

文章编号:1005-6947(2007)01-0073-05

· 基础研究 ·

PGL3-DF3-DTA 特异性杀伤移植瘤 裸鼠人乳腺癌细胞的实验研究

蔡明, 黄文广, 潘晟

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 普通外科, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 研究新构建的含人乳腺癌 DF3 启动子和白喉毒素 A 片段的重组表达载体 PGL3-DF3-DTA 对裸鼠人乳腺癌移植瘤的特异性杀伤作用。方法 建立人乳腺癌移植瘤裸鼠动物模型, 将 4 周龄裸鼠 36 只随机分为实验组、空载体组、空白对照组、阴性对照组 4 组, 每组 9 只。将 DF3 阳性和阴性的人乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 分别接种于相应的裸鼠皮下。待成瘤后, 将重组表达载体 PGL3-DF3-DTA 和 PGL3-DF3 多次、多位点注射入相应裸鼠移植瘤内。连续测量瘤体大小, 计算瘤体体积。在不同时间点分批处死部分动物, 行形态学观察、检测肿瘤细胞的凋亡, 检测 Ki-67, Bax 及 Bcl-2 蛋白的表达。结果 裸鼠人乳腺癌动物模型建立成功, 经重组表达载体 PGL3-DF3-DTA 作用后的人乳腺癌细胞出现明显的凋亡现象, Ki-67 及 Bcl-2 基因表达水平降低, Bax 基因表达水平升高。结论 重组表达载体 PGL3-DF3-DTA 能对 DF3 阳性的乳腺癌细胞产生特异性杀伤作用。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(1): 73-77]

关键词: 乳腺肿瘤/病理学; 重组蛋白质类; PGL3-DF3-DTA/治疗应用; 疾病模型, 动物; 基因表达

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Experimental study on PGL3-DF3-DTA specific killing of tumors from implanted human breast cancer cells in nude mice

CAI Ming, HUANG Wen-guang, PAN Sheng

(Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: Objective To study the specific killing effect of recombinant expression vector containing human breast cancer DF3 promoter and diphtheria toxin A fragment on human breast cancer cells implanted in vivo.

Methods To establish human breast cancer xenograft in nude mice, thirty-six nude mice were divided into four groups at random, nine animals in each group. Human breast cancer cells of DF3 positive and negative (MCF-7 and MDA-MB-231) were inoculated into corresponding animals respectively. Recombinant expression vector PGL3-DF3-DTA and PGL3-DF3 were inoculated into corresponding tumor after if developed in the animals. The tumor weight was measured and calculated continually. The animals were killed at different time periods. The morphological changes were observed. The apoptosis index of cells was evaluated by in-situ TUNEL. Immunocytochemical methods were used to detect the expression of Ki-67, Bax and Bcl-2 protein. **Results** Human breast cancer xenograft were established in nude mice successfully. The human breast cancer cells treated by PGL3-DF3-DTA showed a typical apoptosis morphology and TUNEL detection analysis revealed the apoptosis index of the experimental groups was significantly enhanced, which was associated with time and dosage. The expression of Ki-67 and Bcl-2 were downregulated, and the expression of Bax was elevated. **Conclusions** Recombinant expression vector PGL3-DF3-DTA could produce specific killing effect on DF3 positive human breast cancer cell line.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(1): 73-77]

基金项目:湖北省卫生厅科研基金资助项目(NX200501)。

收稿日期:2006-03-30; **修订日期:**2006-06-29。

作者简介:蔡明,男,湖北武汉人,华中科技大学同济医学院附属协和医院研究生,主要从事外科肿瘤方面的研究。

通讯作者:黄文广 E-mail: huang_hanju@houtmail.com。

Key words: Breast Neoplasms/pathol; Recombinant Proteins; PGL3-DF3-DTA/ther use;

Disease Models's, Animal; Gene Expression

CLC number: R737.9

Document code: A

靶向性基因治疗是近年来治疗肿瘤的新思路。目前将配体与杀伤基因偶联成复合物,通过配体与受体结合的内吞效应转导自杀基因,同时采用组织特异性的转录调控序列控制自杀基因在肿瘤组织中的特异性表达这一方法已成为当今肿瘤治疗研究的热点。笔者等构建了含人乳腺癌DF3启动子转录调控序列和白喉毒素A片段(DTA)的重组表达载体PGL3-DF3-DTA,使DTA能选择性地DF3阳性的乳腺癌细胞中表达,并证实重组表达载体PGL3-DF3-DTA在体外能对DF3阳性的人乳腺癌细胞产生特异性杀伤作用^[1-2]。本实验通过建立裸鼠人乳腺癌移植瘤动物模型,探讨PGL3-DF3-DTA在体内对乳腺癌细胞的特异性杀伤作用,为乳腺癌的基因治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

重组表达载体PGL3-DF3-DTA由本实验小组自行构建^[1-2]。人乳腺癌MCF-7细胞株、MDA-MB-231细胞株由本院普外实验室保存。4周龄雌性裸鼠购于本校实验动物中心。In Situ Cell Death Detection试剂盒购于Roche德国分公司。兔抗鼠Bax, Bcl-2(1:100) IgG购于武汉博士德公司。兔抗鼠Ki-67(1:100) IgG购于Santa Cruz公司。SP试剂盒购于北京中山公司。

1.2 实验方法

1.2.1 建立裸鼠动物模型 4周龄雌性裸鼠36只随机分为4组,每组9只。将对数生长期的人乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231分别制成 10^7 个/mL的细胞悬液,并大量提取重组质粒PGL3-DF3-DTA和PGL3-DF3。(1)实验组:将MCF-7细胞接种于裸鼠皮下。成瘤后,将重组表达载体PGL3-DF3-DTA多位点注射于移植瘤内。(2)空载体组:将MCF-7细胞接种于裸鼠皮下。成瘤后,将空载体PGL3-DF3多位点注射于移植瘤内。(3)阴性对照组:将MDA-MB-231细胞接种于裸

鼠皮下。成瘤后,将PGL3-DF3-DTA多位点注射于移植瘤内。(4)空白对照组:将MCF-7细胞接种于裸鼠皮下,不予任何处理。每次注射质粒量为100 μ g,每周1次,连续5次。

1.2.2 观测裸鼠移植瘤的大小和一般情况 用游标卡尺测量瘤体长径(a)、短径(b)。按公式 $V = (1/2) \times ab^2$ 计算移植瘤的体积。重组表达载体PGL3-DF3-DTA对移植瘤生长的抑制率(IR%) = $(1 - \text{实验组移植瘤体积} / \text{阴性对照组移植瘤体积}) \times 100\%$ 。另外,在裸鼠成瘤后(注射质粒之前)、连续注射质粒3周后、连续注射质粒5周后3个时间点分别每组处死3只动物,检测其生物学特性,观察重组表达载体PGL3-DF3-DTA在体内对人乳腺癌细胞的特异性杀伤作用。

1.2.3 光镜形态学观察 取出各组动物移植瘤组织,用10%中性缓冲福尔马林固定24h,常规脱水、透明、石蜡包埋,制成4 μ m厚的石蜡切片。作常规HE染色,光镜下观察。

1.2.4 凋亡原位检测方法(TUNEL)检测细胞凋亡 将石蜡切片脱蜡、水化。切片经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,加3% H₂O₂-甲醇液,置于室温10min,以阻断内源性过氧化物酶。加20 μ g/mL的蛋白酶K消化15~20min。PBS冲洗3 \times 5min后,滴加TUNEL反应混合液(A液:B液按1:9混合),置37 $^{\circ}$ C湿盒温育2h。PBS冲洗3 \times 5min后,用正常山羊血清,37 $^{\circ}$ C湿盒孵育20min,防止POD转换剂的非特异性结合。甩干后滴加POD转换剂,37 $^{\circ}$ C湿盒孵育30~40min。PBS冲洗3 \times 5min后,DAB显色。苏木素复染细胞核30s,常规脱水、透明、封片。

1.2.5 免疫组织化学技术检测Ki-67, Bax及Bcl-2基因编码蛋白的表达 石蜡切片脱蜡、水化、H₂O₂-甲醇处理方法同1.2.4。抗原修复处理:90 $^{\circ}$ C,80%功率,微波,2 \times 5min。充分水洗,PBS冲洗。加正常山羊血清,室温20min。滴加特异性的一抗50 μ L,4 $^{\circ}$ C过夜。PBS冲洗,滴加Biotin-羊抗兔IgG,37 $^{\circ}$ C,30min。PBS冲洗,滴加

HRP 标记链霉亲和素 (S-P 复合物), 37℃ 30 min。PBS 冲洗 3 × 5 min 后, DAB 显色; 苏木素复染细胞核 30 s, 常规脱水、透明、封片。

1.2.6 结果分析 1.2.3 ~ 1.2.5 3 项的阳性染色结果呈棕黄色, 不同生物学指标在细胞中的着色部位不同。染色结果用 TJTY-300 型全自动图像分析仪对检测结果进行分析。连续观察 10 个高倍视野, 每高倍视野下随机观察 100 个细胞, 计算阳性细胞数。

1.3 统计学处理

实验结果均采用 t 检验或方差分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

表 1 移植瘤体积 V (cm³) 和 PGL3-DF3-DTA 对移植瘤生长的抑制率 IR (%) ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	2 周		3 周		4 周		5 周		6 周		7 周	
		V (cm ³)	IR (%)	V (cm ³)	IR (%)	V (cm ³)	IR (%)	V (cm ³)	IR (%)	V (cm ³)	IR (%)	V (cm ³)	IR (%)
实验组	9	0.283 ± 0.008	-	0.293 ± 0.016 [†]	12.01	0.339 ± 0.014 [†]	30.82	0.399 ± 0.019 [†]	35.33	0.441 ± 0.017 [†]	42.88	0.506 ± 0.021 [†]	51.95
空载体组	9	0.292 ± 0.017	-	0.356 ± 0.020	-	0.506 ± 0.017	-	0.622 ± 0.023	-	0.776 ± 0.020	-	1.088 ± 0.023	-
空白对照组	9	0.276 ± 0.014	-	0.321 ± 0.019	-	0.484 ± 0.018	-	0.626 ± 0.017	-	0.755 ± 0.016	-	1.029 ± 0.021	-
阴性对照组	9	0.277 ± 0.012	-	0.333 ± 0.018	-	0.490 ± 0.016	-	0.617 ± 0.021	-	0.771 ± 0.018	-	1.053 ± 0.022	-

注: † 与阴性对照组比较, P < 0.05

2.2 形态学观察

HE 染色, 阴性对照组可见肿瘤细胞生长旺盛, 瘤细胞体积大、数量多; 肿瘤细胞核浆比例失调, 细胞浆较少、细胞核较大、核仁明显、核分裂像多见; 还可见瘤巨细胞。随着肿瘤生长时间的延长, 阴性对照组可见肿瘤中央部位因生长过快而导致组织缺血、缺氧形成的坏死区。实验组早期可看到较为典型的肿瘤细胞凋亡形态学变化, 如胞质浓缩, 胞核固缩、深染等; 随着 PGL3-DF3-DTA 的持续作用, 实验组肿瘤细胞凋亡现象更明显, 凋亡细胞数量明显增多 (图 1)。

2.3 TUNEL 标记检测结果

TUNEL 染色阳性物质位于细胞核, 凋亡细胞核呈棕黄色。实验组早期阳性染色的细胞数略微比阴性对照组多; 随着 PGL3-DF3-DTA 的连续注射, 实验组的凋亡细胞数目逐渐增多, 明显多于阴性对照组 (图 2)。

2 结果

2.1 裸鼠移植瘤的生长的情况

各组裸鼠于接种 2 周后均可见皮下肿瘤形成, 且肿瘤生长很迅速, 各组裸鼠之间移植瘤体积无明显差异。在裸鼠移植瘤内多位点注射质粒后, 实验组裸鼠移植瘤生长明显延迟, 其他 3 组的移植瘤生长仍然很旺盛。至第 7 周, 实验组裸鼠的移植瘤体积明显小于其他 3 组, 空载体组、空白对照组、阴性对照组裸鼠的平均瘤体体积约为实验组的 2 倍, 但空载体组、空白对照组、阴性对照组之间瘤体体积无明显差别 (表 1)。

2.4 免疫组化检测结果

2.4.1 Ki-67 表达 Ki-67 阳性染色结果为细胞核内出现棕黄色细颗粒状物质。免疫组化结果表明实验组早期阳性染色细胞数目略少于阴性对照组; 多次注射 PGL3-DF3-DTA 后, 实验组中阳性染色细胞数明显少于阴性对照组 (图 3)。

2.4.2 Bcl-2 表达 Bcl-2 定位于细胞浆, 其阳性染色结果为细胞浆内出现棕黄色颗粒状沉淀。染色结果显示, 实验组早期肿瘤组织中 Bcl-2 基因表达水平略低于阴性对照组; 连续注射 PGL3-DF3-DTA 后, 实验组肿瘤组织中 Bcl-2 基因表达水平明显低于阴性对照组。Bax 定位于细胞浆, 其阳性染色结果为细胞浆内出现棕黄色颗粒状沉淀。实验组早期 Bax 基因表达水平略高于阴性对照组; 连续注射 PGL3-DF3-DTA 后, 实验组 Bax 基因表达水平明显高于阴性对照组 (图 4)。

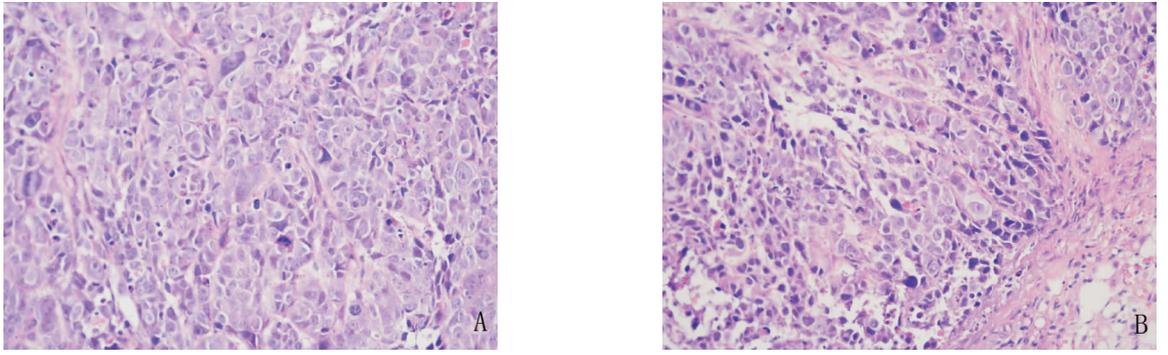


图1 实验组与阴性对照组早期 HE 染色(HE×400) A:阴性对照组; B:实验组

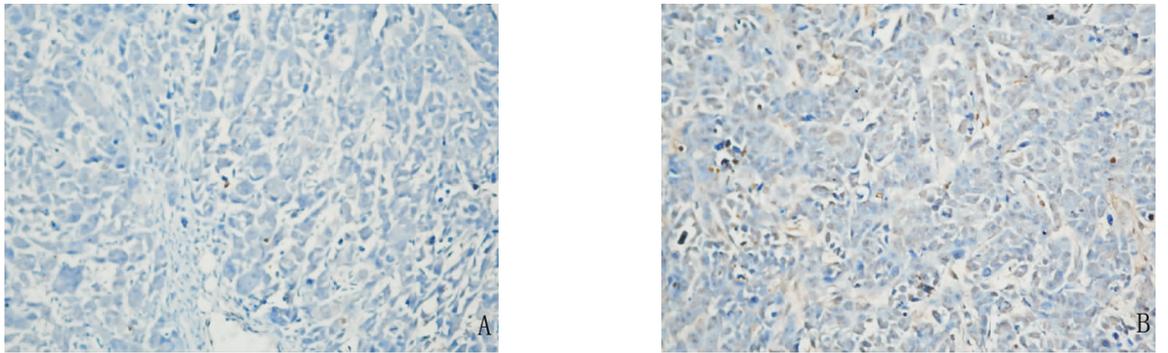


图2 实验组与阴性对照组晚期 TUNEL 染色(TUNEL×400) A:阴性对照组; B:实验组

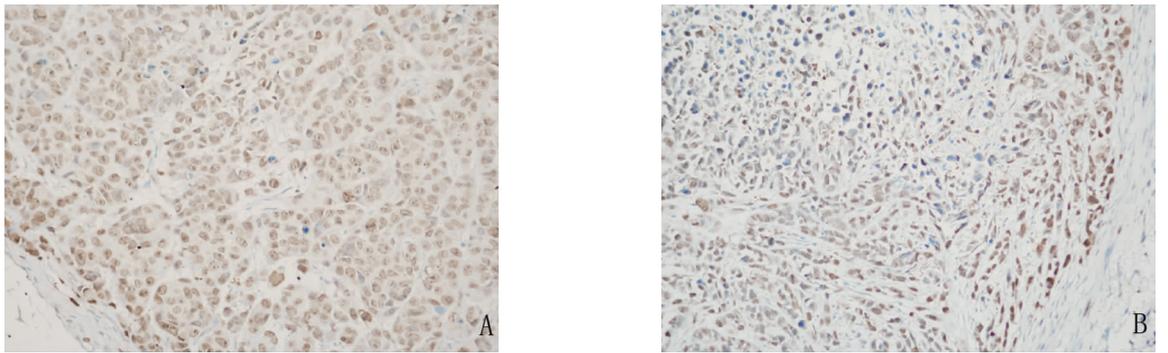


图3 实验组与阴性对照组晚期 Ki-67 染色(SP×400) A:阴性对照组; B:实验组

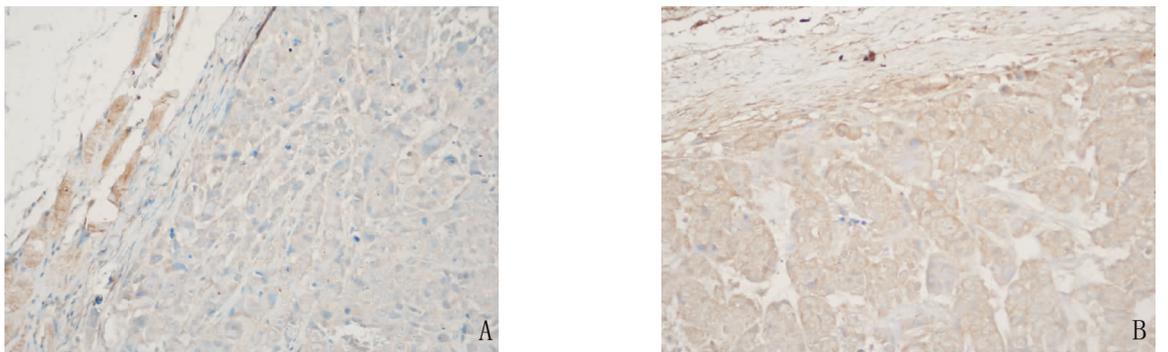


图4 实验组与阴性对照组晚期 Bax 染色(SP×400) A:阴性对照组; B:实验组

3 讨论

细胞的增殖与肿瘤的发生、浸润和转移有着密切的关系。核增殖抗原 Ki-67 是一种与细胞有丝分裂密切相关、能反映细胞增殖状态的核抗原,近年来被认为是一种能有效评估肿瘤增殖活性的标记物。Ki-67 的表达出现于 G₁ 中期至晚期,S 期和 G₂ 期逐渐增加,有丝分裂期达到高峰,分裂后迅速降解或丢失抗原决定簇,至 G₀ 期则不表达,半衰期为 1h 或更短。众多研究表明,Ki-67 的表达能准确可靠地反映恶性肿瘤的增殖率,与多种肿瘤的发展、转移和预后有关。因此 Ki-67 对恶性肿瘤的早期诊断、早期治疗和疗效评估起重要作用^[3-4]。实验发现,经 PGL3-DF3-DTA 作用后,Ki-67 基因的表达水平明显下降。这说明 PGL3-DF3-DTA 能阻止肿瘤细胞的生长、增殖,延缓肿瘤细胞的发展。

肿瘤细胞的发生、发展及退化与细胞凋亡有着密切的关系。肿瘤细胞凋亡受凋亡抑制基因 Bcl-2 和凋亡促进基因 Bax 的双向调节。Bcl-2 是目前公认的抗凋亡基因。众多研究表明 Bcl-2 能抑制各种因素(包括物理、化学、生物等因素)对细胞凋亡的诱导作用。这导致了 DNA 受损的细胞持续生存,突变产物聚集,从而促进了肿瘤的发生、发展。此外,也有研究报道 Bcl-2 蛋白的表达与肿瘤的组织学分级、淋巴转移、术后局部复发呈正相关。因此,目前认为 Bcl-2 是抑制细胞凋亡的重要因素,是决定肿瘤预后的重要指标,也是判断肿瘤细胞是否多耐药的一个客观指标^[5-7]。Bcl-2 相关 X 蛋白 Bax 与 Bcl-2 具有 40% 的同源性,其功能与 Bcl-2 相反。Bcl-2 和 Bax 形成了对细胞凋亡的正负调控。目前普遍认为 Bcl-2 与 Bax 的比例决定了细胞的发展趋势:如 Bcl-2 表达增加,则形成 Bcl-2 同源二聚体,细胞凋亡被抑制,细胞得以存活;如 Bax 表达增加,则形成 Bax 同源二聚体,加速细胞凋亡;如 Bcl-2 与 Bax 表达水平相当时,则形成 Bcl-2/Bax 异源二聚体,终止细胞凋亡^[8]。实验表明,随着 PGL3-DF3-DTA 的持续作用,Bcl-2 基因表达水平明显下降,Bax 基因表达水平明显上升,这说明 PGL3-DF3-DTA 能促进肿瘤细胞的凋亡。

高效、特异的杀伤肿瘤细胞是肿瘤治疗的关

键。导向性治疗药物可以特异性地杀伤肿瘤细胞,具有高效、低毒等特点,所以近年来成为肿瘤治疗研究的热点^[9-10]。本文通过构建含人乳腺癌 DF3 启动子转录调控序列和白喉毒素 A 片段的重组表达载体 PGL3-DF3-DTA,研究白喉毒素对乳腺癌细胞的影响。为使 DTA 基因能选择性地 DF3 阳性的乳腺癌细胞中表达,本实验在该重组表达载体的上游构建了人乳腺癌特异性 DF3 启动子,在其下游插入 DTA 片段,从而提高了该质粒用于基因治疗的效率及安全性。实验证明,用新构建的重组表达载体 PGL3-DF3-DTA 治疗乳腺癌动物模型,可以在很大程度上提高肿瘤治疗的特异性及靶向性,本实验结果为研究 DF3 阳性肿瘤的靶向性基因治疗提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 殷涛,黄文广,黄汉菊,等. 人乳腺癌相关抗原 DF3 转录调控序列的克隆及其调控表达[J]. 中国普通外科杂志,2004,13(10):808-812.
- [2] 罗威,黄文广,殷涛. 含人乳癌 DF3/MUC1 启动子转录调控序列和白喉毒素 A 链基因表达载体的构建[J]. 郑州大学学报,2005,40(3):473-476.
- [3] 李红智,王宗敏,谢丽微,等. C-erbB-2, PCNA 和 Ki67 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2002,12(10):51-53.
- [4] 李宝江,朱志华,王军业,等. Ki67, P53, VEGF 和 C-erbB-2 在乳腺癌组织中表达的相关性研究及其临床意义[J]. 癌症,2004,23(10):1176-1179.
- [5] 范宇,傅西林,王颖,等. 细胞凋亡及其相关基因与乳腺癌预后关系的研究[J]. 中国肿瘤临床,2000,27(7):524-529.
- [6] 余楠. 雌激素对凋亡调控基因 Bcl-2 家族的影响及与乳腺癌的关系[J]. 国外医学肿瘤学分册,2002,29(3):209-212.
- [7] 吴智勇,范扬航,许嘉宁. Bcl-2 在乳腺癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. 医学新知杂志,2005,12(2):21-22.
- [8] 刘雪梅,黄剑飞. Bcl-2, Bax 在乳腺癌中表达的临床意义[J]. 河南肿瘤学杂志,2005,18(1):14-16.
- [9] Frankel AE, Kreitman RJ, Sausville EA. Targeted toxins[J]. Clin Cancer Res,2000,6(2):326-334.
- [10] Kreitman RJ. Recombinant toxins for the treatment of cancer[J]. Curr Opin Mol Ther,2003,5(1):44-51.