

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2009·01·013

· 基础研究 ·

## 组织特异性 CD/5-FC 系统热化疗治疗裸鼠结肠癌肝转移瘤的安全性

王 瑜<sup>1</sup>, 张宝明<sup>1</sup>, 黎成金<sup>1</sup>, 王 烈<sup>1\*</sup>, 涂小煌<sup>1</sup>, 王 羊<sup>2</sup>( 1. 南京军区福州总医院 普通外科研究所, 福州 350025; 2. 咸阳市中心医院 普外科 陕西 咸阳 712000 )

[ 摘 要 ] 目的: 探讨组织特异性胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶( CD/5-FC )系统热化疗对裸鼠结肠癌肝转移模型治疗的安全性。方法: 30 只裸鼠经门静脉注射转染 CD 基因的人结肠癌 LOVO 细胞, 建立结肠癌肝转移模型, 随机分为对照组、热化疗组和化疗组, 分别经腹腔注射生理盐水、43 °C 前药 5-FC 和室温前药 5-FC[ 均为 500 mg/( kg · d ) ]进行治疗。治疗 21 d 后处死裸鼠, 取各组裸鼠肝脏转移瘤组织、正常肝组织及胃、肺、胰腺、小肠及大肠组织作病理检测; RT-PCR 检测各组织的 CD 基因表达。结果: 常规病理检测显示对照组肝转移瘤组织细胞生长活跃, 热化疗组较化疗组肝转移瘤细胞生长受抑制更明显; 3 组裸鼠正常肝组织及胃、肺、胰腺、小肠和大肠组织均呈正常形态, 无明显病理改变。RT-PCR 检测显示, 3 组肝脏转移瘤组织 CD 基因表达稳定, 均见 154 bp 条带; 显示 3 组裸鼠正常肝组织及胃、肺、胰腺、小肠和大肠组织均无 CD 基因表达。结论: 组织特异性 CD/5-FC 系统热化疗明显提高了 CD 基因表达的靶向性, 减少了热化疗引起的正常组织损伤, 该治疗系统有较好的安全性。

[ 关键词 ] 结肠癌; 肝转移; 胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶; 基因治疗; 安全性

[ 中图分类号 ] R730.54; R735.3 [ 文献标志码 ] A [ 文章编号 ] 1007-385X( 2009 )01-059-04

## Tissue-specific CD/5-FC system thermochemotherapy in treatment of a liver metastasis model of colon cancer in nude mice: the safety

WANG Yu<sup>1</sup>, ZHANG Bao-ming<sup>1</sup>, LI Cheng-jin<sup>1</sup>, WANG Lie<sup>1\*</sup>, TU Xiao-huang<sup>1</sup>, WANG Yang<sup>2</sup>( 1. Institute of General Surgery, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China; 2. Department of General Surgery, The Central Hospital of Xianyang, Xianyang 712000, Shaanxi, China )

[ Abstract ] **Objective:** To study the safety of tissue-specific cytosine deaminase /5-fluorocytosine ( CD/5-FC ) system thermochemotherapy in treatment of a liver metastasis model of colon cancer in nude mice. **Methods:** Liver metastasis model was established by intravenously injection of LOVO cell lines harboring tissue-specific CD gene in 30 nude mice. The mice were then randomly divide into three groups, namely, a control group, a thermochemotherapy group, and a chemotherapy group; the three groups were intraperitoneally injected with sodium saline, 43 °C pro-drug 5-FC or pro-drug 5-FC, respectively. After 21 days, the animals were sacrificed and the pathological changes of liver, stomach, lung, pancreas, small intestine, and large intestine were examined by H-E staining. RT-PCR was used to study the expression of CD gene. **Results:** The growth of tumor cells in the control group grew actively, and the growth in the 43 °C pro-drug 5-FC group was greatly inhibited compared with those in the pro-drug 5-FC and normal saline groups. The normal liver, stomach, lung, pancreas, small intestine and large intestine tissues showed no pathological changes and no CD expression. RT-PCR examination revealed stable CD gene expression in the 3 groups. **Conclusion:** Tissue-specific CD/5-FC system thermochemotherapy can improve the specificity of CD gene expression, and reduces the damages to the normal tissues by the thermochemotherapy.

[ Key words ] Colon cancer; Liver metastasis; cytosine deaminase/5-fluorocytosine; gene therapy; safety

[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16( 1 ): 59-62 ]

[ 基金项目 ] 福建省自然科学基金资助项目( No. C0410045 )。Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province ( No. C0410045 )

[ 作者简介 ] 王 瑜( 1966- ), 男, 福建省福州市人, 医学博士, 主要从事肿瘤外科方面的研究

\* 通讯作者( Corresponding author ). E-mail: fzptwk@21cn.com

肿瘤基因治疗的关键是目的基因的转染效率及持续稳定的表达。对于自杀基因来说,目的基因的靶向性表达更为重要。如果自杀基因在正常组织细胞中表达,在其前药转换作用下,同样会使正常细胞“自杀”死亡,从而产生与临床上放疗、化疗相类似的毒性作用。应用某些肿瘤特异性或组织特异性调控元件控制自杀基因的表达,可以达到靶向治疗的目的。本课题组前期实验<sup>[1]</sup>已经证实温热疗法可以增强前药5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC)/胞嘧啶脱氨基酶(cytosine deaminase, CD)基因靶向性杀伤结肠癌细胞的作用。但正常人细胞能产生少量癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA),该自杀基因系统可能会对表达CEA的正常组织产生损伤作用。本实验观察组织特异性胞嘧啶脱氨基酶/5-氟胞嘧啶(CD/5-FC)系统热化疗对裸鼠结肠癌肝转移模型的正常组织的损伤作用,探讨该系统对肿瘤进行基因治疗的安全性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂和材料

4~6周龄BALB/c裸鼠30只[动物合格证号为SCXK(沪)2007-0005],雌雄各半,体重18~22g,购自上海实验动物中心,SPF级条件下饲养。人结肠癌细胞LOVO株购自中科院上海细胞生物研究所。含CEA启动子调控CD基因表达的逆转录载体G1CEACDNa、大肠杆菌*E. coli* JM109由本室保存。RPMI 1640培养基、G418、0.25%胰蛋白酶、青霉素、链霉素购自Gibco公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,脂质体lipofectamine<sup>TM</sup> 2000(LF2000)购自Invitrogen公司。质粒提取试剂盒购自Omega公司。*Sal* I购自Promega公司,5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC)购自Sigma公司, RN-Alater为QIAGEN公司, Trizol reagent购自Invitrogen公司, RT-PCR试剂盒购自Promega公司, Taq DNA聚合酶购自TaKaRa公司。CD基因引物由Sangon公司合成,引物序列(扩增产物为154 bp):上游5'-GGAAGTGAAGCAGGAAGTCG-3',下游5'-AAAT-TCAAAATGCGGAATCG-3'。

### 1.2 质粒的扩增和酶切鉴定

将质粒G1CEACDNa在感受态中大量扩增后,按质粒抽提试剂盒说明书提取并纯化质粒,主要步骤见文献<sup>[2]</sup>。

### 1.3 G1CEACDNa对人结肠癌LOVO细胞的转染

在24孔培养板中分别接种 $3 \times 10^3$ 个LOVO细胞,细胞生长至95%融合时,以脂质体法将

G1CEACDNa转染LOVO细胞,G418筛选抗性克隆并扩增。主要步骤见文献<sup>[3]</sup>。

### 1.4 裸鼠结肠癌肝转移模型的建立

30只4~6周龄BALB/c裸鼠称重后,用1%戊巴比妥钠0.15~0.20 ml(40 mg/kg)腹腔内注射麻醉,术野皮肤消毒,上腹部斜切口长约0.5 cm,暴露门静脉主干。将转染后的LOVO-CEACD细胞悬液0.2 ml(细胞量为 $1 \times 10^7$ 个)注入门静脉,注射时间约10 s,迅速压迫止血并防止腹腔内种植转移,关腹。操作过程遵循无菌操作原则。

### 1.5 动物模型分组及自杀基因前药给药治疗

30只结肠癌肝转移裸鼠模型随机分为3组(对照组、热化疗组、化疗组),每组10只,分别经腹腔注射生理盐水、43℃前药5-FC和室温前药5-FC,剂量均为500 mg/(kg·d)进行治疗,连续给药21 d。

### 1.6 病理学检测 CD/5-FC 热疗后模型裸鼠主要器官组织形态的变化

治疗21 d后处死裸鼠,剖腹切取各组模型裸鼠的肝脏转移瘤组织、正常肝组织及胃、肺、胰腺、小肠和大肠组织。10%甲醛固定,石蜡包埋,切片,H-E染色,观察各组裸鼠肝脏的转移瘤组织、正常肝组织及胃、肺、胰腺、小肠和大肠组织病理学变化。

### 1.7 RT-PCR 检测主要器官组织 CD 基因的表达

分别切取各组裸鼠肝脏转移瘤组织、肝正常组织及胃、肺、胰腺、小肠和大肠组织,RNAlater保护组织RNA免受降解。按Trizol reagent试剂盒说明书提取各标本的RNA,-80℃保存;按RT-PCR试剂盒操作步骤合成cDNA,RT-PCR反应采用25 μl反应体系:PCR混合物12.5 μl,cDNA 2 μl,上、下游引物各0.5 μl去离子水10 μl;反应条件为94℃ 3 min,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,72℃ 10 min,35个循环,产物行琼脂糖凝胶电泳。

## 2 结 果

### 2.1 CD/5-FC 热化疗后模型裸鼠主要器官组织病理形态变化

对照组肿瘤细胞生长活跃(图1A);热化疗组肿瘤细胞空泡变性,细胞核皱缩、边集甚至消失,仅残留少量肿瘤细胞,并可见散在的成纤维细胞、大量淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润(图1B);化疗组有少量细胞空泡变性,少量淋巴细胞浸润,肿瘤细胞生长受到抑制(图1C)。3组裸鼠正常肝组织及胃、肺、胰腺、小肠和大肠组织未见结肠癌细胞浸润,均呈正常形态,无明显病理损伤改变(图2)。

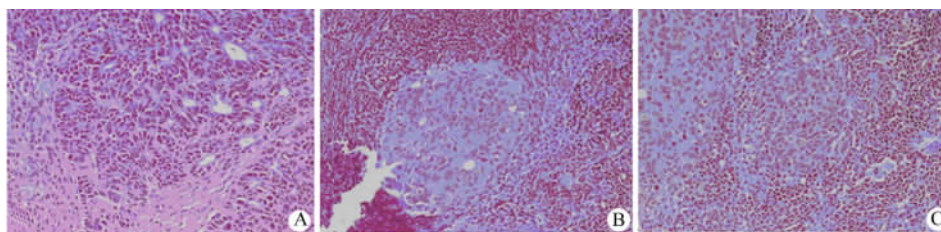


图1 CD/5-FC 热化疗治疗 21 d 后各组肝脏转移瘤组织形态变化 (H-E, ×400)

Fig.1 Histological changes of liver metastasis tumor tissue treated by CD/5-FC thermochemotherapy( H-E, ×400 )

A: Tumor cells grew actively in the tumor tissues of liver metastasis;B: Tumor cells were denatured vacuously, mesoplasts crinkled, cellular boundary disappered, only a small number of tumor cells remained, fibroblast were scattered, and tumor cells were invaded by a lot of lympholeukocytes and eosinophilic granulocytes;C: Small amount of tumor cells were denatured vacuously, others were infiltrated by lympholeukocytes, and the growth of tumor cells were surspressed

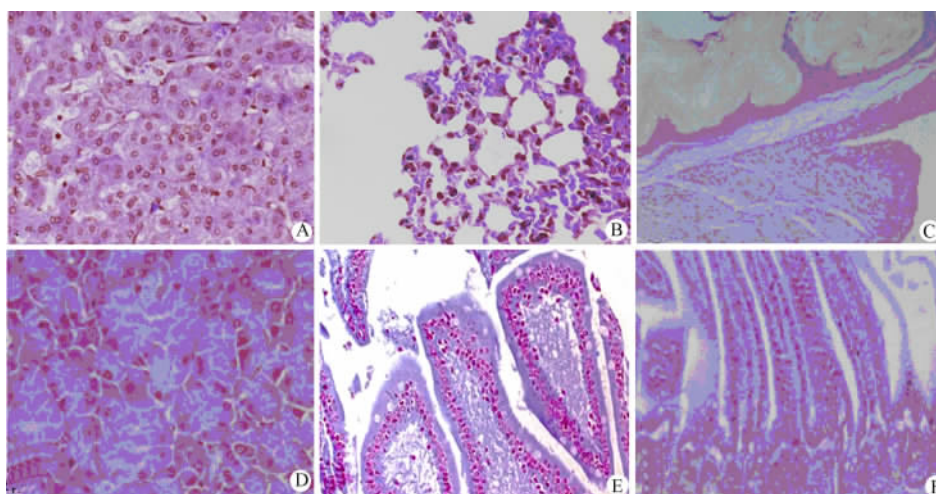


图2 CD/5-FC 热化疗治疗 21d 后模型裸鼠各主要器官正常组织的形态变化 (H-E, ×400)

Fig. 2 Histological changes of different normal tissues treated by CD/5-FC thermochemotherapy for 21 d( H-E, ×400 )

A: Normal liver tissue; B: Normal lung tissue; C: Normal stomach tissue;

D: Normal pancreas tissue; E: Normal small intestine tissue; F: Normal large intestine tissue

## 2.2 CD/5-FC 和热化疗后模型裸鼠主要器官组织 CD 基因的表达

CD/5-FC 热化疗处理 21 d 后,RT-PCR 检测显示,3 组裸鼠正常肝组织、胃、肺、胰腺、小肠和大肠组织,均未见 CD 基因表达。3 组裸鼠肝脏转移瘤组织均见 CD 基因表达(154 bp,图3)。

## 3 讨论

本研究模拟结直肠癌切除术后癌细胞回流入门静脉至肝脏血行播散肝转移的过程,采用门静脉注射法建立转染 CD 基因细胞的裸鼠肝转移模型,符合肿瘤在人体内发生、发展的复杂环境<sup>[4]</sup>。胞嘧啶脱氨酶是来源于真菌和大肠杆菌的一种自杀基因,编码的 CD 酶是真菌和大肠杆菌代谢旁路中的一种酶,哺乳动物中不含此种酶。CD 可将无毒的 5-氟

胞嘧啶脱氨基转化为肿瘤化疗药物氟尿嘧啶( fluorouracil,5-FU),从而在肿瘤局部产生高浓度毒性作用以杀伤肿瘤细胞而全身反应较轻<sup>[5]</sup>。已有实验<sup>[6-7]</sup>证实热疗不影响 CD 基因的表达,甚至可以提高 CD 基因的表达水平,并且提高 5-FC 治疗的敏感性。本研究结果显示:对照组肝转移瘤组织细胞生长活跃,表明结肠癌肝转移模型制备成功;热化疗组细胞空泡变性,细胞核皱缩、边集甚至消失,仅残留少量肿瘤细胞,并可见散在的成纤维细胞、大量淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润,表明 CD/5-FC 热化疗对肝转移瘤细胞有较大程度杀伤;化疗组有少量细胞空泡变性,少量淋巴细胞浸润,肿瘤细胞生长受到抑制。RT-PCR 检测转移瘤组织中 CD 基因表达,3 组 CD 基因均稳定表达(154 bp),证实 CD 基因具有较好的靶向性。

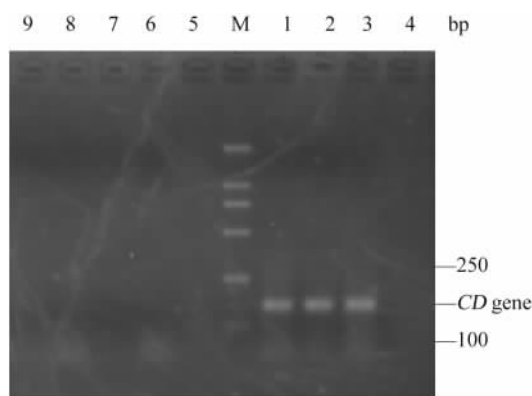


图3 RT-PCR检测CD/5-FC热化疗后模型裸鼠各主要器官组织中CD基因的表达

Fig.3 CD gene expression in different tissue detected by RT-PCR

M: DNA Marker; 1: Liver metastasis tumor tissues of control group, showing CD gene( 154 bp); 2: Liver metastasis tumor tissue of thermochemotherapy group; 3: Liver metastasis tumor tissue of chemotherapy group; 4: Normal liver tissue; 5: Normal lung tissue; 6: Normal stomach tissue; 7: Normal pancreas tissue; 8: Normal small intestine tissue; 9: Normal large intestine tissue

目的基因在特定部位的表达是基因治疗成功的关键因素,一方面针对肿瘤组织具有强大的治疗效能,另一方面对其他组织器官无或少有毒性作用<sup>[8]</sup>。组织和细胞靶向性转录技术是利用特异性启动子控制目的基因的表达,从而在特定的细胞中表达基因的治疗作用<sup>[9]</sup>。CEA是结肠癌等恶性肿瘤相对特异性标志物,在结肠癌中的阳性率约为70%~90%,在结肠癌肝转移及复发病例中阳性率更高<sup>[10]</sup>。CEA<sup>+</sup>肿瘤细胞含有CEA转录激活因子,正常细胞无或很少,所以可以作为调控元件,启动自杀基因CD表达,靶向性杀伤CEA<sup>+</sup>肿瘤,而其他组织细胞免受攻击<sup>[11]</sup>。CEA转录调控元件包括增强子元件和在5'侧翼区域的启动子,能调控目的基因在CEA为阳性的癌组织中表达<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13]</sup>发现CEA在正常组织亦有表达,正常人的CEA血清值<30 μg/L(不同实验室正常值有差别),但与肿瘤组织相比,它是微量的。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FC作用下,产生选择性杀伤肿瘤细胞的作用。本实验以CEA基因5'端转录调控序列(TRS)作为组织特异性元件驱动CD基因,构建成重组逆转录病毒真核表达载体,在体外转染结肠癌LOVO细胞,门静脉注射入裸鼠体内,予以生理盐水、43℃前药5-Fc和前药5-Fc对比观察CD/5-Fc系统热化疗对裸鼠正常组织是否有损伤作用。结果

显示,各组裸鼠肝脏正常组织及胃、肺、胰腺、小肠、大肠组织均呈正常形态,无明显病理损伤改变。RT-PCR检测各组裸鼠正常肝组织及胃、肺、胰腺、小肠、大肠组织中均无CD基因表达。

本研究提示:组织特异性CD/5-Fc系统热化疗对裸鼠正常组织无损伤作用。但进行自杀基因治疗时,正常组织CEA表达控制在怎样的水平,才能不造成正常组织损害仍有待于进一步研究。本结果对于CEA分泌阳性的胰腺癌、胃癌、乳腺癌、肺癌等疾病的组织特异性基因治疗同样有参考意义。

### [参考文献]

- [1] 李金茂,黎成金,赖大年,等. 温热疗法增强前药氟胞嘧啶对转基因结肠癌细胞株的杀伤作用[J]. 中华胃肠外科杂志,2006,9(3):234-237.
- [2] 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.
- [3] 黎成金,马庆久,涂小煌,等. 组织特异性CD/5-FC系统对大肠癌的原位基因治疗[J]. 肿瘤防治研究,2005,32(4):206-208.
- [4] 黎成金,王羊,张宝明,等. 裸鼠结肠癌肝转移模型的建立[J]. 肝胆外科杂志,2008,16(4):308-310.
- [5] Negroni L, Samson M, Guignon JM, et al. Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90B phosphorylation[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(10): 2747-2756.
- [6] 黎成金,王羊,王烈,等. 热化疗对结肠癌LOVO细胞胞嘧啶脱氨酶基因表达的影响[J]. 中华实验外科杂志,2008,25(5):606-608.
- [7] 陈平,陈志琳,徐立春,等. 5-FC/CD自杀基因疗法结合热休克蛋白-多肽复合物疫苗治疗小鼠黑色素瘤的研究[J]. 肿瘤防治研究,2001,28(3):164-166.
- [8] Liu T, Zhang G, Chen YH, et al. Tissue specific expression of suicide genes delivered by nanoparticles inhibits gastric carcinoma growth[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(12):1683-1690.
- [9] Terazaki Y, Yano S, Yuge K, et al. An optimal therapeutic expression level is crucial for suicide gene therapy for hepatic metastatic cancer in mice[J]. Hepatology, 2003, 37(1):155-163.
- [10] Chung-Faye GA, Kerr DJ, Young LS, et al. Gene therapy strategies for colon cancer[J]. Mol Med Today, 2000, 6(2): 82-87.
- [11] 王天宝,董广文,汪建平. CEA启动子特异性启动双自杀基因CD与TK在CEA<sup>+</sup>恶性肿瘤中表达[J]. 中华普通外科学文献,2008,2(1):24-27.
- [12] Li Y, Chen Y, Dille J, et al. Carcinoembryonic antigen-producing cell-specific oncolytic adenovirus, OV798, for colorectal cancer therapy[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(10): 1003-1009.
- [13] Bockmann B, Grill HJ, Giesing M. Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors[J]. Bi-mol Eng, 2001, 17(3): 95-111.

[收稿日期] 2008-11-11

[修回日期] 2008-12-26

[本文编辑] 韩丹