

·实验研究 Experiment research·

经导管动脉注入脂质体介导的 p53 基因治疗肝癌的实验研究

朱光宇, 卢勤, 滕皋军, 魏晓莹, 郭金和, 余辉, 邓钢, 何仕诚, 方文, 李国昭

【摘要】 目的 以兔 VX2 肝癌模型为对象,探讨经导管动脉注入脂质体介导的 p53 基因治疗肝癌的可行性及转染和表达情况。方法 将 pCMV-myc-p53 质粒、阳离子脂质体 LipofectAMINE 以及 pCMV-myc-p53 和 LipofectAMINE 的复合体分别注入兔 VX2 肝癌模型的肿瘤供血动脉,并提取肿瘤组织蛋白,采用蛋白印迹法及免疫组化检测基因转染及其表达。以不同量的 pCMV-myc-p53 与 LipofectAMINE 形成的复合体分别注入兔 VX2 肝癌模型的肿瘤供血动脉内,同法检测基因的转染及其表达。结果 脂质体介导的 p53 基因经动脉途径成功转染了兔 VX2 肝癌模型的肿瘤组织并进行表达,其转染效率明显高于单纯基因导入,基因的量与转染效率之间存在量效关系。结论 经动脉途径导入脂质体介导的 p53 基因治疗肝癌是可行、有效的,具有广阔的应用前景。

【关键词】 p53 基因;脂质体;转染效率;肝癌;放射学;介入性

中图分类号 R735.7 文献标识码 A 文章编号:1008-794X(2007)02-0109-06

Experimental research on treating hepatic carcinoma by arterial injection of liposome mediated p53 genes ZHU Guang-yu, LU Qin, TENG Gao-jun, WEI Xiao-ying, GUO Jin-he, YU Hui, DENG Gang, HE Shi-cheng, FANG Wen, LI Guo-zhao. Department of Radiology, Pathology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 Objective To investigate the transfection and expression of p53 genes mediated by liposome and its feasibility in treatment of liver cancer by transcatheter arterial injection on rabbit VX2 hepatocarcinoma model. **Methods** pCMV-myc-p53 plasmids, LipofectAMINE and p53-LipofectAMINE complex were infused into tumor's feeding artery of rabbit VX2 hepatocarcinoma model respectively, and then protein of cancer tissue was extracted, followed by measuring gene transfection and expression by western blot and immunohistochemistry. p53-LipofectAMINE complex in different doses were infused into tumor's feeding artery of rabbit VX2 hepatocarcinoma model with the gene transfection and expression detected by the same way. **Results** Liposome-mediated p53 gene injected through catheter could be successfully transfected and expressed in the cancer tissue of rabbit VX2 hepatocarcinoma model, with transfection efficiency higher than the gene delivery alone. The efficiency and the gene dose has dose-effect relationship. **Conclusions** Treatment of liver cancer by transcatheter arterial injection of p53 genes mediated by liposome is a feasible and effective method, with wide prospect of application. (J Intervent Radiol, 2007, 16: 109-114)

【Key words】 p53 gene; Liposome; Transfection efficiency; hepatic carcinoma; Radiology; interventional

肝癌是发病率很高的恶性肿瘤之一,全世界每年新增病例超过 100 万例,尤以亚太地区居多。该病的预后极差,传统治疗方法疗效有限^[1]。近年来,随着分子生物学、病毒学及遗传学的发展,人们研

究发现肝癌的发生有遗传易感性基础,因此,针对肝癌研究进入到基因水平,p53 是重要的抑癌基因。本研究以兔 VX2 移植性肝癌模型为动物模型,以脂质体为基因载体,经导管动脉内注入脂质体与 p53 基因的复合物,探究动脉内输注脂质体与 p53 基因复合物的可行性及转染和表达情况,现将结果报道如下。

作者单位 210009 南京东南大学附属中大医院放射科
(朱光宇、卢勤、滕皋军、郭金和、余辉、邓钢、何仕诚、方文、李国昭),病理科(魏晓莹)

通讯作者:滕皋军

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验试剂 真核细胞表达质粒 pCMV-myc-p53 由东南大学医学院生化实验室构建,大肠埃希菌 DH5 α 菌株为本实验室保存菌株,阳离子脂质体 LipofectAMINE 为 Clontech 公司产品,质粒提取试剂盒为 Roche 公司产品,蛋白提取试剂盒为南京凯基生物科技发展有限公司产品。

1.1.2 实验动物 新西兰大白兔 40 只由南京金陵种兔场提供,雌雄不限,体重 2.5 ~ 3.5 kg,平均(2.8 \pm 0.4)kg。VX2 肿瘤细胞株由江苏省人民医院苗毅教授惠赠。

1.1.3 实验设备及器械 影像设备:CT 机(GEHispeed ct/i),MR 机(Marconi,1.5 T),DSA(GE INNOVA 3100);介入用器械:4 F Soft-Vu 导管和鞘管(Boston Scientific, Cordis, USA),4F 导管、导丝、穿刺系统、4 F 鞘管和 3 F SP 导管(Turomu Japan),对比剂为欧乃派克(Omnipaque,300 mgI/ml)。

1.2 实验步骤

1.2.1 质粒的扩增纯化 采用 CaCl₂ 转化法将 pCMV-myc-p53 质粒导入大肠埃希菌 DH5 α 菌株,用含氨苄西林的 LB 平板培养基培养,选择挑取阳性菌落,接种于 LB 培养液中,振荡培养过夜。按质粒提取试剂盒说明书操作步骤进行质粒提取纯化,并测序鉴定。

1.2.2 VX2 自体移植肝癌模型的建立 将 VX2 肿瘤细胞接种于兔后肢皮下成瘤并传代。待瘤体长至 2 ~ 3 cm³,采用外科方法将肿瘤取出,置入 4 $^{\circ}$ C 生理盐水。将瘤周组织和肿瘤包膜剥离干净,除去坏死组织,切取靠近瘤体边缘的灰白色鱼肉样组织,于超净台中用无菌眼科剪剪成约 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小的瘤组织块,1 ml 注射器抽吸备用。实验兔均采用 1%戊巴比妥钠(3 ml/kg)麻醉,剑突中下 1/3 略偏左作约 2 cm 长纵行切口,打开腹腔,暴露肝脏,轻压腹部挤出肝脏左叶,用盐水纱布将其拉出体外,注入备用瘤组织块约 0.8 ml 后局部压迫 15 ~ 20 s 后,确认穿刺点无液体渗出,将肝脏回纳腹腔,逐层缝合切口,所有实验兔均经耳缘静脉注入青霉素 80 万 u 预防感染。

1.2.3 影像学检查 肿瘤接种后 1、2 周内分别行 MRI 和(或)CT 平扫及增强扫描,了解成瘤与否及所成瘤体的大小、形态、数量及增强表现。CT 及 MRI 检查时各实验组荷瘤兔所用扫描参数及对比剂类型、总量及注入速度均相同,CT 增强时选用非离子

型对比剂欧乃派克(Omnipaque,300 mgI/ml),对比剂剂量为 5 ml(3 ml 欧乃派克加 2 ml 生理盐水),注射速率为 0.3 ml/s。MR 主要采用 T₁WI、T₂WI 及 DWI 序列。实验兔扫描前禁食 4 h,扫描体位为俯卧位,头先进,所有实验兔均在深度麻醉下采集图像以保证图像清晰。

1.2.4 介入技术

1.2.4.1 与对照组的比较研究:选取肿瘤直径约 3 cm 的荷瘤兔 15 只,随机分成 3 组,每组 5 只,所有实验兔均在肿瘤肝脏移植 2 周后行股动脉置鞘后插管检查和治疗操作。A 组 5%葡萄糖液 500 μ l 与 LipofectAMINE 40 μ l 混合后静置 10 min,经导管注入肿瘤供血动脉;B 组 5%葡萄糖液 500 μ l 与 pCMV-myc-p53 10 μ g,混合后静置 10 min,经导管注入肿瘤供血动脉;C 组 5%葡萄糖液 500 μ l 与 LipofectAMINE 40 μ l 混合后静置 10 min,加入 pCMV-myc-p53 10 μ g 后静置 20 min,经导管注入肿瘤供血动脉。

1.2.4.2 p53 基因的量与转染效率的关系研究:选取肿瘤直径约 3 cm 的荷瘤兔 18 只,随机分成 6 组,每组 3 只,所有实验兔均在肿瘤肝脏移植 2 周后行股动脉置鞘后插管检查和治疗操作。各组所用 p53 的量分别为 0 μ g、7.5 μ g、10 μ g、15 μ g、20 μ g 和 30 μ g,首先将与 p53 质量比为 3 : 1 的 LipofectAMINE 分别与 5%葡萄糖液 500 μ l 混合后静置 10 min 后加入相对应的 pCMV-myc-p53,静置 20 min,经导管注入肿瘤供血动脉。

1.2.5 基因转染及表达情况的检测 上述两部分研究的实验兔均于术后饲养 48 h 后处死,取肿瘤组织,部分肿瘤组织按试剂盒说明书提取组织蛋白,蛋白印迹检测基因转染情况,部分进行 HE 染色及免疫组化检查,了解肿瘤组织病理结构及 p53 基因在肿瘤组织内的表达情况。

2 结果

2.1 质粒的制备

按照上述方法制备的质粒 pCMV-myc-p53 经过纯化后测序鉴定结果表明所制备的质粒完全符合实验要求。

2.2 动物模型的建立情况及影像学检查结果

40 只实验兔中死亡 2 只(麻醉意外死亡 1 只,腹泻死亡 1 只),存活兔经影像学检查证实移植均获成功,其中 36 只所成肿瘤为孤立病灶,未见有肝内及远处转移,2 例出现腹腔及肺部转移。病灶直径

在 3 cm 左右的荷瘤兔有 35 只。接种 2 周后 CT 或 MR 扫描均能显示肿瘤。CT 平扫多呈等或低密度区,坏死区呈更低密度,增强扫描表现为边缘明显环状强化或非均匀强化,坏死区无强化。MRI 显示

肿瘤实质部分 T1WI 表现为均匀低信号,T2WI 为稍高信号或混杂信号,边缘清楚,坏死部分呈长 T1 长 T2 信号影,DWI 上瘤灶呈明显高信号,边界清晰,坏死区呈低信号(图 1~6)。



图 1 荷瘤兔 CT 平扫示病灶为低密度



图 2 CT 增强扫描示病灶周边环形强化

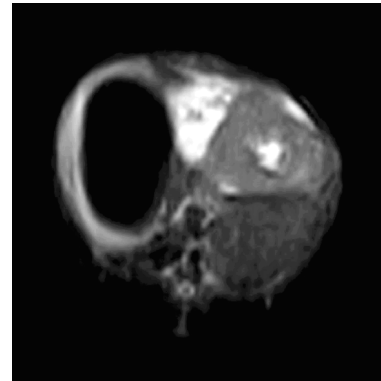


图 3 MRI T2WI 示病灶呈略高混杂信号,坏死区呈高信号

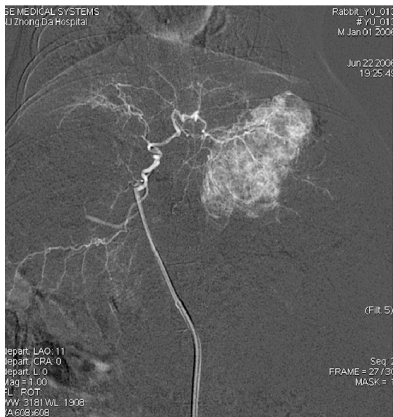


图 4 DSA 示肿瘤血管丰富,染色明显



图 5 病灶大体观

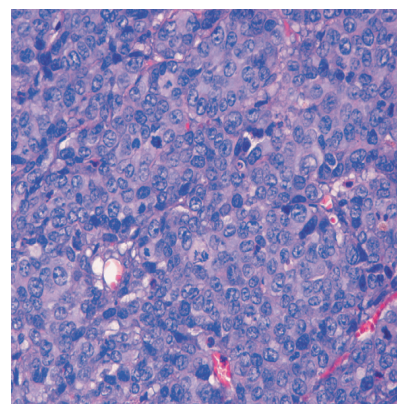


图 6 肿瘤组织病理所见(HE × 400)

2.3 基因治疗的结果

2.3.1 介入操作及实验动物情况 两组共 33 只荷瘤兔均成功施行经股动脉的肝动脉插管并超选至肿瘤供血动脉内,造影证实后成功注入实验试剂,术后所有实验兔均存活,48 h 内无动物死亡。

2.3.2 与对照组比较研究的结果 A、B、C 3 组的肿瘤组织在转染后 48 h 蛋白印迹法检测均可见特异性 p53 蛋白表达,但三者之间存在显著的浓度梯度差异,各条带用 Lab Work 4.5 软件进行光密度半定量分析的结果亦证实三者之间存在显著性差异。免疫组化检查表明三组在 p53 基因蛋白表达产物上有显著性差异。

2.3.3 p53 基因的量与转染效率的关系研究结果 不同剂量的 pCMV-myc-p53 与 LipofectAMINE 形成的复合物转染荷瘤兔 48 h 后,所取的肿瘤组织进行 Western Blot 检测均可见特异性 p53 蛋白表达,但 p53 基因的量与转染效率之间表现为曲线关系,

当 p53 的量小于 10 μ g 时,随着 p53 的增加,转染效率逐步增加,当 p53 的量大于 10 μ g 时,转染效率保持相对稳定。用 Lab Work 4.5 软件进行光密度半定量分析的结果亦证实这一趋势。免疫组化检查表明 p53 基因蛋白表达产物亦有上述趋势(图 7~10)。

3 讨论

VX2 肿瘤是由 Shope 病毒在兔皮肤上诱发而产生的乳头状瘤,在组织学上属鳞状细胞癌,经 72 次传代后仍可在兔体内移植的转移性肿瘤^[2],具有很强的侵袭转移能力。因其肿瘤血供丰富,类似人类肝细胞肝癌,常用于肝肿瘤影像诊断学、抗癌药物药动学和肿瘤治疗学的临床前研究^[3],兔 VX2 肝癌模型的应用使得原来停留在体外离体细胞的相关研究进入到在体研究阶段,其研究结果更接近人体的实际环境,更接近临床,对临床研究更具有指

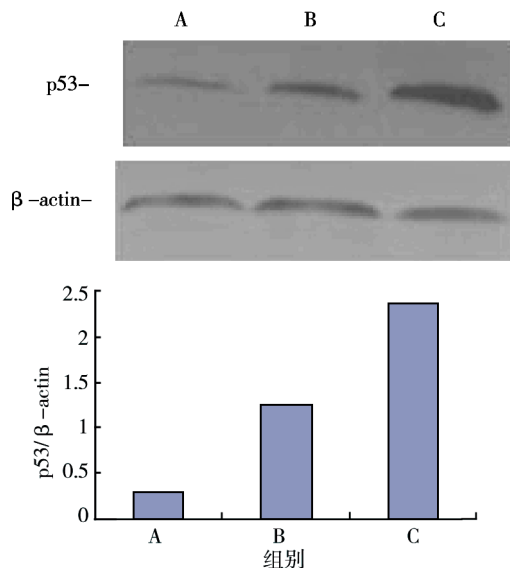


图 7 组织提取蛋白印迹法检测结果(A LipofectAMINE, B pCMV-myc-p53, C LipofectAMINE + pCMV-myc-p53) 下图为相应条带的光密度比值

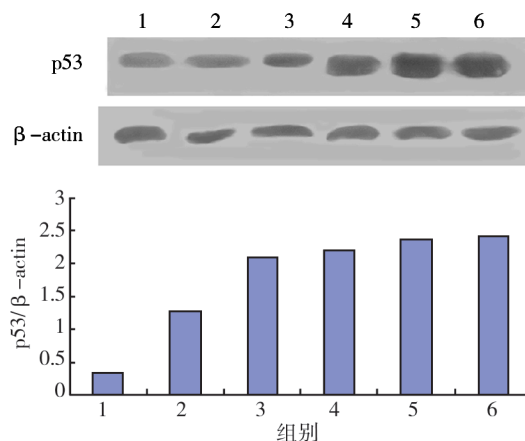


图 8 组织提取蛋白印迹法检测结果(1~6 组 p53 的量分别为 0、7.5、10、15、20 和 30 μ g, 与相应脂质的质量比为 1:3), 下图为相应条带的光密度比值

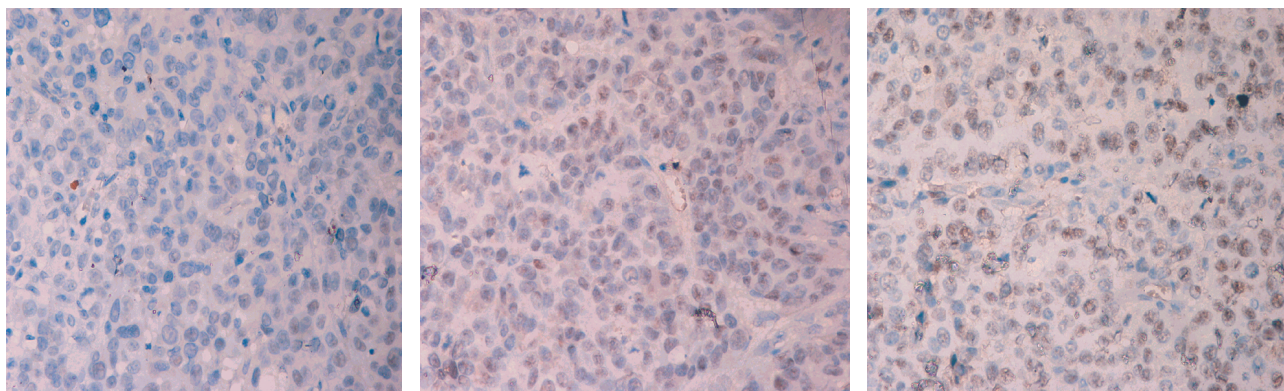


图 9 A、B、C 三组肿瘤组织免疫组化结果示 p53 蛋白表达由弱渐强($\times 400$, 阳性表现为细胞核中棕黄色染色)

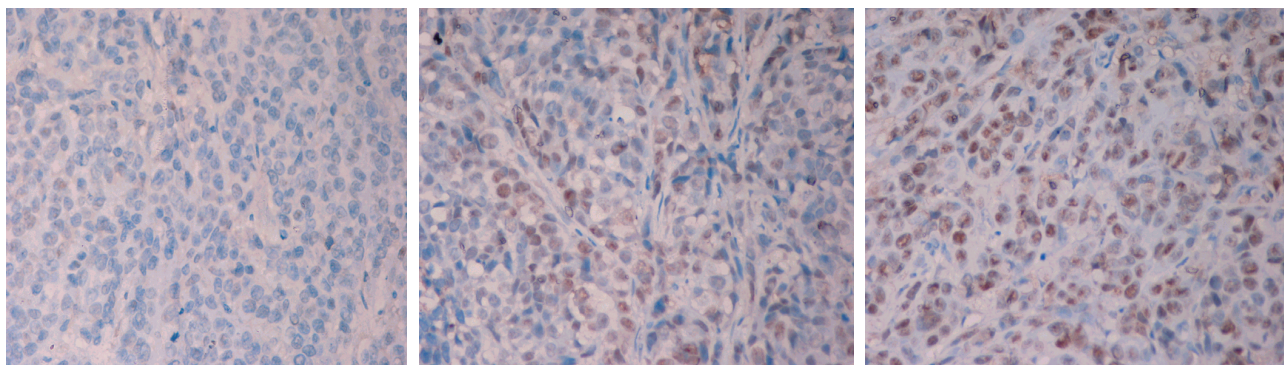


图 10 p53 的量分别为 0、7.5、10、15、20 和 30 μ g 转染的肿瘤组织的免疫组化 结果示自 0 ~ 10 μ g 阳性率逐渐增高, 自 10 ~ 30 μ g 阳性率相近

导意义,本研究应用兔 VX2 肝癌自体移植模型发现该模型制作简便、复制稳定、成瘤周期短,价格低廉,是合适的肝癌基因治疗的动物模型。

p53 是重要的抑癌基因,是目前抑癌基因研究中最令人瞩目者。在人类肿瘤中, p53 变异是最普遍的遗传异常,约半数以上人类肿瘤存在 p53 基因的

改变,而肝癌中超过 50% 存在 p53 基因突变,在 36% 的进展期肝癌中发现 p53 基因的突变和缺失,因而该基因被认为与肝癌有相关性^[4-5],许多学者发现导入野生型 p53 基因可以抑制体外培养的肿瘤细胞,同时对活体的肿瘤组织亦有较好的抑制作用^[6-9],研究发现 p53 基因主要通过下调原癌基因蛋

白的表达,抑制 Bcl-2 蛋白,增加线粒体膜的通透性而引起细胞的凋亡来治疗肿瘤,同时野生型 p53 可以减少 P-糖蛋白的表达而提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,因此,野生型 p53 基因的回复被认为是肿瘤有希望的治疗方法^[10,11],目前常用的基因治疗方法包括瘤体内注射及静脉用药,本研究结果显示,经动脉途径导入 p53 基因后蛋白印迹法检测证明 p53 基因成功转染了肿瘤细胞,免疫组化检查亦检测到相应的蛋白表达,说明经动脉途径导入 p53 基因是可行且有效的。

单纯基因的转染效率低下,不能满足临床基因治疗的需要,合适的载体是提高临床疗效和保证治疗安全性的必要因素,理想的基因转导载体应具有安全性好、转染特异性强、转染率高和操作简便等特点^[4]。以往常用的是病毒类载体,包括腺病毒及逆转录病毒,虽然病毒类载体具有转染效率高的优势,但腺病毒载体在使用过程中可引起急性感染及导致宿主体内的特异性免疫反应,加之 DNA 不整合到宿主细胞的染色体,因此表达时间短,逆转录病毒只能感染分裂复制的细胞,因而对高分化而不分裂的细胞就不能实施基因转移,逆转录病毒在辅助细胞中有同源重组为野生病毒而引起恶性转化的风险,同时其介导的基因转移操作复杂,技术要求高,因而限制了病毒类载体的广泛应用^[12,13]。

非病毒载体,主要是阳离子脂质体,是一种人工合成的单层或多层磷脂双分子层组成的封闭环形囊状结构,将 DNA 包在中心水相空间而转运的结构,脂质体作为载体时宿主体不会出现外源性病毒基因所致的特异性免疫反应,这是病毒载体无法避免的,同时该方法具有操作简便、携带外源基因大小不受限制、表达时间较腺病毒载体长、分裂期及非分裂期细胞均可被转染等特点,另外,该载体的注入方式多样,可经静脉注入、经导管或瘤体直接注入,因此是目前在实验研究中广泛运用的载体系统^[14],有研究表明,阳离子脂质体与基因组成的复合物可以避免血液成分中红细胞及网状内皮系统对基因转移系统的影响,扩展基因的循环范围,增强对转移病灶的治疗,同时还可以降低不良反应,复合物还具有很强的稳定性,因而有望取代病毒类载体成为基因治疗的新型载体。已有动物实验证实静脉应用脂质体作为载体具有较好的疗效^[15,16],本研究表明,运用脂质体作为载体较单纯导入基因具有更高的转染效率,同时在一定范围内,基因的量与转染效率成正比。另外,本研究还说明经动脉途径

导入基因同样可得到较好的转染效果。

在对转染效率的检测方法上,以往采用 PCR 法,显示特异性 P53 的蛋白条带,但此方法仅能定性分析,本实验采用蛋白印迹法检测法除了能通过条带直观地显示 P53 蛋白条带,还能通过 Lab Work 4.5 软件进行光密度半定量分析,能够更加准确地了解转染的效率,另外,本研究还对肿瘤组织进行了免疫组化检查,从病理学角度观察 p53 基因转染后的蛋白表达情况,使得对 p53 转染效率的检测更加全面、准确。但上述方法只是针对离体的肿瘤组织进行检测,不能实现在体检测,有研究利用放射自显影的方法,将碘化钠标记到 p53 基因上,在体外用 γ 相机来测定 p53 基因的转录及表达情况。另外,有学者将超顺磁性的探针标记在载体和基因组成的复合物上,通过磁共振成像的方法追踪基因的转染与表达,这些方法的应用将会使得在体检测基因的转录与表达成为可能,必将加速基因临床应用的进程。

综上所述,利用兔 VX2 移植肝癌模型进行肝癌动脉内基因治疗的研究是可行的,脂质体作为一种基因治疗的载体可以明显提高基因的转染效率,在一定范围内存在量-效关系,可经蛋白印迹法及免疫组化检测,为临床应用提供了科学的实验数据,但脂质体作为一种载体,其转染效率较病毒类载体低,因此,提高脂质体转染效率的方法还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Leong ASY. Epidemiology, risk factors, etiology, premalignant lesions and carcinogenesis[M]. //Leong ASY, Liew CT, Lau JWY, et al. Hepatocellular carcinoma: contemporary diagnosis, investigation and management. London: Arnold, 1999, 1-17.
- [2] Pauser S, Wanger S, Lippmann M, et al. Evaluation of efficient chemoembolization mixtures by magnetic resonance imaging therapy monitoring: An experimental study on the VX2 tumor in the rabbit liver[J]. Cancer Res, 1996, 56: 1863-1867.
- [3] 郭卫平,刘燕,王执民,等.兔肝 VX2 移植瘤改良模型的建立[J].中国医学影像技术,2002,18:397-399.
- [4] 卢勤,滕皋军. p53 基因治疗肿瘤的研究进展[J].中华放射学杂志,2000,34:659-661.
- [5] Habib NA, Hodgson HJ, Lemoine N, et al. A phase I/II study of hepatic artery infusion with wtp53-CMV-Ad in metastatic malignant liver tumours[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10: 2019-2034.
- [6] Bookstein R, Demers W, Gregory R, et al. P53 gene therapy in vivo of hepatocellular and liver metastatic colorectal cancer[J].

- Semin Oncol, 1996, 23: 66 - 77.
- [7] Hirao K, Sugita T, Kubo T, et al. Targeted gene delivery to human osteosarcoma cells with magnetic cationic liposomes under a magnetic field [J] Int J Oncol, 2003, 22: 1065 - 1071.
- [8] Gautam A, Waldrep JC, Densmore CL, et al. Growth inhibition of established B 16-F 10 lung metastases by sequential aerosol delivery of p53 gene and 9-nitrocamptothecin [J] Gene Ther, 2002, 9: 353 - 357.
- [9] Riva CM. Restoration of wild-type p53 activity enhances the sensitivity of pleural metastasis to cisplatin through an apoptotic mechanism [J] Anticancer Res, 2000, 20: 4463 - 4471.
- [10] Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, et al. Targeted delivery of oncogene-selective antisense oligonucleotides in neuroectodermal tumors: therapeutic implications [J] Ann N Y Acad Sci, 2004, 1028: 90 - 103.
- [11] Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis [J] Science, 2004, 303: 1010 - 1014.
- [12] McPake CR, Shetty S, Kitchingman GR, et al. Wild-type p53 induction mediated by replication-deficient adenoviral vectors [J] Cancer Res, 1999, 59: 4247 - 4251.
- [13] Bookstein R, Demers W, Gregory R, et al. p53 gene therapy in vivo of hepatocellular and liver metastatic colorectal cancer [J] Semin Oncol, 1996, 23: 66 - 77.
- [14] Mohr L, Yoon SK, Eastman SJ, et al. Cationic liposome-mediated gene delivery to the liver and to hepatocellular carcinomas in mice [J] Hum Gene Ther, 2001, 12: 799 - 809.
- [15] Gharwan H, Wightman L, Kircheis R, et al. Nonviral gene transfer into fetal mouse livers (a comparison between the cationic polymer PEI and naked DNA) [J] Gene Ther, 2003, 10: 810 - 817.
- [16] Ogris M, Wagner E. Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes [J] Somat Cell Mol Genet, 2002, 27: 85 - 95.

(收稿日期 2006-10-12)