

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.06.002

HIFU 联合载 HSV-TK 基因的纳米级超声分子探针治疗对裸鼠肝移植瘤血管生成的影响*

谢 辉¹, 刘 山¹, 曾 辉¹, 李友伟¹, 许 进¹, 丁 雄², 刘长安², 李 峰^{1△}

(1. 四川省德阳市人民医院肝胆外科 618000; 2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 400010)

[摘要] **目的** 观察高强度聚焦超声(HIFU)治疗裸鼠肝移植瘤后,再注入载单纯疱疹病毒-胸苷激酶基因(HSV-TK)的纳米级超声分子探针治疗效果,并探讨其治疗机制。**方法** 用人肝癌 HepG2 细胞构建裸鼠皮下移植瘤模型 60 只,采用 CZF 型 HIFU 机治疗后,分别经鼠尾静脉注射 200 μ L 的微泡+HSV-TK+磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC3)(A 组)、微泡+HSV-TK(B 组)、HSV-TK+GPC3(C 组)、HSV-TK(D 组)、微泡+GPC3(E 组)、PBS 液(F 组),每 3 天 1 次,共注射 3 次。每次注射后,根据超声监测微泡到达靶组织的情况,对 A、B、D、E 组用 DZC 型超声转染仪给予 2 W/cm²、1 MHz、5 min 超声辐照。首次注射 48 h 后,各组经腹腔注射 0.2 mL 更昔洛韦(GCV,100 mg·kg⁻¹·d⁻¹),连续注射 14 d。治疗结束后,用免疫组织化学法测残瘤中微血管密度(MVD)水平,用 Western blot 和免疫组织化学法测量残瘤中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和血管内皮生长因子(VEGF)的变化情况,用 Q-PCR 检测肿瘤中 HIF-1 α 、VEGF 基因的转录水平。**结果** 治疗 14 d 后,B、C、D、E、F 组肿瘤组织中 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达量,VEGF 及 HIF-1 α mRNA 水平,MVD 均明显高于 A 组($P < 0.05$)。**结论** 载 HSV-TK 的纳米级超声分子探针治疗可降低 HIFU 治疗后残瘤组织中的 VEGF、HIF-1 α 及 MVD 水平,从而抑制肿瘤的生长,提高 HIFU 的治疗效果。

[关键词] 血管内皮生长因子 A;高强度聚焦超声;缺氧诱导因子 1;分子探针;微血管密度

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)06-0725-04

The effect of HIFU combined with nanoscale ultrasound molecular probes with simple virus thymidine kinase gene on angiogenesis in the nude mouse tumor*

Xie Hui¹, Liu Shan¹, Zeng Hui¹, Li Youwei¹, Xu Jin¹, Ding Xiong², Liu Changan², Li Feng^{1△}

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Deyang, Deyang, Sichuan 618000, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To observe the change of the protein and gene expression of hypoxia inducing factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the nude mouse tumor, which has been treated by HIFU combined with nanoscale ultrasound molecular probes with HSV1-TK gene microvascular density. **Methods** Sixty nude mice were implanted with HepG2 Cells to establish subcutaneous transplanted tumor. Divided this mice into six groups at random after treated by HIFU: MB+ HSV-TK+ GPC3 (group A), MB+ HSV-TK (group B), HSV-TK+ GPC3 (group C), HSV-TK (group D), MB+ GPC3 (group E), PBS (group F). They were injected into the tail vein every after 3 days. Mice in group A, B, D and E were exposed to ultrasound by 2 W/cm², 1 MHz, 5 minutes and 0.2 mL ganciclovir(GCV) was intraperitoneally injected at the first 48 hours after injection. After the treatment, immunohistoche were used to detect the microvascular density(MVD), Western blot and immunohistoche was employed to test the protein change of the VEGF and HIF-1 α , Q-PCR was used to test the mRNA gene transcription of VEGF and HIF-1 α in the tumor tissues. **Results** After 14 days, the protein expression of HIF-1 α and VEGF in group A was significantly lower than that in group B, C, D, E and F ($P < 0.05$), the MVD level in the tumor is also like this, and the difference is statistically significant. **Conclusion** Anoscale ultrasound molecular probes with HSV1-TK can reduce the level of VEGF, MVD and HIF-1 α in the tumor which has been treated by HIFU, so it can inhibit tumor growth and improve the therapeutic efficacy after HIFU treatment.

[Key words] vascular endothelial growth factor A; high-intensity focused ultrasound; hypoxia-inducible factor 1; molecular probe; microvascular density

高强度聚焦超声(high-intensity focused ultrasound, HIFU)已成为手术难以切除的中晚期肝癌的一种重要治疗方法。但由于各种因素的影响, HIFU 治疗难以完全杀灭病灶组织,因此存在治疗后肿瘤的残存和复发^[1-2]。所以,研究提高和巩固 HIFU 疗效的方法,对于提高患者生活质量、延长生存时间具有重要意义。

随着医疗技术的快速发展,肿瘤的基因治疗逐渐成为一个新的研究热点^[3]。其中,单纯疱疹病毒-胸苷激酶/更昔洛韦(HSV-TK/GCV)自杀基因系统已显示出了良好的应用前景^[4]。Zhou 等^[5]使用超声击碎携带自杀基因的微泡,从而使

自杀基因定向释放的技术,提高了靶基因在癌细胞中的转染效率。但是该方法是一种被动寻靶作用,缺乏主动靶向性,这有可能降低该方法的转染效率,其疗效仍有待提高。

磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(glypican-3, GPC3)在胎儿的肝脏中高度表达,在成人正常肝组织中无表达,但肝癌发生时再度高表达。有研究提示,在原发性肝癌中, GPC3 的阳性率约为 80%、特异性为 90%,这表明 GPC3 有望成为原发性肝癌靶向治疗的靶点^[6-7]。本课题组前期已成功制备靶向超声分子探针,即已完成了载基因微泡与 GPC3 单克隆抗体的连接。同时通过实验证明,该方法成功地提高了自杀基因在肝癌细胞中的

表达,从而靶向杀伤肝癌细胞,提高 HIFU 疗效。本实验旨在通过用 HIFU 联合载基因纳米级超声分子探针治疗裸鼠肝移植瘤,以观察肝癌移植瘤中血管内皮生长因子(VEGF)、微血管密度(MVD)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的变化,并探讨其可能的机制。

1 材料与与方法

1.1 细胞株与实验动物 人肝癌 HepG2 细胞由重庆医科大学附属第二医院刘长安教授赠送。SPF 级 BABL/C 4~6 周龄雄性裸鼠共 60 只,体质量(20 \pm 2)g,购自重庆医科大学动物实验中心。

1.2 主要试剂及仪器 叠氮磷酸二苯酯(DPPA)、链霉亲和素(SA)、生物素化二硬脂酰磷脂酰乙醇(Bio-DSPE)、甘油、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)购自美国 Sigma 公司;全氟丙烷气体(C3F8)由重庆医科大学超声影像研究所惠赠;DMEM/高糖培养基购自美国 HyClone 公司;质粒提取试剂盒购自美国 Omega 公司;生物素化 GPC 单克隆抗体购自 Abcam 公司;兔抗人 CD34 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;兔抗人 VEGF 多克隆抗体、兔抗人 HIF-1 α 多克隆抗体为碧云天进口分装;注射用 GCV 购自宜昌长江药业公司,DZC 型低频超声转染仪由重庆医科大学超声影像学研究所研制。

1.3 微泡的合成、质粒的提取及载 HSV-TK 基因的超声分子探针的构建 首先提取质粒。HSV-TK 质粒由课题组前期构建完成,该质粒以 pIRES2-EGFP 为载体,用其克隆转化大肠杆菌 DH5 α ,经卡那霉素筛选克隆成功菌体后,在 LB 培养基中扩增大肠杆菌;用 Omega 质粒大抽试剂盒抽提、纯化质粒;紫外分光光度计调整质粒纯度为 $A_{260}/A_{280} = 1.91$,浓度为 1 mg/mL。参照李奥等^[8]方法合成纳米级超声微泡后,通过生物素-亲和素连接法,参照景周宏等^[9]方法实现 GPC3 单克隆抗体与微泡的结合,构建成肝癌特异性超声分子探针,再通过静电吸附作用,加入多聚赖氨酸连接质粒与微泡,进而制备成载 HSV-TK 基因的纳米级超声分子探针。

1.4 HIFU 治疗后裸鼠移植瘤残瘤模型的建立 取培养生长良好的 HepG2 细胞,用 DMEM/High Glucose 培养基调整细胞浓度为 1×10^7 /mL,锥虫蓝拒试验检测其细胞活力大于 90%。取 0.2 mL 在裸鼠背部皮下接种,15 d 后观察见成瘤率为 100%,肿瘤直径达 1.0~1.5 cm。经腹腔注射水合氯醛麻醉裸鼠后,用 CZF 型 HIFU 治疗仪消融治疗 80% 裸鼠皮下移植瘤,消融治疗完成后无裸鼠死亡现象。

1.5 动物分组及处理 将 HIFU 治疗后裸鼠分成 6 组,每组 10 只,消融后立即经鼠尾静脉各注射 200 μ L(0.1 μ g/ μ L)微泡或 PBS 液,微泡+HSV-TK+磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC3)记为 A 组、微泡+HSV-TK 记为 B 组、HSV-TK+GPC3 记为 C 组、HSV-TK 记为 D 组、微泡+GPC3 记为 E 组、PBS 液记为 F 组。每 3 天注射 1 次,共注射 3 次。对于 A、B、D、E 组超声辐照,在每次注射探针后根据超声监测其到达肿瘤中的情况,调整超声频率为 1 MHz、声强为 2 W/cm² 进行照射,持续时间为 5 min。所有裸鼠在首次辐照后 48 h,经腹腔注射 0.2 mL GCV(100 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹),连续注射 14 d。

1.6 免疫组织化学检测及判定标准 采用免疫组织化学 SP 法检测各组残瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达及 MVD。所用一抗分别为兔抗人 HIF-1 α 和 VEGF 多克隆抗体(工作浓度 1:100),及兔抗人 CD34 多克隆抗体(工作浓度 1:100)。结果判定标准:在细胞质或(和)细胞核内出现棕褐色和棕黄色颗粒的细胞为 VEGF 和 HIF-1 α 阳性细胞,每张切片在 400 倍光镜下取 5 个视野,用 IPP 图像分析系统扫描,取 5 个视野积分光密度值(IOD)。MVD 计数测定按照 Weidner 等^[10]的方法:

先在 100 倍视野下确定 MVD 最高区域,然后在 400 倍光镜下计数微血管数目。微血管判定标准为:呈棕黄色且有管腔(管腔小于 8 个红细胞大小)的内皮细胞形成的条索间隙状结构;黄染的细胞或者细胞簇未显示管状结构,但与周围的肿瘤细胞、微血管及其他结缔组织分开者;管腔直径大于 8 个红细胞和可见平滑肌的管壁不计算在内。

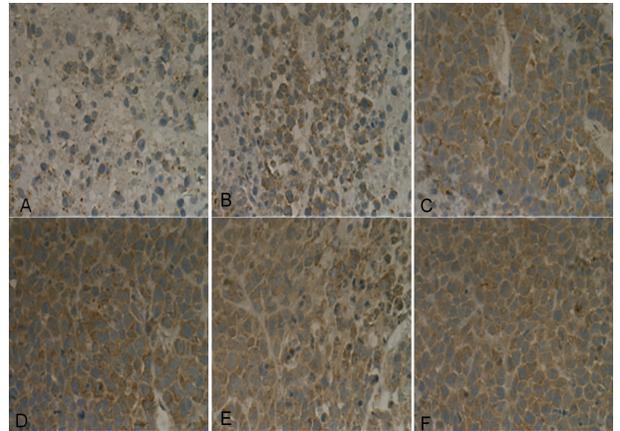
1.7 肿瘤组织中 VEGF 和 HIF-1 α 基因转录水平的检测 采用 Q-PCR 法。治疗完成后,取各残瘤组织,用 Trizol 法提取液取总 RNA,依步骤行荧光定量 PCR。其反应条件为:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 检测信号。

1.8 Western blot 检测 HIF-1 α , VEGF 蛋白表达 治疗结束后,取各组肿瘤组织,以 GAPDH 为内参照,Western blot 法检测各组残瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达,并采用 UVP 凝胶图象处理系统 Labworks4.6 软件分析目的条带的灰度值。

1.9 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

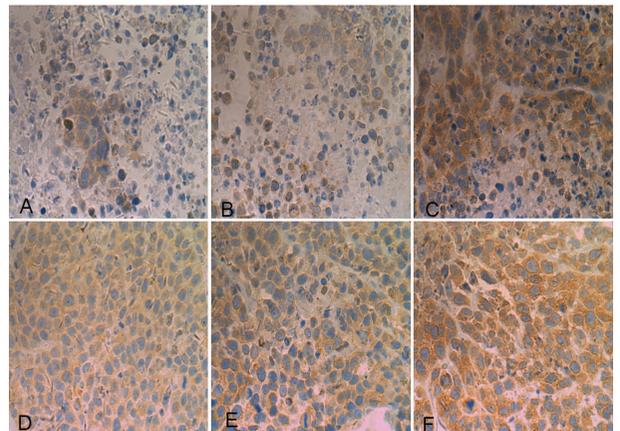
2 结果

2.1 各组残瘤中 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白的表达 免疫组织化学和 Western blot 结果显示,各组残瘤中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达明显高于 A 组($P < 0.05$),同时 C、D、E 及 F 组也明显高于 B 组($P < 0.05$),见图 1~4。



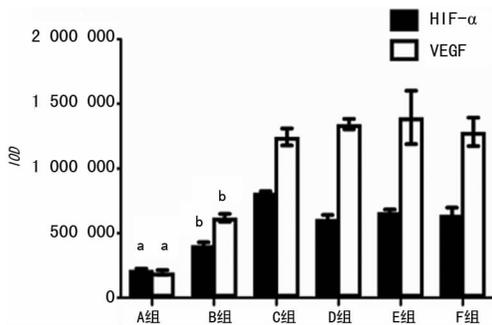
A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组; F: F 组。

图 1 各组肿瘤组织中 VEGF 表达(免疫组织化学 $\times 400$)



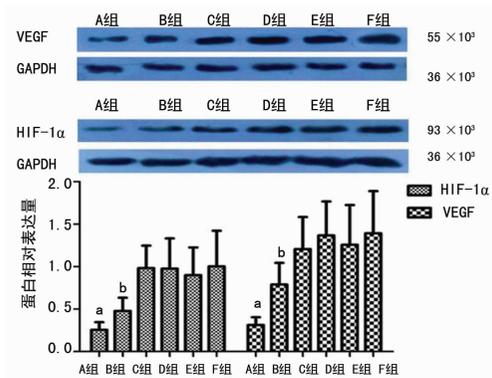
A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组; F: F 组。

图 2 各组肿瘤组织中 HIF-1 α 表达(免疫组织化学分析 $\times 400$)



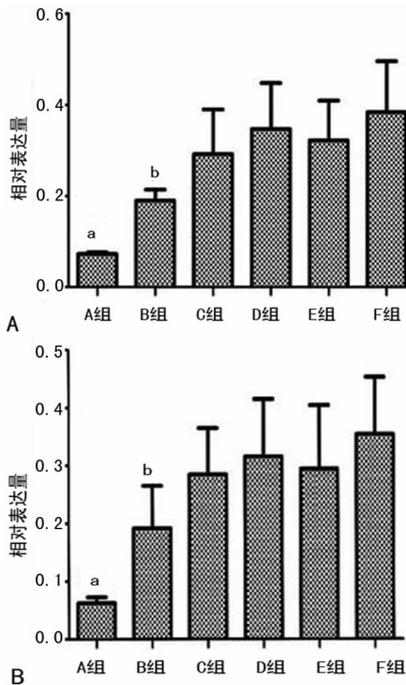
a: $P < 0.05$, 与 B、C、D、E、F 组同指标比较; b: $P < 0.05$, 与 C、D、E、F 组同指标比较。

图 3 各组肿瘤组织中 HIF-1α 和 VEGF 表达的 IOD



a: $P < 0.05$, 与 B、C、D、E、F 组同指标比较; b: $P < 0.05$, 与 C、D、E、F 组同指标比较。

图 4 Western blot 检测各组肿瘤中 VEGF、HIF-1α 的表达



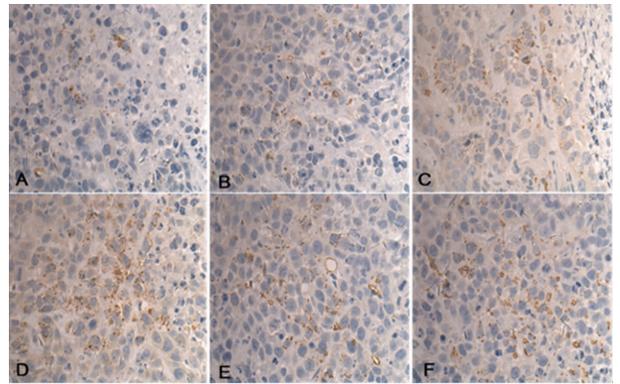
A: VEGF; B: HIF-1α; a: $P < 0.05$, 与 B、C、D、E、F 组比较; b: $P < 0.05$, 与 C、D、E、F 组比较。

图 5 各组肿瘤组织中 HIF-1α 和 VEGF 基因转录水平

2.2 各组肿瘤组织中 VEGF、HIF-1α mRNA 的水平 Q-PCR 结果显示, B、C、D、E、F 组残癌组织中 HIF-1α 和 VEGF mRNA 的转录水平明显高于 A 组 ($P < 0.05$), 同时 C、D、E 及 F

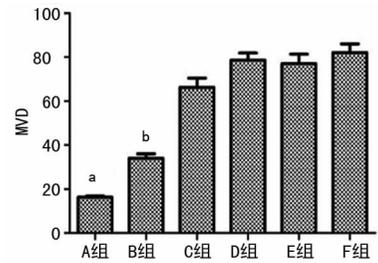
组也明显高于 B 组 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.3 各组肿瘤组织中 MVD 的水平 免疫组织化学结果显示, 与 A 组比较, 其余各组肿瘤组织中 MVD 的水平均明显偏高 ($P < 0.05$), 见图 6、7。



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组; F: F 组。

图 6 各组肿瘤组织中 MVD 测定 (免疫组织化学 × 400)



a: $P < 0.05$, 与 B、C、D、E、F 组同指标比较; b: $P < 0.05$, 与 C、D、E、F 组同指标比较。

图 7 各组肿瘤组织中 MVD 水平

3 讨论

肿瘤的生长转移与新生毛细血管的形成密切相关, 而新生血管的形成又与血管内皮生长因子、表皮生长因子等血管生成因子有关。大量研究已表明, VEGF 是目前已知的作用最强、特异性最高的血管生成刺激因子。HIF-1 是一种核转录因子, 它由 HIF-1α 和 HIF-1β 两个亚基组成, 主要在组织缺氧时出现。其中 HIF-1α 作为氧分子调节单位, 对 HIF-1 的功能和活性起着决定性作用。大多数肿瘤组织中均存在着 HIF-1α, 包括早期癌变甚至癌前病变^[11], 这表明肿瘤细胞缺氧发生于微血管生成之前, 并对肿瘤的生长和转化起促进作用^[12]。因 VEGF 是 HIF-1 最重要的靶基因, HIF-1α 也被认为是肿瘤新生血管生成的核心启动子^[13]。研究证明, HIF-1α 不仅能增强 VEGF 的转录活性, 还可以增加 VEGF mRNA 的稳定性^[14-15]。Tsuzuki 等^[16]发现, VEGF 主要表达于缺氧的肿瘤细胞内。同时, 将缺失 HIF-1 的肿瘤细胞移植, 其生成的肿瘤组织中 VEGF 的表达明显降低, 这再次证明了 VEGF 的高表达与 HIF-1α 的激活有关。

HSV-TK/GCV 自杀基因系统是目前肿瘤基因治疗的新热点。HSV-TK 基因可磷酸化无毒的 GCV, 将其转化成细胞毒性药物, 从而对肿瘤细胞起杀伤作用。既往使用超声辐照破坏携带目的基因的微泡, 该方法提高了自杀基因在肿瘤组织中的表达, 但是该方法是一种被动寻靶作用, 缺乏主动靶向性。本研究采用的载 HSV-TK 基因的纳米级超声分子探针, 采用纳米级微泡作为载体, 同时连接上 GPC3 抗体, 解决了传统微泡不能主动寻靶的问题, 进而提高了自杀基因的转染率、表达率, 增强了基因治疗的肿瘤杀伤效应。

本实验结果表明, HIFU 治疗裸鼠肝移植瘤后, 再注入载 HSV-TK 的纳米级超声分子探针治疗, 在残瘤中 MVD、VEGF 及 HIF-1 α 的表达均低于 HIFU 联合包裹 HSV-TK 基因的超声微泡组及其他对照组。这表明 HIFU 联合载 HSV-TK 基因的纳米级超声分子探针治疗可以更有效地抑制肿瘤组织中血管的生成, 使得肿瘤生长的血供条件受限, 造成肿瘤内部出现缺血坏死, 从而提高肿瘤的治疗效果。分析其机制, 可能是由于载 HSV-TK 基因的纳米级超声分子探针, 改善了肿瘤组织中的缺氧环境, 进而使 HIF-1 α 的表达降低, 使得 VEGF 的表达下调来降低残瘤中的 MVD。但 HIFU 联合载 HSV-TK 基因的纳米级超声分子探针治疗裸鼠肝移植瘤, 其导致缺氧环境改善的具体机制目前尚不明确, 可能与治疗过程中自由基的产生有关, 这有待于进一步研究。

综上所述, HIFU 联合载 HSV-TK 基因的纳米级超声分子探针治疗肝癌, 可降低肝癌组织中 VEGF 和 HIF-1 α 的表达, 使肿瘤新生血管减少, 破坏肿瘤生长的血供条件, 进而抑制肿瘤生长、转移, 提高并巩固了 HIFU 治疗肝癌的疗效, 这为肝癌治疗手段的改善提供了理论依据。

参考文献

- [1] Zhou YF. High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation[J]. *World J Clin Oncol*, 2011, 2(1): 8-27.
 - [2] Wijlemans JW, Bartels LW, Deckers R, et al. Magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound (MR-HIFU) ablation of liver tumours[J]. *Cancer Imaging*, 2012, 28(12): 387-394.
 - [3] Duarte S, Carle G, Faneca H, et al. Suicide gene therapy in cancer; where do we stand now[J]. *Cancer Lett*, 2012, 324(2): 160-170.
 - [4] Yin X, Yu B, Tang Z, et al. Bifidobacterium infantis-mediated HSV-TK/GCV suicide gene therapy induces both extrinsic and intrinsic apoptosis in a rat model of bladder cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(2): 77-81.
 - [5] Zhou S, Li S, Liu Z, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene treats hepatoma in mice[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1): 170-175.
 - [6] Wang HL, Anatelli F, Zhai QJ, et al. Glypican-3 as a useful diagnostic marker that distinguishes hepatocellular carcinoma from benign hepatocellular mass lesions [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2008, 132(11): 1723-1728.
 - [7] Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, et al. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer [J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(3): 649-656.
 - [8] 李奥, 王志刚, 赵建农, 等. 纳米级超声分子探针的制备及其体外寻靶实验[J]. *中国超声医学杂志*, 2010, 26(4): 289-292.
 - [9] 景周宏, 何承俊, 潘万龙, 等. 载肝癌细胞 GPC3 抗体的纳米级脂质超声微泡制备及体外寻靶研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(5): 449-453.
 - [10] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(2): 169-180.
 - [11] Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 12(1): 9-22.
 - [12] Ku JH, Park YH, Myung JK, et al. Expression of hypoxia inducible factor-1 α and 2 α in conventional renal cell carcinoma with or without sarcomatoid differentiation [J]. *Urol Oncol*, 2011, 29(6): 731-737.
 - [13] Kong J, Kong J, Pan B, et al. Insufficient radiofrequency ablation promotes angiogenesis of residual hepatocellular carcinoma via HIF-1 α /VEGF [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37266.
 - [14] Florczyk U, Czauderna S, Stachurska A, et al. Opposite effects of HIF-1 α and HIF-2 α on the regulation of IL-8 expression in endothelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(10): 1882-1892.
 - [15] Nagao K, Oka K. HIF-2 directly activates CD82 gene expression in endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(1): 260-265.
 - [16] Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1 α hypoxia response element \rightarrow VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6248-6252.
- (收稿日期: 2016-10-23 修回日期: 2016-11-16)
-
- (上接第 724 页)
- [10] Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4): 575-581.
 - [11] Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, et al. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13247.
 - [12] Hannafon BN, Ding WQ. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(7): 14240-14269.
 - [13] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 175-205.
 - [14] Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of Bim in health and disease [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23058-23134.
- (收稿日期: 2016-10-24 修回日期: 2016-11-22)