形成，而对照肿瘤细胞排列紊乱，罕见腺样结构，说明反义 hTR 基因治疗后 7901 细胞有分化倾向，见图 2。

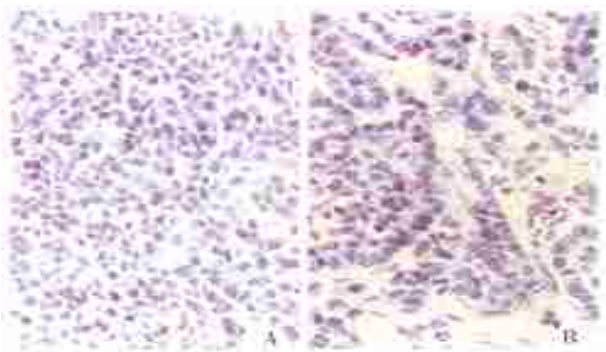


图 2 反义 hTR 基因治疗前后 7901 细胞移植瘤 (HE× 200)

A：未治疗组；B：治疗组

Fig 2 Pathological changes of transplant tumor treated with antisense hTR gene (HE× 200)

A: Untreated; B: Treated with ahTR

3 讨论

业已表明，抑制端粒酶活性能导致肿瘤细胞的衰老死亡或诱导分化，提示端粒酶是肿瘤治疗的较理想靶点[6]。我们既往的研究也发现反义端粒酶 RNA(hTR)转染的 7901 胃癌细胞趋向分化、恢复接触抑制和密度抑制、并丧失了在裸鼠体内的致瘤能力[2]，在此基础上我们进一步探讨反义 hTR 基因瘤内注射对人胃癌裸鼠移植瘤的治疗作用。

本研究选用 Roche 公司最新推出的高效非脂质体型阳离子转染试剂 FuGENETM6(其体外转染效率可达 50%～70%)作为载体对荷瘤鼠进行基因治疗，结果发现治疗后肿瘤生长速度减慢，在 1 月时治疗组肿瘤体积较对照组缩小了 23%；病理组织学显示治疗组肿瘤瘤细胞形成较多的腺样结构，提示有分化迹象。Mata 等[7] 在 Burkitt 淋巴瘤裸鼠皮下移植模型中经渗透泵每天原位给予 50 μg 的 PS-ODN(连续 14 d)，结果肿瘤生长速度明显减慢，脾转移结节明显减少。

反义 hTR 基因瘤内注射对荷瘤鼠肿瘤有一定的治疗作用，然而治疗效果并不理想，其原因可能是：瘤组织致密、瘤内压力高、血管丰富，体内转染效率低；反义 hTR 转染的肿瘤细胞不能够发挥旁观者效应，对周围未转染的肿瘤细胞起同化作用；抑制端粒酶活性起效慢。因此，反义 hTR *in vivo* 基因治疗肿瘤尚待进一步研究。如采用腺病毒或腺相关病毒载体，以提高外源基因体内转染的效率[8]；*in vivo* 基因治疗联合化疗药物[9] 等措施可能会提高反义 hTR 基因对肿瘤的治疗效果。

参考文献：

[1] 杨仕明，房殿春. 端粒、端粒酶与肿瘤[J]. 国外医学：病理生理科学与临床分册，1887，4(3)：302－307.

[2] 杨金亮，房殿春，杨仕明，等. 反义 hTR 对人胃癌细胞株 SGC-7901 恶性表型的逆转作用[J]. 第三军医大学学报，2000，22(7)：611－614.

[3] 富志明，刘亚伦，唐国基. 人体胃腺癌细胞株 SGC-7901 的培养及其特性[J]. 肿瘤临床，1984，11(1)：57－58.

[4] 杨金亮，房殿春，杨仕明，等. 正反义人端粒酶 RNA 组份(hTR)真核表达载体的构建[J]. 世界华人消化杂志，2000，8(5)：491－493.

[5] 萨姆布鲁克，费里奇，曼尼阿蒂斯著. 金冬雁，黎孟枫等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1988. 19－22.

[6] 杨金亮，杨仕明，房殿春. 抗端粒酶治疗肿瘤的研究进展[J]. 肿瘤，1999，19(2)：117－119.

[7] Mata J C, Joshi S S, Palen B, *et al*. A hexameric phosphorothioate oligonucleotide telomerase inhibitor arrests growth of Burkitt's lymphoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1997, 144(1): 189－197.

[8] 王宝梅，曹雪涛，鞠细文，等. 腺病毒介导大肠杆菌 CD 自杀基因体内外对肿瘤的杀伤研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，1998，5(1)：28－31.

[9] 杨金亮，房殿春，杨仕明，等. 抑制端粒酶活性能增加胃癌细胞对化疗药物的敏感性[J]. 中华内科杂志，2001，40(7)：478－479.

(编辑 陈聪连)

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