Survivin 启动子控制 LRIG1 基因表达的重组腺病毒对人膀胱癌裸鼠移植瘤的治疗

孙家媛[1]，何振宇[1]，李凤岩[1*]，管迅行[1]，严泽军[2]
(1. 华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心放射治疗科，广东 广州 510060；2.宁波大学医学院附属宁波市第一医院泌尿外科，浙江 宁波 315010)

摘 要： 【目的】探讨 Survivin 启动子控制 LRIG1 基因表达的重组腺病毒对人膀胱癌裸鼠移植瘤的治疗作用及机制。【方法】建立膀胱癌裸鼠移植瘤模型，将成瘤裸鼠随机分为 3 组，Ad-Surp-LRIGl 组(尾静脉注射 Ad-Surp-LRIGl 上清液)、AD-LRIG1 组(尾静脉注射 Ad-LRIGl 上清液)、PBS 组(尾静脉注射 PBS)，观察各组裸鼠移植瘤生长情况并绘制肿瘤生长曲线；RT-PCR 和 Western blot 分别检测各组肿瘤组织中 LRIG1 和 EGFR mRNA 和蛋白的表达。【结果】Ad-Surp-LRIGl 组肿瘤生长速度明显慢于其他 2 组，治疗结束后 Ad-Surp-LRIGl 组肿瘤较其他 2 组轻，差异有统计学意义($F = 97.86$，$P < 0.001$)，Ad-LRIGl 组与 PBS 组相比差异无统计学意义($t = 1.73$，$P = 0.06$)。与其他两组相比，Ad-Surp-LRIGl 组 LRIG1 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高，而 EGFR 的 mRNA 和蛋白表达水平则显著降低($P < 0.01$)。【结论】Ad-Surp-LRIGl 在体外均能明显抑制膀胱癌的生长，其机制可能部分与 LRIG1 能下调 EGFR 的表达有关。

关键词：腺病毒载体；膀胱肿瘤；Survivin 启动子；LRIG1 基因；基因治疗
中图分类号：R737 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-3554(2012)05-0582-05

Tumor-suppressing Effect of Recombinant Adenovirus Encoding LRIG1 Gene Driven by Survivin Promoter in Nude Mice Heterotransplanted Models of Human Bladder Cancer

SUN Jia-yuan[1], HE Zhen-yu[1], LI Feng-yan[1*], GUAN Xun-xing[1], YAN Ze-jun[2]
(1.State Key Laboratory of Oncology in Southern China//Department of Radiation Oncology, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Department of Urology, Ningbo First Hospital, Medical College of Ningbo University, Ningbo 315010, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the treatment efficiency and mechanism of recombinant adenovirus encoding LRIG1 gene driven by survivin promoter in nude mice heterotransplanted models of human bladder cancer.【Methods】Heterotransplanted models of human bladder cancer cell line BIU87 cells in nude mice were established. The mice were randomly divided into 3 groups during the experiment: Ad-Surp-LRIGl group received viral supernatant solution of Ad-Surp-LRIGl by tail vein injection, Ad-LRIG group received viral supernatant solution of Ad-LRIG by tail vein injection, and PBS group received phosphate buffer solution (PBS). The growth of tumors was observed and the growth curve was mapped. The expression of LRIG1 and EGFR were examined by reverse transcription PCR (RT-PCR) and Western blot.【Results】The tumor growth rate in Ad-Surp-LRIGl group was slower than that in the other two groups. The tumor quality in Ad-Surp-LRIGl was lighter than that in the other two groups, the differences were statistically significant ($F = 97.86$, $P = 0.00$), the quality difference in Ad-LRIGl group and PBS group was not statistically significant difference ($t = 1.73$, $P = 0.06$). Compared with Ad-LRIGl group and PBS group, the expression of mRNA and protein of LRIG1 was obviously up-regulated and that of EGFR was down-regulated in Ad-Surp-LRIGl group ($P < 0.01$).【Conclusions】The recombinant adenoviral vector of Ad-Surp-LRIGl could inhibit significantly the growth of bladder cancer in vivo, the mechanism may be partly LRIG1 can downgrade the expression of EGFR.

Key words: adenoviral vector; bladder neoplasm; survivin promoter; LRIG1 gene; gene therapy
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(5): 582-586]

收稿日期：2011-12-22
基金项目：浙江省自然科学基金(Y2090805)
作者简介：孙家媛，硕士研究生，主治医师，研究方向：肿瘤的基础研究，E-mail：sun_jia_yuan@sina.com；* 通信作者：李凤岩，副主任医师，研究方向为肿瘤的放射治疗，E-mail：lfygz@126.com

肿瘤靶向性基因治疗是当今医学研究的热点之一，其基本原理是将具有组织特异性的启动子序列与抑癌基因整合，通过该启动子使抑癌基因只在特定的组织细胞中表达，从而提高肿瘤治疗的靶向特异性，减少或避免治疗过程中对正常组织细胞造成损害。Survivin 基因是一种抗凋亡基因,其表达产物 Survivin 蛋白在包括膀胱癌在内的多种肿瘤内大量表达,而在正常组织中不表达[1-2]。Sruvivin 基因中含有多转录起始位点,该位点内的 Survivin 启动子可以在转录水平调控 Survivin 基因的表达。研究发现,在肿瘤细胞内某些因子上调了 Survivin 启动子活性,启动了 Survivin 基因的表达,从而造成肿瘤细胞和正常细胞内 Survivin 蛋白的表达差异[3]。因此,将 Survivin 启动子用于表达载体中调控目的基因的表达时，只会在肿瘤细胞内特异性表达目的基因产物，从而起到增强基因治疗特异性及降低其毒副反应的效果;而将 Survivin 启动子克隆至腺病毒载体上取代其原有启动子时,由于 Survivin 启动子也同时调控了病毒本身结构基因的表达，因而这种重组腺病毒仅能在 Survivin 阳性细胞内复制,即为“条件复制型腺病毒”，从而避免了腺病毒复制对正常细胞的影响。为了解决基因治疗的靶向性，本课题组利用在前期研究中构建的含有 Survivin 启动子和 LRIG1 基因的重组腺病毒载体 Ad-Surp-LRIGl，对膀胱癌进行了体内治疗实验研究，证实该载体具有良好的靶向性,报道如下。

1　材料与方法

1.1　材　料

BALB/c 裸鼠（雌性,SPF 级)30 只,4 ~ 6 周龄,体质量 15 ~ 20 g,购自湖北省实验动物研究中心(合格证号:SCXK(鄂)2003-0005),饲养于华中科技大学同济医学院实验动物中心。PBS、RPMI-1640 购自美国 Sigma 公司,ECL 显色试剂盒购、逆转录试剂盒(立陶宛 Fermentas 公司)、Trizol(美国 Invitrogen 公司)、EGFR 兔抗人多克隆抗体（美国 Santa Cruz 公司)、LRIG1 兔抗人多克隆抗体(瑞典 Agrisera 公司)及相应二抗试剂盒购自武汉古泰生物公司,凝胶成像分析仪(LEICA Q550IW 德国),酶标仪(美国 Stratagene 公司)。含 LRIG1 基因的重组腺病毒载体 AD-LRIG1 和含 Survivin 启动子和 LRIG1 基因的重组腺病毒载体 Ad-Surp-LRIGl 由本课题组构建。

1.2　方　法

1.2.1　细胞株及细胞培养　人膀胱癌细胞株 BIU87(北京大学泌尿外科研究所),人胚肾 293 细胞(HEK293),分别培养于含 100 mL/L 胎牛血清、青霉素 100 U/mL 及链霉素 100 μg/mL 的 RPMI-1640 培养液中,细胞在相对湿度为 95%、37 ℃、体积分数 5% CO_2 的环境中单层生长,每 3 d 换液传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2　重组腺病毒的扩增、纯化和滴度测定　鉴定正确的重组腺病毒 Ad-Surp-LRIGl 和 AD-LRIG1 分别经 *Pac* Ⅰ酶切后用 Lipofectamine 2000 介导分别转染 293 细胞，于转染后不同时期在荧光显微镜下观察细胞 EGFP 的表达状况，待有较明显的病毒克隆斑或蚀斑形成后,收集细胞,反复冻融 3 次裂解细胞。收集上清反复扩增至需要的病毒量。氯化铯梯度离心纯化病毒,以 50%细胞培养物感染量 (50% tissue culture infective dose, TCID50)法测定病毒滴度。

1.2.3　重组腺病毒 Ad-Surp-LRIGl 的鉴定　采用 PCR方法,以病毒基因组 DNA 为模板,应用 LRIG1 基因的上下游引物(引物设计参照文献[4])和 Survivin 启动子的上下游引物（上游:5′-CTGGTACCGCAATGGCACAAT-3′；下游 5′-GTGCTAGCCGCACGCCCTCTT-3′）进行 PCR 反应,再次鉴定重组腺病毒 Ad-Surp-LRIGl。

1.2.4　重组腺病毒 Ad-Surp-LRIGl 的体内抑瘤实验　取对数生长期的膀胱癌细胞株 BIU87，调整细胞浓度为 2×10^7 mL^{-1}，每只裸鼠背部皮下接种 0.2 mL。30 只裸鼠中,造模成功 26 只。将裸鼠随机分 3 组,Ad-Surp-LRIGl 组(9 只,尾静脉注射 Ad-Surp-LRIGl 上清液)、AD-LRIG1 组(9 只,尾静脉注射 Ad-LRIGl 上清液)、PBS 组(8 只,尾静脉注射 PBS)，待第 4 周时肿瘤长至约 0.4 ~ 0.5 cm 时开始尾静脉注射病毒上清液 0.1 mL 或 PBS 0.1 mL,共 2 次,注射间隔 72 h,各组裸鼠分别于注射当天及注射后第 5、9、13、17、2l、25、30 天用游标卡尺测量肿瘤最大长径(a)、横径(b),计算肿瘤体积:肿瘤体积=($a \times b^2$)/2,并绘制肿瘤生长曲线。实验结束后,完整剥取肿瘤,称其质量。计算抑瘤率:抑瘤率=(1-实验组平均瘤质量/对照组平均瘤质量)×100%。同时切取 3 组裸鼠的心、肝、肾组织行

HE 染色检查有无异常。

1.2.5 LRIG1、EGFR mRNA 的表达 用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测,分别取 3 组裸鼠肿瘤组织 50 mg,用 Trizol 裂解肿瘤组织,提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,然后 PCR 扩增。引物的设计及反应条件参照文献[5],引物由上海博亚公司合成。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,紫外光下观察、拍照。

1.2.6 LRIG1、EGFR 蛋白的表达 用 Western blot 检测,分别取 3 组裸鼠肿瘤组织 50 mg,加入约 5 倍湿重的裂解缓冲液,粉碎匀浆,4 ℃下 12 000 ×*g* 离心 15 min, 取上清液,Bradford 法测定其中总蛋白浓度。在 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳,上样量为 30 μg 总蛋白。电泳完毕后, 使用电转移仪(Biometra)将样品转至 PVDF 膜。用含 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入 LRIG1 兔抗人多克隆抗体,工作浓度 1∶5 000,EGF 兔抗人多克隆抗体和 β-actin 兔抗人多克隆抗体,工作浓度 1∶2 000,室温作用 1 h。洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体,工作浓度 1∶1 000,室温作用 1 h,采用 ECL 显色。

1.2.7 统计学方法 采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料用率表示。组间计量资料比较采用成组设计的 t 检验,组内比较采用配对 t 检验,率的比较采用 χ^2 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组腺病毒的扩增、纯化和滴度测定

将 Ad-Surp-LRIGl 和 Ad-LRIG 分别转染 HEK-293 细胞, 荧光显微镜下观察可见绿色荧光蛋白显著表达,证实转染成功。Ad-Surp-LRIGl 病毒滴度为 1.4×10^{10} pfu/mL,Ad-LRIG1 病毒滴度为 1.7×10^{11} pfu/mL。

2.2 重组腺病毒 Ad-Surp-LRIGl 的鉴定

用 LRIG1 和 Survivin 的上下游引物做 PCR 鉴定, 分别扩增出 892 bp 的 LRIG1 和 440 bp 的 Survivin 条带, 说明重组腺病毒中带有 Survivin 启动子及 LRIG 基因片段(图 1)。

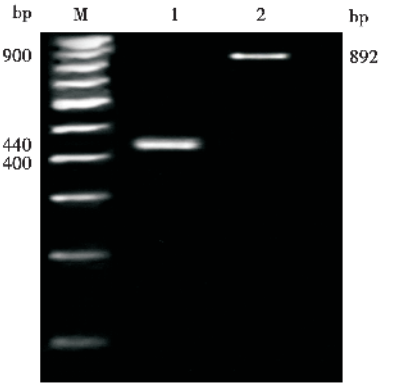


图 1 Ad-Surp-LRIGl 病毒的鉴定

Fig. 1 Virus identification of Ad-Surp-LRIGl

M: 100 bp DNA marker; 1: Survivin Amplification fragmen; 2: LRIG1 Amplification fragment Amplification

2.3 重组腺病毒膀胱癌移植瘤的抑制作用

治疗前各组裸鼠肿瘤大小差异无统计学意义($F = 0.01$, $P = 0.10$),提示各组肿瘤体积具有可比性。从肿瘤生长曲线可以看出(图 2),治疗开始后第 9 天出现明显差异,Ad-Surp-LRIGl 组肿瘤生长速度明显慢于其他 2 组, 治疗结束后可见 Ad-Surp-LRIGl 组肿瘤较其他 2 组轻,差异有统计学意义($F = 97.86$, $P < 0.001$),Ad-LRIGl 组与 PBS 组相比差异无统计学意义($t = 1.73$, $P = 0.06$),说明 Ad-LRIGl在体内并不能明显抑制肿瘤的生长(表 1)。

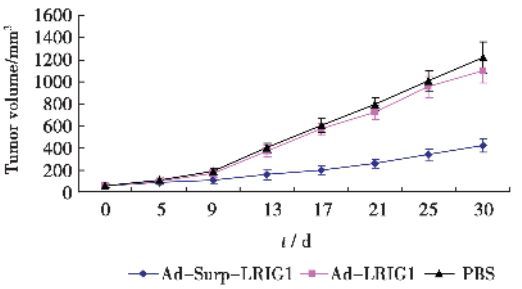


图 2 各组裸鼠移植瘤生长曲线

Fig.2 The growth curves of different group

2.4 肿瘤组织的病理变化

光镜下发现,Ad-Surp-LRIGl 组肿瘤细胞排列稀疏分散,结构紊乱,有片状坏死,多为纤维组织所代替, 部分肿瘤细胞胞质空泡变性, 染色质疏松,部分细胞可见核固缩。PBS 组和 Ad-LRIGl 组可见大量瘤细胞紧密排列,间质极少,肿瘤血管丰富,细胞形态和细胞核呈多行性,核大深染,核分裂相多见。3 组裸鼠的心、肝、肾组织 HE 染色病理切片均未见明显改变, 说明 Ad-Surp-LRIGl 对裸鼠的正常组织无明显损害。

表 1　重组腺病毒对膀胱癌移植瘤的抑制作用

Table 1　Tumor inhibitory effect of recombinant adenovirus

Group	Case	Tumor volume before treatment/mm^3	Tumor mass after treatment/g	Inhibitation rate/%
PBS	8	56.11 ± 17.95	1.28 ± 0.14	–
Ad-LRIGl	9	56.75 ± 18.34	1.15 ± 0.12	10.02
Ad-Surp-LRIGl	9	57.37 ± 17.73	0.44 ± 0.06	65.62

2.5　各组移植瘤中 LRIG1 和 EGFR mRNA 的表达

RT-PCR 结果表明,Ad-Surp-LRIGl 组中 LRIG1 mRNA 的表达水平（1.98 ± 0.11）较 Ad-LRIGl 组(0.41 ± 0.05)和 PBS 组(0.40 ± 0.05)明显升高,差异有统计学意义(F = 851.34,P = 0.00);Ad-LRIGl 组和 PBS 组相比,差异无统计学意义(t = 0.39,P = 0.71)。Ad-Surp-LRIGl 组中 EGFR mRNA 的表达水平（0.46 ± 0.04）较 Ad-LRIGl 组(1.28 ± 0.05)和 PBS 组(1.31 ± 0.06)明显降低,差异有统计学意义（F = 591.21,P = 0.00）;而 Ad-LRIGl组和 PBS 组相比,差异无统计学意义（t= 0.10,P = 0.33;图 3)。

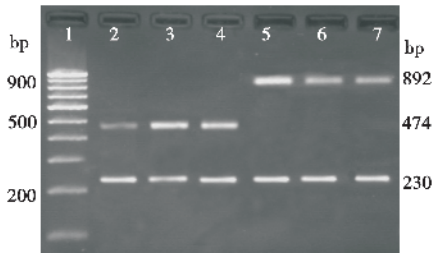


图 3　RT-PCR 检测三组肿瘤组织中 LRIG1 和 EGFR 的 mRNA表达

Fig.3　The mRNA expression of LRIG1 and EGFR were examined by reverse transcription PCR (RT-PCR)

M: 100 bp DNA marker; 2,5: Ad-Surp-LRIGl group; 3,6: Ad-LRIGl group; 4,7: PBS group (LRIG1:892 bp; EGFR:474 bp; GAPDH:230 bp)

2.6　各组移植瘤中 LRIG1 和 EGFR 蛋白的表达

Western blot 分析显示,Ad-Surp-LRIGl 组中 LRIG1 的蛋白表达（3.04 ± 0.14）较 Ad-LRIGl 组(1.13 ± 0.03)和 PBS 组(1.05 ± 0.03)明显升高,差异有统计学意义(F = 704.32,P = 0.00);Ad-LRIGl 组和 PBS 组相比,差异无统计学意义(t = 1.24,P = 0.24)Ad-Surp-LRIGl 组中 EGFR 的蛋白表达(0.67 ± 0.03)较 Ad-LRIGl 组(1.73 ± 0.06)和 PBS 组(1.69 ± 0.10) 明显降低, 差异有统计学意义(F = 282.74,P = 0.00);Ad-LRIGl 组和 PBS 组相比,差异无显著性(t = 0.76,P = 0.47)。结果如图 4。

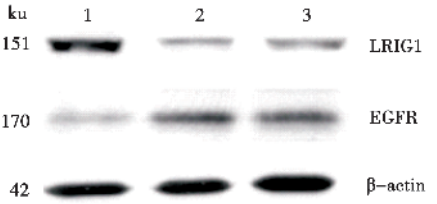


图 4　Western blot 检测 3 组肿瘤组织中 LRIG1 和 EGFR 蛋白的表达

Fig.4　The protein expression of LRIG1 and EGFR were examined by Western blot

1: Ad-Surp-LRIGl group; 2: PBS group; 3: Ad-LRIGl group

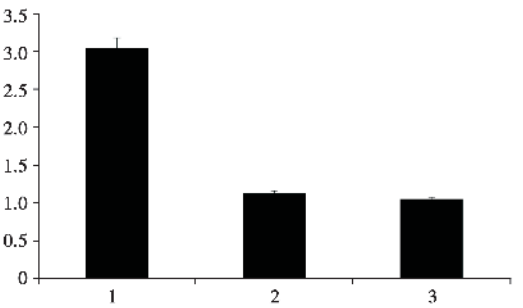


图 5　3 组肿瘤组织中 LRIG1 蛋白的表达

Fig.5　The protein expression of LRIG1

1: Ad-Surp-LRIGl group; 2: PBS group; 3: Ad-LRIGl group

3　讨　论

腺病毒由于具有嗜上皮细胞性、对人致病性低、能同时表达多个基因、能有效进行增殖、滴度高等优点,是基因治疗中使用最广泛的载体之一[6]。但由于腺病毒转染细胞没有特异性,因此除了能在肿瘤细胞中表达目的基因产物外，还会在正常细胞中表达这些产物，从而带来某些潜在的

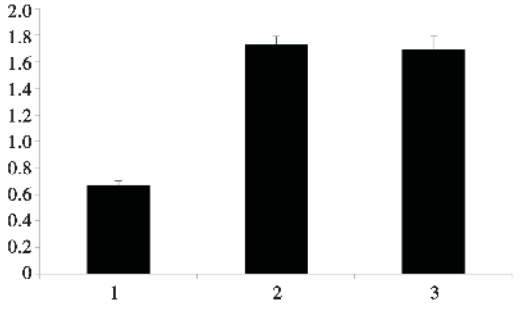


图 6　3 组肿瘤组织中 EGFR 蛋白的表达

Fig. 6　The protein expression of EGFR

1：Ad-Surp-LRIGl group；2：PBS group；3：Ad-LRIGl group

Legend：Data from four experiments

毒副作用，而且病毒在体内的复制本身就会对正常细胞产生影响。因此，如何调控腺病毒载体在肿瘤细胞中特异性复制并表达目的基因产物，最大限度地避免治疗的副作用是目前基因治疗研究的热点。

LRIG1 基因是 Nilsson 等在人类基因组中找到的与果蝇 Kekkon-1 基因同源的一类基因，该基因定位于人染色体 3p14.3 位点上，在人类许多肿瘤中都可以检测到该位点肿瘤基因的杂合性缺失[7]，这提示 LRIG1 可能是一种新的抑癌基因。我们的前期研究也显示，人膀胱癌细胞系 BIU87 转染野生型 LRIG1 基因后，细胞的增殖、运动和侵袭能力受到明显抑制[4,8]。因此我们推测，构建携带有 Survivin 启动子和抑癌基因 LIRG1 的重组条件复制型腺病毒，不仅能够在肿瘤细胞内特异性表达目的基因产物，起到杀伤肿瘤细胞的目的，还不会对正常细胞造成不良影响，尽可能避免目前基因治疗的很多副反应。本实验证实了我们的设想。

因常用的肿瘤内局部多点注射方法只能应用于实验室研究，不能应用于临床，故本研究中治疗方法和临床接轨，通过裸鼠尾静脉注射，发现 Ad-Surp-LRIGl 能明显抑制膀胱癌裸鼠移植瘤的生长，而且对裸鼠的正常组织无明显损害，更进一步说明 Ad-Surp-LRIGl 具有良好的靶向性。研究中通过 Western blot 和 RT-PCR 检测显示，与 Ad-LRIGl 组和 PBS 组相比，Ad-Surp-LRIGl 组肿瘤组织中 LRIG1 的表达在转录水平和蛋白水平显著增强，而 EGFR 表达则明显减弱。EGFR 是原癌基因 c-erbB-2 的表达产物，是一种有蛋白激酶功能的跨膜蛋白，它参与上皮增生过程的跨膜信号传导，是细胞膜信号传递过程中的重要物质，当 EGFR 介导的信号通路中某一成分的基因发生易位、突变、丢失或重排等都可引起细胞恶变，其在多种肿瘤细胞的生长、增殖、分化、黏附和迁移中起重要作用[9]。本研究显示 LRIG1 基因参与形成 EGFR 的负反馈环路，并且是 EGFR 的负性调节体，这可能是 LRIG1 能抑制肿瘤生长的机制之一。

综上所述，Survivin 启动子驱动的 LRIG1 基因重组腺病毒载体具有良好的肿瘤靶向特异性，能抑制膀胱癌的生长，有望实现膀胱癌的靶向基因治疗。由于 Survivin 启动子的活性上调与 LRIG1 基因的表达下调不仅仅局限于膀胱癌中，因此本研究结果也为其他肿瘤的基因治疗提供了新的思路。

参考文献：

[1] Pennati M, Folini M, Nadia Z. Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(6): 1133-1139.

[2] Shariat SF, Karakiewicz PI, Godoy G, et al. Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder:a multicenter external validation study[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(22): 7012-7019.

[3] Konopka K, Spain C, Yen A, et al. Correlation between the levels of survivin and survivin promoter-driven gene expression in cancer and non-cancer cells[J]. Cell Mol Biol Lett, 2009, 14(1): 70-89.

[4] 叶章群，严泽军，杨为民，等. LRIG1 基因对膀胱癌细胞侵袭力的影响[J].中华外科杂志，2007，45(4)：258-261.

[5] 叶飞，郭东升，易伟，等. LRIG1 过度表达 LRIG1 基因逆转人胶质瘤侵袭性的机制[J].中华实验外科杂志，2005，22(2)：200-202.

[6] Fukazawa T, Matsuoka J, Yamatsuji T, et al. Adenovirus -mediated cancer gene therapy and virotherapy[J]. Int J Mol Med, 2010, 25(1): 3-10.

[7] Hedman H, Nilsson J, Guo D, et al. Is LRIG1 a tumour suppressor gene at chromosome 3p14.3? [J]. Acta Oncol, 2002, 41(4): 352-354.

[8] Yang WM, Yan ZJ, Ye ZQ, et al. LRIG1, a candidate tumour-suppressor gene in human bladder cancer cell line BIU87[J]. BJU Int, 2006, 98(4): 898-902.

[9] Mason RA, Morlock EV, Karagas MR, et al. EGFR pathway polymorphisms and bladder cancer susceptibility and prognosis[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(7): 1155-1160.

（编辑　张恩健）