DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.001

重组 RA538腺病毒对人胃癌细胞的体内及体外分子治疗研究*

论著

陈洁平** 徐采朴 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆, 400038
林 晨 张雪艳 付 明 邓友平 程金科 吴 (中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物室) 北京, 100021

提 要 目的: 研究重组 RA538腺病毒对胃癌细胞的体内外生物学作用。方法: 采用 LacZ基因 X-gal染色、MTT、克隆形成试验、DNA梯度降解试验、原位末端标记、流式细胞仪、裸鼠致瘤性、裸鼠皮下移植瘤模型实验等方法,对 RA538重组腺病毒在人胃癌 SGC7901细胞系中的作用进行体内外研究。结果: Ad-RA538对 SGC7901细胞产生明显的生长抑制作用,MTT显示生长抑制率为 76.3%。DNA梯度降解试验、原位末端标记、流式细胞仪显示 Ad-RA538诱导了 SGC7901细胞凋亡。经 Ad-RA538处理的 SGC7901细胞裸鼠致瘤性消失。Ad-ASc-myc对裸鼠皮下移植瘤模型瘤内注射能有效降低肿瘤的生长速度,生长抑制率为 60.66%。结论: Ad-RA538对胃癌细胞具有显著的体内外生长抑制及凋亡诱导作用。

关键词 腺病毒;基因治疗;胃癌;维甲酸
中图法分类号 R373.1; R394; R735.2

胃癌为常见恶性肿瘤,发病率及死亡率均居我国各种恶性肿瘤的前列。探索胃癌发生发展过程中基因变异规律,寻找有效的针对肿瘤细胞的目的基因,无疑对临床胃癌的防治具有重要意义[1,2]。抑癌基因 RA538为维甲酸(Retinoic acid, RA)诱导基因[3]。该基因能诱导肿瘤细胞终末分化、凋亡及下调 c-myc基因表达[4]。腺病毒载体的发展使基因治疗付诸于临床应用成为可能,它以遗传毒性低、致病性小、宿主范围广、滴度高、装载容量大等优势已广泛用于基因治疗[5]。本课题研究腺病毒(Adenovirus, Ad)介导 RA538对人胃癌细胞生物学行为的影响,探索腺病毒介导 RA538治疗胃癌的可行性,为胃癌的基因治疗提供候选基因。

1 材料与方法

1.1 细胞系

293细胞: 为腺病毒 E1基因转化的人胚肾细胞系。培养条件为高糖 DMEM培养基,含 10%胎牛血清,37℃, 5% CO_2。
SGC7901细胞: 为人胃腺癌细胞系。培养条件为 M199培养基,含 10%胎牛血清,37℃, 5% CO_2。

1.2 重组体腺病毒的制备[6]

为 E1和 E3区缺失的复制缺陷型 5型腺病毒载体。重组 RA538及 LacZ腺病毒(Ad-RA538及 Ad-LacZ)均为中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物室构建。采用 Ad-RA538及 Ad-LacZ经鉴定为阳性的重组体腺病毒,在 293细胞进行繁殖及滴度测定。提取腺病毒 DNA,用一对 RA538基因引物及一对腺病毒基因组引物进行 PCR扩增鉴定。

1.3 腺病毒转导效率测定

用重组腺病毒 Ad-LacZ(含报告基因 LacZ),按 25、50、100、200感染强度(Multiplicity of infection, MOI)感染细胞。X-gal染色后显微镜下观察蓝染的细胞即 LacZ基因表达的阳性细胞。分别计算蓝染细胞的百分率。

1.4 细胞生长曲线—— MTT法

采用 96孔板,每孔接种细胞 5 000~8 000个, 37℃, CO_2孵箱中培养 12~24 h后用病毒感染细胞。取不同时间点,弃去培养基,每孔加入 MTT溶液。37℃孵育 3~4 h,弃去 MTT溶液。每孔加入 DMSD,将 96孔板置水平摇床上摇动后以酶标仪在 525 nm波长下测定每孔 D_A值。

1.5 平板克隆形成实验

每组取 1个 35 mm培养皿,接种细胞 50万个/皿。按不同滴度感染病毒,培养 24 h后收获细胞。按 500个/皿接种至新的 60 mm平皿中,每种接种 3个平皿。置 CO_2孵箱中培养 2~3周。结晶紫染色,显微镜下计数大于 50个细胞的克隆数。

1.6 细胞 DNA梯度降解(DNA ladder)的检测

分别收集病毒感染组及对照组细胞。加裂解液 400μl混匀。离心收集上清。加入 SDS至终浓度 1%,加 RNA酶 56℃作用 2 h,加入蛋白酶 K 37℃ 2 h,乙醇沉淀 DNA,干燥后加 TE 20μl溶解 DNA沉淀。琼脂糖凝胶电泳,长波紫外灯下观察并照相。

1.7 细胞凋亡原位检测(TUNEL试验)

将细胞悬液滴于用多聚赖氨酸处理过的玻片上,涂匀,干燥后用多聚甲醇固定 30 min,取出自然干燥后按以下步骤进行: PBS洗 3次,每次 5 min,穿透液冰上 2 min,PBS洗 3次,每次 5 min,加 10μl Tunel反应混合液,置湿盒中, 37℃, 1 h,PBS洗 3次,每次 5 min,荧光显微镜下观察并照相。PBS洗 3次,每次 5 min,AP覆盖液 10μl, 37℃ 1 h,PBS洗 3次,每次 5 min,底物缓冲液 50μl,室温下 10~15 min,苏木素复染,树脂封片。

* 国家 863计划资助项目, No. Z20-01-02
** 陈洁平,女,36岁,主治医师,博士

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

1.8 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡

PI染色法: 病毒感染细胞后分别于不同的时间点收集细胞, PBS清洗一遍。注入 70% 乙醇,固定 18 h 离心弃乙醇后用 PBS洗 1次。加入 RNA酶 37℃作用 1~ 2 h 加入 PI(100 μg/ml) 100 μl混匀置冰上 30 min后在流式细胞仪上检测。

1.9 PCR分析

PCR条件: 25 μl反应体系中含 DNA 2 μl, 10× PCR buffer, 15 mmol/L $MgCl_2$, 4种 dNTPs各 25 μmol/L,加目的基因引物 50 pmol/L及 1单位 Taq DNA多聚酶,反应在 PCR仪中进行。 95℃预变性 5 min, 95℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 28~ 30个循环后 72℃延伸 7 min。 PCR产物鉴定及定量分析: PCR产物用琼脂糖凝胶电泳检测,在长波紫外灯下观察并照相。

1.10 裸鼠皮下致瘤实验

裸小鼠,品系为 Balb/C, 5~ 6周龄,雌雄不限,由中国医学科学院肿瘤研究所动物室提供。接种 SGC7901细胞于 60mm培养皿中, 10^6 细胞/皿,按 100的感染强度分别感染 Ad-RA538, Ad-LacZ及 PBS, 24 h内消化细胞,制成 10^6 细胞 /0.1 ml的细胞悬液。 5周龄雄性裸鼠 12只,随机分为 4组,每组 3只,分别注射 Ad-RA538, Ad-LacZ及 PBS各 0.1 ml 连续观察肿瘤出现时间和体积,时间为 1个月。

1.11 裸鼠皮下移植瘤模型治疗实验

收集对数生长期 SGC 7901细胞,制成细胞悬液,按 100 μl/只量接种于裸鼠皮下。裸鼠均为 5周龄鼠,共 23只。雌雄各半。待肿瘤长至 5 mm左右时,取其中 20只肿瘤体积较为均一的裸鼠,随机分为 4组,每组 5只。瘤体内注射腺病毒液或 PBS 0.1 ml,病毒液含量为 10^9 pfu /只,隔日注射 1次,共 3次,连续观察肿瘤大小,持续 1月。

1.12 统计学分析

采用计算机统计程序进行 χ^2 检验及 t 检验。

2 结果

2.1 重组体腺病毒的制备

Ad-RA538及 Ad-LacZ重组体腺病毒,经 293细胞繁殖后制备成病毒贮存液,于 -70℃冰箱中备用。各重组体腺病毒滴度测定为 Ad-RA538 3.0×10^9, Ad-LacZ 3.0×10^{11}。提取各重组体腺病毒 DNA,分别以腺病毒及 RA538的引物进行 PCR鉴定,结果 Ad-LacZ可见腺病毒阳性扩增条带, Ad-RA538可见腺病毒及 RA538阳性扩增条带。

2.2 重组体腺病毒的转导效率

采用插入 LacZ报告基因的重组体腺病毒,进行重组体腺病毒对不同细胞转导效率的检测。以 Ad-LacZ按 MOI 25 50 100 200的量分别感染 SGC 7901细胞,48 h后进行 X-gal染色显示转染效率分别为 90 100 100 100

2.3 腺病毒介导 Ad-RA538对胃癌细胞的生物学作用

2.3.1 Ad-RA538感染后胃癌细胞的形态学变化 以 Ad-RA538 MOI 100的感染强度感染 SGC7901细胞,第 1~ 3天细胞聚集,变圆,胞浆内空泡增多, 4~ 5天后逐渐浮起悬浮于培养基中。对照组细胞形态无明显变化。

2.3.2 Ad-RA538对胃癌细胞生长的抑制作用 ① MTT试验: 用 MTT法对 Ad-RA538 Ad-LacZ感染的 SGC7901细胞生长情况进行检测,结果,见图 1 Ad-RA538对 SGC7901细胞生长抑制率可达 76.3% (MOI 200, 8 d)。与 Ad-LacZ组比 $P<0.01$ ② 克隆形成试验: 按不同 MOI 25 50 100 200的量以 Ad-LacZ感染 SGC7901细胞其存活率分别为 89.5%, 109.0%, 95.8%, 117.5%, Ad-RA538为 88.8%, 70.6%, 39.9%, 16.1%。说明 Ad-RA538可以明显抑制 SGC7901细胞的克隆形成能力及存活率。

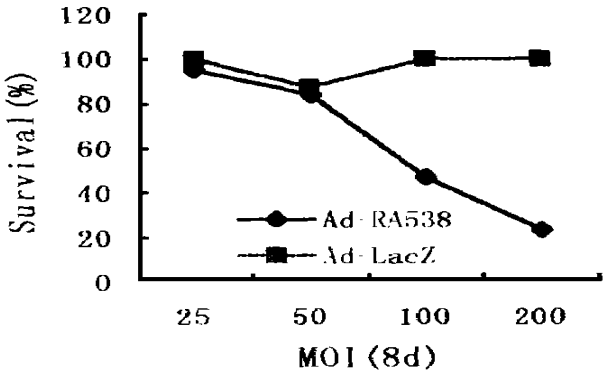


图 1 Ad-RA538对 SGC7901细胞生长的抑制作用 (8 d)

Fig 1 Anti-proliferative effect of Ad-RA538 on SGC7901 cells(8 d)

2.3.3 Ad-RA538对 SGC7901细胞的诱导凋亡作用 ① DNA梯度降解试验: 提取细胞染色体 DNA进行琼脂糖凝胶电泳结果发现, SGC7901细胞经 Ad-RA538处理 2 d后染色体 DNA发生断裂, 2 4 6 d电泳可见 180~ 200 bp不同倍体梯状 DNA(DNA Ladder), DNA Ladder的出现有一定的时间效应,以 6d时明显, Ad-LacZ处理组染色体 DNA未见明显的 DNA Ladder。 ② 细胞凋亡原位末端标记 (TUNEL): 细胞发生凋亡时,染色体 DNA在核小体之间发生断裂,形成以核小体为单位的不同长度的 DNA片断,同时产生多个 3-OH末端,使用末端转移酶可将标记的 dUTP连接在 DNA片段的 3-OH末端上,进行显色,从而显示凋亡细胞。 Tunel检测法发现 Ad-RA538可以使 SGC7901细胞出现明显凋亡。 Ad-LacZ处理的细胞未见凋亡。 ③ 流式细胞仪分析: SGC7901细胞分为 Ad-RA538 Ad-LacZ及细胞对照组,以 MOI100的感染强度感染腺病毒,分别于 6 12 24 h 2 4 6 d收集各组细胞,经 70% 乙醇固定, PI染色等处理后,经 FCM检测显示: Ad-RA538组 12 h G1期阻滞, 4 6 d S期及 G2期阻滞, 2 d开始出现凋亡高峰, 2 4 6 d的凋亡峰分别为 34.2%、18.2%、22%。 Ad-LacZ组未见相应变化。结果见图 2

2.4 腺病毒介导 RA538对胃癌细胞生长抑制作用的体内研究

2.4.1 裸鼠皮下致瘤实验 将经 Ad-RA538及 Ad-LacZ以

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

MOI100的感染强度处理的 SGC7901细胞,分别注射于 3组裸鼠皮下,每组 3只,每只注射 10^7细胞 /ml的细胞悬液 100μl,另 1组 3只各注射 PBS 100μl,结果显示,1月后 Ad-RA538处理的 SGC7901细胞裸鼠成瘤率为零,而 Ad-LacZ及 PBS处理组成瘤率为 100%,见表 1

2.4.2　裸鼠皮下移植瘤模型的治疗实验　　将 SGC 7901细胞制成 10^7细胞 /ml的细胞悬液,以每只 0.1 ml的量分别注射于裸鼠皮下。待肿瘤长至 5 mm左右时取瘤体较为均一的 20只裸鼠,随机分为 4组,每组 5只。分别瘤体内注射 100μl Ad-RRA538、Ad-LacZ及 PBS(Mock)。每 4 d用卡尺测量瘤体大小,持续 1月,根据公式计算肿瘤体积,见表 2　Ad-RA538对裸鼠皮下移植瘤模型的治疗结果显示,1月后肿瘤小于对照组。对肿瘤生长的抑制率 Ad-RA538为 60.66%。

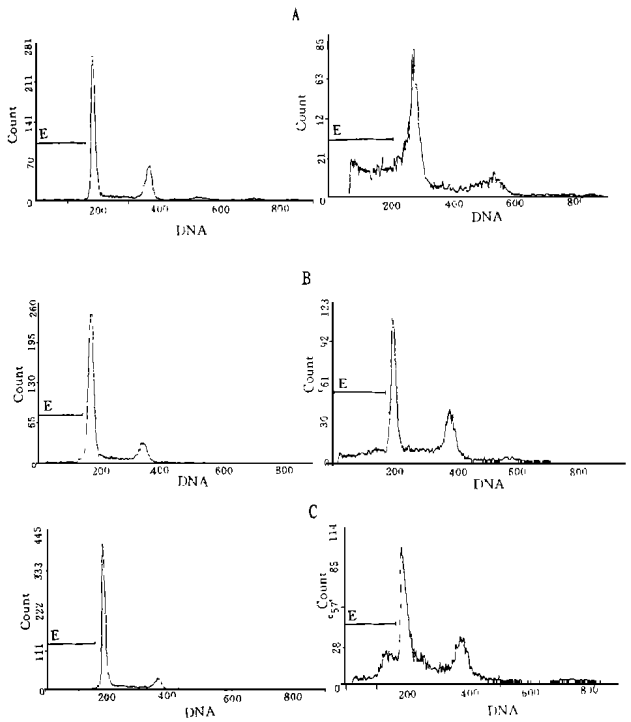


图 2　Ad-RA538感染后 SGC7901细胞流式细胞仪分析

Fig 2　Flow cytometry analysis of SGC7901 cell infected with Ad-RA538　(A, B, C: Ad-LacZ or Ad-RA538 2d, 4d, 6d)

表 1　Ad-RA538对 SGC7901细胞裸鼠皮下致瘤实验结果

Tab 1　Tumorigenicity assay in nude mice follow Ad-RA538 and Ad-ASc-myc

Type of virus infected	Tumorigenicity /mice	Tumorigenicity (%)	Weight of tumors(g)
Ad-RA538	0/3	0	0
Ad-LacZ	3/3	100	0.947
Mock	3/3	100	0.580

表 2　Ad-RA538对 SGC7901细胞裸鼠皮下移植瘤模型的治疗实验结果

Tab 2　*In vivo* experimental therapy of Ad-RA538 on SGC7901 tumors in nude mice

Type of virus infected	Tumor size (cm^3) on different days							
	0	4	8	12	16	20	24	28
Ad-RA538	0.47	0.48	0.73*	2.24*	2.75**	6.34**	7.34**	9.84**
Ad-LacZ	0.39	0.95	2.76	5.89	9.73	14.25	17.65	20.60
Mock	0.36	0.86	2.12	5.87	10.25	14.89	17.90	25.01

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Ad-LacZ or Mock

3　讨论

在肿瘤的基因治疗中,由于基因的转移主要采取将目的基因直接转移至宿主体内的方式,这就要求选择的载体具有高效转导、高效表达及安全等特点,只有这样才能满足临床肿瘤基因治疗的需要。为此,我们选择了腺病毒作为 RA538基因的载体系统。在研究中发现,腺病毒转导效率高,能将目的基因转移到几乎 100%的肿瘤细胞,MOI 25时,培养细胞的转导效率即高达 90%以上。我们的实验显示 Ad-RA538对 SGC7901细胞有明显的生长抑制及凋亡诱导作用,原因之一可能与 Ad-RA538对 SGC7901细胞的高效转导有关。由于基因治疗所采用的体内方式要求采用的重组腺病毒需有较高的滴度,才能达到体内治疗对用药体积的要求。我们采取收集 293细胞,反复冻融的方法,收集到的重组腺病毒滴度高达 10^{11}pfu /ml,使我们对裸鼠体内实体瘤的使用得以在有限的容积内达到病毒的有效治疗量,取得了较为满意的治疗效果。

胃癌的发生是多因素、多阶段及多基因变异的综合病变过程。多种癌基因及抑癌基因的异常累积是癌变过程中的重要机制[1,2]。据此重建抑癌基因功能成为目前胃癌基因治疗所追求的基本目标。基因治疗不同于单基因遗传病,除基因载体及导入手段外,目的基因的选择极为关键。选用抑癌基因 RA538进行胃癌基因治疗的研究,主要基于如下考虑:① RA538是采用全反式维甲酸(RA)诱导人食管癌细胞系,经消减杂交法得到的抑癌基因,已有的研究表明 RA538对恶性细胞具有广谱抑制作用[3,4]。② 维甲酸对肿瘤细胞具有抑制生长及诱导凋亡作用[7,8],而 RA538具有与维甲酸类似的作用。③ 胃癌细胞中 c-myc基因高表达,而 RA538具有降调节 c-myc的作用。我们将 RA538基因以重组腺病毒介导,导入胃癌 SGC7901细胞中,对细胞的生长、致瘤性及肿瘤生长均有十分明显的抑制作用。实验结果显示: Ad-RA538对 SGC7901生长抑制率达 76.3%,克隆形成率为 4.6%。并能使

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

SGC7901细胞形成明显的 DNA Ladder,原位末端标记及流式细胞仪检测均显示 SGC7901细胞凋亡。体内实验显示,经 Ad-RA538处理的胃癌细胞对裸鼠无致瘤性。裸鼠皮下肿瘤模型治疗实验显示 Ad-RA538具有显著抑制肿瘤生长作用。以上结果表明 Ad-RA538具有显著的抑制胃癌细胞恶性表达及诱导凋亡作用,导入关键的抑癌基因有可能通过阻止肿瘤细胞生长,诱导凋亡,从而达到治疗肿瘤的目的。采用抑癌基因进行胃癌基因治疗的探索,国内外文献报告体外试验显示 BCL-XS, Rb, p16, p53基因对胃癌细胞恶性增殖具有抑制作用[9,10], Bouillet等[11]报道使用消减杂交技术在 p16胚胎细胞中发现了一个新的 RA诱导基因 Stra6,它在体外可以诱导肿瘤细胞凋亡,与 RA538基因的作用一致。这些均表明抑癌基因的导入对胃癌细胞的生长具有一定的抑制作用。采用腺病毒介导 RA538基因进行胃癌的基因治疗在国内外属首次尝试,体内与体外试验均取得了令人满意的效果。

本实验结果表明, Ad-RA538对 c-myc基因高表达的 SGC7901细胞生长有很强的抑制作用。Ad-RA538在用于胃癌基因治疗的方面具有良好的应用价值。Ad-RA538替代维甲酸用于肿瘤的分化治疗,可以避免维甲酸的临床毒副作用。由于腺病毒对人致病性小,宿主细胞广泛、滴度高等优点, Ad-RA538可望成为一种非常有前途的基因治疗药物用于肿瘤的临床治疗。

参考文献

1 Anderson W F. Gene therapy of cancer. Human Gene Therapy, 1994, 5(1): 1

2 Tanaka T, Kanai T, Lan K H, *et al*. Adenovirus-mediated gene therapy of gastric carcinoma using cancer-specific gene expression *in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 231(3): 775

3 冯 骆,王秀琴,吴 ,等.从人食管癌细胞系分离分化基因的新方法.中国科学(B辑), 1991, 20(10): 1059

4 闫水忠,王秀琴,吴 ,等.维甲酸激活基因 cDNA RA538诱发人食管癌细胞终末分化与凋亡.中国科学(C辑), 1996, 26 560

5 Cheng D Y, Kolls J K, Lei D, *et al*. *In vivo* and *in vitro* gene transfer and expression in rat intestinal epithelial cells by E1-deleted adenoviral vector. Hum Gene Ther, 1997, 8(6): 755

6 Zhang W W, Fang X, Branch C D, *et al*. Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated trannsfection and PCR analysis. Biol/Techniques, 1993, 15(5): 868

7 Giandomenico V, Lancillotti F, Fiorucci G, *et al*. Retinoic acid and IFN inhibition of cell proliferation is associated with apoptosis in squamous carcinoma cell line: role of IRF-1 and TGase II-dependent pathways. Cell Growth Differ, 1997, 8(1): 91

8 Cooper M P, Klaassen I, Brakenhoff R H, *et al*. All-trans retinoic acid induced gene expression and growth inhibition in head and neck cancer cell lines. Oral Oncol, 1997, 33(4): 270

9 Clarke M F, Apel I J, Benedict M A, *et al*. A recombinant BCL-XS adnovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(24): 11024

10 李文梅,吕有勇.导入 Rb、p53、p16和 H-ras反义 RNA对人胃癌细胞恶性增殖的影响.中国肿瘤生物治疗杂志, 1997, 4(2): 90

11 Bouillet P, Sapin V, Chazaud C, *et al*. Development expression pattern of stra 6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein. Mech Dev, 1997, 210(2): 173

(收稿: 1999-01-31;修回: 1999-04-08)

(编辑 张大春)

Studies on the therapeutic effects of recombinant adenovirus RA538 on human gastric cancer cells *in vivo* and *in vitro*[*]

Chen Jieping, Lin Cheng, Xu Caipu, Zhang Xueyan, Fu Ming, Deng Youping, Cheng Jinke, Wu Min (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the biological effects of recombinant adenovirus RA538 on human gastric cancer cell line *in vivo* and *in vitro*. Methods: Ad-LacZ X-gal staining, MTT, cloning, DNA ladder, Tunel, FCM, tumorigenicity in nude mice and model of subcutaneously transplanted tumor in nude mice were used in this study. Results: Ad-RA538 strongly inhibited cell growth and induced apoptosis of SGC7901

[*] This project was Supported by National "863" Plan, No. Z20-01-02

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net