

• 论 著 •

肝动脉灌注 AdVEGF-tk 治疗大鼠肝癌

王孟龙,殷正丰*,吴宗娣,康晓燕,钱海华,夏少晴,吴孟超

(第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室,上海 200438)

[摘要] **目的:**研究经肝动脉灌注腺病毒介导的血管内皮生长因子(VEGF)启动子调控的单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV-tk)系统(AdVEGF-tk)对大鼠肝癌模型的治疗作用。**方法:**以二乙基亚硝胺(DEN)诱导建立 Wistar 大鼠肝癌模型,将 32 只成瘤鼠随机分成 AdVEGF-tk/GCV 组、Ad/GCV 组、AdCMV-tk/GCV 组和生理盐水/GCV 组,每组 8 只。诱癌后第 120 天时经肝动脉分别给予重组腺病毒或生理盐水,次日起连续 10 d 每天腹腔内给予丙氧鸟苷(GCV)1 次,剂量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。停止注射后第 10 天剖腹测量肿瘤大小,比较各组间肿瘤评分变化及大鼠存活情况。**结果:**DEN 处理第 120 天后,所有大鼠均有典型肿瘤形成,病理证实为肝细胞癌。经肝动脉灌注腺病毒载体或生理盐水后,AdCMV-tk/GCV 组在腹腔内注射 GCV 开始后第 5 天陆续死亡,灌注后第 20 天时该组大鼠只剩下 2 只;其他 3 组大鼠均完全存活。肿瘤评分表明,AdVEGF-tk/GCV 组处理前后肿瘤评分没有明显差异 [$(2.25 \pm 0.89) \text{ vs } (2.25 \pm 0.76)$], 而 Ad/GCV 组 [$(2.00 \pm 0.93) \text{ vs } (3.89 \pm 0.83)$] 和生理盐水/GCV 组 [$(2.13 \pm 0.83) \text{ vs } (3.75 \pm 0.89)$] 在处理 after 明显增高 ($P < 0.01$)。到灌注后第 90 天时,AdVEGF-tk/GCV 组大鼠的生存时间明显延长。**结论:**肝动脉灌注 AdVEGF-tk/GCV 可明显减缓肿瘤生长速度并延长荷瘤大鼠的生存时间,且不良反应小。

[关键词] 血管内皮生长因子;单纯疱疹病毒胸苷激酶;腺病毒载体;肝动脉灌注;肝肿瘤

[中图分类号] R 735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0084-03

Vascular endothelial growth factor promoter-thymidine kinase gene in treatment of hepatocellular carcinoma by selective administration into hepatic artery in rats

WANG Meng-Long, YIN Zheng-Feng*, WU Zong-Di, KANG Xiao-Yan, QIAN Hai-Hua, XIA Shao-Qing, WU Meng-Chao (Lab of Molecular Oncology Research, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the therapeutic efficacy of HSV-tk under the control of VEGF promoter against rat hepatocarcinomas. **Methods:** Diethylnitrosamine (DEN) was used to develop hepatocarcinomas in 32 Wistar rats, which were subsequently divided into 4 groups: AdVEGF-tk group, Ad group, AdCMV-tk group and saline group. Then selective administration of recombinant adenovirus or saline *via* the intrahepatic artery was performed in all rats 120 d after the first DEN dose. Ganciclovir (GCV) was given at a dose of $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (*ip*) started on the following day and lasted 10 d. All the treated animals were anesthetized and laparotomized to evaluate tumor burden 10 d before and after the last GCV dose. The survival was checked daily in the remaining animals. **Results:** After the treatment of DEN (120 d), typical liver tumors were found in all laparotomized rats. The deaths were recorded continuously 5 d after GCV treatment in the animals treated with AdCMV-tk/GCV, but not in other groups. Tumor score remained stable in rats treated with AdVEGF-tk/GCV [$(2.25 \pm 0.89) \text{ vs } (2.25 \pm 0.76)$], but increased in the rats treated with Ad/GCV [$(2.00 \pm 0.93) \text{ vs } (3.89 \pm 0.83)$] or saline/GCV [$(2.13 \pm 0.83) \text{ vs } (3.75 \pm 0.89)$], $P < 0.01$. Furthermore, treatment with AdVEGF-tk/GCV increased the survival of tumor-bearing animals for more than 90 d. **Conclusion:** The results display a pronounced tumor growth delay and a prolonged survival time when AdVEGF-tk is injected by intrahepatic artery route followed by GCV administrations.

[KEY WORDS] vascular endothelial growth factor; herpes simplex virus-thymidine kinase; adenoviral vector; hepatocellular carcinoma; rat

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 84-86]

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)主要在肿瘤细胞以及受到肿瘤刺激的周围基质细胞中表达,在肿瘤血管生成过程中起着关键作用^[1]。新近的研究表明,腺病毒介导的 VEGF 启动子调控的单纯疱疹病毒胸苷激酶基

因(AdVEGF-tk)可选择性杀死肝癌细胞,缺氧可增强这种杀伤作用^[2,3]。本研究以二乙基亚硝胺

[基金项目] 教育部留学回国人员启动基金(99QD3)。

[作者简介] 王孟龙(1964-),男(汉族),博士,讲师。

* Corresponding author. E-mail: yinzfk@online.sh.cn

(DEN)诱导的大鼠肝癌为模型,经肝动脉途径灌注 AdVEGF-tk,通过分析大鼠荷瘤状况和存活情况,探讨 AdVEGF-tk 对活体肝癌的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 重组腺病毒构建、包装与扩增 应用3种重组腺病毒 AdCMV-tk、AdVEGF-tk 及空病毒 Ad。AdCMV-tk由 CMV 启动子调控 TK 基因表达。AdVEGF-tk由 VEGF 启动子调控^[2,3]。3种重组腺病毒构建、包装与扩增等操作方法参见文献^[2~4]。

1.2 大鼠肝癌模型制备与疗效评价 参照 Rajewsky 等^[5]和 Gerolami 等^[6]介绍的方法诱导肝癌,稍作修改:将 DEN 加入到饮水中(0.1 g/L),每周配制更新,让大鼠自由饮用,70 d 后停用 DEN,改用正常饮水。实验采用6周龄 Wistar 雄性大鼠,体质量为150~180 g。自饮用诱癌剂后第90天开始,每10 d 剖腹探查5只大鼠,观察肿瘤形成情况,确定大鼠肝癌模型的建立成功。之后将32只肝癌模型大鼠随机分成4组,每组8只,即 AdVEGF-tk/GCV 组、AdCMV-tk/GCV 组、Ad/GCV 组和生理盐水/GCV 组。根据处理前后肿瘤评分和大鼠存活情况评价疗效。肿瘤评分标准按照 Barajas 等^[7]的肿瘤评分法稍作修改而制定。

1.3 经肝动脉灌注给药 诱癌第120天在氯胺酮(200 mg/kg)麻醉下,纵向开腹,探查并记录肿瘤数目、位置和大小,肝硬化程度,有无远处转移、粘连等。分离腹腔干动脉、肝固有动脉和胃十二指肠动脉。钳夹腹腔干动脉,将30号针经胃十二指肠动脉插入肝动脉,注入重组腺病毒溶液(5×10^9 pfu)或生理盐水 100 μ l,之后结扎胃十二指肠动脉,开放腹腔干动脉和肝动脉血流。动脉血流中断时间为5~15 min。次日起腹腔内注射丙氧鸟苷(GCV),剂量为 50 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,每天1次,连续10 d。最后1次注射后第10天,剖腹探查,再次记录肿瘤生长状况以及大鼠存活情况,并与上次记录比较。

1.4 组织标本处理 氯胺酮麻醉下剖腹,切除肿瘤块及其癌旁肝组织,或用10%甲醛固定,石蜡包埋切片,常规 H-E 染色,观察组织学变化情况。

1.5 统计学处理 各组大鼠肿瘤生长率之间的比较采用配对 *t* 检验,荷瘤鼠的生存率采用 Kaplan-Meier 过程分析。

2 结果

2.1 DEN 诱导大鼠肝癌模型 用低浓度 DEN 处

理 Wistar 大鼠 70 d,第90天时剖腹探查发现肝脏表面弥散着乳白色小结节,直径为1~2 mm。第120天时所有被探查的大鼠均有典型的肿瘤形成,呈灰白或红褐色,直径为1~6 mm,病理证实为肝细胞癌。部分大鼠肝硬化程度较轻,未发现腹水形成和远处转移。

2.2 不同处理对大鼠肝癌生长和存活的影响 经肝动脉灌注处理后,AdCMV-tk/GCV 组在给予 GCV 5 d 后开始死亡,第20天时仅剩2只存活,而其他3组大鼠全部存活,表明肝动脉灌注 AdCMV-tk/GCV 具有致死性毒性。对死亡大鼠尸检发现腹腔内器官水肿,肝脏肿胀,肿瘤稍有增大,镜检可见非肿瘤肝脏组织明显坏死。对存活鼠剖腹探查发现肝门区与胃十二指肠及大网膜均有不同程度的粘连。部分肝脏出现新肿瘤,有些肿瘤比处理前增大,但均未见肿瘤破裂出血和远处转移。对所有存活鼠的肿瘤进行评分,存活的 AdCMV-tk/GCV 组2只大鼠处理前后的肿瘤评分均为 1.50 ± 0.71 ; AdVEGF-tk/GCV 组处理前后肿瘤评分分别为 2.25 ± 0.89 和 2.25 ± 0.76 ,相差不显著; Ad/GCV 组处理前后肿瘤评分分别为 2.00 ± 0.93 和 3.89 ± 0.83 ,相差显著($P < 0.01$); 生理盐水/GCV 组处理前后肿瘤评分分别为 2.13 ± 0.83 和 3.75 ± 0.89 ,相差显著($P < 0.01$)。表明肝动脉灌注 AdVEGF-tk/GCV 对肿瘤生长具有选择性抑制作用。尽管 AdVEGF-tk/GCV 组有些肿瘤也有不同程度增大,但肿瘤评分并无明显变化,而且很少出现新的癌结节。探查后继续观察大鼠生存情况,灌注后第90天,仅 AdVEGF-tk/GCV 组有3只大鼠存活,AdVEGF-tk/GCV 组大鼠的生存时间明显延长(图1)。AdCMV-tk/GCV 组在早期就几乎全部死亡,因此图1未显示有关资料。

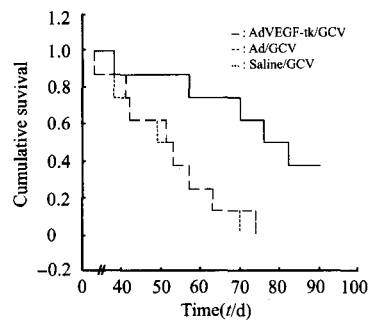


图1 肝动脉灌注给药后各组大鼠生存率

Fig 1 Long-term survival of tumor-bearing rats after treatment with recombinant adenovirus via IHA

3 讨论

DEN 诱发大鼠肝癌模型不仅具有肝细胞增生和肝硬化背景,肿瘤以肝动脉供血为主,而且全身免疫系统未被彻底破坏,因此与人体原发性肝癌的临床情景比较相似^[5,6,8]。

新近实验表明,AdVEGF-tk/GCV 可选择性地杀死体外培养的肝癌细胞,同时对正常肝细胞几无影响^[2,3]。已知人与大鼠 VEGF 启动子中的 HRE 高度同源,尤其是含有 HIF-1 结合位点和两侧的(A/C)ACAG 重复序列几乎完全相同^[9]。

基于以上情况,本次研究观察了 AdVEGF-tk 经肝动脉灌注对大鼠肝癌的治疗作用。结果表明,AdCMV-tk/GCV 处理可导致大部分大鼠死亡,这与其他相关文献的报道^[6]一致。起因于 CMV 启动子非特异性活性使 TK 基因在肝脏或全身细胞中广泛表达而产生的毒性作用。另一方面,AdVEGF-tk/GCV 处理可明显减缓肿瘤生长速度,并延长荷瘤大鼠的生存时间。这是因为 VEGF 主要在缺氧的肿瘤细胞及其周围基质细胞中表达,由 VEGF 启动子调控的 HSV-tk/GCV 系统不仅破坏了肿瘤细胞本身,还破坏了肿瘤赖以生存的微环境,同时 AdVEGF-tk/GCV 对肝脏及全身毒性反应很弱,即 VEGF 启动子的特异性活性减少了 TK 所致的广泛毒性,因此是安全的。

实验发现动物经 AdVEGF-tk 肝动脉灌注后,肝内肿瘤并没有停止生长,只是生长速度延缓,其可能原因有:(1)体内肿瘤细胞表达间隙连接蛋白较低,旁观者效应不及体外试验明显;(2)重组腺病毒经肝动脉灌注后在肝脏及肿瘤中停留时间较短,并且可能很快被单核巨噬细胞清除^[10];(3)肿瘤细胞周围存在不同程度的纤维增生,阻止了腺病毒在肿瘤细胞间扩散;(4)本研究使用的 VEGF 启动子仅含有单拷贝 HRE,在大鼠肝癌细胞中的活性相对较低。因此,下一步研究将要重点解决上述问题。

[参考文献]

[1] Grunstein J, Roberts WG, Mathieu-Costello O, et al. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a

critical factor in tumor expansion and vascular function[J]. *Cancer Res*,1999,59(7):1592-1598.

[2] 王孟龙,殷正丰,吴宗娣,等.腺病毒介导的 VEGF 启动子-胸苷激酶系统对肝癌细胞的选择性杀伤作用[J].第二军医大学学报,2002,23(1):12-14.

Wang ML, Yin ZF, Wu ZD, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase under the control of vascular endothelial growth factor promoter confers the sensitivity to ganciclovir in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Uni)*,2002,23(1):12-14.

[3] 王孟龙,殷正丰,吴宗娣,等.缺氧对血管内皮生长因子启动子-胸苷激酶系统杀伤肝癌细胞系的增强作用[J].中华肿瘤杂志,2002,24(5):455-457.

Wang ML, Yin ZF, Wu ZD, et al. Hypoxia augments the killing effect of herpes simplex virus thymidine kinase gene expression driven by the promoter of the vascular endothelial growth factor gene on human hepatocellular tumor cells [J]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi (Chin J Tumor)*,2002,24(5):455-457.

[4] He TC, Zhou S, Da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1998,95(5):2509-2514.

[5] Rajewsky MF, Dauber W, Frankenberg H. Liver carcinogenesis by diethylnitrosamine in the rat [J]. *Science*,1966,152(718):83-85.

[6] Gerolami R, Cardoso J, Lewin M, et al. Evaluation of HSV-tk gene therapy in a rat model of chemically induced hepatocellular carcinoma by intratumoral and intrahepatic artery routes [J]. *Cancer Res*,2000,60(4):993-1001.

[7] Barajas M, Mazzolini G, Genove G, et al. Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12[J]. *Hepatology*,2001,33(1):52-61.

[8] Rabes HM, Szymkowiak R. Cell kinetics of hepatocytes during the preneoplastic period of diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis[J]. *Cancer Res*,1979,39(4):1298-1304.

[9] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Mol Cell Biol*,1996,16(9):4604-4613.

[10] Bramson JL, Hitt M, Gauldie J, et al. Pre-existing immunity to adenovirus does not prevent tumor regression following intratumoral administration of a vector expressing IL-12 but inhibits virus dissemination[J]. *Gene Ther*,1997,4(10):1069-1076.

[收稿日期] 2003-05-17

[修回日期] 2003-11-20

[本文编辑] 余党会