

文章编号:1005-6947(2008)05-0454-04

· 基础研究 ·

# PGL3-DF3-DTA 在 DF3 阳性人乳腺癌细胞移植瘤中的表达和作用

张杨, 黄文广, 黄汉菊, 杨琰

(华中科技大学同济医学院协和医院 普通外科, 湖北 武汉 430022)

**摘要:**目的 探讨含人乳癌 DF3/MUC1 启动子转录调控序列的 DTA 重组表达载体 PGL3-DF3-DTA 对乳腺癌 DF3 阳性癌细胞的选择性表达和杀伤作用。方法 将乳腺癌的两种细胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 分别接种于裸鼠背侧皮下, 7 d 后开始用重组的质粒进行活体内瘤注射治疗。肿瘤接种后第 29 天脱颈椎处死裸鼠, 测量移植瘤的体积和质量; 并采用逆转录-聚合酶链反应法 (RT-PCR) 检测裸鼠移植瘤内 DTA 的表达情况。结果 重组表达载体 PGL3-DF3-DTA 在 MCF-7 细胞株移植瘤中表达, 明显抑制肿瘤生长。结论 重组表达载体 PGL3-DF3-DTA 对乳腺癌 DF3 阳性的癌细胞起到了选择性表达和杀伤作用。 [中国普通外科杂志, 2008, 17(5): 454-457]

**关键词:** 乳腺肿瘤; DF3/MUC1; 重组质粒; DTA; 基因治疗

**中图分类号:** R 737.9

**文献标识码:** A

## The expression and effect of PGL3-DF3-DTA on DTA positive human breast cancer cell in vivo

ZHANG Yang, HUANG Wenguang, HUANG Hanju, YANG Yan

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

**Abstract:** **Objective** To study the selective expression and eradicating effect of recombinant plasmid vector DTA containing transcriptional regulation sequence of human breast cancer DF3/MUC1 promoter (PGL3-DF3-DTA) on DF3 positive breast carcinoma cell lines. **Methods** The MCF-7 and MDA-MB231 breast carcinoma cell lines were transplanted into the dorsal subcutaneous tissue of nude mice in different groups. The mice was subcutaneously injected with recombinant plasmid PGL3-DF3-DTA 7 days after transplantation and the animals were sacrificed 29 days after transplantation. The tumors were excised and the weight and volume were determined. The expression of DTA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Recombinant plasmid vector PGL3-DF3-DTA was expressed in xenograft of MCF-7 breast carcinoma cell lines, and the growth of tumor was significantly inhibited. **Conclusions** Recombinant plasmid vector PGL3-DF3-DTA has selective expression and eradicating effect on DF3-positive breast cancer cell lines. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(5): 454-457]

**Key words:** Breast Neoplasms; DF3/MUC1; Recombinant Plasmid; Diphtheria Toxin A fragment (DTA); Gene Therapy

**CLC number:** R 737.9

**Document code:** A

收稿日期:2007-08-20; 修订日期:2008-02-22。

作者简介:张杨,男,华中科技大学同济医学院协和医院住院医师,主要从事胃肠外科、肿瘤免疫方面的研究。

通讯作者:黄文广 E-mail:huang\_hanju@hotmail.com

目前乳腺癌的治疗方法主要是手术切除、化疗、放疗及内分泌治疗,但对于有远处转移的患者,尚无特殊的治疗方法。随着分子生物学及免疫学的发展,基因治疗已成为一种较为有效和具有临床应用潜力的治疗策略。本实验通过建立裸鼠人乳腺癌移植瘤动物模型,利用已经构建的含人乳腺癌DF3/MUC1启动子转录调控序列的DTA表达载体PGL3-DF3-DTA,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 材料与方 法

### 1.1 材 料

重组表达载体PGL3-DF3-DTA由本实验小组自行构建<sup>[1]</sup>。人乳腺癌MCF-7细胞株和MDA-MB-231细胞株由本院普外实验室保存。4周龄雌性裸鼠购自湖北省实验动物研究中心;1640培养基购自GIBICO生物公司;逆转录酶, Oligo dT, Taq DNA聚合酶, dNTPs购自Promega生物技术公司;聚合酶链反应(PCR)引物购自北京赛百盛基因技术有限公司;胎牛血清购自杭州四季青公司。其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231细胞用含10%胎牛血清的1640培养基,另添加NaHCO<sub>3</sub>和羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES),置于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。细胞换液时间为1~2d,3~4d传代;待其贴壁生长至70%~80%汇合时,用0.25%的胰酶消化传代培养。

1.2.2 裸鼠皮下移植瘤模型的建立 将对数生长期的MCF-7和MDA-MB-231细胞分别与磷酸盐缓冲液(PBS)混合,制成单细胞悬液。将13只裸鼠随机分为3组,即MCF-7组,MDA-MB-231组,空白对照组。前两组每组5只,按每鼠分别接种MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞,1×10<sup>7</sup>个0.2 mL于右后腿外侧皮下注射;对照组3只不做任何处理。约7d后,待肿瘤体积达到150~200 mm<sup>3</sup>时,开始向MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞移植瘤内分别多点注射重组质粒50 μgPGL3-DF3-DTA(50 μgPGL3-DF3-DTA + 50 μL lipofectamin + 450 μL无血清1640培养基)/只。注射后针头应保留在肿瘤组织内30s,以防止注射物反向扩散<sup>[2]</sup>。间隔2d注射1次,共7次。为了确定PGL3-DF3-DTA对正常组织是否有损害作用,空白对照组动物于相同部位注射相同剂量的重组质粒。定期观察小

鼠的精神状态、饮食及排便情况。用游标卡尺测量肿瘤结节的长度(a)和宽度(b),按公式<sup>[3]</sup> $V = ab^2 / 2$ 计算肿瘤体积。绘制肿瘤生长曲线。在第7次注射3d后(肿瘤接种后第29天)处死裸鼠,解剖并观察肺、肝、肾、心、脾及腹腔的转移以及损害情况。手术切除肿瘤组织,称其湿重。将各组肿瘤组织做好标记,各组分别取200 mg以4%甲醛溶液固定常规石蜡包埋。其余肿瘤组织置液氮中储存,以备RNA抽提,并观察每组动物各脏器的组织病理学改变。

1.2.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测移植瘤中DTA mRNA表达

(1)用trizol试剂提取细胞总RNA。

(2)cDNA的合成 取总RNA 8 μg、Oligo(dT) 1 μL,用DEPC处理水补充反应体积至15 μL,混匀。75℃变性10 min后置冰上冷却2 min;加入5×缓冲液5 μL,10 mmol/LdNTPs 3 μL,逆转录酶2 μL;42℃反应60 min后,95℃变性5 min灭活逆转录酶,置-20℃保存。

(3)PCR扩增 DTA引物序列为 sense: 5'-TTTCGTACCACGGGACTAAACCTGG-3', Anti-sense: 5'-CCACGTTTTCCACGGGTTTCAA-3',扩增片段大小为468 bp。小鼠β-actin为内对照,其引物序列:正义为5'-TGAGACCTTCAACACCCAG-3';反义为5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3';产物大小为316 bp。

(4)扩增体系 25 μL体系。cDNA 2 μL, dNTP 1 μL(20 mmol/L), MgCl<sub>2</sub> 22 μL, 10×缓冲液 2.5 μL, 正反义引物(10 μmol/L)各1.5 μL, Taq酶 1 μL, 三蒸水补足反应体积至25 μL。PCR条件:94℃变性5 min, 94℃变性30 s, 51℃复性45 s, 72℃延伸45 s, 循环30次;末次循环72℃延伸10 min。PCR产物经2.0%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,紫外灯下照相。

### 1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料采用t检验, P < 0.05为有统计学差异, P < 0.01为差异非常显著。

## 2 结 果

### 2.1 PGL3-DF3-DTA对裸鼠移植瘤生长的影响及两组治疗后一般情况比较

MCF-7组和MDA-MB-231组,10只裸鼠均存活,并有肿瘤形成,成瘤率100%。MCF-7组和MDA-MB-231组肿瘤体积分别为(159.44 ± 5.26) mm<sup>3</sup>和

( $167.62 \pm 9.48$ )  $\text{mm}^3$ , 差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。随着 PGL3-DF3-DTA 注射后时间的延长, 两组移植瘤体积开始出现差异, 第 29 天, MCF-7 组和 MDA-MB-231 组肿瘤体积分别为 ( $273.44 \pm 29.19$ )  $\text{mm}^3$  和 ( $617.58 \pm 75.15$ )  $\text{mm}^3$ , 差异有极显著性 ( $P < 0.01$ )。MCF-7 组和 MDA-MB-231 组瘤重分别为 ( $0.24 \pm 0.05$ ) g 和 ( $0.60 \pm 0.11$ ) g, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。MDA-MB-231 组肿瘤生长呈明显递增, MCF-7 组生长曲线较为低平 (图 1)。重组质粒 PGL3-DF3-DTA, 治疗后 MCF-7 组的肿瘤体积及重量均显著低于 MDA-MB-231 组 ( $P < 0.01$ ) (表 1)。MCF-7 组裸鼠精神及进食状态较好, MDA-MB-231 组皮肤较粗糙, 精神状态差, 进食欠佳, 体型消瘦。两组动物均无腹腔、肺、肝、脾、肾等脏器的改变及转移和腹水形成。空白对照组动物精神及进食状态良好, 肉眼未见任何组织异常。病理检查显示两组肿瘤坏死程度无明显差异。

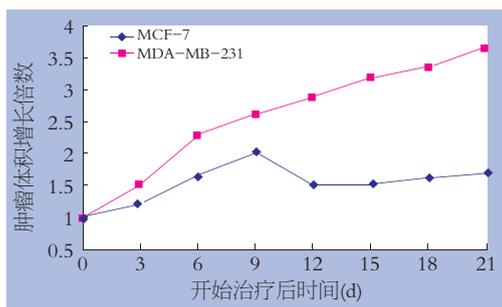


图 1 两组裸鼠肿瘤生长曲线图

表 1 重组质粒 PGL3-DF3-DTA 对人乳腺癌 MCF-7 裸鼠移植瘤的抑制作用

分组	肿瘤重量(g)		肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )	
	治疗后	治疗前	治疗前	治疗后
MCF-7	$0.24 \pm 0.05$		$158.84 \pm 5.26$	$273.44 \pm 29.19$
MDA-MB-231	$0.60 \pm 0.11^{1)}$		$167.62 \pm 9.05$	$617.58 \pm 75.15^{1)}$

注: 1) 与 MCF-7 组比较,  $P < 0.01$

## 2.2 裸鼠移植瘤内 DTA 的表达

MCF-7 组和 MDA-MB-231 组移植瘤组织内均有内对照  $\beta$ -actin 条带出现。MCF-7 组移植瘤组织内可检测到 DTA mRNA 的表达, 条带长约 468bp, 特异性好; MDA-MB-231 组移植瘤组织内未见 DTA mRNA 的表达条带 (图 2)。

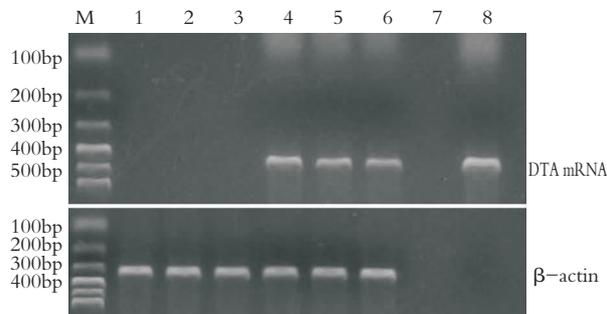


图 2 重组质粒 PGL3-DF3-DTA 治疗两组裸鼠移植瘤 DTA mRNA 的表达 1, 2, 3: MDA-MB-231 组; 4, 5, 6: MCF-7 组; 7: 阴性对照; 8: 阳性对照 (PGL3-DF3-DTA 质粒); M: DNA marker

## 3 讨论

在活体肿瘤的基因治疗中, 利用肿瘤杀伤基因对肿瘤细胞进行目的性特异性杀伤极为关键。非特异性的肿瘤杀伤基因可损害正常的肝、骨髓、肾、肠等重要器官, 最终导致患者死亡。因此, 识别和发展具有特异性的启动子十分重要。

本研究利用在正常细胞与肿瘤细胞中存在差异性表达的基因调控序列, 使毒素基因仅表达在肿瘤细胞中, 构建一种含人乳腺癌 DF3 启动子转录调控序列的 DTA 重组表达载体, 由 DT-A 毒素的表达导致肿瘤生长进行性减慢, 使之选择性地表达和杀伤乳腺癌 DF3 阳性的肿瘤细胞。本实验结果显示, MCF-7 组治疗后肿瘤的平均重量和体积明显低于与 MDA-MB-23 组, 差异有显著性; 而且 MDA-MB-23 组动物皮肤粗糙, 一般情况均较 MCF-7 组动物差。说明 DTA 对乳腺癌 DF3 阳性的肿瘤细胞有选择性抑制及杀伤作用。人乳腺癌细胞 MCF-7 正是过度表达 DF3/MUC1 的乳腺癌细胞之一。已有研究证实, 直接注射 DNA 至肿瘤组织中能导致肿瘤细胞的转导, 利用组织特异性的启动子能获得注射目的基因的特异性表达<sup>[4]</sup>。在以往的实验中, 对仅使用 1 次毒素质粒注射者并未观察到其对肿瘤生长的实质效应<sup>[5]</sup>。这说明, 基因治疗所需要的转染效率是必须通过多次注射 DNA 重组体才能获得的。Goto 等<sup>[6]</sup>指出, DTA 杀伤的肿瘤细胞在停止注射质粒后出现再次生长的现象, 这是由于用重组体进行治疗后, 活性的肿瘤细胞仍然在一定范围内存在, 它们是肿瘤再次生长的根源。Ohana 等<sup>[2]</sup>提出, 重复生长肿瘤的问题可通过反复多次注射含杀伤基因的重组体

而得以解决。本研究组织学检查显示,MCF-7组肿瘤和MDA-MB-23组肿瘤在多次注射PGL3-DF3-DTA后,其坏死程度并无明显不同。因为通过皮下注射肿瘤细胞株形成的肿瘤,不同于自然形成的肿瘤,缺乏间质和血管的支持;当这些皮下肿瘤组织的生长超过其周围组织提供的营养时,它们才开始出现大范围的坏死。

本实验在MCF-7组治疗后的肿瘤样本中检测到DTA mRNA的表达,条带长约468 bp,特异性好;而在MDA-MB-231组治疗后的肿瘤样本中未见DTA mRNA的表达。在体外实验中,PGL3-DF3-DTA转染MCF-7细胞后能够检测到DTA mRNA的表达<sup>[7]</sup>。这与活体实验结果也是一致的。其它活体实验中PGL3-DF3-DTA的特异性杀伤作用也得到了相关证实<sup>[8]</sup>。因此,可以得出如下结论:含人乳癌DF3/MUC1启动子转录调控序列的DTA可选择性表达在乳腺癌DF3阳性的肿瘤中,并对肿瘤的生长起到抑制和杀伤的作用。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(11):808-812.

- [2] Ohana P, Bibi O, Matouk I, *et al.* Use of H19 regulatory sequences for targeted gene therapy in cancer [J]. *Int J Cancer*, 2002, 98(5): 645-650.
- [3] Wang J, Sun L, Myeroff L, *et al.* Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(37):22044-22049.
- [4] Jaffee EM, Dranoff G, Cohen LK, *et al.* High efficiency gene transfer into primary human tumor explants without cell selection [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(10):2221-2226.
- [5] Vile RG, Hart IR. In vitro and in vivo targeting of gene expression to melanoma cells [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(5):962-967.
- [6] Goto T, Mishi T, Tamura T, *et al.* Highly efficient electro-gene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(1):354-359.
- [7] 黄文广,罗威,黄汉菊. 靶向DF3的白喉毒素A链基因对乳腺癌细胞的杀伤作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2007,24(1):15-17.
- [8] 蔡明,黄文广,潘晟. PGL3-DF3-DTA特异性杀伤移植瘤裸鼠人乳腺癌细胞的实验研究[J]. *中国普通外科杂志*,2007,16(1):73-77.

## 穗港海外胃肠肿瘤学术研讨会征文通知

由中山大学附属第一医院、广东省抗癌协会胃癌专业委员会和中山大学胃癌诊治研究中心联合主办的穗港海外胃肠肿瘤学术研讨会定于2008年10月中旬在广州市召开。会议将邀请国内外著名专家做专题研讨和现场手术演示,欢迎国内外医师踊跃参加。参会者可获I类继续医学教育学分。

征文内容:胃肠肿瘤的诊治新进展;胃肠肿瘤的扩大和缩小手术;胃肠间质瘤;胃肠恶性肿瘤微创手术的现状和前景;胃肠癌化学治疗、生物治疗的研究进展;胃肠肿瘤外科密切相关的边缘交叉学术问题。

征文要求:①使用Word文档格式,全文字数4000字符左右,摘要600字左右;②摘要内容应包括文题,作者单位,邮编,姓名及“目的、方法、结果、结论”;③稿件请写明准确的通讯地址、单位名称、邮政编码和联系电话,以便联系;④征文截稿日期2008年9月15日前(请自留底稿,恕不退稿),请务必通过电子邮箱将稿件发至zhwcwk@21cn.com

主题请标明“胃肠肿瘤学术研讨会征文”。联系地址:广州市中山二路58号中山大学附属第一医院胃肠胰外科(邮编510080),联系人及电话:张常华13678987415;徐泽娥020-88263393