

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)01-0075-04

携带 *p16* 基因增殖缺陷型腺病毒对胃癌细胞皮下移植瘤的治疗作用

王伟国¹, 苏长青², 施建国¹, 胡慧珍¹, 李林芳², 马炬明¹(1. 解放军第 117 医院, 杭州 310004; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438)

[摘 要] **目的:** 研究携带 *p16* 基因的增殖缺陷型腺病毒载体对裸鼠皮下胃癌细胞移植瘤的抗肿瘤活性。**方法:** PCR 扩增 *p16* cDNA, 构建腺病毒载体 pSuCMV-*p16* 表达质粒, 在 293 细胞内重组增殖缺陷型腺病毒 AdCMV-*p16*; 建立胃腺癌细胞 SGC-7901 皮下移植瘤裸鼠模型, 分为 3 组(AdCMV-*p16* 组、Ad-LacZ 组、空白对照组), 以 2×10^8 pfu/100 μ l 的重组腺病毒 AdCMV-*p16* 直接瘤内多点注射, 隔日 1 次, 共 5 次, 空白对照组以等量病毒保存液注射, 定时测量瘤体生长情况, 并以 *p16* 免疫组化、TUNEL 凋亡检测等观察 AdCMV-*p16* 抗肿瘤的疗效。**结果:** 携带 *p16* 基因的增殖缺陷型腺病毒 AdCMV-*p16* 对胃腺癌裸鼠移植瘤有明显的抑制作用, 抑瘤率为 58.12%, 而对照病毒 Ad-LacZ 对胃癌移植瘤的抑瘤率仅为 4.26%; 病理学检查显示, 病毒治疗的癌组织中细胞坏死以凋亡为主, 癌细胞中检测到 *p16* 基因的表达。**结论:** 携带 *p16* 基因的增殖缺陷型腺病毒能恢复胃癌细胞中 *p16* 基因的表达, 对胃癌移植瘤生长有明显的抑制作用。

[关键词] 胃癌; 基因治疗; 腺病毒; 抑癌基因; 细胞凋亡

[中图分类号] R730.54 **[文献标志码]** A

Therapeutic effect of replication-deficient adenovirus carrying *p16* gene on gastric cancer xenografts in nude mice

WANG Wei-guo¹, SU Chang-qing², SHI Jian-guo¹, HU Hui-zhen¹, LI Lin-fang², MA Ju-ming¹(1. No. 117 Hospital of PLA, Hangzhou 310004, China; 2. Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a replication-deficient adenovirus carrying *p16* gene and to investigate its anti-tumor activity on human gastric cancer xenografts in nude mice. **Methods:** *p16* cDNA was amplified by PCR and was inserted into the plasmid pSuCMV, the latter was then used to recombine the replication-deficient adenovirus AdCMV-*p16* in 293 cells. Human SGC-7901 gastric cancer xenograft models were established in nude mice and were divided into 3 groups: AdCMV-*p16*, Ad-LacZ, and control groups. Mice in AdCMV-*p16* group received intratumoral injections of 2×10^8 pfu/100 l AdCMV-*p16* (injected every other day for 5 times). Mice in control group received the same volume of virus preserving solution. The tumor volumes were measured at predefined time points. The anti-tumor effect of AdCMV-*p16* was observed by *p16* immunochemical study and TUNEL detection of cell apoptosis. **Results:** The replication-deficient adenovirus expressing *p16* gene evidently inhibited the growth of human gastric cancer xenografts in nude mice ($P < 0.01$), with the inhibition rate being 58.12%; but Ad-LacZ showed no obvious effect on the growth of xenografts ($P > 0.05$), only with a inhibition rate of 4.26%. The pathological examination showed that apoptoses were the main changes in AdCMV-*p16* group, and *p16* gene was found in the cancer cells. **Conclusion:** The replication-deficient adenovirus harboring *p16* gene can recover the expression of *p16* in gastric cancer cells and subsequently inhibit the growth of human gastric cancer.

[Key words] gastric cancer; gene therapy; adenovirus; tumor suppressor gene; cell apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(1): 75-78]

p16 基因是一种重要的肿瘤抑制基因, 在多种人体肿瘤中存在高频率突变失活。已有研究^[1]证明, 在癌细胞中恢复 *p16* 基因的表达, 有助于抑制细胞的恶性增生, 对肿瘤的治疗有十分重要的意义。已有的文

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30572149); 浙江省科技计划资助项目(No. 2006C30021)

[作者简介] 王伟国(1967-), 男, 浙江省海宁市人, 主要从事消化疾病防治方面的研究

[通讯作者] 马炬明, E-mail: wangwg01@ yahoo. com. cn

献报道了多种肿瘤的 *p16* 基因治疗方案,但国内针对胃癌的治疗极少,能检索到的一项研究,是用脂质体转染法将携有野生型 *p16* 基因的逆转录病毒载体 pLNCX 转染人未分化胃癌细胞系 HGC27,观察到转染后的胃癌细胞增殖受到抑制、凋亡率明显增加^[2]。本研究以腺病毒介导 *p16* 基因表达治疗人胃癌细胞的裸鼠皮下移植瘤模型,观察该基因对胃癌的治疗效果,为胃癌基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胚肾细胞系 293 (Microbix Biosystem) 在 DMEM 培养液、10% 胎牛血清、37 °C 5% CO₂ 条件下培养。经 PCR 扩增证实存在 *p16* 基因缺失的人胃癌细胞系 SGC-7901,在 DMEM 培养液、10% 胎牛血清、37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

1.2 增殖缺陷型腺病毒的重组与制备

含 *p16* 完整 cDNA 序列的质粒 pAd-*p16* 由第二军医大学东方肝胆外科医院病毒与基因治疗实验室构建。设计并合成引物:上游 5'-CGG CTA GCG AAT TCA CCA TGG AGC CTT CGG C 3',引入 *Nhe* I 和 *Eco*R I 酶切位点;下游 5'-CGA CGC GTC GAC TTA TCA ATC GGG GAT GTC-3',引入 *Mlu* I 和 *Sal* I 酶切位点。PCR 扩增 pAd-*p16* 中的 *p16* cDNA 序列,酶切后插入腺病毒载体质粒 pSuCMV 中的 *Eco*R I + *Sal* I 位点,构建成 pSuCMV-*p16* 表达质粒。培养 293 细胞,至对数生长期。将重组腺病毒载体质粒 pSuCMV-*p16* 和 5 型腺病毒包装质粒 pPE3 通过 Transfectamine 2000 (QIAGEN) 共转染 293 细胞。共转染后 12 d 出现病毒空斑,挑取空斑,应用 QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) 提取腺病毒 DNA,用上述引物进行 PCR 鉴定,扩增阳性者,命名为 AdCMV-*p16*。在 293 细胞中反复扩增病毒至所需要的滴度。病毒滴度测定采用 Qbiogene 公司的 TCID₅₀ 法。携带报告基因 *LacZ* 的重组腺病毒 Ad5-*LacZ* 由第二军医大学东方肝胆外科医院病毒与基因治疗实验室提供。

1.3 AdCMV-*p16* 对裸鼠皮下胃癌细胞移植瘤的治疗实验

健康 BALB/c 裸鼠 20 只,5 周龄,中科院上海实验动物中心提供[实验动物合格证号为 SCXK(沪)2003-0003],实验雌雄各半,SPF 清洁级动物实验室饲养。取对数生长期的 SGC-7901 细胞,用生理盐水调整细胞数至 1×10^8 /ml,取 100 μ l 细胞悬液注射于裸鼠侧腹部近腋部皮下。每日定时观察记录,

至接种 10 d 后,接种区皮下出现米粒大小硬结。至瘤体生长至约 80 mm³ 时,剔除瘤体过大和过小的裸鼠,其余随机分为 3 组(AdCMV-*p16* 组、Ad-*LacZ* 组、空白对照组),每组 5 只。开始治疗,以 2×10^8 pfu/100 μ l 的重组病毒直接瘤内多点注射,隔日 1 次,共 5 次;空白对照组以病毒保存液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,2 mmol/L MgCl₂,4% Sucrose)代替重组病毒注射,100 μ l \times 5 次。定时测量瘤体生长情况,游标卡尺测量瘤体大小,以公式“ $a \times b^2 \times 0.5$ ”计算瘤体体积(a :最大径; b :最小径)。计算各组的抑瘤率:抑瘤率(%) = (对照组平均瘤体体积 - 实验组平均瘤体体积) / 对照组平均瘤体体积 \times 100%。

1.4 肿瘤组织的病理形态观察

择时断颈处死小鼠,取瘤体标本,在 PBS 液中漂洗干净,用锋利刀片切分组织。以 10% 中性缓冲甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,进行 H-E 染色、TUNEL 染色和 P16 免疫组化。TUNEL 试剂盒和 P16 单克隆抗体购自福州迈新生物工程公司。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 12.0 软件包对数据进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 重组增殖缺陷型腺病毒的制备和鉴定

经酶切鉴定证实,腺病毒载体 pSuCMV-*p16* 携带有 *p16* cDNA、CMV 启动子和 SV40 polyA 序列的表达单元(图 1)。pSuCMV-*p16* 和腺病毒包装质粒在 293 细胞内进行同源重组后,PCR 鉴定证实产生重组增殖缺陷型腺病毒 AdCMV-*p16*,扩增片段 479 bp(图 2)。反复在 293 细胞中扩增和 CsCl 超速离

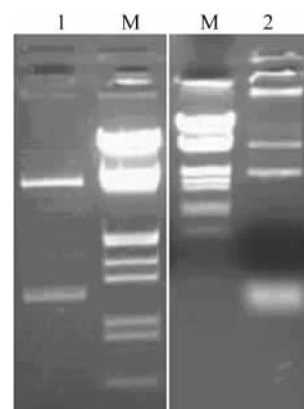


图 1 腺病毒载体质粒 pSuCMV-*p16* 的酶切鉴定
Fig. 1 Endonuclease-digestion identification of adenovirus vector pSuCMV-*p16*

M: Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III; 1: pSuCMV-*p16*/*Eco*R I + *Xba* I (1 199 + 4 331 bp); 2: pSuCMV-*p16*/*Spe* I + *Not* I (1 736 + 3 794 bp)

心纯化, 获得高度浓缩的病毒液。经 TCID₅₀ 测定, AdCMV-p16 病毒滴度达 8.5×10^{10} pfu/ml。

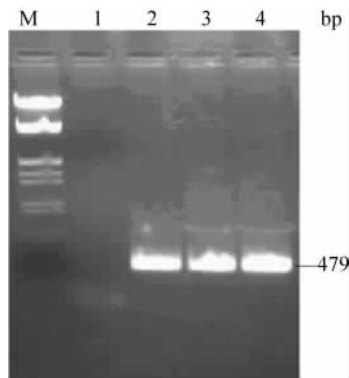


图 2 增殖缺陷型腺病毒 AdCMV-p16 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of adenovirus AdCMV-p16

M: Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III; 1: Negative control; 2: pSuCMV-p16 plasmid as positive control; 3: Clone 1 recombinant adenovirus AdCMV-p16; 4: Clone 2 recombinant adenovirus AdCMV-p16

2.2 AdCMV-p16 对裸鼠皮下移植瘤的抑制作用

以总量 1×10^9 pfu 的重组腺病毒 AdCMV-p16 直接瘤内多点注射, 定时测量瘤体生长情况。结果发现, AdCMV-p16 组对胃癌移植瘤生长的抑制作用明显, 抑瘤率为 58.12%, 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 而对照病毒 Ad-LacZ 抑瘤率仅为 4.26%, 对胃癌移植瘤生长几乎没有抑制作用, 与对照组相比差异无显著性意义 ($P > 0.05$, 图 3)。

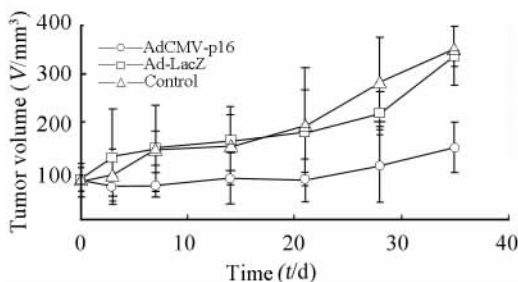


图 3 AdCMV-p16 抗 SGC-7901 移植瘤的效果

Fig. 3 Anti-tumor efficacy of adenovirus AdCMV-p16 on SGC-7901 xenografts

2.3 AdCMV-p16 治疗后胃癌移植瘤的病理改变

观察期结束, 断颈处死小鼠, 取瘤体标本切片, H-E 染色观察。结果可见 AdCMV-p16 治疗组的肿瘤组织内有大小不等的坏死区, 细胞核溶解, 组织无结构, 坏死区周边癌细胞出现明显凋亡, 细胞核碎裂或固缩, 细胞质嗜酸性变; TUNEL 标记显示癌细胞凋亡,

凋亡阳性率为 $(36.8 \pm 9.6)\%$; 免疫组化显示癌细胞有 P16 表达, 阳性率为 $(63.4 \pm 12.6)\%$ 。在 Ad-LacZ 病毒对照组和空白对照组癌细胞生长状况良好, 异型明显, 无明显细胞坏死区, 细胞凋亡阳性率仅 $(3.1 \pm 0.2)\%$ 和 $(2.2 \pm 0.1)\%$, P16 表达阴性(图 4)。

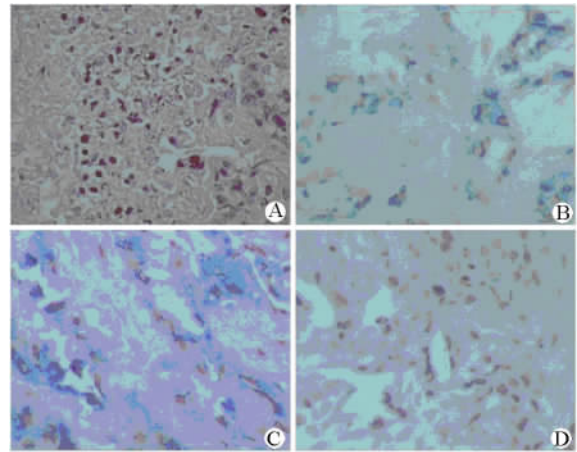


图 4 AdCMV-p16 治疗致 SGC-7901 移植瘤病理改变 ($\times 200$)

Fig. 4 Pathological changes of SGC-7901 xenografts after treated with adenovirus AdCMV-p16 ($\times 200$)

A: There were necroses and apoptoses of cancer cells in AdCMV-p16 treated group(H-E); B: Cancer cells in AdCMV-p16 treated group were positive by TUNEL labeling; C: Cancer cells in AdCMV-p16 treated group were positive for P16 expression by immunohistochemistry; D: Cancer cells in Ad-LacZ control group were negative for P16 expression by immunohistochemistry

3 讨论

由 *CyclinD1*、*CDK4*、*Rb* 和 *p16* 系统构成的反馈环路是细胞周期 $G_1 \rightarrow S$ 限速步骤中重要的调节组件^[3-5]。当 *CDK4* 与 *CyclinD1* 结合形成复合物时, *CDK4* 被激活而具有蛋白激酶活性, 它作用于 *Rb* 蛋白使之磷酸化失活, 释放出转录因子 *E2F*, *E2F* 活化 *C-myc*、*N-myc*、胸苷激酶、二氢叶酸还原酶、DNA 聚合酶等细胞进入 S 期必需的酶蛋白基因的转录, 从而使细胞越过 $G_1 \rightarrow S$ 卡点, 促进细胞增殖^[6-9]。*P16* 蛋白能够与 *CyclinD1* 竞争结合 *CDK4*, 特异地抑制 *CDK4* 的活性, 使 *Rb* 蛋白不被磷酸化而保持活性状态。因此, *P16* 蛋白具有抑制细胞增生的功能。*p16* 突变失活在人类大多数肿瘤中均可以发现, 其失活的形式呈现多样化, 主要有碱基突变、基因缺失和调控区序列甲基化^[10-11]。以穿梭质粒、逆转录病毒等为载体, 介导 *p16* 外源基因在肿瘤细胞系中表达, 成功地阻滞了细胞周期的进程^[12-13]。因此 *p16* 基因有

希望成为肿瘤基因治疗的靶基因之一。

研究发现,获得外源性 *p16* 基因表达的癌细胞,出现 G_1 期阻滞,即细胞周期中 G_1 期细胞比例明显增加,而 S 期细胞比例下降^[14-15]。 G_1 期的阻滞可能会改变许多基因调控路径以及信号传导途径,使细胞向以凋亡为优势的方向发展。细胞周期 G_1 期不仅与细胞增殖有关,与细胞凋亡也有密切关系。由 *p16* 外源基因表达所引起的 G_1 期阻滞,会引起细胞增殖正向调控基因转录的抑制,同时伴随着细胞凋亡相关基因的表达上调以及凋亡信息传导途径的开放^[16-17]。有关细胞 G_1 期阻滞所引发的细胞增殖正向调控基因 *CyclinD1* 转录的抑制、凋亡抑制基因 *bcl-2* 表达下调、凋亡促进基因 *bax* 表达上调,已见有文献报道^[18-19]。同时,获得外源性 *p16* 基因表达的癌细胞,其对放射治疗和化学治疗的敏感性也得到提高^[20],这将有助于联合 *p16* 基因治疗和其他综合治疗手段,进一步提高肿瘤的治疗效果。

在基因治疗的载体选择方面,腺病毒因具有安全性确定、宿主细胞广泛、感染靶细胞效率高、制备方便、感染细胞时不整合到宿主细胞染色体中而没有潜在的致癌危险等优点,被广泛应用于基因转移和基因治疗的研究中^[21]。本研究以重组腺病毒为载体,携带 *p16* 基因,在裸鼠的胃癌移植瘤模型上验证 *p16* 基因的抗肿瘤疗效。结果证实,病毒治疗后的胃癌移植瘤生长受到明显抑制,抑瘤率达 58.12%。这种肿瘤抑制作用在治疗的早期即出现,且随时间延长越加明显。病理学检测发现治疗后癌细胞的变化以细胞凋亡为主,细胞凋亡程度的加重致大范围的肿瘤组织坏死。本研究以肿瘤抑制基因 *p16* 为目的基因,通过抑制细胞周期的进程,诱发细胞发生凋亡,这种基因治疗方法具有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] Chen F, Li Y, Lu Z, *et al.* Adenovirus-mediated Ink4a/ARF gene transfer significantly suppressed the growth of pancreatic carcinoma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(12): 1348-1354.
- [2] 张红宇,孙强,王亚东,等. 野生型 *p53*、*p16* 基因联合抑制人胃癌细胞 HGC27 生长的实验研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2004, 16(6): 344-346.
- [3] Hashiguchi Y, Tsuda H, Inoue T, *et al.* Alteration of cell cycle regulators correlates with survival in epithelial ovarian cancer patients [J]. *Hum Pathol*, 2004, 35(2): 165-175.
- [4] Tsuda H, Hashiguchi Y, Nishimura S, *et al.* Relationship between HPV typing and abnormality of G_1 cell cycle regulators in cervical neoplasm [J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 91(3): 476-485.
- [5] Lukas J, Aagaard L, Strauss M, *et al.* Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G_1 control [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(21): 4818-4823.
- [6] Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1602(1): 73-87.
- [7] Johnson DG, Degregori J. Putting the oncogenic and tumor suppressive activities of E2F into context [J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(7): 731-738.
- [8] DeGregori J, Johnson DG. Distinct and overlapping roles for E2F family members in transcription, proliferation and apoptosis [J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(7): 739-748.
- [9] Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression [J]. *Oncogene*, 2006, 25(38): 5220-5227.
- [10] Su CQ, Ye YK, Wang D, *et al.* Inactivation of the CDKN2/p16 gene induced by methylation at 5'-CpG island and its relation to lung cancer [J]. *Chin J Cancer Res*, 2001, 13(3): 157-161.
- [11] Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, *et al.* Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(24): 6200-6209.
- [12] Lee AW, Li JH, Shi W, *et al.* p16 gene therapy: A potentially efficacious modality for nasopharyngeal carcinoma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(10): 961-969.
- [13] Li AA, Ng E, Shi W, *et al.* Potential efficacy of p16 gene therapy for EBV-positive nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2004, 110(3): 452-458.
- [14] Hemmati PG, Normand G, Verdoodt B, *et al.* Loss of p21 disrupts p14 ARF-induced G_1 cell cycle arrest but augments p14 ARF-induced apoptosis in human carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2005, 24(25): 4114-4128.
- [15] Kim O, Park M, Kang H, *et al.* Differential protein expressions induced by adenovirus-mediated p16 gene transfer into Balb/c nude mouse [J]. *Proteomics*, 2003, 3(12): 2412-2419.
- [16] Shapiro GI. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(11): 1770-1783.
- [17] Auserlechner MJ, Obexer P, Geley S, *et al.* G_1 arrest by p16INK4A uncouples growth from cell cycle progression in leukemia cells with deregulated cyclin E and c-Myc expression [J]. *Leukemia*, 2005, 19(6): 1051-1057.
- [18] Tamm I, Schumacher A, Karawajew L, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of P16INK4/CDKN2 into bax-negative colon cancer cells induces apoptosis and tumor regression *in vivo* [J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(8): 641-650.
- [19] Kataoka M, Wiehle S, Spitz F, *et al.* Down-regulation of bcl-2 is associated with p16INK4-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncogene*, 2000, 19(12): 1589-1595.
- [20] Simon M, Voss D, Park-Simon TW, *et al.* Role of p16 and p14ARF in radio- and chemosensitivity of malignant gliomas [J]. *Oncol Rep*, 2006, 16(1): 127-132.
- [21] 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.

[收稿日期] 2006-11-06

[修回日期] 2006-12-19

[本文编辑] 韩丹