

研究快报

组织专一性表达自杀基因治疗人结肠癌的研究*

蒋琼 戈凯 许德华 郑仲承 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 构建了以癌胚抗原 (CEA) 基因启动子控制的 HSV-TK 和 EC-CD 的表达质粒 pCEA-TK 和 pCEA-CD. 将它们分别与 pSV2-neo 共转染人结肠癌细胞株 LoVo 和人宫颈癌细胞株 HeLa. G418 筛选得到细胞克隆 LoVo/CEA-TK、LoVo/CEA-CD、HeLa/CEA-TK 和 HeLa/CEA-CD. 与野生型 LoVo 细胞相比, LoVo/CEA-TK 和 LoVo/CEA-CD 形态无明显改变, 生长曲线也相似, 但对 GCV 或 5-FC 的细胞毒的敏感性分别提高了 2000 倍或 700 倍. 而 HeLa/CEA-TK (或 HeLa/CEA-CD) 仍对低浓度 GCV (或 5-FC) 不敏感. 以上结果显示了应用组织专一性表达的自杀基因治疗人结肠癌的可能性.

关键词 自杀基因, 人结肠癌, 基因治疗, 癌胚抗原基因启动子

结/直肠癌是常见的恶性肿瘤, 而且多数会发生肝转移, 在经济发达国家中已是致死率为第 1 或 2 位的恶性内脏肿瘤. 在我国, 结/直肠癌的发病率与死亡率也有上升趋势, 因而引起人们的普遍关注^[1].

肿瘤的基因治疗是现代医学研究领域中的前沿课题, 而其中自杀基因的应用又是一个新的热点. 自杀基因又称药物敏感基因, 这类基因转入细胞后能将低毒或无毒性的药物前体转变成细胞毒性药物, 从而杀死细胞. 单纯疱疹病毒的胸苷激酶 (herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK) 基因及其底物 GCV (ganciclovir) 系统和大肠杆菌的胸嘧啶脱氨酶 (*E. coli* cytosine deaminase, EC-CD) 基因及其底物 5-FC (5'-fluorocytosine) 系统是最为常用的自杀基因系统^[2,3]. 为使自杀基因系统只对肿瘤细胞起作用, 人们选用了细胞专一的基因表达调控元件^[4], 使自杀基因只能在靶细胞中表达.

1 CEA 基因元件的细胞专一性

癌胚抗原 (CEA) 是广泛应用的一种肿瘤标志. 在人结肠癌细胞 LoVo 中, CEA 的表达

量达 21 $\mu\text{g/L}$, 是典型的 CEA 阳性细胞. 我们构建了 CEA 基因启动子驱动 CAT 的表达载体, 并作 CAT 分析, 表明它在 LoVo 细胞中的活性是 SV40 启动子的 23%, 而它在 HeLa 细胞中基本无活性. 此结果说明, CEA 启动子具有细胞专一性.

2 CEA 基因元件驱动自杀基因表达及其抑瘤作用

在此基础上, 我们分别构建了置于 CEA 启动子控制之下的 HSV-TK 和 EC-CD 表达载体 pCEA-TK 和 pCEA-CD. 将它们分别与 G418 筛选质粒 pSV2-neo 共转染人结肠癌细胞 LoVo 和人宫颈癌细胞 HeLa, 用 G418 筛选两周后, 挑选抗性克隆, 分别命名为 LoVo/CEATK、LoVo/CEACD、HeLa/CEATK、HeLa/CEACD. 通过以染色体 DNA 为模板进行的 PCR 反应证明以上两种自杀基因已经整合入 LoVo 和 HeLa 细胞 DNA; 以 mRNA 反转录合成的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 反应, 结果显示两种自杀基因在 LoVo 细胞中有表

* 国家“863”计划资助项目.

收稿日期: 1996-02-26, 修回日期: 1996-05-20

达, 而在 HeLa 细胞中均无表达.

在相差显微镜下观察到, 在正常培养条件下, LoVo/CEA-TK 和 LoVo/CEA-CD 与野生型细胞相比, 形态基本无区别; 在加入低浓度 GCV 或 5-FC 后 3 d, 野生型 LoVo 细胞形态无明显改变, 而 LoVo/CEA-TK 或 LoVo/CEA-CD 细胞形态均发生明显改变. 细胞膜变形, 有树枝状突出, 细胞间出现丝状纤维, 细胞内出现很多颗粒状物质及空泡, 并有很多细胞碎片出现, 部分细胞死亡. 电镜观察发现, 核仁固缩, 靠边, 部分细胞核均质化, 变化相当明显. 5 d 后, 则绝大部分细胞死亡.

将 LoVo、LoVo/CEA-TK 和 LoVo/CEA-CD 以相同数目铺于 96 孔板中, 用 MTT 法分别测定它们的生长曲线, 结果表明它们具有极其相似的生长曲线.

如图 1 所示, GCV 对野生型 LoVo 的半杀伤浓度 $IC_{50} > 2000 \mu\text{mol/L}$, 而对 LoVo/CEA-TK 的 IC_{50} 约为 $0.9 \mu\text{mol/L}$, 即 LoVo/CEA-TK 对 GCV 细胞毒敏感性提高了 2000 多倍, 5-FC 对野生型 LoVo 的 IC_{50} 为 $21\ 000 \mu\text{mol/L}$, 对 LoVo/CEA-CD 的 IC_{50} 为 $33 \mu\text{mol/L}$, 可见 LoVo/CEA-CD 对 5-FC 的细胞毒敏感性亦提高约 700 倍 (图 2). 而 HeLa/CEA-TK (或 HeLa/CEA-CD) 仍对低浓度 GCV (或 5-FC) 不敏感.

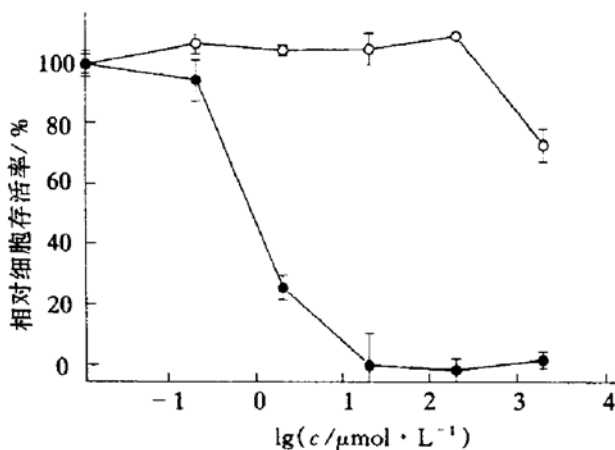


图 1 LoVo/CEA-TK 和 LoVo 对 GCV 的敏感性

●—●: LoVo/CEA-TK, ○—○: LoVo.

($n = 5$)

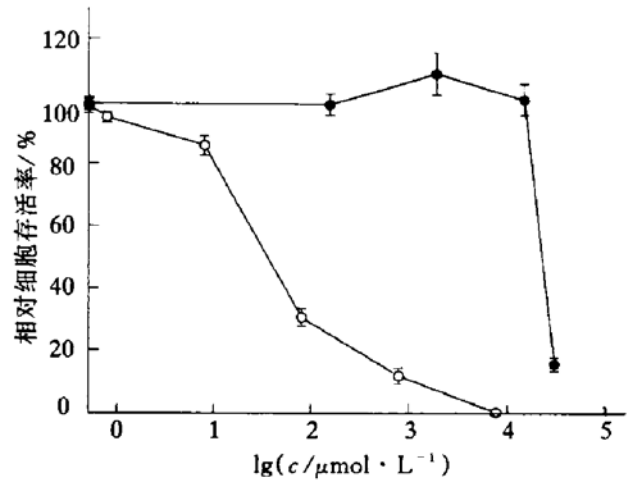


图 2 LoVo/CEA-CD 和 LoVo 对 5-FC 的敏感性

○—○: LoVo/CEA-CD, ●—●: LoVo.

($n = 5$)

以上结果说明两种自杀基因的导入对人结肠癌 LoVo 细胞的形态和生长能力并无明显影响, 转基因细胞对原药敏感性的增加完全是导入基因表达产物造成的生化反应结果. 在 HeLa 细胞中, 尽管两种自杀基因已经整合入细胞 DNA, 但因为 CEA 启动子具细胞专一性, 因此并没有检测到自杀基因的表达. 我们的实验数据展示了应用组织专一性表达自杀基因治疗人结肠癌的可能性.

临床上, GCV 静脉注射, 可使药浓度维持在 $4 \mu\text{mol/L}$ 以上, 血药峰值为 $26 \mu\text{mol/L}$, 而我们筛选到的 LoVo/CEA-TK IC_{50} 只有 $0.9 \mu\text{mol/L}$; 临床口服 5-FC 每天用量为 $0.1 \sim 0.15 \text{ g/kg}$, 而口服 2 g 后 $2 \sim 4 \text{ h}$ 血药浓度达峰值, 约为 $30 \sim 40 \text{ mg/L}$ (即 $233 \sim 310 \mu\text{mol/L}$), 这一浓度也远远大于 LoVo/CEA-CD 细胞杀伤的浓度. 我们的结果提示, HSV-TK/GCV 和 EC-CD/5-FC 系统应用于人结肠癌基因治疗均具有潜在临床价值.

国际上尚无组织专一性表达 HSV-TK 用于结肠癌基因治疗的报道. 我们正在进行动物水平的实验, 摸索高效的导入基因的途径, 有望建立专一、有效治疗人结肠癌的方法.

参 考 文 献

医科大学出版社, 1993: 521~523

- 2 Craig A, Mullen, Mogens K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 33
- 3 Culver K W, Ram Z, Willbridge S *et al.* Science, 1992; 256: 1550
- 4 Tadashi O, Yoshiro T, Isao T *et al.* Cancer Research, 1994; 54: 5258

Experimental Gene Therapy for Human Colorectal Carcinoma Cells by Cell Type-specific Expression of Suicide Genes. Jiang Qiong, Ge Kai, Xu Dehua, Zheng Zhongcheng, Liu Xinyuan (*Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*)

Abstract The expression plasmid pCEA-TK or pCEA-CD was constructed by ligating the CEA gene promoter to suicide gene such as HSV-TK (herpes simplex virus thymidine kinase) gene or EC-CD (*E. coli* cytosine deaminase) gene. A human colorectal carcinoma cell line LoVo or a human uterine cervical cancer cell line HeLa was

co-transfected with pSV2-neo and pCEA-TK (or pCEA-CD). After selection with G418, the transgenic cell clones (LoVo/CEA-TK, LoVo/CEA-CD, HeLa/CEA-TK and HeLa/CEA-CD) were obtained. There was no significant difference in either morphology or cell growth curve between suicide gene transduced cells and wild type cells. But LoVo/CEA-TK (or LoVo/CEA-CD) cells were 2000 (or 700) times more sensitive to the cytotoxicity of pro-drug ganciclovir (or 5-Fluorocytosine) than parental LoVo cells. However, HeLa/CEA-TK or HeLa/CEA-CD cells were still resistant to Ganciclovir (or 5-Fluorocytosine). These results showed the possibility of gene therapy for human colorectal carcinoma by cell type-specific expression of suicide genes.

Key Words suicide gene, human colorectal carcinoma, gene therapy, carcinoembryonic antigen gene promoter

欢迎订阅 欢迎投稿

《应用与环境生物学报》(季刊)

刊号 $\frac{\text{ISSN1006-687X}}{\text{CN51-1482/Q}}$

邮发代号: 62-15

《应用与环境生物学报》是由国家科委批准, 中国科学院主管, 中国科学院成都生物研究所主办并由科学出版社出版的全国性学术性科技期刊(学报级)。主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果, 包括研究论文、研究简报和本刊特约的综述。

《应用与环境生物学报》是我国科学研究院、研究所, 各大专院校以及各科技情报所、图书馆必备的科技刊物, 是我国科学工作者、大专院校师生以及有关科技工作者进行科技交流的良好园地。

《应用与环境生物学报》为季刊, 季末月 25 日出版, 每期 96 页, 每期定价 11.00 元。全国各地邮局(所)均可订阅。