

腺病毒介导的 nm23-H1 对人结直肠癌裸鼠移植作用的实验研究

王琦^{1,2}, 李华玲^{1,2}, 何学令², 刘艳², 尹海林^{2*}

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 四川大学实验动物中心, 成都 610041)

摘要:目的 探讨 Ad-GFP-nm23-H1 对人高转移结直肠癌移植瘤的抑制作用, 为临床肿瘤基因治疗提供一定的理论依据。方法 将 15 只人结直肠癌移植瘤裸鼠随机分为高剂量组 (10^{10} PFU/ml Ad-GFP-nm23-H1)、低剂量组 (10^9 PFU/ml Ad-GFP-nm23-H1)、阴性对照组 (PBS)。均采用瘤体注射给药, 连续给药 4 d, 每 2 d 测一次肿瘤体积。观察 10 d 后取瘤块称重和组织病理学检查。结果 Ad-GFP-nm23-H1 高剂量组移植瘤体积较其他各组明显缩小 ($P < 0.05$), 瘤体积抑制率和瘤重抑制率分别为 76% 和 66%。结论 Ad-GFP-nm23-H1 对人高转移结直肠癌移植瘤有抑制作用, 并存在剂量依赖性。

关键词: nm23-H1; 人结直肠癌 Lovo 移植瘤; 裸鼠

中图分类号: Q95-33; R73 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2010)03-0469-03

Anti-tumor Action of Adenovirus-mediated nm23-H1 on Human Colon Cancer Xenografts in Nude Mice

WANG Qi^{1,2}, LI Hua-ling^{1,2}, HE Xue-ling², LIU Yan², YIN Hai-lin^{2*}

(1. School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Laboratory Animal Center of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effects of Ad-GFP-nm23-H1 on human colorectal carcinoma bearing nude mice and to gain further insight into some theoretical and methodical basis for using nm23-H1 gene therapy in cancers. **Methods** Fifteen nude mice inoculated subcutaneously with human colon cancer cell line Lovo, were allocated randomly into 3 groups: high dose (treated with 10^{10} PFU/ml Ad-GFP-nm23-H1), low dose (treated with 10^9 PFU/ml Ad-GFP-nm23-H1) and control group (treated with PBS). Mice were injected uninterruptedly for 4 days. Tumor volume was measured every three days. The animals were killed on the sixth day after treatment, the xenografts were weighed, and studied histologically. **Results** The volume and weight of xenografted cancer in Ad-GFP-nm23-H1 groups were markedly lower than those in control group. Tumor volume and weight inhibition rates of the Lovo cell line which were treated with Ad-GFP-nm23-H1 of 10^{10} PFU/ml were 76% and 66% respectively. **Conclusions** Ad-GFP-nm23-H1 showed significant inhibitory effects on proliferation of human colorectal carcinoma Lovo cell line *in vivo*.

Key words: nm23-H1; human colon cancer xenograft; nude mice

结直肠癌是西方国家发病率最高的消化道肿瘤疾病, 在我国发病率也呈上升趋势。结直肠癌的治疗手段主要以手术为主, 晚期治疗则以化疗为主。尽管近年来出现了一些用于结直肠癌化疗的新药, 但化疗药物对患者产生的副作用较大。为了拓展新疗法, 研究人员利用腺病毒的生物学特点构建了许多腺病毒携带的相关肿瘤抑制基因用于肿瘤的治疗, 并取得了良好的治疗效果。nm23 是从小鼠黑色素瘤细胞中分离出来的可抑制肿瘤转移的一种 cD-

NA 基因 (Steeg *et al.*, 1988)。众多的临床研究显示 nm23 的表达水平与诸多恶性肿瘤的转移呈负相关。目前, 应用 nm23 基因治疗研究多为体外实验, 而在体内对肿瘤的生长抑制作用的研究报道较少。本研究在建立结直肠癌动物模型的基础上, 以 nm23-H1 蛋白为靶点, 通过重组腺病毒技术, 对结直肠癌的基因治疗进行体内研究, 以期通过观察肿瘤生长抑制情况, 探索肿瘤基因治疗的新途径。

收稿日期: 2009-09-14 接受日期: 2009-10-09

作者简介: 王琦 (1984 ~), 女, 硕士研究生, 主要从事动物实验和新药安全性评价

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yin37143@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 重组腺病毒 Ad-GFP-nm23-HI 从人肝细胞中克隆出人 nm23-H1 cDNA 基因片段,以复制缺陷型腺病毒(E1 区和 E3 区缺失)为载体,由北京诺赛基因组研究中心有限公司设计构建携带绿色荧光蛋白的 Ad-GFP-nm23-HI。

1.1.2 细胞株 人高转移结直肠癌细胞株 Lovo (四川大学华西器官微循环与消化外科研究室)。

1.1.3 实验动物 裸鼠 20 只,4 周龄,雄性,由四川大学实验动物中心提供,生产许可证:SCXK(川)2004-010。

1.1.4 主要试剂和仪器 胰蛋白酶(Gibco);新生小牛血清、RPM I -1640 培养液和 PBS(成都哈里生物工程有限公司)。CO₂ 培养箱(Shellab);细胞培养瓶(Corning);游标卡尺(杭州工具量具有限公司);电子天平(上海精密仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Lovo 细胞用含 10% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养基,于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中常规传代培养。

1.2.2 人结直肠癌裸鼠移植瘤模型的建立 将处于指数生长期的瘤细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 2 × 10⁷/ml。无菌条件下,接种于裸鼠右前肢腋下,0.2 ml/只。待瘤体达到 1 cm³ 左右,无菌条件下取出瘤体,分成 1 ~ 2 mm³ 瘤块,平均接种于 15 只裸鼠右前肢腋下。

1.2.3 动物分组及给药 待肿瘤生长至 0.5 cm³ 左右,将 15 只裸鼠移植瘤模型随机分为 3 组,即高剂量组(10¹⁰ PFU/ml)、低剂量组(10⁹ PFU/ml)、对

照组(PBS),每组 5 只。各组均采用瘤内注射,每天 1 次,连续 4 d。注射 Ad-GFP-nm23-HI 后连续观察 10 d。每 3 d 测肿瘤体积 1 次。

1.2.4 组织学检查 15 d 后处死动物,取出瘤体,测量体积、称重,并用 10% 的甲醛固定肿瘤,进行组织病理学检查。

1.2.5 数据处理 数据统计采用 SPSS11.0 软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 表示有统计学意义。

2 结果

不同剂量 Ad-GFP-nm23-HI 均能显著抑制人结直肠癌 Lovo 移植瘤的生长。各组移植瘤生长随不同治疗时间出现明显变化。对照组肿瘤持续增长,肿瘤体积不断增大,而治疗组肿瘤生长缓慢,且随时间增长其生长抑制作用更加明显,肿瘤体积抑制率和瘤重抑制率与对照组比较均有统计学意义,对照组肿瘤体积明显大于 Ad-GFP-nm23-HI 组,抑制率分别为 76.0% 和 64.5%;对照组肿瘤重量明显重于 Ad-GFP-nm23-HI 组,抑制率分别为 66.1% 和 32.5% (*P* < 0.05) (图 1,表 1)。

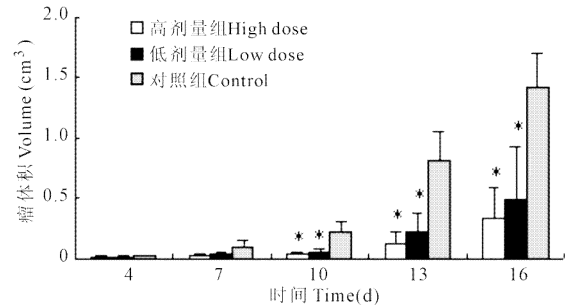


图 1 Ad-GFP-nm23-HI 对 Lovo 移植瘤体积的影响
Fig. 1 The effect of Ad-GFP-nm23-HI on the volume of Lovo xenografted cancer after

表 1 Ad-GFP-nm 23-HI 对 Lovo 移植瘤重量和体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 The effect of Ad-GFP-nm23-HI on the weight and volume of Lovo xenografted cancer after ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	瘤重 (g)	瘤重抑制率 (%)	瘤体积 (cm ³)	瘤体积抑制率 (%)
对照组 (PBS)	2.216 ± 0.445	0	1.426 ± 0.279	0
低剂量组 (10 ⁹ PFU/ml)	1.497 ± 0.212 *	32.5	0.506 ± 0.431 *	64.5
高剂量组 (10 ¹⁰ PFU/ml)	0.751 ± 0.274 *	66.1	0.342 ± 0.257 *	76.0

肿瘤体积抑制率 = (1 - 实验组平均瘤体积/对照组平均瘤体积) × 100%, 瘤重抑制率 = (1 - 实验组平均瘤重/对照组平均瘤重) × 100%, * 与对照组相比 *P* < 0.05

2.2 Ad-GFP-nm23-HI 治疗后移植瘤组织病理学的变化

镜下观察,对照组的肿瘤组织结构尚好,瘤细胞体积较大,明显异形,核大而深染,易见核分裂,胞浆

少,嗜碱性;低剂量 nm23-HI 组可见部分瘤体组织结构尚好,周边可见小片状瘤体坏死;高剂量 nm23-HI 组可见大部分瘤体组织坏死和凋亡,仅在毛细血管周围可见结构尚好的瘤体组织(封 3,图 2)。

3 讨论

肿瘤本质上表现为细胞失去控制的异常增殖。这种异常生长的能力除了表现为肿瘤本身的持续生长外,在恶性肿瘤还表现为对邻近正常组织的侵犯及经血管、淋巴管和体腔转移到身体其他部位,而这往往是肿瘤致死的原因。肿瘤转移是一个极其复杂的过程,包括肿瘤细胞从原发瘤脱离,进入血管和淋巴管,通过粘附于内皮细胞的适宜部位驻留,诱导血管形成,最终在远离原发部位形成转移灶(曾益新等,2006)。肿瘤转移过程受诸多基因调控,K-1735 cDNA 文库中筛选出的一个 cDNA 克隆,发现该基因在肿瘤细胞中的表达与肿瘤细胞的转移能力呈负相关。目前,临床研究发现 nm23-H1 表达水平与转移呈负相关的肿瘤有黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌等(刘志荣等,2006)。

近年来有关文献报道 nm23 蛋白在结直肠癌无淋巴结转移组中的阳性表达率显著高于有转移组,其阳性表达率与结直肠癌淋巴结转移呈负相关(许天文等,2005;刘毓健等,2003)。nm23 蛋白发挥抑制肿瘤生长和转移作用的可能机制为 nm23 蛋白具有核苷二磷酸激酶(NDPK)活性。当 nm23 蛋白失活,减少 GDP 生成 GTP 的量,会发生纺锤体形成障碍,从而导致瘤细胞染色体非整倍体的形成,进而促进肿瘤的发展。NDPK 还可通过调节 GTP 供给而调节 G 蛋白活性,从而调节细胞信号的传递(陈军等,2000)。

翁德胜等(2004)发现 nm23 基因在高转移 Lovo 细胞中呈低表达。在本研究中,我们利用宿主范围广、转染效率高、容易制备且安全性高的腺病毒为载体(Alemanly *et al.*, 2007)以 nm23-H1 作为靶基因,构建携带绿色荧光蛋白(GFP)的基因药物 Ad-GFP-nm23-H1。

在前期的体外实验中我们已经证实了 Ad-GFP-nm23-H1 对 Lovo 细胞的增殖和侵袭转移有明显的抑制作用。为了进一步了解 Ad-GFP-nm23-H1 对体

内 Lovo 细胞的影响,对裸鼠皮下移植瘤进行了观察,结果显示对照组瘤块具有生长快速的特点,而 Ad-GFP-nm23-H1 处理组瘤块生长则较缓慢。提示 Ad-GFP-nm23-H1 对在体肿瘤生长具有抑制作用。

组织病理学检查发现,Ad-GFP-nm23-H1 治疗后的肿瘤组织可见细胞体积缩小,胞浆固缩,细胞膜皱缩,可见大片死亡细胞和散在坏死灶,对照组的肿瘤组织结构尚好,瘤细胞体积较大,明显异形,核大而深染,易见核分裂,胞浆少,嗜碱性,并浸润到周围的肌肉组织,证实了 Lovo 细胞的幼稚、低分化与恶性程度高的特性。

本研究结果表明,Ad-GFP-nm23-H1 对人高转移结直肠癌 Lovo 细胞的生长具有明显的抑制作用,为 nm23-H1 临床上基因治疗提供了一定的实验依据。在后续实验中,我们将建立结直肠癌肝转移模型,同时通过静脉注射带有 nm23-H1 的腺病毒,了解腺病毒能否在体内自动感染肿瘤细胞并表达,从而达到基因治疗的目的。

4 参考文献

- 陈军,周清华. 2000. nm23 基因与肺癌转移关系的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 3(3): 230~235.
- 刘毓健,喻志革,赵承梅,等. 2003. 转移抑制基因 nm23-H1 在结直肠癌中的表达及其与临床病理因素的关系[J]. 中华胃肠外科杂志, 6(5): 323~325.
- 刘志荣,杨湛. 2006. nm23-h1 与肿瘤侵袭、转移的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,14(9): 1166~1168.
- 翁德胜,丁彦青,孙青. 2004. 高低转移人大肠癌细胞系基因表达谱差异[J]. 第一军医大学学报,24(3):256~259.
- 许天文,陈道达,郑勇斌,等. 2005. C-erbB-2, nm23 蛋白表达与结直肠癌浸润转移的相关性[J]. 华中科技大学学报(医学版), 34(2): 214~216.
- 曾益新,吕有勇,朱明华,等. 2006. 肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社: 1~2.
- Alemanly R. 2007. Cancer selective adenoviruses[J]. Molecular Aspects of Medicine, 28(1): 42~58.
- Stegg PS, Bevilacqua G, Kopper L, *et al.* 1988. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential[J]. Natl J Cancer Inst, 80(3): 200~204.