DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.002

文章编号: 1000-5404(1999)11-0780-04

腺病毒介导多基因对胆管癌细胞凋亡的诱导和肝细胞毒性损害

王征旭[1],何振平[1],吴祖泽[2],刘吉奎[1],马宽生[1],张维维[3] ([1]第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心,重庆 400038;[2]军事医学科学院百环生物医学研究中心,北京 100850;[3]美国 Baxter医疗用品基因治疗部)

【提要】 目的: 研究腺病毒介导的多基因(GM-CSF、B7-1、p53、IL-2)对胆管癌细胞系 QBC939凋亡的诱导作用和对正常肝细胞的作用。方法: 应用 TUNEL细胞凋亡检测法和光镜观察,分析同时含 GM-CSF、B7-1、p53、IL-2 4种目的基因的重组腺病毒载体(Ad-multigenes)对胆管癌细胞系 QBC939和肝细胞系 L02的作用以及对大鼠肝脏的毒性损害。结果: Ad-multigenes与化疗药物顺铂协同,能诱导 30%左右的 QBC939发生凋亡,并对肝细胞系 L02和大鼠肝细胞无明显毒性损害。结论: Ad-multigenes能诱导胆管癌细胞 QBC939发生凋亡,且与化疗药物顺铂具有协同增强作用。初步分析对人肝细胞及大鼠肝脏无明显毒性损害,具有一定的临床应用前景。

关键词 多基因;腺病毒;胆管癌细胞系;基因治疗;凋亡;肝细胞毒性
中图法分类号 R373.1; R735.8 文献标识码 A

肿瘤基因治疗作为一种新型的肿瘤治疗途径正在不断发展,业已取得初步的临床疗效[1,2]。导入野生型 p53抑癌基因治疗恶性肿瘤,是肿瘤基因治疗的重要途径之一[3,4]。我们已经构建了同时含人 p53、B7-1、GM-CSF、IL-2基因的重组腺病毒载体,并证实能在胆管癌细胞系 QBC939中表达及抑制其生长(待发表)。本文我们研究该重组腺病毒载体对胆管癌细胞系凋亡的诱导,和初步分析对人肝细胞系 L02和大鼠肝脏的毒性损害,进一步为临床使用该重组腺病毒载体治疗肝、胆等恶性肿瘤,提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 重组腺病毒载体、细胞系、实验动物及主要试剂

E1、E3区缺失的复制缺陷型 Ad5重组腺病毒载体 Ad-multigenes,同时含 SV40启动子驱动的人 B7-1 cDNA和 IL-2 cDNA(两目的基因间靠 EMC-IRES相连),以及 CMV启动子驱动的人野生型 p53 cDNA和人 GM-CSF cDNA。含绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)报告基因的重组腺病毒载体 Ad-GFP(构建方式及载体的结构与 Ad-multigenes完全相同,仅含有的目的基因不同),在本实验中作为对照重组腺病毒载体。胆管癌细胞系 QBC939由本科王曙光博士建立并惠赠。含 5型腺病毒 E1片段的人胚肾细胞系 293细胞,由美国 Baxter医疗用品公司提供。正常人肝细胞系 L02,购自中国科学院上海细胞生物学研究所。以上细胞均培养于含 10%胎牛血清的高糖型 DMEM(GIBCO)中。Wistar雌性大鼠,体重 180~200 g,购自军事医学科学院实验动物中心。检测细胞凋亡试剂盒: TdT Frag EL™ DNA Fragmentation Detection kit,购自 Oncogene Science公司;顺铂(10 mg/2 ml)由云南个旧生物制药厂生产。

1.2 光镜观察 QBC939、L02细胞的形态变化及分析 L02肝细胞生长曲线改变

QBC939胆管癌细胞和 L02肝细胞,以 1×10⁴/孔接种于 24孔板,8 h后感染不同 MOI(Multiplicity of infection)的 Ad-multigenes或 Ad-GFP,培养基作对照。每日在倒置显微镜(OLYMPUS IX-70)下观察细胞的形态改变,连续观察 10 d。L02肝细胞接种 60 mm平皿后 8 h,感染 100 MOI的 Ad-multigenes或 Ad-GFP,培养基作对照,分别于感染后第 1、3、4、6 d,收集细胞,台盼蓝染色,进行细胞计数,每皿重复 3次,取平均值。

1.3 TUNEL法检测细胞凋亡

6孔板内放入载斑片,接种 QBC939细胞 5×10⁵/孔,8 h后感染 50 MOI Ad-multigenes,或 50 MOI Ad-GFP,培养基作对照。感染病毒后 48 h,部分孔加入顺铂,使终浓度为 10 μg/ml,24 h后取出长有细胞的载玻片,检测细胞凋亡,具体方法按试剂盒说明书操作,并略有改动: 细胞用 Tris缓冲盐溶液(TBS)清洗→4%甲醛室温固定 10 min→TBS洗→加入 10 μg/ml蛋白酶 K,室温消化 5 min→TBS洗→3% H_2O_2室温封闭 5 min→TBS洗→加入末端标记脱氧核酸转移酶(TdT)和生物素化的脱氧核苷酸(dUTP)混合物,37℃反应 90 min→TBS洗→封闭液室温封闭 10 min→加入辣根酶标记的链霉卵白素,室温作用 30 min→DAB显色,甲基绿复染,常规脱水、封片。凋亡细胞的计数方法是: 随机选取 5个观测视野,每个视野在高倍镜下计数全部细胞数和凋亡细胞数,取平均值。

1.4 重组腺病毒载体对大鼠肝细胞的毒性作用

Wistar大鼠随机分组,每组 3只鼠。乙醚吸入麻醉后无菌切开腹部,显露门静脉,分别注入 1×10⁷、1×10⁸或 5×10⁸的

作者简介: 王征旭,男,34岁,主治医师,博士;现在第二军医大学东方肝胆外科医院从事博士后工作
收稿日期: 1999-01-21;修回日期: 1999-09-29

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

Ad-multigenes或 Ad-GFP, PBS做对照,缝合腹部,观察大鼠生存情况。13 d后取大鼠肝脏做常规病理切片分析。

1.5 统计学处理

使用 POMS统计软件(上海第一医科大学与中山医科大学合编)中的 t检验进行统计学处理, $P < 0.01$为差异非常显著。

2 结果

2.1 Ad-multigenes对胆管癌细胞和肝细胞生长的影响

我们已实验证实,50 MOI的 Ad-GFP可使 80%左右的 QBC939细胞受感染(表达绿色荧光蛋白),但随着感染重组腺病毒载体滴度的增加腺病毒本身对靶细胞的毒性损害亦逐渐出现,而腺病毒的转染效率并不进一步增加。既要使目的基因在靶细胞中高效表达,又不至于引起腺病毒对靶细胞的毒性损害,因此我们选用 50 MOI作为本实验的感染剂量。胆管癌细胞 QBC939转导 50 MOI的 Ad-multigenes后 48 h,逐渐出现较为明显的细胞致病变效应:细胞变圆、空泡化,细胞间歇增大等,并逐渐脱落、死亡,以感染后第 5天较为明显,而转导 50 MOI Ad-GFP的胆管癌细胞和转染 100 MOI Ad-GFP或 Ad-multigenes的 L02肝细胞及培养基对照均无此现象,见图 1、2 转染 100 MOI Ad-GFP或 Ad-multigenes的 L02肝细胞的生长曲线,与未转基因的 L02肝细胞相似,提示 L02肝细胞的生长不受影响。原代培养的肝成纤维细胞,给予 100 MOI Ad-multigenes后连续观察 10 d,亦未见明显细胞形态改变。

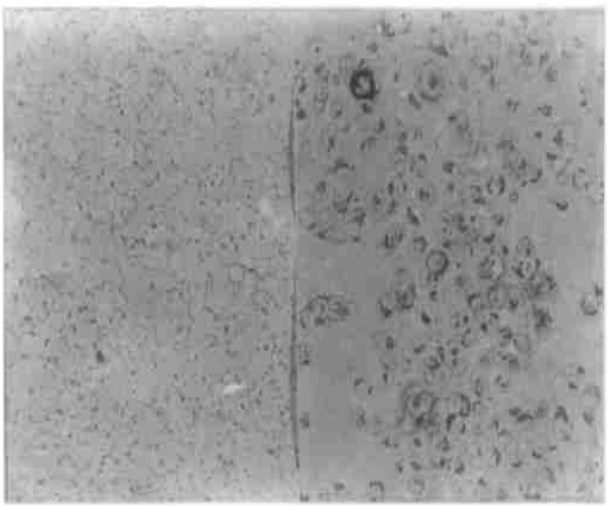


图 1 导入腺病毒多基因后 5 d倒置显微镜下观察 QBC939细胞形态改变 (× 400)
左:细胞对照;右:导入 Ad-multigenes

Fig 1 Morphological changes of QBC939 5 days after transduced with Ad-multigenes (× 400)
Left: Control; Right: Transduced with Ad-multigenes

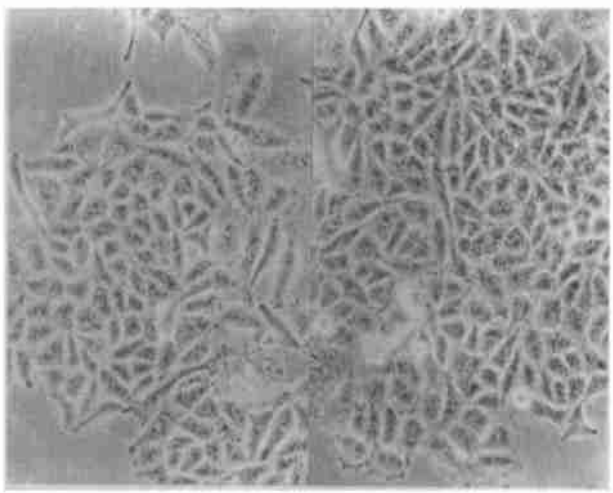


图 2 导入腺病毒多基因后 5 d倒置显微镜下观察 L02肝细胞形态改变 (× 400)
左:细胞对照;右:导入 Ad-multigenes

Fig 2 Morphological changes of hepatocellular cell line L02 5 days after transduced with Ad-multigenes (× 400)
Left: Control; Right: Transduced with Ad-multigenes

2.2 Ad-multigenes诱导胆管癌细胞发生凋亡

根据 TUNEL检测细胞凋亡的设计方法,若凋亡细胞出现 DNA断裂,TdT特异性结合到断裂 DNA的 3′端,通过细胞化学染色,在光学显微镜下见凋亡细胞呈棕色。细胞仅用顺铂处理,或感染 50 MOI Ad-GFP,与培养基对照相似,偶可见凋亡细胞出现;当给予 50 MOI的 Ad-multigenes时,凋亡细胞明显增多,达 6%左右;同时给予 10μg/ml顺铂时,凋亡细胞更进一步增加,可见 30%左右的细胞出现凋亡,见表 1图 3,提示腺病毒介导的多基因与化疗药物具有明显的协同作用,进一步诱导胆管癌细胞发生凋亡。

表 1 胆管癌细胞系 QBC939导入 Ad-multigenes和加入顺铂协同诱导细胞凋亡($\bar{x}\pm s$,%)

Tab 1 Apoptosis induced by Ad-multigenes in combination with cisplatin in cholangiocarcinoma cell line QBC939($\bar{x}\pm s$,%)

Group	Cisplatin treatment	Apoptotic Cells
Control	−	1.04± 0.21
	+	1.1± 0.17
Ad-GFP	−	1.27± 0.53
	+	1.47± 0.37
Ad-multigenes	−	6.3± 1.08
	+	32.77± 4.31

2.3 腺病毒对大鼠肝脏的病理损害

大鼠术后饲养 13 d,期间各组鼠未见明显异常反应。剖腹取肝脏,外观未见明显坏死灶,行病理检察,光镜下各组未见明显异常,见图 4。

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

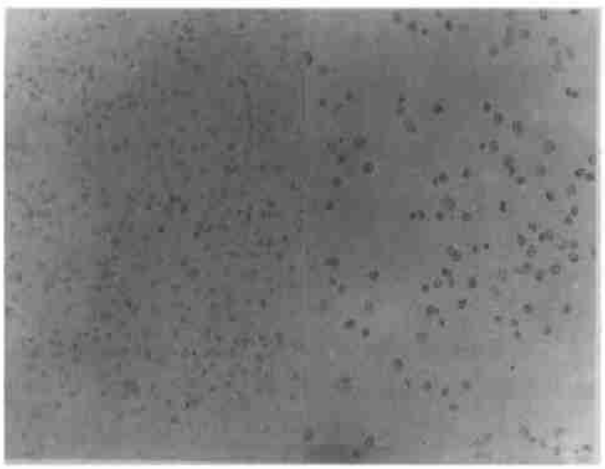


图 3 导入腺病毒多基因后 72 h用 TUNEL法分析 QBC939细胞发生凋亡 (× 200)
左: 导入 50 MOI Ad-GFP和加入 10μg /ml顺铂
右: 导入 50 MOI腺病毒多基因和加入 10μg /ml顺铂

Fig 3 Assay of apoptosis in QBC939 72 hrs after transduced with Ad-multigenes by TUNEL method (× 200)
Left: Transduced with 50 MOI Ad-GFP in combination with 10μg /ml Cisplatin; Right: Transduced with Ad-multigenes 50 MOI in combination with 10μg /ml Cisplatin

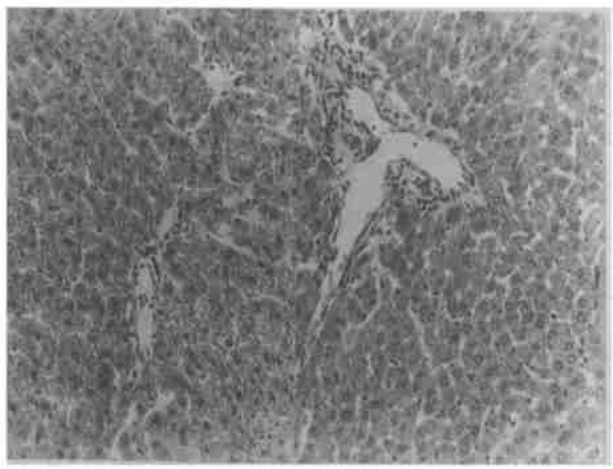


图 4 大鼠肝细胞病理形态变化 (HE× 400)
左: PBS对照; 右: 门静脉内注入 5× 10^8 MOI的 Ad-multigenes

Fig 4 Morpholgical change of rat hepatocellular cells (HE× 400)
Left: PBS control; Right: Injecting 5× 10^8 MOI Ad-multigenes into portal vein

3 讨论

腺病毒介导的多基因中, p53基因主要发挥抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡的作用,用于杀灭大的实体瘤; B7-1 GM-CSF IL-2基因则起免疫增强作用,通过提高肿瘤细胞的免疫原性,而刺激机体的抗肿瘤免疫反应,用于杀灭未导入 p53抑癌基因的残余灶或转移灶,这样多基因的联合使用,其治疗效果会优于单独使用某一个治疗基因。腺病毒载体具有不整合进入宿主细胞基因组 DNA中、无遗传毒性、表达时间短暂、转化效率高、感染的靶细胞范围广等特点,近年来越来越受到人们的重视,尤其是在肝、胆恶性肿瘤的基因治疗中[5,6]。我们已发现导入多基因后, QBC939细胞的生长受到一定程度的抑制 (待发表),其原因主要是多基因中 p53抑癌基因诱导肿瘤细胞凋亡所至[7]。光镜检测可见导入 Ad-multigenes后, QBC939细胞逐渐出现空泡化,细胞变圆、间隙增大,并逐渐脱落、死亡。培养基中单独加入顺铂 (10μg /ml),与培养基对照相比,出现凋亡细胞数量相似,少于 2%,导入 Ad-multigenes后,凋亡细胞数量明显增多,达到 6%左右,若顺铂与多基因同时使用,则凋亡细胞可达 30%左右 ($P < 0.01$)。p53基因的异常,能导致肿瘤细胞以化疗药物的抗性增加,而导入野生型 p53抑癌基因,则能增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性[4,7],提示临床使用野生型 p53抑癌基因治疗肿瘤时,同时使用化疗药物,抑瘤效果会更佳。目前对于野生型 p53抑癌基因在细胞信号转导通路中的作用,已进行了较多的研究[8], p53基因与化疗药物的协同作用,可能与运动失调性毛细血管扩张症 (Ataxia telangiectasia)基因的突变有关,进一步调控细胞周期和促进肿瘤细胞的 DNA损伤,从而达到诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

重组腺病毒载体的毒性试验包括两部分,其一是检测腺病毒载体本身的毒性,其二是检测导入的目的基因的毒性。对后一部分的毒性试验主要是观察所导入的目的基因,是否对正常细胞有损害作用,因临床使用重组腺病毒载体治疗肝、胆恶性肿瘤时,难以避免腺病毒载体进入正常肝组织。本实验所使用的重组腺病毒载体,其多基因能抑制胆管癌和肝癌 (另文发表)细胞的生长,尤其是其中的 p53抑癌基因,是否也能抑制正常肝细胞的生长,是临床十分关注的问题。通过我们的试验,导入 100 MOI的 Ad-multigenes后,正常肝细胞系 L02和肝成纤维细胞,形态上未见明显异常改变, L02肝细胞的生长也不受影响,初步说明该重组腺病毒载体对正常肝细胞无明显毒性损害,支持野生型

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

p53抑癌基因作用的靶细胞是存在 DNA损伤的细胞(如肿瘤细胞),而对正常细胞不起作用的观点,有待进一步研究。另外临床在使用重组腺病毒载体治疗肝胆恶性肿瘤时,主要考虑两种途径,第一是 B超或 CT引导下肿瘤内直接注射重组腺病毒载体,第二是通过肝动脉或门静脉注射重组腺病毒载体,而第二种途径的治疗可能使更多的肝癌细胞导入目的基因[9,10]。我们通过大鼠门静脉内直接注射最高达 5× 10^8 MOI的重组腺病毒载体,初步观察未见明显的大鼠肝脏毒性损害,有待进一步研究。

实验表明,腺病毒介导的多基因能诱导胆管癌细胞系 QBC939发生凋亡,与化疗药物顺铂有明显协同增强作用,初步观察对正常人肝细胞系 L02和大鼠肝脏无明显毒性损害。

参考文献

[1] Habib N A, Ding S F, Masry R, *et al*. Preliminay report: The short term effects of direct p53 DNA injection in primary hepatocelluar carcinomas[J]. Cancer Detect Prev, 1996, 20(2): 103- 107.

[2] Mastrangelo M J, Berd D, Nathan F E, *et al*. Gene therapy for human cancer: An essay for clinicians[J]. Semin Oncol, 1996, 23(1): 4- 21.

[3] Nguyen D M, Wiehle S A, Koch P E, *et al*. Delivery of the p53 tumor suppression gene into lung cancer cells by an adenovirus/DNA complex[J]. Cancer Gene Ther, 1997, 4(3): 191- 198.

[4] Seth P, Katayose D, Li Z, *et al*. A recombinant adenovirus expressing wild type p53 induces apoptosis in drug-resistant human breast cancer cells: A gene therapy approach for drug-resistant cancers[J]. Cancer Gene Ther, 1997, 4(6): 383- 390.

[5] Castell J V, Hernandez D, Gomez-Foix A M, *et al*. Adenovirus-mediated gene transfer into human hepatocytes: Analysis of the biochemical functionality of transduced cells[J]. Gene Ther, 1997, 4(2): 455- 464.

[6] Kanai F, Lan K H, Shiratori Y, *et al*. *In vivo* gene therapy for α-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene[J]. Cancer Res, 1997, 57(2): 461- 465.

[7] Xu G W K, Sun Z T, Forrester K, *et al*. Tissue-specific growth suppression and chemosensitivity promotion in human hepatocelluar carcinoma cells by retroviral-mediated transfer of the wild type p53 gene[J]. Hepatology, 1996, 24(5): 1264- 1268.

[8] Canman C E, Lim D, Cimprich K A, *et al*. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53[J]. Science, 1998, 281(5383): 1677- 1679.

[9] Kitten O, Cosset F L, and Ferry N. Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into rat hepatocytes *in vivo*[J]. Human Gene Ther, 1997, 8(7): 1491- 1494.

[10] Cao G, Kuriyama S, Du P, *et al*. Complete regression of established murine hepatocellular carcinoma by *in vivo* tumor necrosis factor α gene transfer[J]. Gastroenterology, 1997, 112(3): 501- 510.

(编辑　王　红)

Effects of adenovirus-mediated multigenes on the induction of apoptosis of cholangiocarcinoma cell line and the cytotoxicity of hepatocyte line

WANG Zheng-xu, HE Zhen-ping, WU Zu-che, LIU Ji-kui, MA Kuan-shen, ZHANG Wei-wei (Department of hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract **Objective**: To study the effects of adenovirus-mediated GM-CSF, B7-1, p53 and IL-2 on the induction of apoptosis of cholangiocarcinoma cell line QBC939 and on the cytotoxicity of hepatocyte line L02. **Methods**: After the construction of recombinant adenovirus containing human GM-CSF, B7-1, p53 and IL-2 genes, their effects on apoptosis of human cholangiocarcinoma cell line QBC939 and on cytotoxicity of hepatocyte line L02 and the liver of rats were detected with TUNEL assay and optical microscopy. **Results**: Adenovirus-mediated multigenes induced nearly 30% apoptosis of cholangiocarcinoma cell line QBC939 in combination with a chemotherapeutic agent cisplatin and showed no distinct cytotoxicity of hepatocyte line L02 and rat liver. **Conclusion**: Adenovirus-mediated GM-CSF, B7-1, p53 and IL-2 are able to induce 30% apoptosis of cholangiocarcinoma cell line and show no cytotoxicity of liver cells.

Key words multigenes; adenovirus; cholangiocarcinoma cell line; gene therapy; apoptosis; cytotoxicity; hepatocyte

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