

· 论 著 ·

内皮抑素基因腺病毒联合化疗治疗小鼠Lewis肺癌

马凌云, 李 强*, 刘忠令(第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 研究腺病毒介导的小鼠内皮抑素基因联合化疗对肺癌的综合治疗作用。方法: 利用病毒重组技术将内皮抑素基因克隆入增殖缺陷型腺病毒基因组中, 构建携带内皮抑素基因的重组腺病毒AdmES, 复制小鼠Lewis肺癌的动物模型, 随机分成4组, 每组10只: 化疗组, 皮下隔日注射环磷酰胺150 mg/kg, 共3次; 基因治疗组, 一次性瘤内多点注射 6×10^{10} pfu/ml的AdmES病毒纯化液100 μ l; 基因联合化疗组, AdmES病毒纯化液联合环磷酰胺, 剂量同上; 对照组, 以0.9%生理盐水100 μ l替代环磷酰胺。定期测量各组肿瘤体积, 采用Western印迹分析检测基因转导后肿瘤组织中内皮抑素的表达, 应用免疫组化法检测肿瘤微血管密度(MVD), 观察内皮抑素基因对肿瘤血管生长的抑制作用。结果: 构建了表达内皮抑素的重组腺病毒载体AdmES; 各治疗组荷瘤C57BL/6小鼠肿瘤生长抑制明显, 以基因联合化疗组尤为显著($P < 0.01$); 基因治疗组和基因联合化疗组MVD与对照组和化疗组相比差异显著($P < 0.05$)。基因治疗过程中未见明显不良反应, 且荷瘤鼠生存期明显延长, 以联合治疗组为著($P < 0.05$)。结论: 所构建的AdmES重组腺病毒载体可有效表达具有生物学活性的内皮抑素, 并能减少肿瘤内微血管生成, 减慢肿瘤增殖, 延长生存期。

[关键词] 内皮抑素; 重组腺病毒; 肺肿瘤; 基因疗法; 药物疗法

[中图分类号] R 734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)07-0725-04

Combination of adenovirus-mediated endostatin gene and chemotherapy in treatment of Lewis lung cancer in mice

MA Ling-Yun, LI Qiang*, LIU Zhong-Ling (Department of Respiratory Diseases, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the antitumor effect of combination therapy with adenoviral transfer of mouse endostatin gene and cyclophosphamide chemotherapy on mouse Lewis lung cancer. **Methods:** Mouse endostatin gene was cloned into replication-defective adenovirus by virus recombination technology to construct AdmES, adenovirus vector coding mouse endostatin gene, and then its biological activities were surveyed *in vivo*. Animal models of mouse Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mice were established and randomly divided into 4 groups ($n = 10$): including control, chemotherapy, gene therapy, and chemotherapy + gene therapy group. Mice received cyclophosphamide 150 mg/kg s.c. 3 times a day in a 21-d cycle for chemotherapy; control group received 0.9% normal saline 100 μ l. AdmES (6×10^9 pfu/100 μ l) were administered by multiple spots intra-tumor injection to every mouse in gene therapy group and combination therapy group. The tumor sizes were measured at different time points. The expression of endostatin after transfer was detected by Western blot and the microvessel density (MVD) of tumor was measured by immunohistochemical examination. **Results:** Higher titers of recombinant adenoviruses (AdmES) were constructed. Combination therapy with AdmES and cyclophosphamide inhibited tumor growth ($P < 0.01$) and prolonged mice survival time ($P < 0.05$) significantly. **Conclusion:** The recombinant adenovirus can effectively express biologically active mEndostatin, which can inhibit tumor growth, decrease tumor micro-blood vessels and prolong survival time. The gene therapy combined with the chemotherapy have synergistic effect, laying a foundation for the study of combination therapy of the solid tumor.

[KEY WORDS] endostatin; recombinant adenovirus; lung neoplasms; gene therapy; drug therapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(7): 725-728]

〔1〕 实体瘤的发生、发展不仅依赖于肿瘤细胞增殖, 而且与肿瘤内新生血管生成密切相关。肿瘤细胞通过血管获得生长所需营养, 血管为肿瘤转移提供通道。因此, 抑制肿瘤血管的形成, 阻断肿瘤的血供, 就成为肿瘤抗血管生成治疗的理论依据。以往肿瘤治疗以针对肿瘤细胞的化疗为主, 但因肿瘤细胞基因易突变, 容易对化疗药产生耐药性而导致治疗失

败。内皮抑素是内源性新血管生成抑制因子, 能特异性抑制血管内皮增生, 从而有效地抑制血管生成和肿瘤生长, 并已在动物实验中显示出强大的抗肿瘤

〔基金项目〕 上海市科委重点科研基金(034119828)。

〔作者简介〕 马凌云(1974-), 女(汉族), 博士生, 主治医师
E-mail: mlyun66@163.com

*Corresponding author: E-mail: Liqres@sh163.net

疗效^[1]。目前内皮抑素治疗肿瘤已进入Ⅲ期临床阶段, 但内皮抑素重组蛋白需要相对高的注射剂量且容易引起不良反应。本室构建了携带小鼠内皮抑素(mouse endostatin, mES)基因的复制缺陷型重组腺病毒, 将内皮抑素基因导入荷Lewis肺癌小鼠体内并联合传统化疗进行治疗研究, 拟为肺癌的抗血管生成基因治疗及综合治疗的临床应用提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 质粒、细胞株与实验动物 质粒 pBlastmES 购于美国 Invivogen 公司; 腺病毒载体 PUC19、pCA13、pBGHE3 及腺病毒 E1 区转化人胚胎肾 293 细胞株, 为北方基因中心蔡晶晶博士惠赠; 小鼠 Lewis 肺癌细胞株 LLC 购于中国科学院上海细胞库; C57BL/6 小鼠, 4~6 周龄, 由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 中间载体 PUC19-mES 和 pCA13-mES 的构建 在 mES 基因上下游分别合成引物, 引物由孟德尔基因中心合成。对 mES 基因进行 PCR 扩增, 获得 550 bp 大小的 mES 基因片段。克隆到以 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切线性化的 PUC19 载体上(缺失 396~420 bp), 命名为 PUC19-mES。将 PUC19-mES 和 pCA13 应用内切酶 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切, 电泳回收 mES 片段和酶切线性化的腺病毒载体 pCA13(缺失 764~788 bp), 进行连接, 酶切及 PCR 鉴定正确者命名为 pCA13-mES。

1.3 腺病毒载体 Ad-mES 的重组及鉴定 将质粒 pCA13-mES 与质粒 pBGHE3(包含除了 5 型腺病毒 188~1339 bp 以外的整个 5 型腺病毒基因)通过阳离子脂质体法(Lipofectamine 2000, Invitrogen 公司)共转染至 293 细胞, 在细胞内通过两质粒间的同源重组, mES 插入到腺病毒基因组的 E1 区。转染后 9~14 d 出现病毒空斑, 经过病毒空斑纯化, 提取腺病毒 DNA(按 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒说明操作), 应用基因上下游引物行 PCR 鉴定。进行 PCR 鉴定正确后命名为 Ad-mES, 用以下各组引物分别对重组病毒 DNA 进行 PCR 鉴定: (1)以 mES 基因上游引物 P₁/mES 基因下游引物 P₂ 检测 mES 基因的存在; (2)以腺病毒 E1A 基因启动子上游引物 P₃/腺病毒 E1A 基因启动子下游引物 P₄ 鉴别 Ad-mES 病毒中是否存在野生型腺病毒。

1.4 重组腺病毒的扩增、纯化及滴度测定 腺病毒在 293 细胞内进行扩增及氯化铯密度梯度离心纯化的常规方法, 病毒滴度测定采用 TCID₅₀ 法。

1.5 动物模型及疗效观察

1.5.1 小鼠肺癌模型复制及分组 于每只 C57BL/6 小鼠左侧背部皮下接种对数生长期 LLC 细胞 1×10^6 /0.1 ml(10% FCS/DMEM 培养液培养)^[2], 待皮下长出直径约 5~7 mm 肿瘤以后, 随机分为对照组、化疗组、基因治疗组、基因治疗联合化疗组, 每组 10 只。基因治疗组及基因治疗联合化疗组的小鼠一次性瘤内多点注射 Ad-mES 病毒纯化液 6×10^9 pfu/ml^[3]; 化疗以环磷酰胺每次 150 mg/kg, 隔日注射, 21 d 为 1 个周期, 共给药 3 次^[4], 化疗前 30 min 予地塞米松(1 mg/kg)及盐酸托烷司琼(欧必亭, 5 mg/kg)减轻化疗引起的胃肠道不良反应及慢性体质量减轻^[4]; 对照组注射等体积的生理盐水。

1.5.2 疗效及不良反应观察 每天观察动物用药后的反应, 且每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤大小, 计算肿瘤体积及抑瘤率, 直至接种肿瘤后 30 d。肿瘤体积(mm^3) = $a \times b^2 \times 0.52$ (a 、 b 为肿瘤的最大径和最小径)^[1,5], 抑瘤率 = $(1 - \text{治疗组体积变化} / \text{对照组体积变化}) \times 100\%$ 。

1.5.3 标本采集 治疗结束后, 4 组各随机取 5 只小鼠, 留取血清后处死小鼠剥离各组瘤体, 测其直径, 将瘤体以甲醛溶液固定及液氮冻存, 备免疫组化分析测定肿瘤微血管密度(MVD)及 Western 印迹法检测蛋白表达; 未处死小鼠任其自然死亡, 记录小鼠的生存时间。

1.5.4 肿瘤 MVD 及 mES 表达的检测 免疫组化 ABC 法对血管内皮细胞的 CD34 抗原进行标记及血管计数^[6], 肿瘤组织 MVD 用 5 个 200 倍视野下的血管数的平均数表示。按 Western 印迹法常规步骤检测 mES 的表达, 一抗为 1:1000 稀释的鼠 mES 单克隆抗体, 二抗为 1:500 稀释的 AP 标记的羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体, 均购于美国 Upstate Systems 公司。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 10.0 统计软件, 以两因素方差分析比较各组不同时间裸鼠瘤体大小及 MVD, Kaplan-Meier 乘积限法比较生存时间。

2 结果

2.1 重组腺病毒载体 Ad-mES 的构建及鉴定 载体 PUC19-mES 经酶切鉴定结果正确; 将 mES 基因插入到 pCA13 后, 经酶切及 PCR 鉴定正确的阳性克隆命名为 pCA13-mES。以 PCR 鉴定重组腺病毒 Ad-mES 即携带 mES 基因的非增殖型腺病毒, 结果表明 Ad-mES 已克隆入目的基因, 且没有野生型腺病毒混

杂(图1)。Ad-mES经氯化铯密度梯度离心纯化后,TCID₅₀法测定病毒滴度达 6.0×10^{10} pfu/ml。

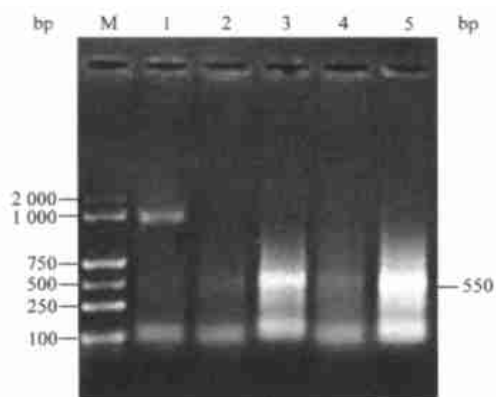


图1 Ad-mES的PCR鉴定

Fig 1 PCR identification of Ad-mES

M: DNA marker (DL 2000); 1: P₃ and P₄ (positive control); 2: Ad-mES amplified using P₃ and P₄ as primers; 3: Ad-mES amplified using P₁ and P₂ as primers; 4: PBS amplified using P₁ and P₂ as primers (negative control); 5: pxc1 amplified using P₁ and P₂ as primers (positive control)

2.2 几种治疗对肿瘤生长抑制的作用 C57BL/6小鼠皮下接种肿瘤细胞后第9天,可观察到直径约5~7 mm的皮下肿瘤结节,成瘤率为100%。分组治疗后观察到对照组小鼠瘤体均呈进行性增大,而经化疗、基因治疗及两者联合治疗后,肿瘤生长抑制明显,瘤体增长速度减缓(图2)。从第21天开始,各治疗组肿瘤体积明显小于对照组($P < 0.05$),至第30天观察结束其抑瘤率分别为50.35%、53.90%、80.70%,基因治疗联合化疗组明显高于化疗组和基因治疗组($P < 0.05$)。

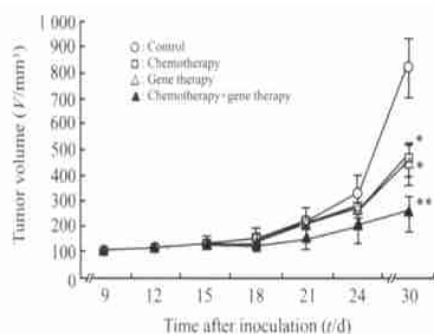


图2 治疗后各组小鼠肿瘤体积的变化

Fig 2 Tumor volume changes in therapeutic group and control group after treatment

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $P < 0.05$ vs chemotherapy group and gene therapy group

2.3 治疗后MVD检测结果 基因治疗组及基因治疗联合化疗组MVD分别为(8.2 ± 1.8)与($5.1 \pm$

1.0),较对照组的(28.8 ± 4.0)显著减少($P < 0.05$);化疗组MVD为(22.4 ± 1.8),与对照组相比无明显差异。

2.4 肿瘤组织中mES蛋白的表达 处死小鼠后,取各组瘤体进行组织mES蛋白表达的Western印迹分析检测,结果显示,基因治疗及基因治疗联合化疗组瘤组织均表达20 000特异性蛋白条带。

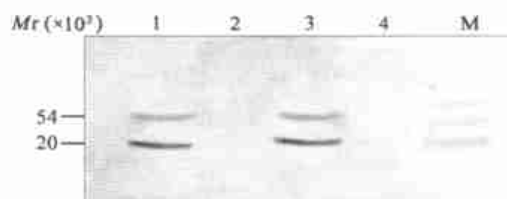


图3 mES蛋白的Western印迹分析

Fig 3 Western blot analysis of mES protein

1: Gene therapy group; 2: Chemotherapy group; 3: Chemotherapy + gene therapy group; 4: Control group; M: Protein marker

2.5 用药期间不良反应的观察 在用药的整个过程中,基因治疗组小鼠活动良好,精神状态佳,反应灵敏,能正常摄食,除肿瘤部位可见坏死外,未见其他不良反应。化疗及基因治疗联合化疗组小鼠未发现明显呕吐,活动敏捷,仅摄食稍减少,体质量未见明显减轻;对照组在接种3周起,即出现摄食、活动减少,消瘦,精神状态差,反应迟钝。

2.6 生存时间 基因治疗联合化疗组、基因治疗组和化疗组的平均存活时间分别为(48 ± 10)、(37 ± 3)和(38 ± 4) d,均显著高于对照组的(23 ± 2) d ($P < 0.05$);基因治疗联合化疗组生存时间最长($P < 0.05$),但化疗组与基因治疗组相比无明显差异。

3 讨论

内皮抑素作为血管抑制剂家族的一员,能抑制内皮细胞迁移和增生,拮抗肿瘤的新生血管生成,从而阻断肿瘤的血液供应,使“饥饿”的肿瘤生长受到抑制,进入“休眠状态”并诱导凋亡^[5]。本实验选择腺病毒作为基因转移工具,以小鼠的内皮抑素基因作为治疗基因,将其亚克隆至穿梭质粒中构建成转移质粒,再与腺病毒基因组质粒共转染293细胞,在293细胞内发生两质粒同源重组而形成具有感染活力的复制缺陷型腺病毒Ad-mES^[7]。早在2000年Sauter等^[8]就已利用腺病毒作为载体,通过静脉注射将内皮抑素基因导入荷Lewis肺癌小鼠及JC乳腺癌小鼠体内,血清获得高达605~1 740 ng/ml内皮抑素,使瘤体减少78%且阻止了肺转移。本实验

采用瘤内多点注射基因腺病毒的方式将内皮抑素转入瘤细胞, 腺病毒载体和细胞表面受体的高亲和力将病毒局限于注射点附近的细胞, 局部药物浓度高, 且避免出现非靶器官的不良反应。

但是内源性血管抑制剂只能特异性抑制内皮细胞的新生和移行, 而不是杀死肿瘤细胞, 肿瘤的治疗应考虑把肿瘤分为两个不同的可以互为刺激对方生长的细胞群体, 一群为肿瘤细胞, 另一群为血管内皮细胞。针对内皮细胞的抗血管生成治疗与传统的细胞毒治疗相结合^[9~12], 具有化疗药物剂量要求低、不良反应小的优点。本实验采用环磷酰胺细胞毒疗法联合内皮抑素基因对实验性肺癌进行治疗, 直接杀伤肿瘤细胞并阻断肿瘤供血, 结果肿瘤增长缓慢, 生存期明显延长, 比单纯化疗和基因治疗效果更好。提示内皮抑素与环磷酰胺可能具有协同效应或内皮抑素可增强环磷酰胺等化疗药物的抗肿瘤活性。

尽管以腺病毒为载体的治疗在荷瘤鼠体内表现出高效性、不良反应小, 但我们所应用的复制缺陷型腺病毒载体(传统腺病毒载体系统)不能在除包装细胞系(293、911、PERC6 等)以外的细胞中复制增殖, 而抗血管活性物质会因半衰期而表达减少, 于是肿瘤特异性增殖型腺病毒载体成为理想的工具, 该载体病毒可以特异性地在靶向肿瘤细胞内复制、增殖, 大量表达目的基因并最终裂解肿瘤细胞。但对于增殖型腺病毒载体来说, 如何识别何者为肿瘤细胞, 何者为正常细胞的靶向性问题还是个难题。因此如何构建更有效、更安全的基因转移工具成为今后的研究方向。

【参考文献】

- [1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285
- [2] Kuo CJ, Farnes F, Yu EY, *et al* Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(8): 4605-4610
- [3] Feldman AL, Restifo NP, Alexander HR, *et al* Antiangiogenic gene therapy of cancer utilizing a recombinant adenovirus to elevate systemic endostatin levels in mice [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1503-1506
- [4] Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, *et al* Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(7): 1878-1886
- [5] Boehm T, Folkman J, Browder T, *et al* Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [J]. *Nature*, 1997, 390(6658): 404-407
- [6] Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, *et al* Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry [J]. *Liver*, 1998, 18(1): 14-19
- [7] Bett AJ, Haddara W, Prevec L, *et al* An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(19): 8802-8806
- [8] Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, *et al* A denovirus-mediated gene transfer of endostatin *in vivo* results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(9): 4802-4807
- [9] Abraham D, Abri S, Hofmann M, *et al* Low dose carboplatin combined with angiostatic agents prevents metastasis in human testicular germ cell tumor xenografts [J]. *J Urol*, 2003, 170(4 Pt 1): 1388-1393
- [10] Kim ES, Herbst RS. Angiogenesis inhibitors in lung cancer [J]. *Curr Oncol Rep*, 2002, 4(4): 325-333
- [11] Plum SM, Hanson AD, Volker KM, *et al* Synergistic activity of recombinant human endostatin in combination with adriamycin: analysis of *in vitro* activity on endothelial cells and *in vivo* tumor progression in an orthotopic murine mammary carcinoma model [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(12): 4619-4626
- [12] Herbst RS, O'Reilly MS. The rationale and potential of combining novel biologic therapies with radiotherapy: focus on non-small cell lung cancer [J]. *Semin Oncol*, 2003, 30(4 Suppl 9): 113-123

【收稿日期】 2004-04-06

【修回日期】 2004-05-08

【本文编辑】 曹 静

(上接第 724 页)

固定骨折的稳定性是靠螺钉使钢板紧贴骨干而获得。由于 L ISS-PT 由胫前骨筋膜室插入, 放置于骨髓外侧, 钢板不与骨干直接接触, 类似外固定支架的结构, 只是固定杆更贴近骨面, 故有人称之为内固定支架, 自攻自钻型螺钉通过精确的定位系统经皮钻入, 骨折周围的软组织及骨髓无需暴露与剥离, 从而使血液循环得以维持。独特的 Pulling device 设计可使游离骨块获得良好的复位。有效的骨折复位与固定, 加以骨折块周围充足的血液循环, 是骨折愈合的前提, 近年来

经皮微创钢板接骨术 (minimally invasive percutaneous plate osteosynthesis, MIPPO) 在临床上的成功运用充分证实了这一点, 而 L ISS 可以说是 MIPPO 的进一步发展, 更能体现生物接骨术 (biological osteosynthesis, BO) 和微创外科原则的精髓。但目前其价格高昂, 是制约国内临床广泛应用的主要因素。

【收稿日期】 2004-03-30

【修回日期】 2004-05-31

【本文编辑】 曹 静