

组织特异性 CD/5-FC 系统对大肠癌的原位基因治疗

黎成金¹, 马庆久², 涂小煌¹, 王烈¹, 李金茂²

Antitumor Effect of Cytosine Deaminase Genetherapy in Situ Human Colon Carcinoma in Nude Mice

LI Cheng-jin¹, MA Qing-jiu², TU Xiao-huang¹, WANG Lie¹, LI Jin-mao²

1. Department of General Surgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Command, Fuzhou 350025, China; 2. Department of General Surgery, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University

Abstract :Objective To investigate the antitumor effect of genetherapy in situ of carcinoembryonic antigen (CEA) tissue-specific cytosine deaminase (CD) / 5-fluorocytosine (5-FC) system on human colorectal carcinoma in nude mice. **Methods** Recombinant retroviral vector GICEACDNa was packaged in PA317 cells with lipofectamine technique and then the cells were selectively cultured in G418 and the viral supernatant was harvested. The human colorectal carcinoma cell lines LoVo and SW480 were injected into flanking Balb/c nude mice respectively. 0.2ml viral supernatant was injected into tumors daily for 3ds and 500 mg/kg 5-FC was givenip daily for 21ds when the tumors were palpable. All the mice were sacrificed at the end of the treatment, and then PCR and RT-PCR were performed to detect the expression of targeted gene in carcinoma tissue. **Results** The virus titer of GICEACDNa was 5.6×10^6 CFU (colony forming unit, CFU) /L. The targeted genes were detected in tumor tissues. The weight of the LoVo cell tumor were 111.52 ± 25.89 mg ($P < 0.01, t = 4.035, n = 5$ than that in the control groups) and the weight of the SW480 cell tumor were 685.44 ± 240.38 mg ($P < 0.01, t = 3.670, n = 5$ than that in the parent groups) following administration of 5-FC systemically. **Conclusion** The CEA tissue-specific CD/5-FC system has an obvious targeting anti-tumor effect on human colorectal carcinoma LoVo cell tumor and SW480 cell tumor, but the killing effect on the LoVo cell tumor is stronger than that on the SW480 cell tumor.

Key words :CEA; Cytosine Deaminase; 5-Fluorocytosine; Colorectal Carcinoma; Genetherapy

摘 要:目的 探讨癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)组织特异性胞嘧啶脱氨基酶基因对不同分泌 CEA 大肠癌组织的靶向杀伤作用。方法 脂质体法将 CEA 组织特异性逆转录病毒载体 GICEACDNa 在 PA317 细胞中进行包装,大肠癌细胞 LoVo 和 SW480 分别接种到 BALB/c 裸鼠大腿皮下,成瘤 2 周后,瘤内多点注射法行原位基因转染,每天腹腔注射 500mg/kg 的 5-FC(5-fluorocytosine),观察治疗效果。结果 病毒滴度为 5.6×10^6 CFU/L。经多次注射法转染,目的基因在肿瘤组织中能有效表达,治疗 21 天后,基因治疗组有明显的抑瘤作用,但对 LoVo 细胞肿瘤的抑瘤作用明显大于对 SW480 细胞肿瘤。结论 CEA 组织特异性 CD/5-FC 系统对 LoVo 细胞肿瘤的抑瘤作用更明显。

关键词: 癌胚抗原;胞嘧啶脱氨基酶;5-氟胞嘧啶;大肠癌;基因治疗

中图分类号:R735.3⁺4 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)04-0206-03

0 引言

在肿瘤基因治疗研究领域,自杀基因在前药的作用下直接对肿瘤发挥杀伤作用,又兼有强效的旁观者杀伤效应,因此具有广泛的应用前景。基因治疗研究的最终目的是应用于临床,为了探讨 CEA

组织特异性 CD 基因对低表达 CEA 的大肠癌肿瘤的靶向性杀伤作用,我们在前期实验的基础上^[1],进行了原位基因治疗的动物实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料来源、质粒扩增、载体的包装、病毒上清的收集及病毒滴度的测定 见文献[1]。将 LoVo 和 SW480 细胞以 5×10^6 分别接种到 4 周龄 Balb/c 裸鼠大腿外侧皮下,裸鼠雌雄不限,分为 4 组($n = 5$):

收稿日期:2004-07-08;修回日期:2004-12-21

作者单位:1. 350025 中国人民解放军南京军区福州总医院普外科;2. 中国人民解放军第四军医大学唐都医院普外科



G1、G2 组接种 LoVo 细胞；G3、G4 组接种 SW480 细胞。待裸鼠成瘤 2 周后，G1、G3 组病毒上清 0.2 ml 瘤内多点注射，1 次/天，共 3 次；G2、G4 为对照组。之后腹腔注射 5-FC 500mg/kg/d，治疗 21 天，每 3 天测量肿瘤重量，观察肿瘤生长情况。估算肿瘤重量的公式如下： $[长(mm) \times 宽(mm)^2] / 2 = 肿瘤重量(mg)$ 。

1.2 肿瘤组织 DNA 及总 RNA 的提取，PCR 及 RT-PCR 检测 治疗 21 天后将动物处死，肿瘤标本称重后，取约 20mg 新鲜肿瘤组织，按 DNA 抽提试剂盒提取组织 DNA，置-20 冰箱备用；取约 100mg 新鲜肿瘤组织，采用 Life Technologies Inc 的总 RNA 提取试剂盒 TRIZOL Reagent 提取组织总 RNA，用紫外分光光度计定量，置-80 冰箱备用。PCR 用 50μl 反应体系，反应条件：94 3min，94 30s，60 30s，72 40s，72 10min，40 个循环，PCR 产物用 20g/L 琼脂糖凝胶电泳。RT-PCR 反应按 Promega 公司试剂盒说明进行。50μl 反应体系。反应条件为：48 反转录 45min，94 酶 (AMV) 灭活 2min，94 30s，57 1min，68 2min 反应 40 个循环后终止。产物用 20g/L 琼脂糖凝胶电泳。

1.3 统计学处理 在 SPSS 软件中输入成瘤后前药治疗下每 3 天的各组肿瘤重量，采用非配对计量资料的 *t* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 逆转录病毒 G1CEACDNa 包装收获病毒上清的病毒滴度为 5.6×10^6 CFU/L，原位转基因之 LoVo 及 SW480 肿瘤组织 DNA PCR 产物电泳均可见 1.5kb 片段，表明目的基因成功转染，见图 1。

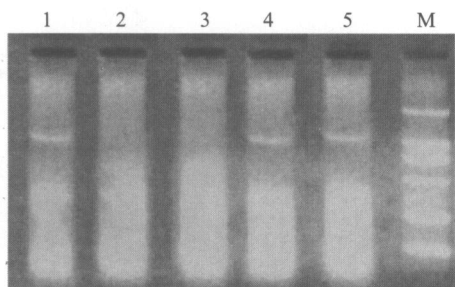


图 1 PCR 检测目的基因整合

1. 原位转基因组 SW480 细胞肿瘤；2. 对照组 SW480 细胞肿瘤；3. 对照组 LoVo 细胞肿瘤；4、5. 原位转基因组 LoVo 细胞肿瘤；M: DNA Marker

2.2 原位转基因肿瘤组织 mRNA RT-PCR 产物电泳可见 1.5kb 条带，表明目的基因在肿瘤组织中有明显表达，见图 2。

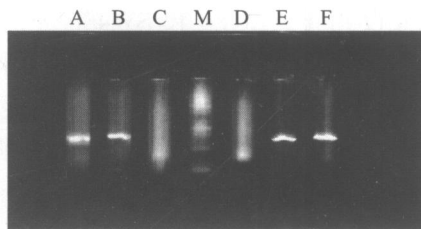


图 2 RT-PCR 检测 CD 基因在肿瘤组织的表达

A、B. 原位转基因组 SW480 细胞肿瘤；C. 对照组 SW480 细胞肿瘤；D. 对照组 LoVo 细胞肿瘤；E、F. 原位转基因组 LoVo 细胞肿瘤；M. DNA Marker

2.3 原位基因治疗对大肠癌细胞 LoVo、SW480 抑瘤实验 肿瘤细胞皮下注射 2 周后，在注射部位均可见肿瘤生长，前药治疗后测量肿瘤大小：在 LoVo 细胞肿瘤，基因治疗组由 (756.34 ± 136.63) mg 缩小为 (111.52 ± 25.89) mg，而对照组肿瘤为 (2256.44 ± 850.63) mg，基因治疗组抑瘤作用明显 ($P < 0.01, t = 4.035, n = 5$)，在 SW480 细胞肿瘤，基因治疗组由 (820.68 ± 235.82) mg 缩小为 (685.44 ± 240.38) mg，对照组肿瘤为 (2453.43 ± 865.34) mg，亦有明显的抑瘤作用 ($P < 0.01, t = 3.670, n = 5$)，但对 LoVo 细胞肿瘤的抑瘤作用明显大于对 SW480 细胞肿瘤 ($P < 0.01, t = 3.703, n = 5$)，见图 3。

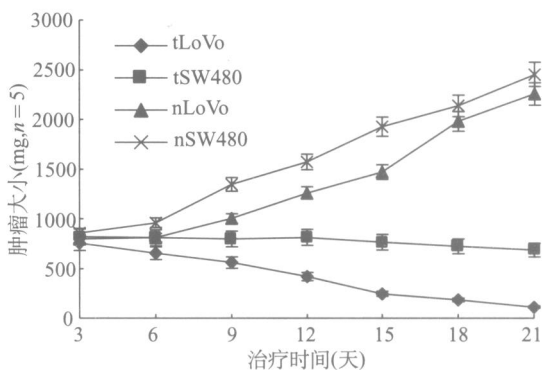


图 3 原位基因治疗抑瘤曲线

tLoVo 原位转基因组 LoVo 细胞肿瘤；tSW480 原位转基因组 SW480 细胞肿瘤；nLoVo 对照组 LoVo 细胞肿瘤；nSW480 对照组 SW480 细胞肿瘤

3 讨论

胞嘧啶脱氨基酶(cytosine deaminase, CD)基因是来源于某些细菌和真菌的一种自杀基因，其编码的 CD 酶能将对真核细胞相对无毒的 5-氟胞嘧啶(5-FC)转换成细胞毒性化疗药 5-Fu，抑制细胞 RNA 和 DNA 的合成而致细胞死亡^[2,3]，近年来对其在肿瘤治疗中的作用已进行了少量 期临床实验。研究表明，CEA 转录调控序列可控制 CD 基因在 CEA 阳性的大肠癌组织中高效表达，在前药 5-FC 作用下，产生选择性杀伤肿瘤细胞的作用^[4]，使

正常组织免受损害。LoVo 和 SW480 分别是高表达 CEA 和低表达 CEA 的人大肠癌细胞株, CEA 分泌水平分别为 49fg/cell 和 3.1fg/cell。逆转录病毒载体 GICEACDNa 由组织特异性 CEA 基因顺式转录调控序列调控 CD 基因的表达, 由于病毒滴度较低, 将 LoVo 细胞和 SW480 细胞分别在裸鼠皮下致瘤后, 采用多次注射法进行转染, 结果显示, 目的基因在转基因肿瘤组织中能有效表达。之后每天用前药 5-FC 500mg/kg 腹腔注射, 21 天后, 转基因治疗组与未转基因组比较, 均有明显的抑瘤作用, 但对 LoVo 细胞肿瘤的作用更为明显, 其机制有待进一步实验证实。

临床资料显示, 在大肠癌患者中, 近 2/3 血清 CEA 正常^[5], 有相当一部分大肠癌患者其 CEA 表达水平较低^[6], 影响大肠癌术后生存率的最主要原因是癌细胞的远处转移, 尤其是肝转移, 因此, CEA 组织特异性 CD/5FC 系统对中晚期大肠癌肿瘤, 特别是结肠癌肝转移的特异性治疗作用可能更有意义。有研究表明, 用 CEA 启动子和增强子共同调节 CD 基因的表达, 能明显提高肿瘤细胞 CD 基因的表达^[7], 放疗、免疫因子与 CD/5FC 系统的联合应用、双自杀基因的共同转导等都能提高 CD/5FC 系统的治疗效果^[7-9], 这可能是未来靶向基因治疗的方向, 可以在保证治疗靶向性的前提下提高治疗效率。

参考文献:

- [1] 黎成金, 马庆久, 赖大年, 等. CD/5-FC 系统对结肠癌细胞的杀伤作用[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(5): 535-539.
- [2] Nakamura H, Mullen JT, Chandrasekhar S, et al. Multimodality therapy with a replication-conditional herpes simplex virus 1 mutant that expresses yeast cytosine deaminase for intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil [J]. Cancer Res, 2001, 61(14): 5447-5452.
- [3] Harvey BG, Maroni J, O'Donoghue KA, et al. Safety of local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of morbid conditions [J]. Hum Gene Ther, 2002, 13(1): 15-63.
- [4] 崔龙, 林言箴, 朱正纲, 等. 5-FC/CD 系统对荷大肠癌裸鼠肿瘤的杀伤效应[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(6): 473-475.
- [5] Perez CA, Ravindranath MH, Gupta RK, et al. Serum total gangliosides and TA90-IC levels: novel immunologic markers in colorectal cancer [J]. Cancer J, 2002, 8(1): 55-61.
- [6] Wichmann MW, Muller C, Hornung HM, et al. Results of Long-term Follow-up after Curative Resection of Dukes A Colorectal Cancer [J]. World J Surg, 2002, 26(6): 732-736.
- [7] Ueno M, Koyama F, Yamada Y, et al. Tumor-specific chemoradio-gene therapy for colorectal cancer cells using adenovirus vector expressing the cytosine deaminase gene [J]. Anticancer Res, 2001, 21(4A): 2601-2608.
- [8] 孙文长, 唐展云, 魏道严, 等. 白介素 18 和胞嘧啶脱氨酶基因对小鼠肝癌的联合基因治疗[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(5): 300-302.
- [9] 陈纲, 李世拥, 于波, 等. X 线联合胞嘧啶脱氨酶基因对结肠直肠癌肿瘤细胞的杀伤作用[J]. 中华外科杂志, 2002, 40(2): 136-138.

[编辑: 安 凤; 校对: 刘红武]