

# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (Volume 13 Number 14)**



**14/2005**

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,  
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学  
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,  
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,  
俄罗斯《文摘杂志》收录.

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (总第142期)

述 评	1645 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究 姚希贤, 崔东来 1650 胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭 丁连安, 黎介寿
胃 癌	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众
肝 癌	1658 Maxizyme对肝癌突变抑癌基因p53的抑制作用 李岩, 林菊生, 孔心涓 1663 肝癌组织中TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 1R II和NF- $\kappa$ B的表达 缪林, 张锁林, 季国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春 1667 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达 吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛 1673 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1mRNA的表达意义 吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛 1679 重组人内皮抑素真核表达载体pCD-sEndo的构建和表达 邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林 1684 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达 丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌
病毒性肝炎	1688 酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库中新基因NS2TP蛋白结合蛋白基因 张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠 1692 抗HBV多聚酶TP区VH抗体体外可抑制HBV复制 于俊岩, 兰林, 王宇明, 丁世涛 1696 黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型 李迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕 1700 丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因NS2TP的克隆化 张黎颖, 成军, 邓红, 刘妍, 王琳
基础研究	1705 苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用 路平, 王永来, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚 1713 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用 刘静冰, 秦叔逵, 李进 1717 消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌的效应 王昌成 1721 $^{103}\text{Pd}$ 诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响 何贵金, 吴荣, 高沁怡, 许书河, 高红, 姜维国, 蒋涛, 戴显伟, 马凯
文献综述	1725 热休克蛋白家族与肝癌的关系 吴顺华, 成军, 郑玉建 1731 HCV的基因型及其变异与肝细胞癌的关系 韩苏夏, 刘正稳, 马瑾璐 1734 移植肝细胞基因调控研究 林勇, 曾欣 1737 三氧化二砷治疗肝癌的分子机制 吴顺华, 成军, 郑玉建 1744 丁酸钠抗肿瘤作用的新进展 崔路佳, 高善玲, 裴风华 1747 聚乙二醇 $\alpha$ -干扰素治疗慢性乙型肝炎的研究进展 周平, 谢仁江 1750 人类免疫缺陷病毒与黏膜免疫 杨贵波, 邵一鸣
研究快报	1760 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立 陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏 1762 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定 王斌, 魏泓 1766 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用 郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周 1768 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达 谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋 1770 巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bj和Ba基因亚型的初步鉴定 温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿 1773 阿霉素对胃癌细胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的影响 邢承忠, 路平, 郭晓临, 刘瑾, 徐惠绵, 袁媛 1776 BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正

临床经验	1779 社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响 张玫, 汤哲, 汤欣, 蔡玲, 牛小羽, 孙书春 1781 口服药物致食管溃疡22例 王孟春, 张丽瑶, 钟琳琳 1782 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用 王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜 1785 肠镜检查肠道准备无效率的影响因素 蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜泊 1787 中国人与非洲黑人 <i>H. pylori</i> 相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析 廖常奎, Geojanna GA 1790 大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究 张思奋, 罗湛滨, 吴文江, 何晶, 范小华 1792 幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎53例 阮鹏, 阮浩然 1794 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义 谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民 1797 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例 孙早喜, 孙诚谊
致 谢	1800 致谢世界华人消化杂志编委
封面故事	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众 世界华人消化杂志 2005;13(14):1652-1657 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm</a>
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005  American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005  ISGCON 2005 November 11-15, 2005 <a href="mailto:isgcon2005@yahoo.co.in">isgcon2005@yahoo.co.in</a> <a href="http://www.isgcon2005.com">isgcon2005.com</a>  Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 <a href="http://www.asge.org/education">www.asge.org/education</a>  II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 <a href="mailto:gec@stradini.lv">gec@stradini.lv</a> <a href="http://www.gastroenterologs.lv">www.gastroenterologs.lv</a>  2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 <a href="mailto:c.chase@imedex.com">c.chase@imedex.com</a> <a href="http://www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm">www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm</a>  10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 <a href="mailto:isde@sapmea.asn.au">isde@sapmea.asn.au</a> <a href="http://www.isde.net">www.isde.net</a>

<div>世界华人消化杂志</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (半月刊)  创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2005-07-28 原刊名 新消化病学杂志</div> <div>名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁 英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪</div>	<div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: <a href="mailto:wjgd@wjgnet.com">wjgd@wjgnet.com</a> <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a> 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</div>	<div>世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.</div> <div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</div> <div>2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有</div>
--	---	---

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年576.00元	1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# Maxizyme 对肝癌突变抑癌基因 p53 的抑制作用

李 岩, 林菊生, 孔心涓

李岩, 林菊生, 孔心涓, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030  
李岩, 女, 1981-12-25 生, 河南省驻马店人, 汉族, 华中科技大学同济医学院硕士生, 研究方向分子肝脏病学.  
国家自然科学基金资助项目, No. 30171061  
通讯作者: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所. linjusheng2001@163.com  
电话: 027-83662578  
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

## Inhibitory effect of maxizyme on mutant-type p53 in hepatocellular carcinoma

Yan Li, Ju-Sheng Lin, Xin-Juan Kong

Yan Li, Ju-Sheng Lin, Xin-Juan Kong, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30171061  
Correspondence to: Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. linjusheng2001@163.com  
Received: 2005-04-04 Accepted: 2005-04-09

## Abstract

**AIM:** To investigate the inhibitory effect of maxizyme on the mutant-type p53 (mtp53) gene at codon 249 in exon 7 (AGG→AGT) in cell-free system, hepatocellular carcinoma (HCC) cell line MHCC97, and nude mice bearing human HCC, and to explore a new method for gene therapy of HCC.

**METHODS:** Anti-mtp53 and control mutant maxizyme were designed and then cloned into the vector pBSKU6 and pEGFPC1, respectively. The <sup>32</sup>p-labeled mtp53 transcript was the target mRNA. Cold maxizyme transcript was incubated with <sup>32</sup>p-labeled target RNA in cell-free system. The products were quantified by measuring the radioautographed count per minute (cpm) in 1 μL solution. The MHCC97 cells were the target cells which contained a mutation at the third-base position of codon 249 of the p53 gene (AGG→AGT). PEGFPMz (recombinant eukaryotic vector) was transfected into MHCC97 cells by Lipofectamine<sup>TM</sup>2000. The expression of mtp53 was analyzed by Northern Blot and Western Blot. The nude mice bearing human liver cancer were prepared and divided into blank control pEGFP and pEGFPMz group. The growth curve of the tumor in mice and the survival rate of mice were

observed. The expression of mtp53 mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** The established pEGFPMz had the correct structure. Maxizyme had a specific cleavage activity for mtp53 with a cleavage efficiency of 49% extracellularly, while the wild type p53 was not cleaved. The control maxizyme had no significant effect on both mutant and wild type p53. After pEGFPMz were transfected into MHCC97 cells, the expression of mtp53 mRNA and protein in pEGFPMz group were 65% and 67% respectively, which were significantly lower than those in blank control and pEGFP group ( $P<0.05$ ). The tumor size decreased and mtp53 mRNA was down-regulated in mice treated with pEGFPMz as compared with those in mice of blank control and pEGFP group (mtp53 mRNA:  $0.95 \pm 0.13$  vs  $1.44 \pm 0.14$ ,  $1.47 \pm 0.12$ ;  $P<0.05$ ), and also the survivals of the mice in pEGFPMz were improved.

**CONCLUSION:** Maxizyme can effectively inhibit the expression of mtp53 mRNA and protein as well as the growth of hepatocellular carcinoma cells.

**Key Words:** Maxizyme; Mutant type p53; Hepatocellular carcinoma

Li Y, Lin JS, Kong XJ. Inhibitory effect of maxizyme on mutant-type p53 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(14):1658-1662

## 摘要

**目的:** 通过 Maxizyme 胞外、胞内及整体水平对肝癌突变抑癌基因 p53 的抑制作用, 为肝癌的基因治疗探索一条新途径.

**方法:** 应用计算机设计针对人肝癌突变抑癌基因 p53 (mtp53) 249 位密码子的 Maxizyme (Mz) 和对照大酶 asMz, 应用分子克隆技术构建核酶的细胞外转录载体和真核表达载体. 应用 RiboMAX<sup>TM</sup> large Scale RNA production systems 胞外转录出核酶和靶基因, 进行细胞外切割反应, 检测大酶对 mtp53 的切割作用, 同时检测对野生型 p53 (wtp53) 是否具有切割作用. 在脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 的介导下稳定转染含有突变型 p53, 且突变位点在 249 位密码子的人肝癌细胞 MHCC97, 应用 Northern Blot, Western Blot 等方法检测大酶在细胞内的表达及对肝癌细胞 mtp53 的抑制作用. 建立人肝癌裸

鼠皮下移植瘤模型, 将荷瘤裸鼠随机分为空白对照组、空载体组和基因治疗组。观察肿瘤生长情况并记录动物死亡时间, 绘制肿瘤生长曲线和生存期图。RT-PCR 检测 mtp53 mRNA 表达水平的变化。

**结果:** 成功构建核酶基因并将其正确克隆入细胞外转录载体 pBSKU6 和真核载体 pEGFPC1 中。Mz 在细胞外具有良好的切割靶基因 mtp53 活性, 切割效率为 49%, 而对野生型 p53 无切割作用, asMz 对突变型 p53 及野生型 p53 均无明显切割作用。在脂质体 LipofectAMINETM2000 的介导下成功转染肝癌细胞 MHCC97, 嵌于 U6 表达系统中的 Mz 在细胞内高效表达。Northern Blot 检测证实 pEGFPMz 组 mtp53 的 mRNA 水平明显下调, Mz 在细胞内的切割效率为 65%。Western Blot 结果提示基因治疗组 mtp53 的蛋白表达明显下降, 切割效率为 67%。动物试验证实 Mz 可减慢裸鼠肿瘤生长速度, Mz 治疗组荷瘤鼠生存期明显延长。PT-PCR 检测到 Mz 治疗组裸鼠肿瘤组织 mtp53 的 mRNA 水平明显下调 (mtp53 mRNA:  $0.95 \pm 0.13$  vs  $1.44 \pm 0.14$ ,  $1.47 \pm 0.12$ ;  $P < 0.05$ )。

**结论:** Mz 可有效切割 mtp53, 抑制其 mRNA 和蛋白质的表达, 有效抑制肝癌细胞的生长。

**关键词:** Maxizyme; 突变型 p53; 肝细胞癌

李岩, 林菊生, 孔心涓. Maxizyme 对肝癌突变抑癌基因 p53 的抑制作用. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1658-1662  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1658.asp>

## 0 引言

p53 基因是人类恶性肿瘤中发生变异频率最高的抑癌基因。其异常表达和很多肿瘤的发生发展密切相关<sup>[1-6]</sup>。突变是 p53 失活的主要形式, 肝癌中 p53 的突变率高达 60%, 且突变热点集中在 249 位密码子 (AGG→AGT)<sup>[7-10]</sup>。突变型 p53 具有癌基因特性且稳定性增高, 降低肿瘤对放化疗药物的敏感性。Maxizyme 是由锤头状核酶 (Hammerhead ribozyme) 演变而来的, Maxizyme 的发现弥补了锤头状核酶对切割位点的限制。我们应用计算机设计了针对突变型 p53 的 Maxizyme, 构建其体外转录载体和真核表达载体, 检测其在胞外、胞内和整体水平对 mtp53 的抑制作用, 为肝癌的基因治疗提供了一条新途径。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 含 wtp53 和 mtp53 基因全长的质粒 pCMV-neo-BAM 载体由美国 Howard Hughes Medical Institute 的 Bert Vogelstein 教授惠赠, pBSKU6 和 pEGFPC1 载体由上海中国科学院生物化学研究所金由辛研究员惠赠, 人肝癌细胞系 MHCC97 购自复旦大学医学院肝癌研究所, Balb/c 裸鼠购自华中科技大学同济医院器官

移植研究所, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  本室保存, 小剂量胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司, 各种限制性内切酶、DNA 连接酶、DL2000 Marker、PCR 试剂、PT-PCR kit 均为日本 Takara 公司产品, pGEM-T vector, X-gal, IPTG, Trizol 试剂和 RiboMAX<sup>TM</sup> large Scale RNA production systems 为美国 Promega 公司产品, Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagent 为 Invitrogen 公司产品, 胎牛血清为 Hyclone 公司产品, DMEM 培养基为 Gibco 公司产品。

**1.2 方法** 应用中国科学院上海生物化学研究所陈农安教授编写的软件设计 Mz 的基因片断。Mz 由两个单体组成 Mz right (MzR) 与 Mz left (MzL), 序列如下: MzL: 5' CTAGAGAGGATGGCTGATGAGCGAAAGGTATGG3'; 5' GATCCCAGACCTTTGGCTCATCAGCCATCCTCT3'。MzR: 5' CTAGAAGTTTCCACTGATGAGCGAACTCCGGG3'; 5' GATCCCCGGAGTTTCGCTCATCAGTGGAACTT3'。同时设计突变的 Mz (asMz, G5→A5) 以排除反义序列互补作用。Mz 的两边设计 Xba I 和 BamH I 酶切位点, 便于克隆操作, 用中国科学院生物化学研究所美国产 Beckman Oligo 1000 M DNA/RNA 自动合成仪合成。应用分子克隆技术构建出体外转录载体 pBSKU6Mz 和真核表达载体 pEGFPMz, DNA 测序仪分析所合成的序列, 酶切鉴定。应用 PCR 技术从质粒 pCMV-neo-BAM 中扩增出野生型 (wild type p53, wtp53) 和 mtp53 片断 (1 002 nt), PCR 产物纯化回收后, 与 pGEM-T 载体连接, 经 DNA 测序证实, 分别命名为 pwtp53 和 pmtp53。PCR 上游引物: 5' GATTCTCTTCTCTCTGTGC3', 下游引物: 5' CTTTCCACGACGGTGACA3'。pwtp53 和 pmtp53 经 Sac I 线性化, Mz 经 Sma I 线性化, 体外转录, 纯化, 放射自显影。[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dUTP 标记的大酶、对照大酶和靶 RNA 水溶液各取 1  $\mu$ L, 测每分钟计数 (cpm)。按同位素的比放及底物和 Mz 中 U 的含量进行定量, 切割率 (CE) 通过底物 (S) 与产物 (P) 放射性条带的放射强度 (cpm) 求得:  $CE = [P/(S+P)] \times 100\%$ 。人 MHCC97 肝癌细胞株培养在含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置 37℃, 50 mL/L 的 CO<sub>2</sub> 培养箱, 待细胞长至对数生长期, 按每孔  $4 \times 10^4$  接种至 24 孔细胞培养板上, G418 筛选 (200 mg/L), 应用 Invitrogen 公司的 Lipofect amine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂盒进行转染, 按操作说明书进行。筛选 15 d 后, 挑选单克隆细胞扩大培养。

**1.2.1 Western blot 分析 p53 蛋白表达水平** 分别收集转染 pEGFPMz、空载体 pEGFP 和未转染任何质粒的肝癌细胞 MHCC97 ( $1 \times 10^7$  个), 收集被无盐裂解液裂解的细胞裂解物, 常规制胶, 每样品 15  $\mu$ L, Marker 上样 15  $\mu$ L, 1 $\times$  SDS 电泳缓冲液, 恒压 200 V, 40 min。用转移缓冲液平衡凝胶和醋酸纤维素滤膜 PVDF 30 min,

4℃湿度电转仪 30 mA 转移过夜. PVDF 膜浸泡在 50 g/L 脱脂奶粉 TBS 溶液中, 室温封闭 30 min, 洗涤液中洗涤 30 min, 加入 10 mL 10 g/L 脱脂奶粉 (含 0.5 g/L Tween20), 加入 5  $\mu$ L 一抗 (抗 p53 抗体), 室温摇动 1 h, 然后 20 mL 10 g/L 脱脂奶粉洗 4 次, 将 PVDF 膜与辣根过氧化物酶标记的第二抗体共同温浴 60 min. 将膜放至等体积配置的检测试剂中孵育 1 min, Saran 包装膜包裹, X 光片曝光并显像. 将膜用 PBS 洗涤两次, 然后用  $\beta$ -actin 抗体进行检测, 方法同上.

**1.2.2 Northern blot 分析 mtp53 mRNA 的表达** 应用 Promega 公司的探针标记试剂盒 Prime-a-Gene Labeling System, 将 p53PCR 和  $\beta$ -actinPCR 片断进行探针同位素标记. DNA 片断沸水 2 min, 速至冰上. Labeling 5 $\times$  buffer 1  $\mu$ L, Mixture of unlabeled dNTPs 1  $\mu$ L, DNA template 5 ng, Nuclease-free BSA 1  $\mu$ L, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP 1  $\mu$ L (3 000 Ci/mmol), Klenow fragment 1  $\mu$ L (5 U), 总体积 10  $\mu$ L 混匀, 室温 60 min, 95℃ 2 min, 溶于 EDTA, 终浓度 20 mmol/L. 收集转染 pEGFPMz、空载体 pEGFP 和未转染任何质粒的肝癌细胞 MHCC97 ( $1 \times 10^7$  个), Trizol 试剂盒提细胞内总 RNA. 样品制备: RNA (20  $\mu$ g, 5.5  $\mu$ L), 10 $\times$  MOPS 1  $\mu$ L, 甲醛 3.5  $\mu$ L, 甲酰胺 10  $\mu$ L, 总体积 20  $\mu$ L, 65℃, 温育 15 min, 冰浴冷却. 电泳, 印迹转移过夜, 封闭非特异性结合位点后, 65℃ 杂交过夜, X 片曝光.

**1.2.3 动物试验** 4-5 周龄 Balb/c-nu 裸鼠 24 只, 雌雄各半, 体重  $13.5 \pm 1.5$  g. 收获处于对数生长期的 MHCC97 细胞, 按每只裸鼠  $1 \times 10^7$  个 (0.2 mL) 接种于其颈背部皮下, 16 d 左右均出现瘤结节, 成瘤率 100%. 待肿瘤长径达  $0.4 \pm 0.05$  cm 时, 随机分为 3 组, 每组 8 只. 1 组为生理盐水对照组, 瘤体内多点注射 150  $\mu$ L 生理盐水; 2 组为 pEGFP 对照组, 瘤体内多点注射 50  $\mu$ g 空质粒载体 (50  $\mu$ g pEGFP+30  $\mu$ L Lipofectamine TM 2 000+120  $\mu$ L 无血清培养基); 3 组为 pEGFPMz 治疗组, 瘤体内多点注射 50  $\mu$ g pEGFPMz (50  $\mu$ g pEGFPMz+30  $\mu$ L Lipofectamine TM 2 000+120  $\mu$ L 无血清培养基). 隔天注射 1 次, 共注射 5 次. 每两天用游标卡尺 (精确到 0.02 mm) 测肿瘤体积 ( $V = Ax^2B/2$ , A 为肿瘤最长径, B 为肿瘤最短径), 观察并记录动物死亡时间, 当有裸鼠死亡时, 将其取瘤称重. 50 d 后将未死亡动物全部处死, 取瘤称重, 绘制裸鼠皮下移植瘤平均生长曲线, Kaplan-Meier 方法进行生存期分析. 取 0.1 cm<sup>3</sup> 肿瘤组织做 PT-PCR 检测, 具体如下: p53 引物序列同上,  $\beta$ -actin mRNA 作为内部参照物, 引物序列: 上游引物: 5'CTCGCTCTCGCTCTTTT 3'; 下游引物: 5' GCGGTGGTGGCGGTCGCGCCGCT 3'. RT 反

应: 总 RNA 2  $\mu$ g, 5 $\times$  buffer 6  $\mu$ L, dNTPmixture (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, RNase inhibitor (40 MU/L) 1  $\mu$ L, Oligo dT primer (20  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, M-MLV (200 MU/L) 1  $\mu$ L, 3 d H<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L, 总体积为 20  $\mu$ L, 混匀, 42℃ 逆转录 1 h, 95℃ 灭活 5 min. 取上述反应产物 5  $\mu$ L, 5 $\times$  PCR buffer 10  $\mu$ L, dNTPmixture (10 mmol/L) 8  $\mu$ L, 引物各 5  $\mu$ L, Taq 1  $\mu$ L, 56  $\mu$ L 3 d H<sub>2</sub>O, 总体积为 100  $\mu$ L, 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 1 min, 31 个循环, 72℃ 10 min. 反应结束后, 取产物 8  $\mu$ L, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析结果, 应用凝胶成像分析系统, 分析每个条带 (lanes) 的定积分值和所占的百分比, 并和  $\beta$ -actin 比较, 计算核酶的切割效率.

**统计学处理** 以上检测试验均重复 3 次. 采用 SPSS10.0 统计学分析软件, 采用 Kaplan-Meier 法进行分析并绘制生存曲线.  $P < 0.05$  具有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 用 Sma I 和 Sac I 双酶切载体 pEGFPMz**, 10 g/L 琼脂糖鉴定应有 920 bp 的片段, 与设计完全一致. 细胞外切割反应显示 pEGFPMz 对 pmt53 切割条带为 874 nt 和 128 nt, pwt53 未被切割, 体外切割效率为 49%, pEGFPasMz 对 pmt53 及 pwt53 均未见明显切割条带, 和预期结果一致. 说明我们设计的大酶对突变型 p53 具有特异性的高效切割作用. Western blot 分析结果提示, 转染 pEGFP-Mz 肝癌细胞 MHCC97 的 p53 (53 kDa) 蛋白表达下降明显, 为 67%. 而转染空质粒组和空白对照组的 mtp53 的蛋白表达没有明显变化 ( $P < 0.05$ ), 提示 Mz 能够特异性切割靶基因 mtp53, 促进 p53 蛋白表达水平下降 (图 1).

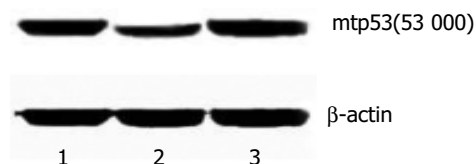


图1 Western blot 分析 p53 和  $\beta$ -actin 蛋白在肝癌细胞 MHCC97 中的表达. 1: MHCC97 细胞转染空载体 pEGFP (1.0  $\mu$ g); 2: MHCC97 细胞转染 pEGFPMz (1.0  $\mu$ g); 3: 空白对照组 MHCC97 细胞.

**2.2 Northern blot 分析 mtp53 mRNA 的表达**  $\beta$ -actin 条带的亮度一致, 表明总 RNA 的量是一致的. 转染 pEGFP-Mz 的肝癌细胞 MHCC97 的 p53 mRNA 下降明显, 为 65%, 而转染 pEGFP 和空白对照的细胞无下降 ( $P < 0.05$ ), 证实 Mz 能够使 mtp53 mRNA 表达水平下降, 对靶基因 mtp53 具有特异性地切割作用 (图 2).



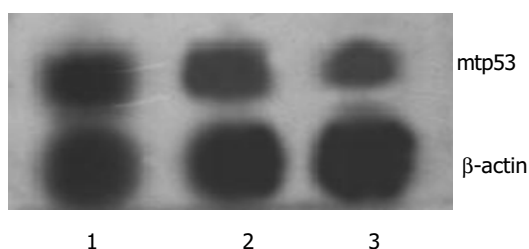


图2 Northern blot 分析 MHCC97 细胞中 mtp53 mRNA 的表达. 1: 转染空载体 pEGFP; 2: 转染 pEGFP-Mz; 3: 转染 pEGFP-Mz.

**2.3 动物试验** RT-PCR 检测图像分析仪扫描 mtp53 和  $\beta$ -actin 条带的灰度, 计算出 pEGFP-Mz 组 mtp53/ $\beta$ -actin 为  $0.95 \pm 0.13$ , pEGFP 组为  $1.47 \pm 0.12$ , 空白对照组为  $1.44 \pm 0.14$ . pEGFP-Mz 组 mtp53 表达明显减弱, 与转染空载体组及空白对照组比较 mtp53 的水平有显著性差异 ( $P < 0.05$ ). 而转染空载体组及空白对照组比较 mtp53 的水平无明显差异 ( $P > 0.05$ , 图3). 皮下移植瘤平均生长曲线显示 Mz 基因治疗组生长速度明显较空白对照组和空载体组减慢, SAS 软件进行  $t$  检验, 证实差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ). 而空载体组和空白对照组肿瘤生长速度无明显差异 ( $P > 0.05$ ). 实验结果提示 Mz 具有显著抑制裸鼠移植瘤生长的作用 (图4). 应用 SPSS10.0 统计学分析软件, 采用 Kaplan-Meier 法进行荷瘤裸鼠生存期的分析, 绘制图表, 显示基因治疗组裸鼠与空载体组和空白对照组相比, 具有明显延长裸鼠生存期的作用 ( $P < 0.05$ ). 而裸鼠生存期在空载体组和空白对照组中无显著差异 ( $P > 0.05$ , 图5).

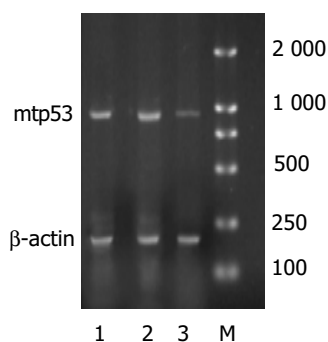


图3 RT-PCR 分析肿瘤组织中 mtp53 mRNA 的表达. 1: 转染空载体 pEGFP 组; 2: 空白对照组; 3: 转染 pEGFP-Mz 组 M: DL2000 marker.

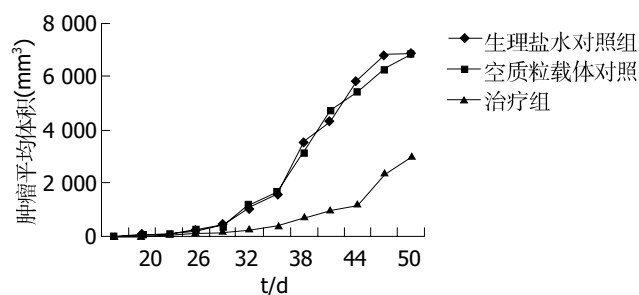


图4 裸鼠皮下肿瘤生长曲线.

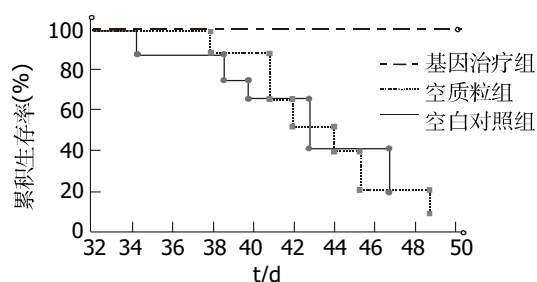


图5 荷瘤裸鼠的生存期.

### 3 讨论

现代医学认为, 肿瘤是多种基因突变引起的复合基因病 (complex genetic disease), 旨在封闭突变基因表达或抑制其功能的基因疗法成为近年肿瘤研究领域的热点. 而核酶 (Ribozyme) 是其中极富挑战性的课题, 核酶是一类具有催化作用的 RNA 分子, 又称催化 RNA (catalytic RNA) [11-15], 和反义寡核苷酸相比, 核酶用于基因治疗有很大的优势, 被称为“分子剪刀”和“分子外科”, 在抗 HIV、抗病毒、治疗白血病、抗多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 及肿瘤方面得到广泛的研究 [16-19]. 锤头状核酶 (Hammerhead ribozyme, Rz) 因其结构简单、易于设计而得到广泛的应用 [20-25]. 用短链核苷酸替代茎 II 即变短的核酶仍保持一定的切割活性称为 minizyme [26-28]. Minizyme 可以形成二聚体结构, 形成二聚体后切割活性明显增强, 此二聚体命名为 Maxizyme [29-31]. Maxizyme 的发现弥补了锤头状核酶对切割位点严格限制的不足. 自 Maxizyme 发现以来主要用于嵌合基因或突变基因所致疾病的治疗, 例如导致慢性粒细胞性白血病 (CML) 的融合基因 BCR-ABL, 显示出良好的应用前景.

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发生存在着多种病因与多种机制, 这些因素在 HCC 的发生中起着协同作用, 但无论何种原因, HCC 的发生均与癌基因的激活和 (或) 抑癌基因的失活有关. 在肝癌发生发展中抑癌基因的突变占有重要地位. 抑癌基因中研究最多的是 p53 基因, p53 基因定位于 17 号染色体短臂. 野生性 p53 (wild type p53, wtp53) 基因监视着基因组的完整性, 有利于细胞启动修复机制, 可诱导细胞凋亡, 抑制肿瘤的形成. p53 突变导致与 DNA 结合力改变, 使 p53 依赖性反式激活作用下降. 突变型 p53 (mutant type p53, mtp53) 基因具有癌基因特性且稳定性增高, 导致细胞转化和过度增生, 同时降低肿瘤对化疗药物的敏感性. 肝癌中 p53 的突变率达 60%, 且突变多发生于 249 位密码子 (G:T 颠换). 针对抑癌基因 p53 的突变, 国内外研究主要是借助基因转移技术恢复或添加肿瘤细胞中失活的 p53, 从而对肿瘤产生一定的治疗作用或抑制肿瘤转移. 但这种

方法不能调节抑癌基因的表达水平,亦不能减少突变基因的表达,限制了临床应用的前景.本实验应用新的基因阻断技术-maxizyme,设计了针对肝癌突变抑癌基因p53的maxizyme,可在249位密码子处切断mtp53mRNA,从而阻断其表达,对mtp53具有抑制作用.实验结果表明我们设计的maxizyme不仅在细胞外对突变型p53具有特异性的高效切割作用,而且在细胞内同样能够特异性切割靶基因mtp53,促进p53蛋白表达水平(Western blot)和mRNA水平(Northern blot)下降.在整体水平上,maxizyme也可明显抑制裸鼠移植瘤的生长,延长荷瘤裸鼠生存期.本实验证实了我们设计的maxizyme对肝癌突变抑癌基因p53在胞外、胞内和整体水平的显著抑制作用,为肝癌的治疗提供了一条新的途径.

#### 4 参考文献

- Liang Y, Wu J, Stancel GM, Hyder SM. p53-dependent inhibition of progestin-induced VEGF expression in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;93:173-182
- Du CH, Xu J, Zhong NS. Roles of mutant p53 gene in malignant phenotypes and resistance to drugs in anti-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide benzo(a)pyrene-induced lung cancer cells. *Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi* 2005;28:176-179
- Hu W, Kavanagh JJ, Deaver M, Johnston DA. Frequent overexpression of STK15/Aurora-A/BTAK and chromosomal instability in tumorigenic cell cultures derived from human ovarian cancer. *Oncol Res* 2005;15:49-57
- Flores ER, Sengupta S, Miller JB. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* 2005;7:363-373
- Yao R, Wang Y, D'Agostini F, Izzotti A. K-ras mutations in lung tumors from p53 mutant mice exposed to cigarette smoke. *Exp Lung Res* 2005;31:271-281
- Kim EL, Yoshizato K, Kluwe L, Meissner H. Comparative assessment of the functional p53 status in glioma cells. *Anti-cancer Res* 2005;25:213-224
- Lee YI, Han YJ, Lee SY, Lee YI. Activation of insulin-like growth factor II signaling by mutant type p53: physiological implications for potentiation of IGF-II signaling by p53 mutant 249. *Mol Cell Endocrinol* 2003;203:51-63
- Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat* 2003;21:201-216
- Jin Y, Abe K, Sato Y, Aita K, Irie H, Shiga J. Hepatitis B and C virus infection and p53 mutations in human hepatocellular carcinoma in Harbin, Heilongjiang Province, China. *Hepatol Res* 2002;24:379-384
- Qian GS, Kuang SY, He X, Groopman JD. Sensitivity of electrospray ionization mass spectrometry detection of codon 249 mutations in the p53 gene compared with RFLP. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1126-1129
- Hayashidani Y, Hiyama E, Murakami Y, Sueda T. Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozymes targeting human telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase in pancreatic carcinoma cells. *Hiroshima J Med Sci* 2005;54:21-27
- Callison SA, Hilt DA, Jackwood MW. In vitro analysis of a hammerhead ribozyme targeted to infectious bronchitis virus nucleocapsid mRNA. *Avian Dis* 2005;49:159-163
- Willkomm DK, Minnerup J, Huttenhofer A, Hartmann RK. Experimental RNomics in *Aquifex aeolicus*: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog. *Nucleic Acids Res* 2005;33:1949-1960
- Pljevaljcic G, Klostermeier D, Millar DP. The tertiary structure of the hairpin ribozyme is formed through a slow conformational search. *Biochemistry* 2005;44:4870-4876
- Pasquali S, Gan HH, Schlick T. Modular RNA architecture revealed by computational analysis of existing pseudoknots and ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res* 2005;33:1384-1398
- Trang P, Kilani A, Lee J, Hsu A, Liou K, Kim J, Nassi A, Kim K, Liu F. RNase P ribozymes for the studies and treatment of human cytomegalovirus infections. *J Clin Virol* 2002;2:63
- Xu RH, Lin J, Zhou XQ, Xie Q, Jin YX, Yu H, Liao D. Activity identification of anti-caspase-3 mRNA hammerhead ribozyme in both cell-free condition and BRL-3A cells. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:606-611
- Bergeron LJ, Perreault JP. Development and comparison of procedures for the selection of delta ribozyme cleavage sites within the hepatitis B virus. *Nucleic Acids Res* 2002;30:4682-4691
- Chang Z, Westaway S, Li S, Zaia J, Rossi J, Scherer L. Enhanced Expression and HIV-1 Inhibition of Chimeric tRNA (Lys3)-Ribozymes under Dual U6 snRNA and tRNA Promoters. *Mol Ther* 2002;6:481
- Okunaga T, Abe Y, Tsuchide T, Hatanaka H, Oshika Y, Tomisawa M, Yoshimura M, Ohnishi Y, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Nakamura M. Ribozyme mediated cleavage of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor inhibits liver metastasis of a pancreatic cancer cell line. *Int J Oncol* 2002;21:1027-1032
- Huesker M, Folmer Y, Schneider M, Fulda C, Blum HE, Hafkemeyer P. Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-MDR1 ribozymes. *Hepatology* 2002;36:874-884
- Wang CH, Tsai LJ, Tsao YP, Hsieh JH, Chien WW, Liao CL, Wang HW, Liu HS, Chen SL. Recombinant adenovirus encoding H-ras ribozyme induces apoptosis in laryngeal cancer cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:805-814
- Banerjee A, Li MJ, Remling L, Rossi J, Akkina R. Lentiviral transduction of Tar Decoy and CCR5 ribozyme into CD34+ progenitor cells and derivation of HIV-1 resistant T cells and macrophages. *AIDS Res Ther* 2004;1:2
- Nahreini P, Hanson AJ, Andreatta CP, Koustas WT, Prasad KN. Altering cellular signaling pathways enhance gene silencing activity of shRNA, shRNA. ribozyme, and shRNA. antisense in neuroblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 2004;24:781-792
- Goila R, Banerjee AC. Sequence-specific cleavage of hepatitis X RNA in cis and trans by novel monotarget and multitarget hammerhead motif-containing ribozymes. *Oligonucleotides* 2004;14:249-262
- Tan TM, Zhou L, Houssais S, Seet BL, Jaenicke S, Peter F, Lim SG. Intracellular inhibition of hepatitis B virus S gene expression by chimeric DNA-RNA phosphorothioate minimized ribozyme. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002;12:257-264
- McCall MJ, Hendry P, Mir AA, Conaty J, Brown G, Lockett TJ. Small, efficient hammerhead ribozymes. *Mol Biotechnol* 2000;14:5-17
- Kuwabara T, Warashina M, Orita M, Koseki S, Ohkawa J, Taira K. Formation of a catalytically active dimer by tRNA (Val)-driven short ribozymes. *Nat Biotechnol* 1998;16:961-965
- Soda Y, Tani K, Bai Y, Saiki M. A novel maxizyme vector targeting a bcr-abl fusion gene induced specific cell death in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;104:356-363
- Iyo M, Kawasaki H, Taira K. Maxizyme technology. *Methods Mol Biol* 2004;252:257-265
- Oshima K, Kawasaki H, Soda Y, Tani K, Asano S, Taira K. Maxizymes and small hairpin-type RNAs that are driven by a tRNA promoter specifically cleave a chimeric gene associated with leukemia in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2003;63:6809-6814