

电穿孔介导质粒 DNA 肿瘤内转移抑制 恶性肿瘤生长与转移*

王 丰¹⁾ 陈霞芳¹⁾ 田毓华¹⁾ 吴继红¹⁾ 李 凌¹⁾ 李川源²⁾ 黄 倩^{1)**}

(¹⁾上海市第一人民医院中心实验室, 上海 200080;

²⁾Department of Radiation Oncology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA)

摘要 利用携带绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 编码基因的表达质粒, 测试电穿孔方法介导目的基因活体组织内转移的效率并优化电击参数。在此基础上采用电穿孔技术直接将编码白介素 12 (IL-12)、白介素 2 (IL-2)、粒单细胞克隆刺激因子 (GM-CSF) 等免疫调节因子或反义血管内皮细胞生长因子 121 (VEGF₁₂₁)、可溶性血管内皮细胞膜受体 (sFlk-1 及 ExTek) 等血管生成抑制因子表达质粒转移至肿瘤局部。实验结果表明电穿孔介导 GFP 表达质粒肌肉内转移的效率较高, GFP 可在肌细胞内持续高水平表达 3 周以上, 而在肿瘤细胞内只能表达 4~6 d, 但高电压短脉冲电击组肿瘤内 GFP 阳性细胞数比低电压长脉冲组高 2.68 倍。多次电击介导 IL-12 表达质粒转移至肿瘤组织内, 可有效地抑制小鼠膀胱癌 BTT-*gfp*、人乳腺癌 MCF-7 及肝癌 SMMC 7721-*gfp* 的生长。MCF-7 对血管生成抑制因子基因转移治疗较敏感, 单独应用反义 VEGF₁₂₁、sFlk-1 或 ExTek 即显示明确的治疗效果。SMMC 7721-*gfp* 单独应用 sFlk-1 有效。小鼠膀胱癌对单独应用反义 VEGF₁₂₁、sFlk-1 或 ExTek 治疗效果不理想, 但联合应用 sFlk-1 和 ExTek 仍然可以有效地抑制肿瘤生长与转移, 甚至使肿瘤缩小或消失。提示电穿孔技术是一项高效、安全、经济的体内基因转移方法。

关键词 电穿孔, 肿瘤基因治疗, 免疫调节, 血管生成

学科分类号 R349.8

肿瘤基因治疗迫切需要解决的二个关键问题是有效的目的基因选择和高效的基因转移技术建立。电穿孔技术已广泛用于体外基因转移, 其突出的优点是简便、高效。运用这一技术以增强抗肿瘤药物细胞毒性的电化学疗法在肿瘤治疗方面已显示出广阔的临床应用前景, 是否可以使用这项技术介导目的基因转移治疗恶性肿瘤正成为肿瘤治疗学新的关注热点。我们尝试利用电穿孔技术直接将编码白介素 12 (IL-12)、白介素 2 (IL-2)、粒单细胞克隆刺激因子 (GM-CSF) 和血管生成抑制因子反义血管内皮细胞生长因子 121 (VEGF₁₂₁)、可溶性血管内皮细胞膜受体 (sFlk-1 及 ExTek) 等真核表达质粒导入小鼠肿瘤局部, 探讨肿瘤基因治疗新方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

T-739 小鼠, 雌雄各半。Balb/C (nu/nu) 裸小鼠, 雌性。体重约 20 g。

1.2 肿瘤细胞株及 VEGF 表达水平的检测

小鼠膀胱移行细胞癌细胞株 BTT-739、稳定转导 GFP 编码基因的 BTT-*gfp*^[1]、人乳腺癌细胞株 MCF-7 (中国科学院上海细胞生物学研究所提供)、

稳定转导 GFP 的人肝癌细胞株 SMMC 7721-*gfp* (上海市肿瘤研究所提供, 本实验室修饰), 分别用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 或 DMEM (Gibco 公司) 培养基培养。肿瘤细胞产生 VEGF 的能力采用 R&D 公司的 ELISA 检测试剂盒测定其培养液中 VEGF 的含量予以确定。

1.3 质粒 DNA 的制备

GFP 真核表达质粒 pEGFP-N1 为 Clontech 公司产品、pNGVL-mIL-12、pNGVL-mIL-2 和 pNGVL-mGM-CSF 由美国 National Gene Vector Laboratories (NGVL) 赠送、编码反义 VEGF₁₂₁ cDNA 的表达质粒 pCR3.1-antiVEGF₁₂₁、编码 VEGF 的受体 Flk-1 胞外段配体结合结构域的表达质粒 pCF-sFlk-1、Angiopoietin1 的受体 Tie2 胞外段配体结合结构域的表达质粒 pCF-ExTek 由本实验室构建。质粒 DNA 抽提与纯化采用德国 Qiagen 公

* 上海市卫生局“百人计划”, 上海市科委“优秀学科带头人培养计划”及“白玉兰”基金, 上海市人事局回国人员专项基金资助课题。

** 通讯联系人。

Tel: 021-63240090-4601, E-mail: huangq@online.sh.cn

收稿日期: 2002-01-29, 接受日期: 2002-02-28

司的 EndoFree™ Plasmid Maxi Kit, 按 1 g/L 溶于 0.9% NaCl 中, -30℃ 储存.

1.4 肿瘤模型的建立与观察

1.4.1 T-739 小鼠膀胱癌肿瘤模型: 将 1×10^6 个稳定转导 GFP 的小鼠膀胱移行细胞癌细胞 (BTT-*gfp*) 接种于同系小鼠右后腿皮下, 一周后肿瘤生长至直径 5 mm 以上, 将相同大小肿瘤的荷瘤鼠随机分入实验组与对照组. 治疗过程中每周用游标卡尺测量肿瘤最大径、最小径与高度各 2 次.

1.4.2 裸小鼠的人乳腺癌和肝癌肿瘤模型: 将 1×10^7 个 MCF-7 和 SMMC 7721-*gfp* 细胞分别接种于 Balb/C 裸小鼠右后腿皮下, 二周后肿瘤生长至直径约 3 mm 以上, 将相同大小肿瘤的荷瘤鼠随机分入实验组与对照组. 治疗过程中每周用游标卡尺测量肿瘤最大径、最小径与高度各一次.

1.5 肌肉及肿瘤组织电击条件的优化

我们选择 *gfp* 作为报告基因评价电穿孔介导质粒 DNA 转移至肌肉及肿瘤组织的效率, 优化电击条件. 实验鼠选用 T-739 小鼠, 电转移的前一天先腹腔注射 1% 戊巴比妥钠, 麻醉后用脱毛膏褪去小腿部的毛发. 次日先用游标卡尺测量腓肠肌的厚度, 然后将 30 μ l (含 30 μ g) pEGFP-N1 注射到腓肠肌内, 立即用 ECM 830 方波电击仪 (BTX, San Diego) 平板电极夹住腓肠肌, 按 200 V/cm, 20 ms/pulse, 8 pulse, 1 Hz 设置电穿孔仪, 然后电击. 对照分二组, 一组腓肠肌内注射 30 μ l 生理盐水后电击, 另一组注射 pEGFP-N1, 但不电击. 电击后 1、2、3 周分别取实验组与对照组小鼠腓肠肌置荧光显微镜下观察.

肿瘤内 *gfp* 基因电转移选用 T-739 小鼠膀胱移行细胞癌皮下移植瘤, 直径约 10 mm. 于电击前一天褪去肿瘤局部皮肤的毛发. 电击前先用游标卡尺测量肿瘤各径线, 以肿瘤最大径为标准. 电击参数分二组, 高电压短脉冲组按 900 V/cm, 100 μ s/pulse, 8 pulse, 1 Hz 设置, 低电压长脉冲组按 200 V/cm, 20 ms/pulse, 8 pulse, 1 Hz 设置. 将 30 μ l pEGFP-N1 (含 30 μ g) 多点注射到肿瘤内, 立即用电极夹住肿瘤最大径电击. 对照组肿瘤内注射 30 μ l 生理盐水后电击或仅注射 pEGFP-N1 不电击. 电击后 1、2、3、4、6、10 d 取出肿瘤, 切成 1 mm 厚的薄片, 采用荧光显微镜观察 GFP 表达情况. GFP 阳性细胞的定量检测采用流式细胞技术, 先用 Dako 公司的组织研磨器破碎肿瘤组织, 再过 100 目的尼龙滤网分离单细胞, 以 460 nm 激光作

为激发光检测 GFP 阳性细胞数.

1.6 目的基因的选择与分组

本研究选用了二类基因, 一类为免疫调节因子, 包括 IL-12、IL-2 和 GM-CSF. 另一类为血管生成抑制因子, 包括反义 VEGF₁₂₁、sFlk-1 和 ExTek.

1.6.1 免疫调节基因治疗组: 其中又分为单次治疗组和多次治疗组.

单次治疗/低电压长脉冲治疗组: 分为 mIL-12 (30 μ g)、mIL-12+ mIL-2 (各 15 μ g)、mIL-12+ mGM-CSF (各 15 μ g) 和生理盐水对照组 (control) 4 组. 实验动物为 BTT-*gfp* T-739 荷瘤小鼠, 每组 5 只, 仅电击治疗一次.

单次治疗/高电压短脉冲治疗组: 分为 mIL-12 (30 μ g)、mIL-12+ mIL-2 (各 15 μ g)、mIL-12+ mGM-CSF (各 15 μ g) 治疗组和生理盐水对照组 (control) 4 组. 实验动物为 BTT-*gfp* T-739 荷瘤小鼠, 每组 7 只, 仅电击治疗一次.

多次治疗/高电压短脉冲组: 分为 mIL-12 (30 μ g)、mIL-12+ mIL-2 (各 15 μ g) 治疗组和生理盐水对照组 (control) 3 组. 实验动物分三种, a. BTT-*gfp* T-739 荷瘤小鼠, 每组 10 只, 每周电击治疗一次, 共治疗 3 次; b. MCF-7 荷瘤裸小鼠, 每组 10 只, 每 2 周电击治疗一次, 共治疗 3 次; c. SMMC 7721-*gfp* 荷瘤裸小鼠, 每组 7 只, 每 2 周电击治疗一次, 共治疗 3 次.

1.6.2 抗肿瘤血管生成治疗组: 分为 anti VEGF₁₂₁ (30 μ g)、ExTek (30 μ g)、sFlk-1 (30 μ g) 治疗组和生理盐水对照组 (control) 共 4 组. 均采用高电压短脉冲方式电击. 实验动物分三种, a. BTT-*gfp* T-739 荷瘤小鼠, 每组 8 只, 每周电击治疗一次, 共治疗 3 次; b. MCF-7 荷瘤裸小鼠, 每组 8 只, 每 2 周电击治疗一次, 共治疗 3 次; c. SMMC 7721-*gfp* 荷瘤裸小鼠, 每组 6 只, 每 2 周电击治疗一次, 共治疗 3 次.

ExTek+ sFlk-1 (各 15 μ g) 联合治疗组, 采用高电压短脉冲方式电击. 实验动物为 BTT-*gfp* T-739 荷瘤小鼠, 共 8 只, 每周电击治疗一次, 共治疗 3 次.

1.7 治疗效果评价

治疗期间每周 (T-739 小鼠) 或每隔一周 (裸小鼠) 测量肿瘤各径线, 根据公式 $V = 0.52 \times a \times b \times c$ (V 代表肿瘤体积; a , b , c 分别代表肿瘤的 3 个相互垂直径线的距离) 计算肿瘤体积, 绘制

肿瘤生长曲线. 单次治疗组 BTT-*gfp* T-739 小鼠于治疗后 3 周处死 (连续观察 3 周). 多次治疗组 BTT-*gfp* T-739 小鼠于第三次治疗后 1 周处死 (连续观察 4 周). 裸小鼠第三次治疗后 2 周处死 (连续观察 8 周). 根据肿瘤的大小和生长速度评价治疗效果. BTT-*gfp* T-739 小鼠及 SMMC 7721-*gfp* 裸小鼠处死后取肝脏和肺置荧光显微镜下, 观察并计数肿瘤转移情况; MCF-7 小鼠处死后取肝脏和肺用中性甲醛固定作常规病理切片检查. 根据转移的肿瘤细胞多少和转移病灶的大小进行评分: 0 分, 低倍镜下未见肿瘤细胞; 1 分, 低倍镜下稀疏可见散在的肿瘤细胞或有 1~2 个转移灶; 2 分, 低倍镜下散在较多的肿瘤细胞或有 3~8 个转移灶; 3 分, 低倍镜下有很多的肿瘤细胞和/或有 10 个以上或很大的转移灶.

1.8 体外 sFlk-1、ExTek 表达结合 VEGF 的能力

采用脂质体 (Lipofectamine, Gibco 公司) 分别将 pCI-sFlk 和 pCI-ExTek 表达质粒转入 NIH3T3 细胞中, 24 h 后收集一过性转染的 NIH3T3 细胞培养液, 并与稳定转染含正义 VEGF₁₆₅ cDNA 表达质粒的 MCF-7 细胞的培养液按 1: 1、2: 1、3: 1 的比例混合, 对照则加入等量未经转染的 NIH3T3 细胞培养液, ELISA 检测混合 15 min、30 min、1 h 和 2 h 后混合培养液中 VEGF 的含量, 观察 sFlk-1 和 ExTek 表达结合 VEGF 的能力.

1.9 血管生成抑制因子对肿瘤内血管生成的影响

抗肿瘤血管生成治疗组治疗完成后取出肿瘤, 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 常规切片. 选用抗平滑肌肌动蛋白单克隆抗体 (SMA, Dako 公司) 作免疫组织化学染色, 观察阳性染色的小血管和微血管的形态特征并计数.

1.10 免疫调节基因治疗组肿瘤病理改变特征

免疫调节基因治疗组治疗完成后, 取出肿瘤作常规病理切片检查, 重点观察肿瘤内淋巴细胞及单核细胞浸润情况.

2 结 果

2.1 电穿孔介导的 GFP 在小鼠肌肉内表达

T-739 小鼠腓肠肌注射 pEGFP-N1 质粒 DNA (30 μ g) 并按低电压长脉冲条件 (200 V/cm; 20 ms/pulse) 电击后 1 周, 电击部位的腓肠肌已有明显的 GFP 表达, 荧光显微镜观察见局部肌纤维发出强烈的绿色荧光. 3 周后腓肠肌内仍然可见明显的 GFP 表达. 但注射生理盐水并电击的对照和

仅注射质粒 DNA 未电击的对照腓肠肌内均未观察到 GFP 表达.

2.2 电穿孔介导的 GFP 在小鼠肿瘤内表达

肿瘤局部注射 pEGFP-N1 质粒 DNA (30 μ g) 后分别按低电压长脉冲 (200 V/cm; 20 ms/pulse; 8 pulse) 和高电压短脉冲 (900 V/cm; 100 μ s/pulse; 8 pulse) 电击, 电击后 1、2、3、4、6、10 d 取肿瘤置荧光显微镜下观察并用流式细胞仪定量检测. 电击后 1、2、3、4 d 高电压组和低电压组肿瘤内均可见散在的 GFP 阳性细胞, 但高电压组的阳性细胞数明显多于低电压组. 电击后 6 d 高电压组高倍镜下零星可见阳性细胞, 低电压组则完全消失. 流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞数, 电击后 1 d 高电压组为 3.58%, 低电压组为 1.34%; 电击后 3 d 高电压组为 0.43%, 低电压组为 0.16%.

2.3 电穿孔介导表达质粒转移抑制肿瘤生长

2.3.1 单次免疫调节基因治疗组: BTT-*gfp* T-739 荷瘤小鼠单次注射 mIL-12, 或 mIL-12 + mIL-2、mIL-12 + mGM-CSF 表达质粒, 结合高电压短脉冲电击, 肿瘤生长减慢 (图 1), 治疗效果明显较低电压长脉冲电击好. 单独应用 mIL-12 与联合应用 mIL-12 + mIL-2 或 mIL-12 + mGM-CSF 的治疗效果差异不明显.

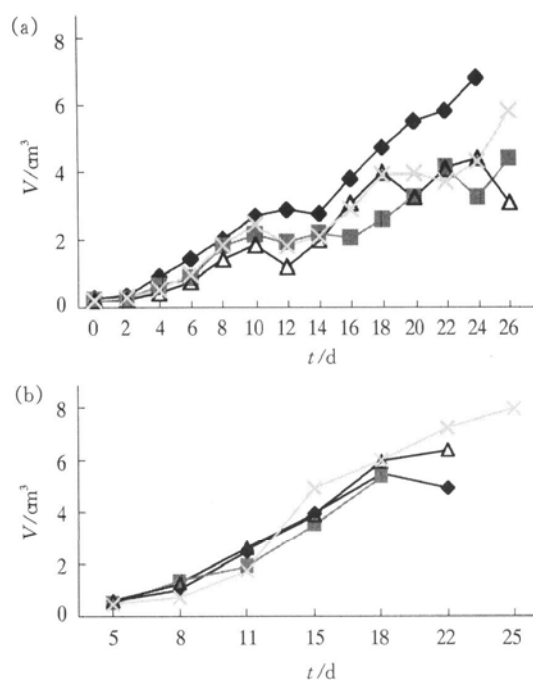


Fig.1 Effect of mIL-12 and mIL-12 + mIL-2, mIL-12 + mGM-CSF genes transfer mediated by single electroporation on tumor growth in vivo

(a)high voltage/short pulses; (b)low voltage/long pulses. ◆: control; ■: mIL-12; △: mIL-12 + mIL-2; ×: mIL-12 + mGM-CSF.

2.3.2 多次免疫调节基因治疗组: 多次注射 mIL-12 或 mIL-12+ mGM-CSF 表达质粒, 结合高电压短脉冲多次电击治疗效果明显好于单次电击治疗 (图 2). 其中 BTT-*gfp* T-739 小鼠 mIL-12+ mGM-

CSF 治疗组, 人乳腺癌 MCF-7 裸小鼠及人肝细胞癌 SMMC 7721-*gfp* 裸小鼠 mIL-12 治疗组肿瘤生长速率比对照组明显减慢 ($P < 0.05$).

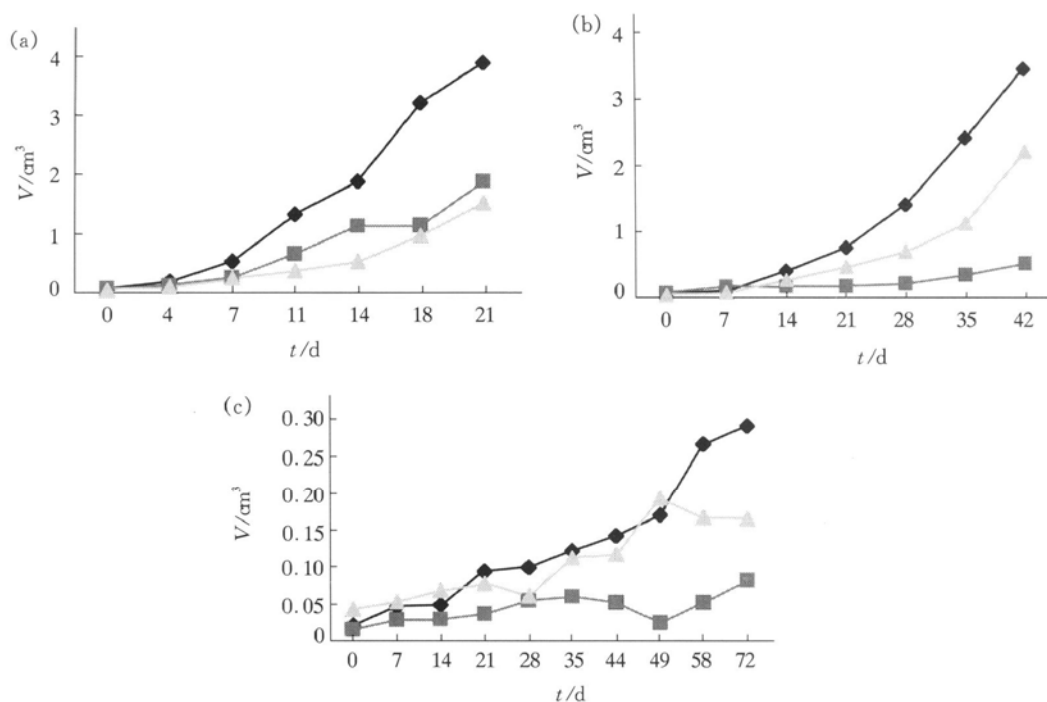


Fig.2 Effect of mIL-12 and mIL-12 + mGM-CSF gene transfer mediated by multi electroporation in tumor on tumor growth *in vivo*

(a) tumor growth curve of BTT-*gfp* T-739 mice; (b) tumor growth curve of MCF-7 nude mice; (c) tumor growth curve of SMMC 7721-*gfp* nude mice. ◆—◆: control; ■—■: mIL12; ▲—▲: mIL12+mGMCSF.

2.3.3 抗肿瘤血管生成治疗组: ELISA 检测 2×10^5 个 BTT-*gfp*、MCF-7、SMMC 7721-*gfp* 细胞在 2% 低血清培养基中培养 24 h 后培养液中 VEGF 的含量分别是 1 327 ng/L、178.8 ng/L、225.7 ng/L.

多次注射反义 VEGF₁₂₁ 或 sFlk-1 或 ExTek 表达质粒, 结合高电压短脉冲多次电击治疗, 不同组织学类型的肿瘤治疗效果不同. 对于裸小鼠 MCF-7 肿瘤, 反义 VEGF₁₂₁、sFlk-1 和 ExTek 都有明显的抑制肿瘤生长的作用 ($P = 0.05$); 对于裸小鼠 SMMC 7721-*gfp* 肿瘤, 仅 sFlk-1 治疗组能明显抑制肿瘤生长 ($P = 0.035$), 其中 2 只肿瘤完全消退. T-739 小鼠 BTT-*gfp* 肿瘤, 则只有 sFlk-1 + ExTek 联合才能有效抑制肿瘤生长 ($P = 0.042$), 这一组的 8 只荷瘤鼠中 2 只肿瘤完全消退, 2 只肿瘤明显缩小 (图 3).

2.4 多次电击治疗对肿瘤肝、肺转移的影响

BTT-*gfp* 荷瘤鼠完成治疗后 2 周处死, 取出

肝脏和肺置荧光显微镜下观察肿瘤转移情况, 根据转移的肿瘤细胞多少及转移灶的数量和大小计算平均转移指数. 由表 1 和表 2 可见 sFlk-1 + ExTek 联合治疗组肿瘤肝、肺转移均明显减少 ($P < 0.05$).

Table 1 Metastasis in lung and liver of BTT-*gfp* T-739 mice after anti-angiogenesis therapy mediated by multi electroporation

	Control	ExTek-1	sFlk-1	ExTek + sFlk-1	antiVEGF121
Liver	1.875	1	1.67	0.6	2.375
Lung	1	0.5	0.167	0.2	1

Table 2 Metastasis in lung and liver of BTT-*gfp* T-739 mice after cytokine therapy mediated by electroporation

	Control	mIL-12	mIL-12 + mGM-CSF
Liver	2.25	1.714	1.25
Lung	1.5	0.571	0.875

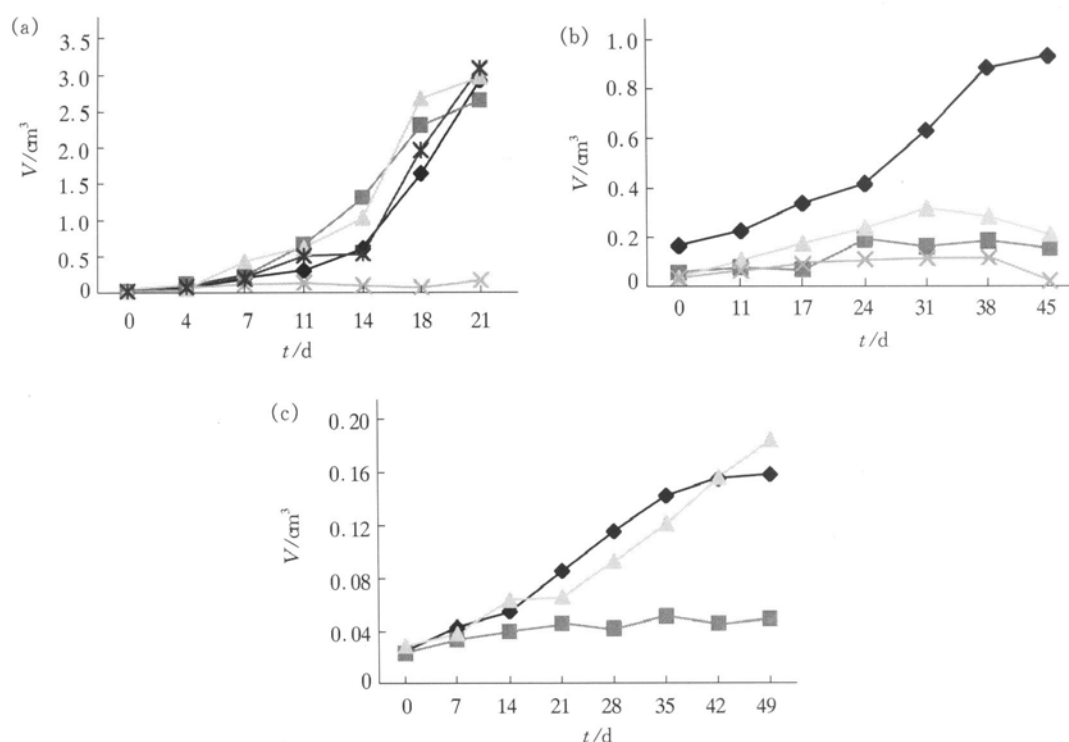


Fig.3 Effect of anti VEGF121, sFlk-1 or ExTek gene transfer mediated by multi electroporation in tumor on

tumor growth in vivo

(a) tumor growth curve of BIT-gfp T739 mice. ◆: control; ■: sFlk-1; ▲: ExTek; ×: sFlk + ExTek; * : antiVEGF121. (b) tumor growth curve of MCF-7 nude mice. ◆: control; ■: antiVEGF121; ▲: sFlk-1; ×: ExTek. (c) tumor growth curve of SMMC 7721-gfp nude mice. ◆: control; ■: sFlk-1; ▲: ExTek.

2.5 sFlk-1、ExTek 表达可竞争结合 VEGF

稳定转染 VEGF₁₆₅ 表达质粒并高水平表达 VEGF 的 MCF-7 细胞培养液与经过 sFlk-1 或 ExTek 一过性转染的 NIH3T3 细胞培养液混合, ELISA 检测不同混合比例和不同混合时间混合液中 VEGF 含量. 检测结果表明加入含 sFlk-1 或 ExTek 的培养液后 15 min 混合液中 VEGF 的含量便明显下降, sFlk-1 组降至原液的 51.2%, ExTek 组降至原液的 35.92%. 但随时间延长或混合液中 sFlk-1 或 ExTek 增加 VEGF 含量变化不大. 提示 sFlk-1 和 ExTek 的表达可与 VEGF 有效结合, 使游离的 VEGF 明显减少.

2.6 血管生成抑制因子对肿瘤组织微血管数的影响

肿瘤组织切片经抗 SMA 单克隆抗体免疫组织化学染色, 阳性着色的血管主要分布在肿瘤周围及肿瘤间质的结缔组织内, 各治疗组与对照组间微血管的数目无明显统计学差异.

2.7 免疫调节基因对肿瘤组织病理改变特征

肿瘤组织切片经 (HE) 染色, IL-12 及 IL-12 + GM-CSF 治疗组肿瘤内淋巴细胞及单核细胞数目明显比只注射生理盐水的对照组增多, 并且可见散

在的浆细胞浸润.

3 讨 论

基因转移是未来治疗遗传性疾病、肿瘤等的一项重要手段. 现有的体内基因转移方法存在这样那样的不足^[2]. 例如逆转录病毒只能感染分裂期细胞; 腺病毒因有很强抗原性使其在体内的存在和表达时间受限并且不能反复应用等. 与病毒相比, 质粒 DNA 简便、经济. 裸露的质粒 DNA 尚有抗原性弱, 可多次反复应用等优点. 电穿孔通过局部高压电击, 增大靶细胞膜通透性, 促进目的基因转入. 此系统较其他非病毒系统, 如阳离子脂质体等的转导效率高. 由于电穿孔技术可高效地将化疗药物导入肿瘤细胞内, 国外已开始探索以电穿孔为基础的肿瘤基因治疗新方法^[3~5]. 我们以 GFP 作为报告基因, 电击后 24 h 肌肉和肿瘤组织内即可见 GFP 表达, 表明电击能有效介导质粒 DNA 转移至多种细胞内. GFP 在肌肉内可持续高水平表达 3 周以上 (只观察了 3 周), 为基因疫苗的应用和代谢性疾病的治疗提供了简便、经济的手段. 但是, GFP 在肿瘤组织内表达的持续时间很短, 电击后

6 d基本上看不到 GFP 阳性细胞. 因此, 若采用电穿孔介导目的基因转移治疗肿瘤必须重复多次.

终末期肿瘤的治疗问题是肿瘤治疗的一大难题, 由于 IL-12 对 NK 细胞、T 细胞等免疫效应细胞具有多重生物学效应, 可在多个层次上产生抗肿瘤效果, 最近还有报道 IL-12 可抑制肿瘤血管生成^[6]. Paul^[7], Caruso^[8], Tamura^[4] 和 Lohr^[5] 等分别采用重组逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒及质粒作载体介导 IL-12 基因转移治疗恶性肿瘤, 实验结果显示 IL-12 单用或联合其他治疗措施均能明显延迟肿瘤远处转移, 提高小鼠生存期. 我们利用电穿孔介导 IL-12 基因转移治疗膀胱癌、乳腺癌、肝癌, 实验结果表明单用 IL-12 或联合 IL-12 + GM-CSF 均能够获得明显的治疗效果. 鉴于肿瘤内淋巴细胞和单核细胞数明显增加, 其治疗效果可能是通过改善肿瘤局部的免疫反应实现的. 提示细胞因子 IL-12 在实体瘤治疗方面有广阔的应用前景.

VEGF 是体内外血管内皮细胞生长特异的有丝分裂原. VEGF 通过选择性地与血管内皮细胞膜上高亲和力的受体酪氨酸激酶 (VEGFR) 结合, 使受体磷酸化而活化, 刺激内皮细胞迁移与增殖. 尽管目前已经发现有 3 种 VEGFR, 其中 VEGFR2 (又称 Flk-1 或 KDR) 是血管内皮细胞膜上 VEGFR 的主要形式. 但并非所有的肿瘤血管均能检测到高水平的 Flk-1 表达. Tie 是血管内皮细胞膜上的另一类主要的受体酪氨酸激酶, 与其配体 Angiopoietin1 结合后同样可以起到促进新生血管形成的作用. VEGF-VEGFR 与 Angiopoietin-Tie 通路的作用和机理不同, 基因敲除小鼠研究表明 VEGF 及 Flk-1 基因敲除的小鼠胚胎死于 E6.5~E7.5 天, 表现为血管内皮细胞增殖和迁移及血管形成异常^[9~11]. 而 Angiopoietin 和 Tie 基因敲除后, 胚胎死于 E8.5 天, 出现血管分支与形态发生异常. 表明 VEGF-VEGFR 通路在血管发生的早期起作用, 而 Angiopoietin 和 Tie 通路则为血管发生后期所必需^[12,13]. 本实验通过反义 VEGF 减少 VEGF 表达, 采用可溶性的 Flk-1 竞争结合 VEGF, 抑制 VEGF-VEGFR 信号传导通路, ExTek 竞争结合 Angiopoietin1, 阻断 Angiopoietin1-Tie2 信号传导通路, 探讨抑制肿瘤血管生成的途径与方法. 由于不同类型或不同组织学起源的肿瘤细胞产生 VEGF 的能力不同, 抗血管生成治疗效果存在差

异. 因此, 在临床应用前有必要根据肿瘤分泌 VEGF 的能力设计个体化的抗血管生成治疗方案, 方可达到可靠的治疗效果. 但是联合阻断多条与血管生成有关的信号传导通路, 仍然可以达到抑制肿瘤生长和转移的目的.

总之, 电穿孔技术十分简便, 介导基因转移的效率也较高. 如果配以适当的目的基因, 可能成为治疗晚期肿瘤的有效措施.

参 考 文 献

- 1 李 凌, 徐 萍, 胡宏慧, 等. 一种新的肿瘤血管生成模型. 生物化学与生物物理学报, 2002, **34** (1): 21~27
Li L, Xu P, Liu W W, *et al.* Acta Biochim Biophys Sin, 2002, **34** (1): 21~27
- 2 Nishikawa M, Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. Hum Gene Ther, 2001, **12** (8): 861~870
- 3 Vicat J M, Boisseau S, Jourdes P, *et al.* Muscle transfection by electroporation with high voltage and short-pulse currents provides high level and long-lasting gene expression. Hum Gene Ther, 2000, **11** (6): 909~916
- 4 Tamura T, Nishi T, Goto T, *et al.* Intratumoral delivery of interleukin 12 expression plasmids with *in vivo* electroporation is effective for colon and renal cancer. Hum Gene Ther, 2001, **12** (10): 1265~1276
- 5 Lohr F, Lo D Y, Zaharoff D A, *et al.* Effective tumor therapy with plasmid-encoded cytokines combined with *in vivo* electroporation. Cancer Res, 2001, **61** (8): 3281~3284
- 6 Duda D G, Sunamura M, Lozonchi L, *et al.* Direct *in vitro* evidence and *in vivo* analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. Cancer Res, 2000, **60** (4): 1111~1116
- 7 Paul D, Qazilbash M H, Song K, *et al.* Construction of a recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector expressing murine interleukin 12 (IL-12). Cancer Gene Ther, 2000, **7** (2): 308~315
- 8 Caruso M, Pham Nguyen K, Kwong Y L, *et al.* Adenovirus-mediated interleukin 12 gene therapy for metastatic colon carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (21): 11302~11306
- 9 Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature, 1996, **380** (6573): 435~439
- 10 Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature, 1996, **380** (6573): 439~442
- 11 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T P, *et al.* Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. Nature, 1995, **376** (6535): 62~66
- 12 Sato T N, Tozawa Y, Deursh U, *et al.* Distinct roles of the receptor tyrosine kinase Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. Nature, 1995, **376** (6535): 70~74
- 13 Dumont D J, Gradwohl G, Fong G H, *et al.* Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. Genes Dev, 1994, **8** (16): 1897~1909

Target Gene Transfer Mediated by Electroporation for Cancer Therapy *in vivo*^{*}

WANG Feng¹⁾, CHEN XiaFang¹⁾, TIAN YuHua¹⁾, WU JiHong¹⁾,
LI Ling¹⁾, LI ChuanYuan²⁾, HUANG Qian¹⁾**

(¹⁾ Central Experimental Laboratory, The First People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200080, China;

(²⁾ Department of Radiation Oncology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA)

Abstract A plasmid encoding green fluorescent protein (GFP) was first used to test efficiency of electroporation and optimize parameters for electroporation *in vivo*. GFP plasmid was efficiently delivered into muscle by electroporation and robust GFP expression in muscle could be observed more than three weeks. While much less GFP positive cells were observed in tumor and GFP expression could only last 6 days but tumors treated with high voltage/short pulse showed about 2.68 fold more GFP positive cells than tumors treated with low voltage/long pulses. The optimized electroporation parameters was used to mediate therapeutic gene transfer into subcutaneous tumors which derived from T739 mice bladder transitional cell carcinoma cell line (BTT-*gfp*), human mammary carcinoma cell line (MCF-7) and human hepatoma cell line (SMMC 7721-*gfp*). Those therapeutic genes included immune reaction regulation factors interleukin12, interleukin2 and GM-CSF or anti-angiogenesis factors such as antisense VEGF121cDNA, soluble form of VEGF receptor (sFlk-1) and Tie2 (ExTek). Inhibition of tumor growth and metastasis were observed in T739 mice carried bladder transitional cell carcinoma and nude mice carried either human breast cancer or liver cancer which were treated with multiple transfers of plasmid encoding interleukin12 mediated by electroporation. MCF-7 and SMMC 7721-*gfp* derived tumor showed sensitive to single anti-angiogenesis gene therapy, yet definite suppression of growth and metastasis of BTT-*gfp* tumor was resulted from co-transfer of sFlk-1 and ExTek gene mediated by electroporation. The results suggest that electroporation is a high efficient, safe and economical method for gene transfer *in vivo* and electro-gene therapy would be a useful method for solid tumor.

Key words electroporation, cancer gene therapy, immune regulated factors, angiogenesis

^{*} This work was supported by grants from the "Project for Talent Accomplishment" (Health Bureau of Shanghai) and grant for "Outstanding Scientist" and "White Magnolia" (Science and Technology Committee of Shanghai Municipality).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-21-63240090-4601, E-mail: huangq@online.sh.cn

Received: January 29, 2002 Accepted: February 28, 2002