

腺病毒携带的人内皮抑素基因(Ad/hEnd) 抑制人舌鳞状细胞癌生长的研究

丁学强¹, 陈宇¹, 李立², 刘然义², 黄嘉凌²
赖坤³, 吴秀菊³, 柯妙拉³, 黄文林²

Inhibition of Tongue Cancer Development in Nude Mice Transfected with Adenovirus Carrying Human Endostatin Gene

Ding Xue-Qiang¹, Chen Yu¹, Li Li², Liu Ran-Yi², Huang Jia-Ling², Lai Kun³,
Wu Xiu-Ju³, Ke Miao-La³, Huang Wen-Lin²

1. 中山大学附属第一医院口腔科,
广东广州 510080
2. 中山大学肿瘤防治中心,
广东广州 510060
3. 广州达博生物制品有限公司,
广东广州 510050

1. Department of Stomatology,
The First Affiliated Hospital,
Sun Yat-sen University, Guangzhou,
Guangdong, 510080,
P. R. China
2. Cancer Center, Sun Yat-sen
University, Guangzhou,
Guangdong, 510060,
P. R. China
3. Double Bioproduct Inc.,
Guangzhou, Guangdong, 510050,
P. R. China

通讯作者: 黄文林

Correspondence to: Huang Wen-Lin

Tel: 86 - 20 - 87343146

Fax: 86 - 20 - 87343146

E-mail: WL_huang@hotmail.com

并列第一作者

基金项目: 国家“863”项目
(2001AA217081); 广东省科技攻
关项目(2KM04404S)

收稿日期: 2002-08-20

修回日期: 2003-09-09

【ABSTRACT】 BACKGROUND & OBJECTIVE: The squamous cell carcinoma of tongue is one of the most common malignant tumors of oral cavity. Surgical therapy is now the mainstay of combined treatment for tongue squamous cell Carcinoma with chemotherapy and radiotherapy. The overall 5-year survival rate was about 50%. The antiangiogenesis therapy has become a new approach of the treatment of tongue carcinoma. This paper was designed to study the characteristics of endostatin expression in tongue cancer cell line (Tca8113), human embryonic epithelial cell line (ECV) and the inhibition of carcinogenesis in nude mice, xenografted with Tca8113, after transfected with recombinated adenovirus (Ad/hEnd) which was cloned with human endostatin gene in E I mutated region. METHODS: (1) To determine the expression and distribution of endostatin in Tca and ECV cells transfected with Ad/hEnd using immunohistochemistry. To determine the endostatin in supernatants of Tca cells transfected with Ad/hEnd using ELISA method. To examine the characteristics of endostatin gene expression in Tca8113 and ECV cells by Western blot analysis. (2) To determine the inhibition rate of proliferation and apoptosis rate of ECV cells by WST-1 test and flow cytometry (FCM), respectively. (3) To observe the inhibition of tumor growth in xenografted nude mice with Tca8113 cells by Ad/hEnd administration. RESULTS: (1) Immunohistochemistry detection indicated that the endostatin was expressed in cytoplasm of Tca8113 cells and ECV cells transfected with Ad/hEnd. Endostatin expression in the supernatant was dose-dependent with the highest to 597 ng/ml. The expression of endostatin in Tca cells was detectable from 1 day to 7 day. Ad/hEnd inhibited ECV cell growth in dose-dependent manner. (2) FCM showed that Ad/hEnd arrested ECV cells in S and G₂ phase and induced apoptosis. (3) The tumor growth curve showed that Ad/hEnd significantly repressed xenograft tumor growth with Tca cell in nude mice; the inhibition rate on Ad/hEnd administrated groups was 45.8% in the 3rd week. CONCLUSION: Ad/hEnd expressed efficiently in Tca8113 and ECV cells. Ad/hEnd can change the cell cycle distribution of ECV cells and induce apoptosis and inhibit proliferation of ECV cells. Ad/hEnd could inhibit the growth of tongue carcinoma in xenograft nude mice.

KEYWORDS: Tongue tumor; Adenovirus; Endostatin; Vector

【摘要】 背景与目的: 舌癌是口腔常见的恶性肿瘤, 目前常规采用以手术为主结合放疗化疗的综合治疗, 总体的 5 年生存率只有 50% 左右, 抗肿瘤血管生成治疗已

成为舌癌治疗的研究方向之一。本实验以 5 型 E1 缺陷型腺病毒携带的人内皮抑素基因 (Ad/hEnd) 感染舌癌细胞 (Tca8113) 和人脐静脉内皮细胞株 (ECV), 并对荷瘤裸鼠舌癌的抑瘤效果进行观察, 研究其在舌癌细胞中的表达及对舌癌抑制作用。方法: (1) 免疫组化法检测内皮抑素蛋白在 Tca8113 细胞和 ECV 细胞中的表达及分布。ELISA 法检测血清中内皮抑素含量, Western blot 检测内皮抑素基因在 Tca8113 和 ECV 细胞的表达特征。(2) 流式细胞仪检测 Ad/hEnd 感染 ECV 后的细胞周期及凋亡, WST-1 法检测 Ad/hEnd 对 ECV 细胞增殖的抑制。(3) Ad/hEnd 对荷瘤裸鼠的舌癌的生长抑制分析。结果: (1) 实验结果显示感染 Ad/hEnd 后 Tca8113 细胞和 ECV 细胞胞浆内可有效合成内皮抑素蛋白, 细胞培养液上清中的内皮抑素蛋白表达浓度呈时间剂量依赖关系, 最高达到 597 ng/ml, 可持续到第 7 天, 并且表达产物有抑制人体静脉内皮细胞 ECV 生长特性, 呈剂量依赖关系。(2) Ad/hEnd 可延长感染后的 ECV 细胞的 S 期及 G₂ 期, 并出现细胞凋亡现象。(3) 应用 Ad/hEnd 后第 3 天肿瘤体积增长受到抑制, 第 6 天开始肿瘤抑制明显增强, 第 3 周抑瘤率达 45.8%。结论: 本实验制备的重组腺病毒 Ad/hEnd 能在 ECV 和 Tca8113 细胞中有效表达内皮抑素, 表达产物可影响 ECV 细胞周期、抑制 ECV 细胞增殖、诱导 ECV 细胞凋亡及抑制荷瘤裸鼠舌癌的生长。

关键词: 舌肿瘤; 腺病毒; 血管内皮抑素; 载体

中图分类号: R739.68 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2003)11-1152-06

舌癌在口腔恶性肿瘤中发病率较高, 目前常规治疗的疗效并不令人满意, 5 年生存率只有 50% 左右, 国内外学者正不断探索新的治疗方法^[1,2]。近几年, Folkman 等^[3-6]报道的血管内皮抑素 (Endostatin) 动物实验和临床观察证实: Endostatin 通过抑制血管生成能显著抑制肿瘤生长。因此, 以 Endostatin 抗肿瘤血管生成治疗的研究备受关注。本研究以携带人 Endostatin 基因的腺病毒 (Ad/hEnd) 感染舌癌细胞以及血管内皮细胞, 观察其在舌癌细胞中的表达及对血管内皮细胞的作用, 以探索采用腺病毒携带的人 Endostatin 基因治疗舌癌方法的可行性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

携带人血管内皮抑素 (Endostatin) 基因的重组腺病毒 Ad/hEnd 在黄文林实验室构建; 兔抗人 Endostatin 蛋白多克隆抗体由 Chemicom 公司提供; Human Endostatin EIA KIT 由 Oncogene 公司提供; HRP 偶联的抗鼠二抗, 抗生物素二抗, 化学发光剂 A、B 及分子 Marker 由 New England BioLabs 公司提

供; PI(溴化丙啶)染色液由美国 Coulter 公司提供。

1.2 细胞培养及载体病毒的制备

1.2.1 病毒增殖 293 细胞由加拿大 MICROBIX SYSTEM INC 提供, 为导入人腺病毒 E1 区基因并具有永生化特性的人胚肾细胞。将 1×10^6 个 293 细胞接种在 75 cm² 培养瓶内, 于含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中扩增 293 细胞。当细胞处于对数生长期, 80% ~ 90% 汇合时加入 20 ~ 30 pfu/细胞的 Ad/hEnd 感染 2 h, 然后加入含 5% 胎牛血清的 1640 培养液同时加入终浓度为 1.5 mmol/L 的 L-精氨酸。约 24 ~ 72 h 后, 即多数细胞出现圆胀、聚集成葡萄串状并开始脱落等改变时, 收集细胞, 以 1 000 r/min 离心 10 min, 倾去上清, 再加入预冷的 PBS, 以 1 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 浓集的细胞放 -80℃ 冰箱冻存。

1.2.2 病毒的抽提、纯化及保存 将冻存的接毒细胞置于 37℃ 恒温水浴箱内约 10 min, 再置于 -80℃ 冰箱约 15 min, 反复冻融 3 次使细胞充分裂解。然后于 4℃ 离心 3 600 r/min、18 min, 收集上清, 以 1.25 g/ml 和 1.4 g/ml 的 CsCl 在 4℃ 下进行密度梯度超速离心, 32 000 r/min 1 h。用 5 ml 注射器小心穿刺, 收集离心后分离的 Ad/hEnd 病毒带, 置于透析袋内, 密封后浸于透析液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1.25 mmol/L MgCl₂, 5% 蔗糖) 中, 置 4℃ 透析过夜, 中途换透析液 3 ~ 4 次。次日将透析的 Ad/hEnd 与等量的 2 × 病毒保存液 (1 mol/L Tris-HCl 10ml, NaCl 5.85g, MgCl₂ · 6H₂O 0.203 g, 人血清白蛋白 1g, 溶于注射用水中, 定容到 1000 ml) 混匀, 取样 20 μl 放入肉汤管中, 37℃ 温箱中检测细菌生长, 然后分装、冻存于 -80℃ 冰箱备用。

1.2.3 病毒滴度的测定 空斑法 (plaque assay): 采用空斑形成单位 (plaque forming unit) 准确测定病毒滴度。将 293 细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于 24 孔培养板中, 待细胞密度达到 80% ~ 90% 汇合的细胞单层时, 加入稀释的 Ad/hEnd 病毒悬液 (以无血清 RPMI-1640 稀释, 每孔 0.2 ml), 每个稀释度及空白对照设 3 个复孔。Ad/hEnd 吸附 2 h 后弃去培养液, 每孔加入 0.8 ml 0.8% 的琼脂糖营养液均匀覆盖在单层细胞上。待琼脂糖营养液凝固后置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养, 每 4 天加 0.8% 的琼脂糖营养液一次。连续观察 2 周, 计算空斑形成数, 计算可形成空斑的最高稀释度的空斑均数, 求出 Ad/hEnd 病毒的感染滴度 (pfu/ml) = 空斑均数 × 病毒稀释度的倒数 / 每孔接种病毒量。

1.3 检测 Endostatin 在 Tca8113 细胞和 ECV 细胞中的表达

ECV-304:人脐静脉内皮细胞,由第二军医大学姜勇教授提供。Tca8113:舌癌细胞株,由上海第二医科大学何荣根教授提供。

将 Tca8113 细胞和 ECV 细胞按 2×10^6 /瓶接种于 25 ml 培养瓶中,加入含 10% 胎牛血清的 1640 培养液,24 h 后用 0、10 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 的 Ad/hEnd 感染细胞,2 h 后吸弃病毒悬液,加入 10% 牛血清的 1640 细胞培养液 2 ml,置 37℃、5% CO₂ 温箱中培养。对照组加入含 10% 牛血清的 1640 培养液 2 ml。24 h 后,通过胰酶消化收集细胞,用 PBS 缓冲液重悬,涂于玻片上固定,加一抗(兔抗人 Endostatin)和二抗(羊抗兔),于光镜下观测 Endostatin 蛋白在细胞内表达和分布。

1.4 ELISA 检测 Ad/hEnd 对 Tca8113 转染后的表达水平

用 0、10、100 MOI(感染复数)的 Ad/hEnd 感染 Tca8113 细胞,分别于 24、36、48、72 h 收集细胞培养液上清,按 Human Endostatin EIA(Oncogene) KIT 的操作规程检测并计算上清中 Endostatin 蛋白含量。

1.5 Western blot 检测 Endostatin 蛋白在 Tca8113 和内皮细胞的表达

分别用 1、10、100 MOI 的 Ad/hEnd 感染 Tca8113 和 ECV 细胞,分别于 24、48、72 h 收集细胞。另外以 30 MOI 的 Ad/hEnd 感染舌癌细胞,分别于 1、2、3、4、5、6、7 天收集细胞。两批样本进行 Western blot 检测。

1.6 流式细胞仪检测细胞分期及凋亡情况

将 1×10^6 内皮细胞按接种于 25 ml 含 10% 牛血清的 1640 培养液的培养瓶中,设 PBS 组、Ad/hEnd 组和 5 型腺病毒组 AD₅。24h 后对照组加入细胞培养液; Ad/hEnd 和 5 型腺病毒组经 30 MOI 的 Ad/hEnd 及 5 型腺病毒分别感染内皮细胞,2 h 后弃去病毒悬液。分别于第 2~5 天采用胰酶消化收集细胞,预冷的 PBS 洗涤 2 次,重悬于预冷的 PBS 缓冲液中,加入无水乙醇至终浓度 70%,固定过夜。以 2 000 r/min 离心 10 min,弃去乙醇,再次悬浮于 PBS,使细胞密度为 1×10^6 /ml,细胞经溴化丙啶(PI, 10 μg/ml)染色 5 min,4℃ 避光 30 min 后,在流式细胞仪上用 488 nm 激发光激发,吸收波长 610 nm,功率为 15 mW。检测细胞 DNA 含量,根据 DNA 含量在流式细胞仪中得出每份样品的各期细胞分布图。LYSIS 软件(Becton Dickinson 公司产品)进行数

据处理分析各组细胞凋亡率。

1.7 细胞生长抑制实验

采用 WST-1 检测 Ad/hEnd 对 ECV 细胞的增殖抑制即细胞活力的影响。将 5×10^4 /ml 的 ECV 细胞接种 0.2 ml 于 96 孔板中,设 PBS、不同 MOI 的 Ad/hEnd 和 5 型腺病毒 3 组。各试验单位设 5 个孔。20 h 后, Ad/hEnd 及 5 型腺病毒组以 30 MOI 的 Ad/hEnd 或 5 型腺病毒(用无血清 RMPI-1640 稀释,每孔 100 μl) 感染细胞。PBS 组每孔各加入 50 μl 的 PBS 作为对照。同时各组加入终浓度为 1 μg/L 的 FGF-2。继续培养 72 h 后,每孔加入 WST-1 试剂 10 μl,孵育 2 h 后,充分震荡。然后在酶联免疫检测仪上测定 450 nm 波长的吸光度值(A 值)。按下列公式求出各组的细胞活力抑制率。抑制率 = $(1 - \text{用组组平均 A 值} / \text{对照组平均 A 值}) \times 100\%$ 。

1.8 Ad/hEnd 抑制人舌鳞状细胞癌裸鼠移植生长的效果

体外培养生长活跃的 Tca8113 细胞常规胰酶消化、离心,取 0.2 ml(即 1.5×10^6 个细胞)接种于裸鼠右肋皮下,观察肿瘤生长情况,1 周后肿瘤长到直径约 6~8 mm 时,将实验鼠随机分成 Ad/lacZ, PBS 和 Ad/hEnd 3 组,每组 6 只裸鼠,分别于第 1 周、第 2 周、第 3 周各注射 0.2 ml 的试剂 1 次,其中每次注射 Ad/hEnd 或 Ad/lacZ 约 1×10^9 pfu。每隔 3~4 天测量肿瘤大小,计算肿瘤体积, $V = 1/2ab^2$ (a 为最大长径, b 为横径),制作生长曲线,计算实验组抑瘤率。抑瘤率计算公式:抑瘤率 = $(\text{对照组平均体积} - \text{用药组平均体积}) / \text{对照组平均体积} \times 100\%$ 。第三周用药后 3 天处死裸鼠取肿瘤称重。

1.9 统计学分析

采用 t 检验处理, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 Ad/hEnd 感染滴度测定

本实验制备的携带人 Endostatin 基因的腺病毒经测定病毒滴度可达 $1 \times 10^{10} \sim 8 \times 10^{10}$ pfu/ml,可满足实验要求。

2.2 Endostatin 蛋白表达的检测

实验组感染的舌癌细胞以 Endostatin 抗体检测,胞浆染棕色,约占细胞总数 25%, ECV 细胞染棕色的约占 28%,对照组无深染细胞,显示感染 Ad/hEnd 后 Tca8113 细胞和 ECV 细胞胞浆内有

Endostatin 蛋白合成。

2.3 检测培养液上清 Endostatin 蛋白的浓度

Endostatin 在感染 Ad/hEnd 的 Tca8113 细胞培养液上清中第 1 天即可表达,100 MOI 的病毒感染后第 3 天表达最强,平均达到 597 μg/L。结果如表 1。

表 1 ELISA 检测 Tca8113 感染 Ad/hEnd 后细胞培养液上清 Endostatin 蛋白的含量(̄x±s)

Tab. 1 Detection of Endostatin in Supernatants of Tca8113 Infected with Ad/hEnd Using ELISA

| MOI | 24h(μg/L) | 36h(μg/L) | 48h(μg/L) | 72h(μg/L) |
|------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 10 ^a | 8.62±5.12 | 30.12±10.26 ^c | 72.35±16.69 ^e | 126.7±13.25 ^e |
| 100 ^b | 37.28±7.36 ^d | 241.48±31.28 ^e | 287.08±28.74 ^e | 597.54±38.47 ^e |
| 0 ^c | 5.24±2.53 | 3.0±1.28 | 4.7±2.33 | 2.67±1.31 |

a and b versus c, ^dP < 0.05; ^eP < 0.01

MOI: multiplicity of infection

2.4 Western blot 检测结果

舌癌和内皮细胞感染 Ad/hEnd 后第 1 天始,目的基因 Endostatin 的产物可在细胞中高效表达,分子量与自然 Endostatin 蛋白一致,无杂合蛋白。10 MOI 的病毒感染细胞后,24 h 可检测到明显的 Endostatin 蛋白条带,结果如图 1。30 MOI 的病毒感染 Tca8113 细胞后,持续到第 7 天仍检测到明显的 Endostatin 蛋白条带。

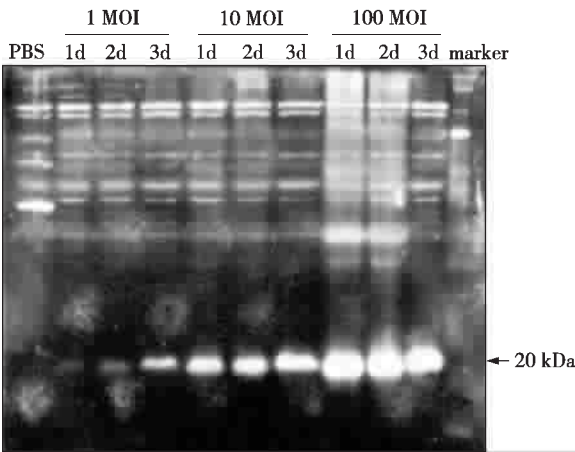


图 1 Western blot 法检测不同 MOI 的感染后 1~3 天 Tca8113 细胞中的 Endostatin 蛋白表达

Fig. 1 The results of endostatin expression in Tca8113 cells after infected with rang multiplicity of infection of Ad/hEnd in 1-3 days by Western blot analysis.

2.5 流式细胞术检测

Ad/hEnd 可明显延长感染的 ECV 细胞的 S 期及 G₂ 期,第 3 天始出现细胞凋亡现象,Ad/hEnd 组

表 2 FCM 检测 ECV 感染 Ad/hEnd 后细胞周期及细胞凋亡率的变化(%, n=3)

Tab. 2 Changes of Cell Cycle and Apoptosis of ECV Cells after Infected with 30 MOI Ad/hEnd(%, n=3)

| | G ₀ /G ₁ phase | S phase | G ₂ /M | Apoptosis rate |
|---------|--------------------------------------|---------|-------------------|----------------|
| Ad/hEnd | | | | |
| 24h | 58.1 | 30.1 | 11.1 | 1.7 |
| 48h | 34.3 | 46.7 | 19.8 | 3.2 |
| 72h | 11.3 | 18.3 | 70.6 | 25.7 |
| 96h | 57.7 | 35.3 | 7.6 | 44.1 |
| Ad5 | | | | |
| 24h | 56.7 | 30.4 | 12.1 | 1.4 |
| 48h | 55.1 | 31.3 | 14.6 | 2.0 |
| 72h | 56.8 | 29.5 | 14.0 | 1.6 |
| 96h | 56.2 | 30.8 | 13.2 | 2.2 |
| PBS | | | | |
| 24h | 57.3 | 27.7 | 15.5 | 1.1 |
| 48h | 60.1 | 29.4 | 10.0 | 1.0 |
| 72h | 58.2 | 28.9 | 12.3 | 1.7 |
| 96h | 56.2 | 28.3 | 16.1 | 2.5 |

细胞凋亡率在第 2、3、4、5 天平均分别为 1.7%、3.2%、25.7%、44.1%,PBS 组为 1.1%、1.0%、1.7%、2.5%,两且之间差异有显著性(P < 0.05);5 型腺病毒组与 PBS 组近似,差异无显著性(P > 0.05)。结果见表 2。

2.6 WST-1 法检测

Ad/hEnd 感染 ECV 细胞能抑制 ECV 细胞生长,1、10、20、30、50 MOI Ad/hEnd 处理细胞时相对应的增殖抑制率平均为 3.81%、7.14%、21.01%、29.37%、34.05%,呈剂量依赖性。在显微镜下观察,ECV 细胞感染后首先变圆,随后逐渐从培养板上脱落。结果见图 2。

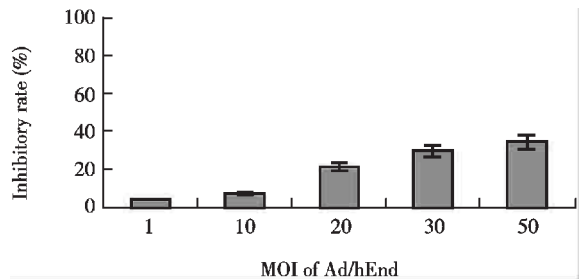


图 2 显示 ECV 细胞增殖抑制率

Fig. 2 The inhibitory rate (IR) was analyzed by WST-1 assay

2.7 Ad/hEnd 抑制人舌鳞状细胞癌裸鼠移植瘤生长的效果

生长曲线表明(见图 3),Ad/hEnd 组在用药后

第3天肿瘤体积缩小,增长受到抑制,第6天开始肿瘤抑制明显增强,第3周抑瘤率达45.8%。Ad/lacZ, PBS和Ad/hEnd3组最终平均瘤重分别为4.67g,4.20g,2.38g。Ad/lacZ组和PBS组之间差异无显著性,Ad/lacZ组和Ad/hEnd组之间差异有显著性。

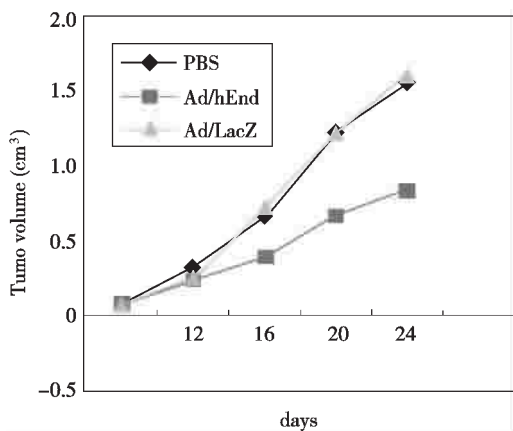


图3 Ad/hEnd对人舌鳞癌裸鼠移植瘤生长曲线的影响

Fig.3 Effect of Ad/hEnd on the growth of human tongue carcinoma xenografted in nude mice

3 讨论

近年来的研究表明,血管生成是实体瘤生长与转移的必要条件。Hanahan等^[7]认为血管生成受促血管生成因子和抑制血管生成因子的调控,当发生肿瘤时,肿瘤细胞可迅速产生VEGF等刺激新生血管生成的多肽分子,导致病理性血管生成,同时VEGF可使血管通透性增强,可促进肿瘤组织营养的交流,也可促进肿瘤细胞的血源性转移。Folkman等^[3-6]研究发现,当肿瘤体积达到2mm³时需要依靠新生血管来获取营养及氧以维持肿瘤的迅速生长,否则,肿瘤组织将保持休眠状态或发生退化。因而通过抑制肿瘤血管生成,切断肿瘤的血供,可以阻止肿瘤迅速生长和转移。这就是抗肿瘤血管生成治疗。血管生成的基本过程包括血管内皮细胞的激活、细胞外基质的降解、内皮细胞的移行增殖、管腔结构的形成及血管外膜的形成,阻断其中任何一个环节,就可抑制肿瘤血管生成。抗肿瘤血管生成治疗与传统肿瘤化疗相比,其靶向并不是直接作用于肿瘤细胞,而是定向作用于血管内皮细胞。由于肿瘤细胞不稳定,染色体具有可塑性,常易发生染色体缺失、重排、易位、基因突变现象,极易产生耐药性。而内皮细胞的染色体组基本正常,具有相对的稳定性,

不易产生抗药性,因而抗肿瘤血管生成治疗有自身特点。近几年,Folkman等^[3-6]报告动物实验和临床观察证实,Endostatin通过抑制血管生成能抑制肿瘤生长,而且抑瘤效果惊人。因此,Endostatin被认为是目前活性最强的血管形成抑制剂,以Endostatin抗肿瘤血管生成治疗的研究备受关注。美国于1999年底开始Endostatin的临床试验研究。

但Endostatin的临床应用面临着不少困难:①由于Endostatin蛋白质结构不稳定,难以大批量制备稳定的具生物活性的蛋白;②Endostatin蛋白质生产技术工艺复杂;③Endostatin半衰期短,需每天多次重复给药,以维持有效药物浓度;④应用Endostatin治疗肿瘤需要较长的疗程,患者须承受巨大的经济负担。采取基因治疗的方法,使机体本身变成一个生产Endostatin蛋白的“工厂”是解决以上问题的最佳途径。这种方法具有明显的优点,首先它可以产生很高活性的内源蛋白;另外,一次治疗就可以获得较长时间的稳定表达,成本降低,并且治疗过程简单,病人容易接受;同时基因治疗能使体内的Endostatin蛋白保持在一个相对稳定的水平,其药物动力学更加合理。

目前国内外以腺病毒携带的人Endostatin基因进行抗肿瘤血管生成的报道和以Endostatin基因抗舌癌的研究资料均较少见,我们对此进行初步的研究探索^[9-11],自行构建携带人Endostatin基因的腺病毒载体(Ad/hEnd),感染舌癌细胞株Tca8113和人脐静脉内皮细胞株ECV,观察其在舌癌细胞中的表达及对血管内皮细胞的作用。由于本实验用的重组病毒(Ad/hEnd)是重组了人Endostatin基因于5型腺病毒E1缺陷区,基因组上的E1A和E1B基因已被目的基因所取代,因此,重组腺病毒的复制是在经腺病毒E1A和E1B转化的人胚肾细胞(293细胞)中完成。

本实验结果显示:Ad/hEnd感染Tca8113细胞和ECV细胞后24h开始,在细胞内用免疫组化法可检测到Endostatin蛋白在细胞浆内的表达;Western blot可检查出现明显Endostatin蛋白条带,分子量与自然Endostatin蛋白一致,无杂合蛋白;ELISA法亦检测到上清的Endostatin蛋白含量。说明Ad/hEnd能在Tca8113细胞和ECV细胞中快速高效表达,这种表达呈剂量依赖性,并持续表达达到第7天仍然可用Western blot检测到。这些结果证明Ad/hEnd能在Tca8113和ECV细胞中高效持久地表达Endostatin蛋白,可为实验提供有效的Endostatin表

达载体。

目前已经证实, Endostatin 是胶原 18 的降解片段,其抑制血管形成的作用机制包括:①与肝素样硫酸蛋白多糖结合,抑制血管形成;②诱导内皮细胞凋亡。它被认为是目前活性最强的血管形成抑制因子。本实验结果显示人血管内皮细胞株 ECV-304 和舌癌细胞株 Tca8113 在感染 Ad/hEnd 后,产生的变化不同。Tca8113 细胞培养到第 7 天,镜下细胞形态无明显改变,细胞数目明显增加;而 ECV 细胞到第 3 天始出现细胞变圆脱落,第 5 天大部分细胞脱落。流式细胞术检测结果显示,感染 Ad/hEnd 后第 2 天,ECV 细胞出现 S 期和 G₂ 期延长,第 3 天起出现凋亡,第 4 天凋亡率达到 44.1%。WST 检测亦证实 Ad/hEnd 对 ECV 的增殖抑制作用。说明 Ad/hEnd 对 Tca 细胞无影响,只特异性对 ECV 细胞起作用,这些变化与文献报道一致。

本实验结果显示 Ad/hEnd 能在 Ecv 和 Tca8113 细胞中有效表达 Endostatin 蛋白,并通过表达 Endostatin 蛋白影响 ECV 细胞周期,诱导细胞凋亡并抑制 ECV 细胞增殖,局部应用 Ad/hEnd 可以抑制裸鼠舌癌移植瘤的生长。这些结果为应用 Ad/hEnd 进行舌癌治疗的试验研究提供了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] 邱蔚六. 口腔颌面外科理论与实践 [M]. 北京:人民卫生出版社,1998:642-645.
- [2] 刘世勋,邱蔚六,张锡泽,等. 试析影响舌癌预后的因素 [J]. 中华口腔医学杂志,1990,25(6):322-325.
- [3] Folkman J. Antiangiogenic gene therapy [J]. PNAS, 1998, 95: 9064-9066.
- [4] O'Reilly, M S. Boelm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. Cell, 1997, 88: 277-285.
- [5] Boehm T, Folkman J, Broower T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [J]. Nature, 1997, 390: 404-407.
- [6] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases [J]. Nat, Med, 1995, 27-35.
- [7] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. Cell, 1995, 86: 353-364.
- [8] Crystal RG. The body as a manufacturer of endostatin [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 336-337.
- [9] 黄文林. 分子病毒学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2002,241-251.
- [10] Wenlin Huang, Flint SJ. Unusual Properties of Adenovirus E2E Transcription by RNA Polymerase III [J]. J Virology, 2003,77(7),4015-4024.
- [11] 陈宇,丁学强,李立,等. 腺病毒携带的人内皮抑素基因在舌癌细胞和血管内皮细胞中的表达 [J]. 中山医科大学学报, 2002,23(5S):4-7. [编辑:钟均行;校对:甘可建]