

基础研究 ·

# 脂质体-c-erbB-2 反义寡核苷酸转染对人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤形成的抑制作用研究

吴永忠<sup>1</sup>,任庆兰<sup>2</sup>,刘宇<sup>2</sup>,陈晓品<sup>1</sup>,李少林<sup>2</sup>

**Inhibitory effect of liposome-c-erbB-2 antisense oligodeoxynucleotides transfection on the human ovarian carcinoma transplanted subcutaneously in nude mice**

WUYong-zhong, RENQin-glan, LIUYu, et al

The first hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**Abstract: Objective** To explore the inhibitory effect of liposome-c-erbB-2 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (c-erbB-2ASODN) on the human ovarian epithelial cancer transplanted subcutaneously in nude mice. **Methods** Human ovarian epithelial cancer cell lines SKOV<sub>3</sub> were treated with liposome-c-erbB-2 ASODN, and then transplanted subcutaneously in nude mice. The changes of tumor volume were observed and the tumor growth inhibition rate was calculated. **Results** The tumor growth inhibition rate of the treated cell lines by c-erbB-2ASODN was reduced, the maximum tumor growth inhibition rate was 40.0% ( $P < 0.05$ ); The first time that tumor can be detected was raised up to 9.6 days ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The study showed that c-erbB-2 ASODN transfection can inhibit the tumor growth of ovarian epithelial carcinoma cell lines in nude mice, it may be a valuable gene therapy for the ovarian epithelial carcinoma.

**Keywords:** c-erbB-2; Antisense oligodeoxynucleotide; Human ovarian epithelial cancer; Tumor transplanted subcutaneously in nude mice

**摘要:**目的 探讨经脂质体—硫代磷酸化修饰的 c-erbB-2 反义寡脱氧核苷酸(ASODN)作用后的卵巢上皮癌细胞株 SKOV<sub>3</sub> 在裸鼠皮下的成瘤能力。方法 利用脂质体将经硫代磷酸化修饰的寡核苷酸导入 SKOV<sub>3</sub> 细胞内,然后将这种被转染的细胞接种于裸鼠皮下,观察肿瘤体积的变化,并计算抑瘤率。结果 经脂质体-c-erbB-2ASODN 作用后的卵巢上皮癌细胞在裸鼠皮下成瘤能力降低,最大抑瘤率达 40.0% ( $P < 0.05$ )。首次出现肉眼可见肿瘤的平均时间延长为 9.6 天( $P < 0.05$ )。结论 c-erbB-2 癌基因的反义调控能降低卵巢上皮癌细胞的成瘤能力,抑制肿瘤生长,在卵巢上皮癌的基因治疗中有一定价值。

**关键词:** c-erbB-2; 反义寡核苷酸; 人卵巢上皮癌; 裸鼠皮下移植瘤

中图分类号: R73-36 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2003) 02-0085-03

## 0 引言

肿瘤的综合治疗原则已成为肿瘤治疗的最根本治疗模式,基因治疗作为肿瘤综合治疗的重要组成部分已广受人们重视<sup>[1,2]</sup>,近年来卵巢癌的反义基因治疗研究取得了可喜的效果<sup>[3]</sup>。我们采用离体途径将硫代磷酸修饰的 c-erbB-2ASODN 经脂质体介导转染入 c-erbB-2 高表达的人卵巢皮癌细胞株 SKOV<sub>3</sub>

内<sup>[4]</sup>,然后移植到裸鼠皮下,以研究 c-erbB-2ASODN 对卵巢癌细胞裸鼠皮下成瘤的抑制作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SKOV<sub>3</sub> 细胞株购自我校基础医学院肿瘤研究室。阳离子脂质体 (lipofectin) 购自 Sigma 公司。BALB/C 遗传背景的裸鼠购自四川抗生素研究所并由我校动物实验中心代养。c-erbB-2 正义寡核苷酸 (c-erbB-2SODN) 序列号为 5'-GGTTCACACGTG-GCG3'; c-erbB-2ASODN 序列为 5'-CCAAGTGTG-CACCGG-3'<sup>[5]</sup>。所有寡核苷酸由上海生物工业公司按要求合成并全部经硫代磷酸化修饰。RPMI-1640

收稿日期: 2002-07-10; 修回日期: 2002-10-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070230)

作者单位: 1.400016 重庆医科大学第一医院肿瘤科; 2. 重庆医科大学基础医学院

培养基、小牛血清、胰酶为 Hyclone 公司产品。细胞培养室由我校动物中心实验室提供。

1.2 细胞培养与脂质体转染 SKOV<sub>3</sub> 细胞在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下,在含 10% 小牛血清的 RPMI-640 培养基中培养。将处于对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶消化后,接种到 100ml 玻璃培养瓶内,每瓶接种细胞数为 6 × 10<sup>5</sup> 个,加普通培养液培养 20h。融合率达到 50% 左右后倾去培养液,用无血清无抗生素培养液(本文称转染液)3ml 清洗细胞表面 2 次,按不同组进行脂质体转染。脂质体先溶于转染液中室温静置 45min 再与寡核苷酸混合包裹并室温静置 15min 以上。按以下分组转染:第 1 组,正常对照组,lipofectin6 μg+ 转染液总量 2000μl;第 2 组,正义观察组,lipofectin6 μg+c -erbB-2SODN6 μg+ 转染液总量 2000μl;第 3 组,反义观察组,lipofectin6 μg+c -erbB-2 ASODN6 μg+ 转染液总量 2000μl。转染 18h 后倾去培养液,加普通培养液 6ml 培养 48h 后换新鲜普通培养液 4ml,再培养 2h 后用 0.25% 胰酶消化并收集细胞,制成 1 × 10<sup>7</sup>/ml 的细胞悬液备用。

1.3 裸鼠皮下移植瘤形成

本研究选用裸鼠共 15 只(每组 5 只)均为 4~6 周龄雌鼠,平均体重 20.5 克,每只裸鼠两个接种点(每组 10 个接种点即 10 个移植瘤),分别位于背侧靠左右后肢处。每点接种细胞数 3 × 10<sup>6</sup> 个。接种后注意每天观察裸鼠情况。

1.4 瘤体测量

皮下接种后第 10d、15d、20d、25d、30d 用游标卡尺测量瘤体最长径(a)与最短径(b),肿瘤体积 V (mm<sup>3</sup>) = ab<sup>2</sup>/6,抑瘤率 = (V<sub>对</sub> - V<sub>观</sub>)/V<sub>对</sub> × 100%<sup>[6]</sup>。

表 2 不同时间肿瘤体积比较

组别	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )				
	10d	15d	20d	25d	30d
正常时间组	40.6 ±5.7	103.0 ±22.5	150.7 ±30.8	205.1 ±51.1	301.4 ±67.1
正义观察组	35.2 ±4.6 *	96.3 ±20.6 *	146.5 ±31.2 *	199.0 ±50.3 *	297.1 ±59.8 *
反义观察组		70.7 ±9.1 **	90.3 ±19.6 **	146.3 ±31.5 **	253.5 ±49.8 *

注: \* P>0.05 \*\* P<0.05

表 3 不同时间抑瘤率比较

组别	抑瘤率 %				
	10d	15d	20d	25d	30d
正常对照组	—	—	—	—	—
正义观察组	13.3	6.5	6.7	2.9	1.5
反义观察组		31.3	40.0	28.7	15.9

测量肿瘤体积时称裸鼠体重。

1.5 统计处理

采用 t 检验和 <sup>2</sup> 检验。

2 结果

2.1 全部 15 只裸鼠均成活并形成单一皮下移植瘤,接种点无红肿破溃。

2.2 各组第一次出现目检可见肿瘤的平均时间不同,反义观察组与正义观察组和正常对照组相比,均有显著性差异。见表 1,图 1。

表 1 首次出现目检可见肿瘤的平均时间比较

分组	移植瘤数	平均时间(天)	t 值	P 值
正常对照组	10	6.2 ±1.2	—	—
正义观察组	10	6.7 ±0.9	0.804	>0.05
反义观察组	10	9.6 ±1.1	2.782	<0.05

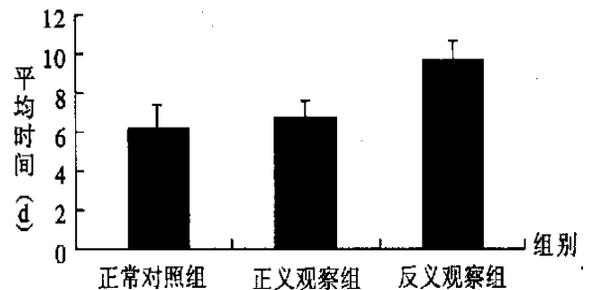


图 1 首次出现目检可见肿瘤平均时间比较

2.3 各组形成皮下移植瘤的体积随时间变化而不同,反义观察组出现肿瘤生长延迟现象,在第 20 天时差别最大。抑瘤率差别在 20 天后又趋下降,见表 2、表 3、图 2。

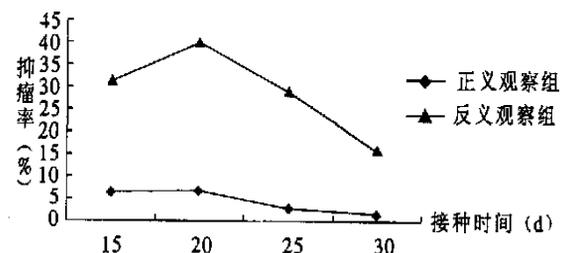


图 2 不同时间抑瘤率变化趋势

2.4 不同时间裸鼠体重无变化,见表 4。

表 4 皮下接种后不同时间裸鼠体重比较

组别	体重(g)		
	10d	20d	30d
正常对照组	20.1 ±1.2	21.2 ±1.1	21.5 ±1.3
正义观察组	19.9 ±1.1	20.7 ±1.2	21.3 ±1.3
反义观察组	18.6 ±0.9	19.6 ±0.7	20.1 ±1.1

3 讨论

3.1 c-erbB-2 癌基因在许多恶性肿瘤中呈高表达, 以 SKOV<sub>3</sub> 细胞株最突出<sup>[4]</sup>, 它与肿瘤的发生、发展、转移、预后密切相关<sup>[7]</sup>。因而 c-erbB-2 是基因治疗的理想靶点。寡核苷酸经硫代磷酸修饰后可保持对核酶的稳定性。阳离子脂质体与寡核苷酸通过静电吸引力结合, 使其包裹率达 100%, 大大提高了寡核苷酸在细胞内的浓度并进一步增强了对核酶的稳定性<sup>[6]</sup>。

3.2 本组资料选用的 c-erbB-2ASODN, 它与 c-erbB-2 mRNA 5' 端编码区互补, 具有很强的反义抑制效应<sup>[5]</sup>。本研究中表现在经 c-erbB-2ASODN 处理后的细胞在裸鼠皮下形成移植瘤的时间延长, 具有较高的肿瘤抑制率。抑瘤率在 20 天前呈上升趋势, 至 20 天时达最大值, 之后又逐渐下降, 与对照组的差别逐渐缩小, 可能是导入细胞内的 ASODN 逐渐降解而失去活性, 癌基因又重新活跃所致, 提示反义基因治疗需连续给药或加用其它治疗才能达到最佳效果。根据肿瘤发生的多基因学说, 采用多基因联合技术可能会取得更好的疗效, 笔者也在开展这方面的研究。正义观察组对皮下移植瘤的形成也有轻微的抑制作用, 这可能是由于寡核苷酸本身具有的非特异性非反义抑制效应所致<sup>[8]</sup>。

3.3 本组资料显示, 各组裸鼠在相同时间体重没有统

计学差异, 表明在一定剂量限度内, ASODN 治疗具有一定安全性。这可能是 ASODN 治疗本身不涉及外源基因的导入以及它本身就具有一定的靶向性, 因此 c-erbB-2 异常高表达往往只有肿瘤细胞才具有。

参考文献:

- [1] Guha C, Guha U, Tribius S, et al. Antisense ATM gene therapy: a strategy to increase the radiosensitivity of human tumor [J]. Gene Ther, 2000, 7 (10): 852-858.
- [2] Pietras K, Ostman A, Sjöquist M, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumor [J]. Cancer Res, 2001, 61 (7): 2929-2934.
- [3] Skiung JS, Squarrito RC, Connor JP, et al. p53 gene mutation analysis and antisense-mediated growth inhibition of human ovarian carcinoma cell lines [J]. Gynecol Oncol, 1996, 60 (1): 72-78.
- [4] King BL, Carter D, Foellmer HG, et al. Neu proto-oncogene amplification and expression in ovarian adenocarcinoma cell lines [J]. Am J Pathol, 1992, 140 (1): 23-31.
- [5] Funato T, Kozawa K, Fujimaki S, et al. Increased sensitivity to cisplatin in gastric cancer by antisense inhibition of the HER-2/neu c-erbB-2 gene [J]. Chemotherapy, 2001, 47 (4): 297-303.
- [6] O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Gallagher M, et al. C-raf-1 depletion and tumor responses in patients treated with the C-raf-1 antisense oligodeoxynucleotide Is5132 (CGP68936A) [J]. Clinical Cancer Research, 1999, 5 (12): 3977-3982.
- [7] Eppenberger-Castori S, Kuegel W, Benz C, et al. Prognostic and predictive significance of erbB-2 breast tumor levels measured by immunohistochemistry [J]. J Clin Oncol, 2001, 19 (3): 645-656.
- [8] Marcusson EG, Yacyshyn BR, Shanahan WJ, et al. Preclinical and clinical pharmacology of antisense oligonucleotides [J]. Mol Biotechnol, 1999, 12 (1): 1-11.

(贺文校对)