

# 人乳腺癌裸鼠移植瘤的体外抗生素诱导基因治疗

曾赵军,胡维新,李子博,罗赛群

Gene Therapy for Human Breast Carcinoma Xenografts in Nude Mice Induced by Antibiotics in Vivo

ZEN G Zhao-jun, HU Wei-xin, LI Zi-bo, LUO Sai-qun

Molecular Biology Research Center, School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410078, China

Corresponding Author: HU Wei-xin

**Abstract :Objective** Using Tet regulation system, the feasibility of gene therapy for human breast carcinoma xenografts in nude mice induced by antibiotics in vivo were investigated in this study. **Methods** Mouse breast cancer model was established by transferring human breast cancer cells subcutaneously into the BALB/ C nude mice to make xenografts. Recombinant retroviruses containing HSVtk and Tet-On gene were constructed respectively for treatment. The growth of tumor was tested and pathological analysis was performed after ganciclovir ( GCV ) and retroviruses treatment induced by doxycycline ( Dox ). The antitumor effect was observed to evaluate the regulatory therapy in breast cancer model of nude mice. **Results** After GCV and retroviruses treatment, under induction of Dox , volume of tumors of nude mice model was decreased remarkably, tumor growth was retarded and survival period was prolonged compared with the control groups ( $P < 0.05$ ). Some of infiltrating inflammatory cells and strong eosinophil cells could be observed in the tumor mass stained with hematoxylin and eosin. **Conclusion** Recombinant retroviruses containing Tet regulation system and suicide gene can successfully used in cancer gene therapy and killed tumor cells in breast cancer model of nude mice after GCV treatment induced by antibiotics(Dox) in vivo.

**Key words:** Breast cancer ; Gene Therapy ; BALB/ C mice ; Retrovirus ; Antibiotic

**摘要** 目的 探讨 Tet 调控下体外抗生素诱导基因治疗人乳腺癌裸鼠移植瘤的可行性。方法 构建人乳腺癌 BALB/ C 裸鼠移植瘤模型, 制备有感染活性的重组逆转录病毒 RevTRE/ HSVtk 与 RevTet-On。观察体外强力霉素(Dox)诱导, 丙氧鸟苷(GCV)和逆转录病毒作用后移植瘤生长的变化及组织病理改变, 分析其对乳腺癌裸鼠移植瘤的调控性治疗作用。结果 乳腺癌裸鼠治疗后, 肿瘤体积明显减小, 生长受抑, 生存周期延长, 组间比较有显著性差异( $P < 0.05$ )。瘤体 HE 染色显示治疗组肿瘤局部有炎性细胞浸润和强嗜酸性细胞。RT-PCR 结果显示 Dox 诱导后瘤体组织 HSVtk 表达较明显。结论 通过逆转录病毒介导 Tet 调控, 可以在体外抗生素 Dox 诱导下对人乳腺癌裸鼠移植瘤模型进行基因治疗, 杀伤肿瘤细胞。

**关键词:** 乳腺癌 ; 基因治疗 ; 裸鼠 ; 逆转录病毒 ; 基因调控

中图分类号: Q782 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)07-0480-03

## 0 引言

自杀基因治疗是近年来肿瘤治疗研究的热点之一。单纯疱疹病毒胸苷激酶 ( HSVtk ) 在体细胞内

能将无毒的药物前体 GCV 代谢为有毒物质, 诱导靶细胞产生“自杀”效应, 从而清除肿瘤<sup>[1]</sup>。本实验用含有调控因子 Tet-On 和 HSVtk 基因的重组逆转录病毒与底物 GCV 处理后, 在体外强力霉素作用下观察对人乳腺癌 BALB/ C 裸鼠移植瘤模型肿瘤生长、瘤体大小以及肿瘤组织病理学等改变, 分析肿瘤组织内 HSVtk 基因表达的变化。以探讨在体外抗生素诱导下, 自杀基因对乳腺癌细胞株 MCF-7 移植的乳腺癌裸鼠的体外调控性治疗作用。

收稿日期: 2005-07-18 ; 修回日期: 2005-09-29

基金项目: 美国中华医学会(CMB) 基金资助项目 (# 99-698)

作者单位: 410078 长沙, 中南大学生物科学与技术学院分子生物学研究所

通讯作者: 胡维新

作者简介: 曾赵军(1971-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤基因治疗研究工作

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 人乳腺癌细胞株 MCF-7、PA317、NIH3T3 来自中南大学湘雅医学院细胞中心。年龄 4 周的雌性 BALB/c 裸鼠( $\text{nu}^-/\text{nu}^-$ )购于中国医学科学院上海实验动物中心。

1.1.2 主要试剂和质粒 质粒载体 pRevTRE、pRevTet-On 购自美国 Clontech 公司,质粒 pGEM7Z-tk 由中南大学湘雅医学院肿瘤研究所曹亚教授惠赠。pRevTRE/ HSVtk 由本中心构建<sup>[2]</sup>,含有四环素反应元件(TRE)和自杀基因 HSVtk。限制性内切酶购自 Roche 公司和 Promega 公司。G418、潮霉素、DMEM、0.25% 胰蛋白酶、RNA-TRIzol 试剂盒均购自 Gibco BRL 公司。GCV、Dox 购自美国 Sigma 公司。其余试剂购自 Sigma 公司。

### 1.2 逆转录病毒的制备、纯化与滴度测定

通过改进的“微乒乓感染法”将质粒逆转录病毒载体导入包装细胞 PA317 中,以潮霉素 B 或 G418 筛选克隆细胞,浓缩克隆细胞上清制备重组逆转录病毒<sup>[3]</sup>。得到病毒后纯化并测定其滴度。

### 1.3 BALB/c 裸鼠移植瘤模型的建立、分组和干预方法

模型的构建:取对数生长期的 MCF-7 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,用 PBS 洗 2 遍,离心 1 000r/min 4 min,无血清的 DMEM 培养基重悬细胞,细胞计数使细胞密度达  $2 \times 10^6/\text{ml}$ ,以 0.2 ml 细胞悬液注射接种于 BALB/c 裸鼠左侧近前腋处皮下并作好标记。细胞接种后,观测裸鼠生长状况。

动物分组和干预:待裸鼠皮下肿瘤长至 0.7~0.8 cm 后,按随机数字表法将裸鼠随机分为 4 组,即培养基 DMEM 组、GCV+ 病毒组、GCV+ Dox 组、Dox+ GCV+ 病毒治疗组,每组 8 只,苦味酸标记。GCV+ 病毒组、Dox+ GCV+ 病毒治疗组荷瘤裸鼠皮下肿瘤内给予注射病毒悬液,病毒滴度为  $1 \times 10^6 \text{ CFU}/\text{ml}$ ,每周 2 次,连续 2 周。同时注射病毒悬液第 2 周开始 GCV+ Dox 组、Dox+ GCV+ 病毒治疗组荷瘤裸鼠皮下肿瘤内给予注射 Dox 0.1 ml(100 mg/kg),连续 7 d。DMEM 组给予腹腔注射 DMEM 培养基 0.2 ml,GCV+ 病毒组、GCV+ Dox 组、Dox+ GCV+ 病毒治疗组均给予腹腔注射 GCV(100 mg/kg) 各 0.2 ml,每天上下午各 1 次,连续 14 d。治疗前后每隔 3 d 均用游标卡尺测量肿瘤瘤体长径 b 和短径 a,监测荷瘤裸鼠体重及生长状况。肿瘤体积按  $V = (a^2 \times b) / 2 (\text{mm}^3)$  公式计算。同时记录下荷瘤裸鼠的生存时间。

### 1.4 BALB/c 裸鼠移植瘤组织病理形态学检测

治疗结束后 BALB/c 裸鼠以 2% 戊巴比妥钠(20 mg/kg)腹腔内注射麻醉。解剖 BALB/c 裸鼠,观察肿瘤与周围组织粘连、浸润生长及淋巴转移情况。取出肿瘤组织,除去结缔组织,在无菌条件下称量每只 BALB/c 裸鼠新鲜肿瘤瘤体湿重并拍照。计算肿瘤生长抑制率:(1 - 不同处理组瘤重/对照组瘤重) × 100%。然后肿瘤组织用无菌生理盐水快速冲洗 2~3 次,留取部分肿瘤迅速投入液氮中保存作 RT-PCR 分析 HSVtk 基因表达用;余下部分肿瘤从最大面切开肿瘤,肉眼观察肿瘤颜色、有无出血、坏死及与周围组织粘连等改变。肿瘤组织以 10% 多聚甲醛固定 24 h,经 70%、80%、90%、95%、100%、100% 乙醇梯度脱水,二甲苯透明 2 次,每次 20 min,56~60 浸蜡 1 h,石蜡包埋。以 5 μm 厚度行组织切片,HE 染色后,普通显微镜下观察并拍照。

### 1.5 RT-PCR 检测 BALB/c 裸鼠移植瘤组织 HSVtk 基因的表达

从液氮中取出移植瘤组织,剪碎,加入 TRIzol 溶液研磨。按 RNA-TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA,在 0.5 ml Eppendorf 管中加入 RNasin(10 U/μl) 1 μl,Oligo(dT)<sub>15</sub> 引物(0.5 g/L) 1 μl,总 RNA 1 μg,dNTP(10 mmol/L) 2 μl,5× 逆转录缓冲液 10 μl,AMV 逆转录酶( $2.5 \times 10^7 \text{ u/L}$ ) 1 μl,补加无 RNA 酶的 DEPC 水至总反应容积为 50 μl,混匀,42℃ 反应 1 h,94℃ 5 min 终止反应,冰浴冷却 5 min,-20℃ 保存。PCR 反应在 0.5 ml Eppendorf 管中依次加入灭菌水 32 μl,10× PCR 缓冲液 5 μl,MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) 4 μl,dNTP(10 mmol/L) 1 μl,3' 和 5' 端引物(2.5 μmol/L) 各 2 μl,T K 引物为(上游引物:5'-GGCA TGCCTTA TGCCGTGACCGAC-3',下游引物 5'-CCA GGTCGCA TA TCGTCGGTA TGG-3')扩增 HSVtk 基因片段;逆转录产物 5 μl,Taq DNA 聚合酶(5 000 u/L) 1 μl,总反应容积为 50 μl 混匀。覆盖石蜡油,稍加离心,94℃ 变性 2 min。设置反应程序:94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 50 s 共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 反应产物 5 μl 加 2 μl 载样缓冲液,以 1× TAE 为电泳缓冲液,在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳约 1 h(电压 80 V)。PCR 产物应为 420 bp,以 -actin(PCR 产物为 280 bp)为对照,反应体系同上。电泳完毕后,将琼脂糖凝胶用图像分析仪进行分析。

### 1.6 统计学分析

采用 t 检验和方差分析(SPSS 10.0 统计软件包), $P < 0.05$  有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 Dox 诱导干预后对裸鼠移植瘤生长的影响

Dox + GCV + 病毒治疗组裸鼠治疗后35d,与对照组相比较,肿瘤体积明显减小,生长受到明显抑制,组间比较有显著性差异( $P < 0.05$ );而对照组DMEM、GCV + 病毒、GCV + Dox 干预处理35d后,瘤体积变化进行组间比较无显著性差异( $P > 0.05$ ,图略)。Dox + GCV + 病毒组肿瘤生长抑制率为89%,而GCV + Dox 组和GCV + 病毒组的肿瘤生长抑制率分别为47%、56.3%,Dox + GCV + 病毒组(治疗组)肿瘤生长抑制率显著大于其他组( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 各组BALB/c裸鼠移植瘤治疗结束后  
湿重统计表(g)

组别	BALB/c 裸鼠只数	均值 ± 标准差
DMEM组	5	2.70 ± 1.17*
GCV + Dox组	5	1.44 ± 0.34
GCV + 病毒组	5	1.32 ± 0.39
Dox + GCV + 病毒组	6	0.30 ± 0.20*

Dox + GCV + 病毒组肿瘤湿重与各对照组相比较,差异有显著性\*( $P < 0.05$ );DMEM组BALB/c裸鼠肿瘤湿重与各组相比较,差异有显著性\*( $P < 0.05$ );GCV + Dox组与GCV + 病毒组裸鼠肿瘤湿重相比较,差异无显著性( $P = 0.516 > 0.05$ )

### 2.2 裸鼠移植瘤组织病理形态学观察

解剖BALB/c裸鼠,观察发现裸鼠移植瘤为实体瘤,多呈球形或结节状,有完整包膜,有的与周围组织有粘连,有新生血管生成。HE染色镜下观察发现:Dox + GCV + 病毒组荷瘤裸鼠肿瘤的组织切片中有较多的散在小片状坏死区,细胞形态结构模糊,胞核裂解、消失。肿瘤局部有炎性细胞浸润和强嗜酸性细胞。对照组肿瘤细胞则排列紧密,多呈巢状,间质纤维可见。瘤细胞较大,形态多样。核深染,胞浆丰富。肿瘤细胞生长活跃并可见核分裂相和瘤巨细胞。

### 2.3 RT-PCR 检测 HSVtk 基因的表达

RT-PCR 获得约420bp 的DNA片段,与预期片段大小一致。RT-PCR结果显示强力霉素诱导后的Dox + GCV + 病毒治疗组裸鼠移植瘤组织内HSVtk 表达较明显,GCV + 病毒组有微弱表达,而DMEM组、GCV + Dox 组肿瘤组织内没有检测到HSVtk 基因的表达,见图1。

## 3 讨论

有效地靶向转录或使目的基因受转录调控元件的精确调控是基因治疗领域的研究热点之一。假如能利用抗生素在体外调节控制导入的外源基因的表

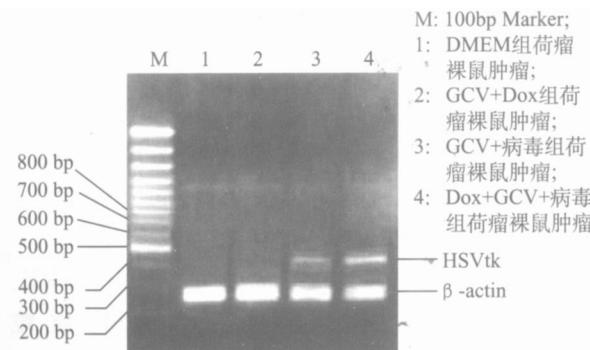


图1 RT-PCR检测BALB/c荷瘤裸鼠  
治疗35d后肿瘤HSVtk的表达

达将有助于控制基因治疗中毒副作用的发生,使治疗更安全有效。Gossen等<sup>[4]</sup>提出的Tet调控系统就是利用大肠杆菌抗四环素操纵子(tet operon)的阻遏与去阻遏作用来调控基因表达,使目的基因表达受到四环素的精确调控。其中Tet激活系统(Tet-On)是突变的Tet阻遏蛋白与VP16的激活域融合表达rtTA,在强力霉素存在时,rtTA与TetOp结合启动子,可以激活或抑制靶向转录<sup>[4]</sup>。作者通过构建有调控因子Tet-On基因及调控元件 TRE 和胸苷激酶基因 HSVtk 的逆转录病毒,转入乳腺癌肿瘤细胞中,使得BALB/c裸鼠移植瘤能受到外源诱导剂强力霉素Dox的诱导控制,使自杀基因HSVtk 转录与表达与Tet-On系统的开启相一致,并可激活前药丙氧鸟苷GCV,转变为有毒物质,从而在裸鼠体内发挥杀瘤作用。实验中Dox + GCV + 病毒治疗组裸鼠治疗后35d,与对照组相比较,瘤组织中外源HSVtk基因的表达明显,肿瘤体积减小,生长受到了明显抑制。进一步说明强力霉素Dox诱导开启了经逆转录病毒感染进入裸鼠移植瘤组织的Tet-On系统,并激活了体内外源HSVtk基因的表达,使乳腺癌细胞死亡。该系统的建立对于今后在临床基因治疗中体外给予抗生素(如强力霉素等)干预以达到治疗和调节体内恶性肿瘤的生长奠定了良好的实验基础。

## 参考文献:

- Finocchiaro LM, Bumaschny VF, Karara AL, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in multicellular tumor spheroids[J]. Cancer Gene Ther., 2004, 11(5): 333-345.
- Ingram N, Porter CD. Transcriptional targeting of acute hypoxia in the tumour stroma is a novel and viable strategy for cancer gene therapy[J]. Gene Ther., 2005, 12(13): 1058-1069.
- 曾赵军,胡维新,罗赛群,等.重组逆转录病毒介导的HSVtk基因表达及提高逆转录病毒滴度的初步研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2004,18(4):332-336.
- Gossen M, Freundlich S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells [J]. Science, 1995, 268(5218): 1766-1769.

[编辑:贺文]