

· 实验研究 ·

逆转录病毒介导 Dm-dNK 基因在乳腺癌细胞中的表达及细胞杀伤毒性

赵蕾 郑新宇 张鸿 李继光 徐惠绵

【摘要】 目的 探讨可否将果蝇多底物脱氧核苷酸激酶(Dm-dNK)表达于乳腺癌细胞,以及其对肿瘤细胞的杀伤效果。**方法** 构建表达 Dm-dNK 复制缺陷的逆转录病毒载体;重组病毒感染乳腺癌细胞系 MCF7(ER+)及 MDA-MB-231(ER-),测定感染细胞酶的活性及对于核苷酸类似物 araT 及 araC 的细胞毒性。**结果** Dm-dNK 可以在乳腺肿瘤细胞中表达并具有酶的活性(Western 印迹显示细胞内的 Dm-dNK 蛋白表达);同时,感染的肿瘤细胞对 araT 及 araC 的敏感性增加。**结论** Dm-dNK 可以定位表达于乳腺肿瘤细胞核并保持酶的活性,Dm-dNK 可能成为乳腺肿瘤分子化疗的新方法。

【关键词】 基因治疗; 分子化疗; 核苷酸激酶; 核苷酸类似物

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

Retrovirus-mediated expression of Dm-dNK in breast cancer cells and its cytotoxicity ZHAO Lei, ZHENG Xin-yu, ZHANG Hong, LI Ji-guang, XU Hui-mian. Third Division of Medical Laboratory Technology Center, China Medical University, Shenyang 110000, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of nucleoside analog phosphorylation by Dm-dNK (*Drosophila melanogaster* deoxyribonucleoside kinase), and the killing effect as a novel suicide gene in breast cancer cell lines. **Methods** A replication-deficient retroviral vector that expresses Dm-dNK was created, and the human breast cancer cells MCF7 (ER+) and MDA-MB-231 (ER-) were transduced with the recombinant retrovirus. The enzymatic activity and the sensitivity of the untransfected cells and the cells infected with either GFP (green fluorescent protein) vector alone or the pLE-Dm-dNK-GFP to pyrimidine nucleoside analogs araT (1-β-

基金项目: 国家自然科学基金(30371625)和“863”计划(2006AA02Z493)资助项目

作者单位: 110001 沈阳,中国医科大学实验技术中心三部(赵蕾),基础医学院(张鸿),第一附属医院乳腺外科(郑新宇、李继光、徐惠绵)

通讯作者: 郑新宇, E-mail: xyzheng@mail.cmu.edu.cn

Darabinofuranosylthymine) and araC (1- β -D-arabinofuranosylcytosine) were determined. **Results** It was showed that the Dm-dNK was enzymatically active and that the over-expression of the enzyme in the tested cell lines resulted in an increased sensitivity to the cytosine nucleoside analogs araT and araC. **Conclusions**

Dm-dNK can be locally overexpressed in the nuclei of breast cancer cells and it retains enzymatic activity. It may contribute to the development of novel breast cancer treatment strategies.

【Key words】 Gene therapy; Molecular chemotherapy; Nucleoside analogs; Nucleoside kinase

2000 年中国医科大学实验技术中心从黑腹果蝇中成功分离出一种多底物的脱氧核苷酸激酶(drosophila melanogaster deoxyribonucleoside kinase, Dm-dNK), 并对其是否可作为分子化疗基因进行了评估^[1-4]。为了探讨该系统是否可以用于乳腺癌治疗, 本研究利用逆转录病毒作为载体, 成功将 Dm-dNK 转入乳腺癌细胞系。本研究发现: Dm-dNK 可以在乳腺肿瘤细胞中表达并保持其酶的催化活性; Dm-dNK 的表达增加了某些核苷酸类似物的敏感性。该系统的建立可能为乳腺肿瘤的治疗开辟另一条新的分子化疗途径。

1 材料与方法

1.1 质粒载体的构建

pLEGFP-N1 (Clontech 公司) 质粒载体用于构建质粒。Dm-dNK 序列插入 pLEGFP-N1 质粒载体的 *Xho* I-*Bam* H I 位点^[4]; 质粒用 NucleoBond 药盒 (Clontech 公司) 纯化。纯化的质粒经 ABI310 测序仪 (Perkin Elmer Life Sciences 公司) 测序确认。

1.2 细胞培养及转染

RetroPack PT67 包装细胞购于 CLONTECH 公司; MCF7 (ER+) 及 MDA-MB-231 (ER-) 乳腺癌细胞购于美国 ATCC (American Type Culture Collection) 公司。MCF7 乳腺癌细胞培养于 RPMI 1640 培养液; MDA-MB-231 细胞培养于 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养液; 培养液外加 10% 小牛血清 (Gibco BRL 公司), 100 U/ml 青霉素及 0.1 mg/ml 链霉素。细胞生长于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱。

构建质粒转染 PT67 包装细胞, 收集病毒, 感染肿瘤细胞的方法详见文献[4]。转染细胞加 1.2 mg/ml 遗传霉素 (Geneticin, Life Technologies, Inc. 公司) 用于选择稳定转染质粒的细胞克隆。Olympus E600 型显微镜加 SPOT RT 数字相机用以观察及荧光照相。细胞核应用 DAPI (Molecular Probes 公司) 复染。

1.3 Western blot 分析及酶活性测定

细胞蛋白提取液的准备见文献[2]。NuPAGE™ 4% ~ 12% Bis-Tris 聚丙烯酰胺凝胶(美国 Invitrogen 公司)电泳分离蛋白提取液,转膜,PBS 缓冲液稀释牛血清蛋白至 2%,摇床洗膜 1 h 以阻断背景蛋白。加入 Living colors® A. v. 抗 GFP 抗体(美国 Clontech 公司)室温下孵育蛋白转入膜 2 h,TBS 缓冲液洗膜 3×10 min,碱性磷酸结合的抗兔 IgG 第二抗体(美国 Sigma 公司)1:5000 稀释,孵育 1 h;TBS 缓冲液洗膜 3×10 min,碱性磷酸酶免疫复合物用 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)及硝基四氮唑蓝(nitro blue tetrazolium, Sigma)显色。酶活性测定实验方法见文献[2], $3.0 \mu\text{mol/L}$ [methyl- ^3H]-dThd(Moravsek Biochem)及 $2 \mu\text{mol/L}$ 非标记的 dThd(Sigma 公司)用于酶促反应中。

1.4 细胞毒性实验

细胞毒性实验(MTT 比色法)参考 Hussain 的方法^[5]。准备细胞于 96 孔培养板中,每孔约 3000 个细胞。培养 24 h 后,弃原培养液加入不同浓度的药物 araT(Lilly Research Laboratories 公司)和 araC(Sigma 公司),含药培养液更换 1 次。用药物 3 ~ 4 d 后,小心吸去上清液,加入二甲亚砜(DMSO)100 ml,在振荡器上轻轻振荡 5 min 后用酶标仪于 490 nm 处测吸光度(A 值)。细胞成活测定使用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Boehringer Mannheim 公司)测定,每个实验至少重复 3 次。

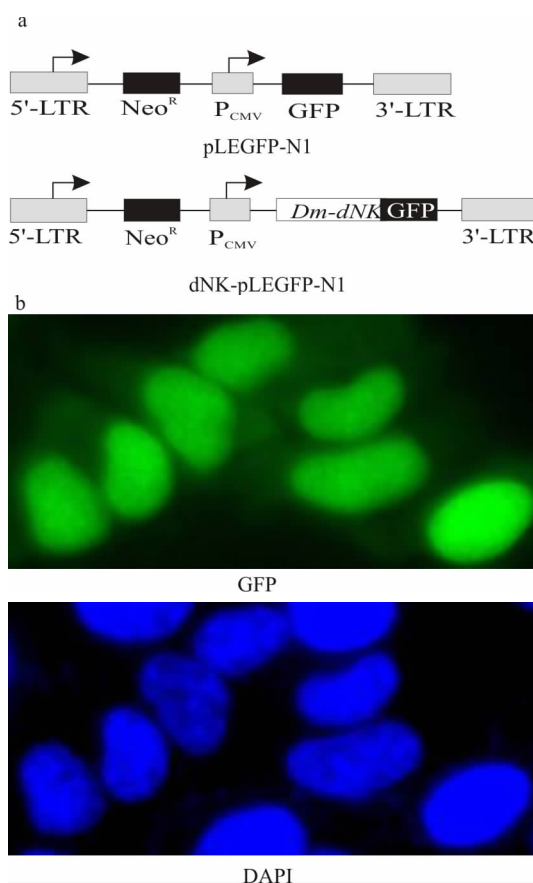
1.5 统计分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Students *t* 检验行组间统计学分析(GraphPad Prism 3 软件)。

2 结果

2.1 Dm-dNK 在乳腺肿瘤细胞核中表达并保持酶的活性

为探讨 Dm-dNK 的亚细胞表达位点,本研究将 Dm-dNK 克隆于 pLEGFP-N1 C 端与 GFP 产生融合蛋白(图 1a);逆转录病毒感染的 MCF7 细胞显示出点状带绿色的荧光表达(图 1b);与细胞核特异染料 DAPI(蓝色)重叠的荧光显色,显示出 Dm-dNK 蛋白明确表达于细胞核;且稳定表达于细胞核的 Dm-dNK 细胞(绿色荧光)大于视野的 90%;这与在其他肿瘤中的表达位点类似^[2]。在 MCF7 细胞系中,应用抗 GFP 抗体的 Western blot 实验可检测出一个约 $M_r 55\ 000$ 的蛋白表达条带(图 2a),与 Dm-dNK 和 GFP 的总和大小相吻合。为评估线粒体表达 Dm-dNK-GFP 融合蛋白的酶活性,本研究测定了感染细胞蛋白提取液磷酸化脱氧胸苷嘧啶(dThd)的能力(图 2b)。与非感染的细胞及只表达 GFP 的转染细胞相比,其磷酸化 dThd 的能力提高了近 20 倍。



a: pLEGFP-N1 表达 Dm-dNK 载体的构建;b:感染表达 pLEGFP-N1 质粒的 MCF7 细胞的荧光显微镜下图像(细胞核用 DAPI 染剂复染, ×40)

图 1 Dm-dNK 在 MCF7 细胞核中的表达

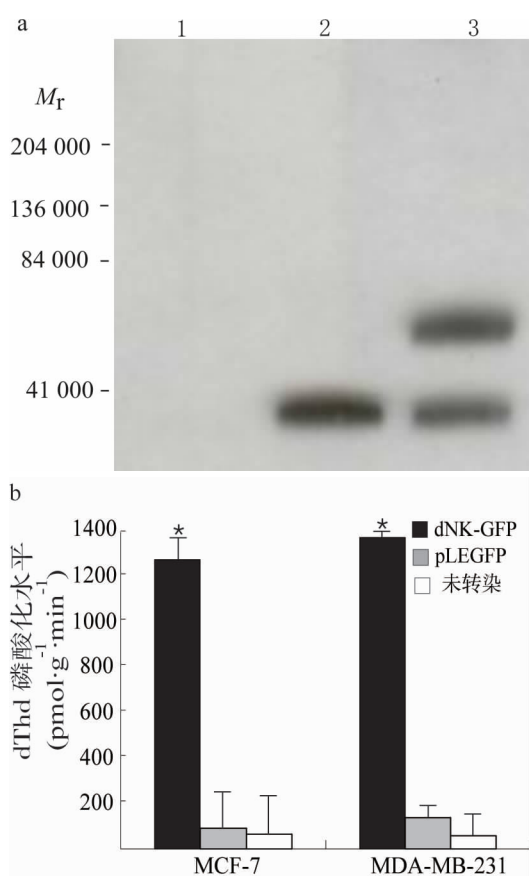
2.2 表达 Dm-dNK 的乳腺癌细胞增加了对某些核苷酸类似物的细胞毒性

本研究同时比较测定了嘧啶核苷酸类似物 araT 及 araC 对 Dm-dNK-GFP 感染细胞、GFP 单独转染细胞及非转染细胞的细胞毒性(图 3)。细胞毒性测定于上述药物加入感染细胞后的 3 ~ 4 d。对于上述 2 种核苷酸类似物, pLEGFP 单独转染细胞及非转染细胞的细胞毒性差异相差不到 2 倍。与单独表达 GFP 的转染细胞相比,表达 Dm-dNK-GFP 的 MCF-7 细胞及 MDA-MB-231 乳腺癌细胞显著增加了对 araT 及 araC 的敏感性(图 3)。

3 讨论

虽然乳腺癌有外科治疗、化学治疗、放射治疗及内分泌治疗等多种综合治疗手段,但是对于晚期及复发肿瘤,治愈率仍低于 5%^[6]。同时,化学治疗、放射治疗也会给患者带来较严重的副作用和沉重的经济负担。因此,对于早期微转移病灶,特别是晚期转移性肿瘤就需要更有效的治疗手段。

具有细胞毒性的核苷酸类似物可以作为抗肿瘤的化疗药物。其作用机制



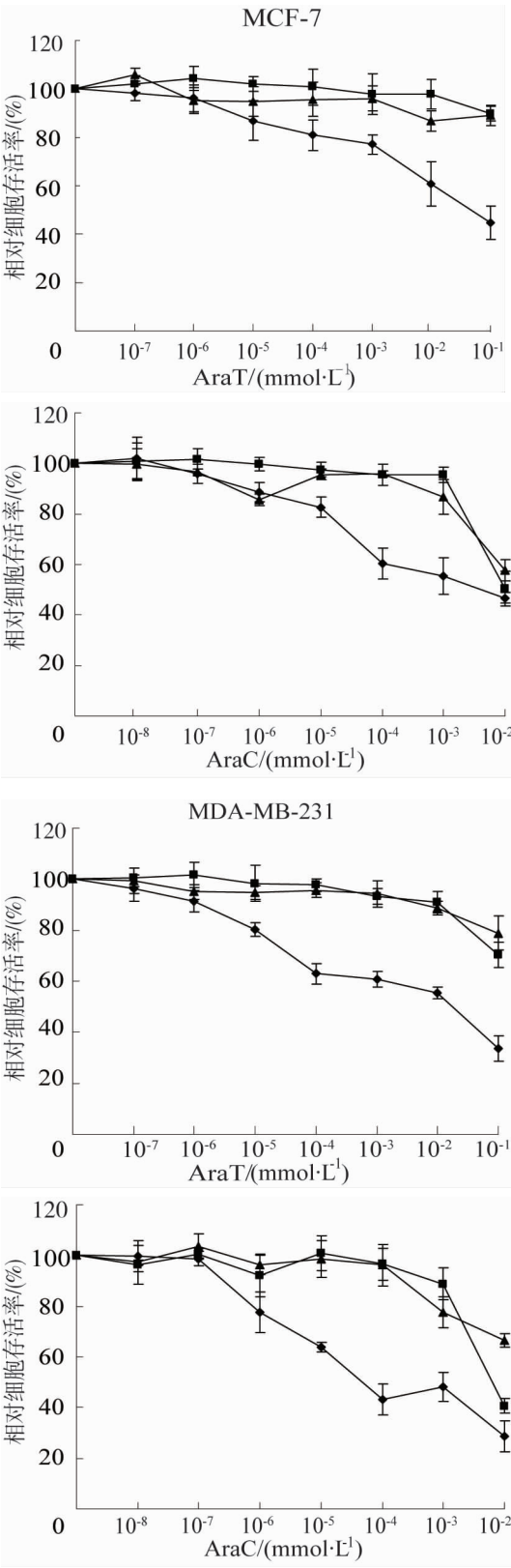
a: 抗 GFP 抗体对转染细胞的 Western blot 分析; 1: 未转染; 2: pLEGFP; 3: dNK-GFP

b: Dm-dNK 酶活性测定 (测定转染与非转染 MCF7 及 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的 dThd 磷酸化水平); * $P < 0.01$, 与其他组比较

图 2 感染细胞的蛋白表达及 dNK-GFP 的酶活性测定

是:细胞内的核苷酸类似物被核苷酸激酶磷酸化成三磷酸状态;在 DNA 复制及修复过程中,磷酸化的核苷酸类似物可以整合到肿瘤细胞 DNA 链中,致使 DNA 链复制延伸终止,导致细胞死亡。近 10 年来,各类种属来源的核苷酸激酶基因被用来探讨是否可以作为“自杀”基因用于肿瘤基因/癌前药物的分子化疗策略^[7]。该策略是基于核苷酸激酶在肿瘤细胞中过度表达,而该酶能磷酸化并激活具细胞毒性的核苷酸类似物。除杀死表达核苷酸激酶的细胞,磷酸化的代谢物还可通过所谓的缝隙连接 (Gap Junction) 进入邻近细胞而杀死非表达激酶的周边细胞,这种现象被称做“旁观者效应”^[8-9]。单纯疱疹病毒的胸腺嘧啶激酶 1 型 (herpes simplex type-1 thymidine kinase) 结合核苷酸类似物更昔洛韦 (GCV ganciclovir) 是目前研究最多的肿瘤分子化疗系统^[7,9-10],且已进入临床 III 期试验^[11]。

分子化疗的方法治疗乳腺肿瘤目前已进入临床 I 期试验。Pandha 等^[12]报道了利用 HER-2 启动子驱动胞嘧啶脱氨酶 (cytosine deaminase, CD) 治疗乳腺癌的临床 I 期试验;结果显示 11 例患者中有 9 例 HER-2 阳性的细胞内可以



▲:非感染细胞;■:GFP 感染细胞;◆:pLE-dNK-GFP 感染细胞

图3 表达 Dm-dNK 乳腺癌细胞系对于 araT 及 araC 的细胞毒性

表达 CD, 12 例患者中有 4 例显示肿瘤缩小。Braybrooke^[13]报道利用逆转录病毒 P450 2B6(CYP2B6) 基因的临床 I 期试验, 显示 1 例乳腺癌患者达到部分缓解, 4 例(33%)病情稳定。2000 年中国医科大学实验技术中心从黑腹果蝇中成功分离出 Dm-dNK, 并对其是否可以用做分子化疗基因进行了评估^[1-4]。结果显示: 由于 C 末端的核定位信号(nuclear localization signal, NLS), Dm-dNK 可以表达于人体细胞的细胞核^[2]。将核定位信号人工突变后, Dm-dNK 变为在肿瘤细胞质中表达; Dm-dNK 的细胞质内表达与细胞核内表达相比, 其酶的活性、细胞对核苷酸类似物的敏感性以及旁观者效应, 均没有明显区别^[4]。为探讨多底物、高催化活性的 Dm-dNK 基因是否可用于乳腺肿瘤的分子化疗, 本研究利用逆转录病毒介导 Dm-dNK 感染乳腺癌细胞系 MCF-7(ER+) 及 MDA-MD-231(ER-)。结果显示: Dm-dNK 可成功表达于乳腺肿瘤细胞核(图 1b), 并保持酶的活性(图 2b); 表达 Dm-dNK 的乳腺癌细胞显著增加了其对于核苷酸类似物 araT 及 araC 的敏感性(图 3), 即具有显著的细胞杀伤毒性。

尽管还有一些技术问题需要解决, 本研究仍提示 Dm-dNK 有可能成为乳腺肿瘤分子化疗的新策略。对该模型系统的进一步评估, 有助于寻找出另一种乳腺癌, 特别是晚期复发肿瘤分子化疗(自杀基因)的新途径。

参考文献

- [1] Johansson M, van Rompay A R, Degreve B, *et al*. Cloning and characterization of the multisubstrate deoxyribonucleoside kinase of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*, 1999, 274: 23 814 – 23 819.
- [2] Zheng X, Johansson M, Karlsson A. Retroviral transduction of cancer cell lines with the gene encoding *Drosophila melanogaster* multisubstrate deoxyribonucleoside kinase. *J Biol Chem*, 2000, 275: 39 125 – 39 129.
- [3] Zheng X, Johansson M, Karlsson A. Bystander effects of cancer cell lines transduced with the multisubstrate deoxyribonucleoside kinase of *Drosophila melanogaster* and synergistic enhancement by hydroxyurea. *Mol Pharmacol*, 2001, 60: 262 – 266.
- [4] Zheng X, Johansson M, Karlsson A. Nucleoside analog cytotoxicity and bystander cell killing of cancer cells expressing *Drosophila melanogaster* deoxyribonucleoside kinase in the nucleus or cytosol. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289: 229 – 233.
- [5] Hussain R F, Nouri A M, Oliver R T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods*, 1993, 160: 89 – 96.
- [6] Takahashi S, Ito Y, Hatake K, *et al*. Gene therapy for breast cancer: review of clinical gene therapy trials for breast cancer and MDR1 gene therapy trial in Cancer Institute Hospital. *Breast Cancer*, 2006, 13: 8 – 15.
- [7] Springer C J, Niculescu Duvaz I. Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J Clin Invest*, 2000, 105: 1161 – 1167.
- [8] Freeman S M, Abboud C N, Whartenby K A, *et al*. The “bystander effect”: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res*, 1993, 53: 5274 – 5283.
- [9] Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, *et al*. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 31 831 – 31 835.
- [10] Moolten F L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res*, 1986, 46: 5276 – 5281.
- [11] Ayala G, Satoh T, Li R, *et al*. Biological response determinants in HSV-tk + ganciclovir gene therapy for prostate cancer. *Mol Ther*, 2006, 13: 716 – 728.

- [12] Pandha H S, Martin L A, Rigg A, *et al* . Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: a phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression. J Clin Oncol, 1999, 17: 2180 – 2189.
- [13] Braybrooke J P, Slade A, Deplanque G, *et al* . Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma. Clin Cancer Res, 2005, 11: 1512 – 1520.

(收稿日期: 2007-04-24)

(本文编辑: 周艳)