文章编号：1000-5404(2005)05-0385-03

论著

全反式维甲酸增强 HSV-TK/GCV 对 BIU-87 细胞旁观者效应的观察

罗顺文，叶　钢，张荣贵，江永浩，刘为池　（第三军医大学新桥医院泌尿外科，全军肾脏病中心，重庆 400037）

提　要：目的　体外观察全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对 BIU-87 细胞缝隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)及旁观者效应的影响。**方法**　用染料划痕标记技术观察 ATRA 对 BIU-87 细胞 GJIC 功能的影响，MTT 法观察 ATRA 处理后 HSV-TK/GCV 对 BIU-87 细胞旁观者效应的变化。**结果**　ATRA 显著改善 BIU-87 细胞 GJIC 功能，并提高 HSV-TK/GCV 的旁观者杀伤作用。**结论**　ATRA 可以改善 BIU-87 细胞间通讯功能，可能是 ATRA 增强 HSV-TK/GCV 旁观者效应的重要原因之一。

关键词：膀胱癌；全反式维甲酸；缝隙连接细胞间通讯；HSV-TK
中图法分类号：R329.25；R459.9；R737.14　　**文献标识码：**A

ATRA enhances the bystander effect of HSV-TK/GCV on BIU-87 cell line *in vitro*

LUO Shun-wen, YE Gang, ZHANG Rong-gui, JIANG Yong-hao, LIU Wei-chi (Renal Diseases Research Center, Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective　To observe whether all-trans retinoic acid (ATRA) can improve the gap junction intercellular communication (GJIC) of BIU-87 cell lines and enhance the bystander effect of HSV-TK/GCV *in vitro*. **Methods**　Scrap loading and dye transferring was used to evaluate the GJIC of BIU-87 cells after ATRA therapy. MTT test was used to detect the changed bystander effect of BIU-87 cells on HSV-TK/GCV after ATRA therapy. **Results**　ATRA improved the GJIC of BIU-87 cells greatly and enhanced bystander effect of HSV-TK/GCV on the BIU-87 cells. **Conclusion**　ATRA can improve the GJIC of tumor cells, which is perhaps one of the most important reasons for enhancing the bystander effect of HSV-TK/GCV on the BIU-87 cell line.

Key words: bladder cancer; all-trans retinoic acid; gap junction intercellular communication; HSV-TK

单纯疱疹胸苷激酶基因/丙氧鸟苷系统(HSV-TK/GCV)已广泛应用于肿瘤基因治疗的研究，其优点是存在旁观者效应。我们既往的实验研究表明，HSV-TK/GCV 对膀胱癌细胞有杀伤作用，但旁观者效应不显著[1,2]。本实验体外观察全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对HSV-TK/GCV对人膀胱癌 BIU-87 细胞旁观者杀伤作用的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

重组逆转录病毒载体 PL(HyTK)SN 质粒内含与潮霉素磷酸转移酶基因相融合的Ⅰ型单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV1-TK)基因，由新桥医院神经外科黄其林博士惠赠。全反式维甲酸(Sigma 公司)溶解于二甲基亚枫(DMSO) - 20 ℃保存，用培养基稀释到实验浓度，丙氧鸟苷(GCV)为湖北科益药业有限公司产品，脂质体(DOTAP)转染试剂盒和质粒提取试剂盒为 Promega 公司产品，荧光染料 Lucifer-Yellow CH(Sigma 公司)，潮霉素(Gibco 公司)。TK 基因引物：P1 5′ CCGGCCCTCACCCTCATCTT，P2 5′ CCGATTGACTTTGTGCCTTCCT(上海基康公司合成)。RT-PCR 试剂盒购自鼎国试剂公司。膀胱癌细胞株 BIU-87(北京医科大学泌尿外科研究所提供)培养于含 10% 小牛血清的 PRMI1640 培养基中(37 ℃，5% CO_2)。0.25% 胰酶消化传代。

1.2　方法

1.2.1　重组质粒 DNA 的提取及 BIU87-TK 克隆筛选　细菌在含氨苄青霉素 LB 培养基过夜培养，按试剂盒说明书操作，提取质粒，经琼脂糖电泳鉴定并测定 OD 值。脂质体介导转染(DOTAP/DNA：10 μl/2 μg)后细胞于含潮霉素 B(400 mg/L)培养液中筛选 3 周，设阴性对照，扩增培养阳性克隆细胞(BIU87-TK)，提取细胞 RNA，RT-PCR 鉴定 TK 基因的导入和表达。

1.2.2　划痕标记染料示踪技术观察 ATRA 对 BIU-87 细胞缝隙连接细胞间通讯(GJIC)功能的影响　实验组 ATRA 溶解于 DMSO 后，配成含 ATRA 终浓度为 10 μmol/L 的培养基，对照组加等量 DMSO，不含 ATRA。分别观察 ATRA 作用 12、24、48、72 h，去培养基，0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次，吸净后浸于 0.05% Lucifer-

作者简介：罗顺文(1974－)，男，福建省连城县人，硕士研究生，主治医师，主要从事泌尿系统肿瘤方面的研究。电话：(023)65221053，E-mail：luosw2000.student@sina.com
通讯作者：叶　钢，电话：(023)68774624，E-mail：gye@mail.xinqiaohospital.com.cn
收稿日期：2004-10-12；修回日期：2005-02-15

Yellow CH 的缓冲液中 2 min，尖手术刀片划痕后 3 min，0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次，荧光显微镜上观察染料从划痕列细胞向邻近细胞传递距离。

1.2.3 ATRA 增强 HSV-TK/GCV 旁观者效应的观察 细胞总数为 1×10^5 接种在 24 孔培养板上，其中阳性克隆细胞（BIU87-TK）与 BIU-87 亲本细胞按不同比例混合培养于含 10 μmol/L ATRA 培养液和对照组培养液中（BIU87-TK 细胞比例分别为 10%、20%、40%、60%、80%、100%），每组 6 复孔，约 80% 融合后 5 孔换含 GCV 100 μg/ml 的培养基，另一孔为组内对照，5 d 后测光吸收值，每孔杀伤率 =（组内对照孔 MTT 值 - 治疗孔 MTT 值）/ 组内对照 MTT 值 × 100%，求均值。

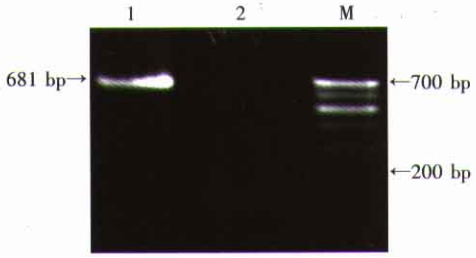
1.3 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，以 SPSS 软件进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 BIU87-TK 细胞的建立

所提取质粒 DNA 经酶切电泳鉴定，符合实验要求。脂质体介导 TK 基因转染，于含潮霉素 B 培养液中筛选，阴性对照细胞 10～14 d 全部死亡，转染阳性细胞生长，经扩增传代培养后建立 BIU87-TK 细胞，提取细胞 RNA，经 RT-PCR 检测出特异性 681 bp 的 TK 基因片段，证明有 HSV-TK 基因的导入和表达（图 1）。



M: Marker; 1: TK(+); 2: TK(-)

图 1 RT-PCR 产物电泳图：转染细胞有 TK 片段，未转染细胞无 TK 片段

Fig 1 RT-PCR products of TK DNA segment: positive in the transferred cells, negative in the untransferred cells

2.2 ATRA 对 BIU-87 细胞 GJIC 功能的影响

对照组细胞传输功能很低，染料传到划痕附近 1～2 列细胞，ATRA 作用后，染料传输功能明显改善，在 12 h 有改变，24 h 达到最高水平，可传到划痕邻近 4～6 列细胞，作用 72 h 仍维持在相同水平。经 ATRA 作用 24 h，实验组传输至 4～6 列细胞，而对照组的染料传输只有 1～2 列细胞（图 2、3）。

2.3 ATRA 增强 HSV-TK/GCV 旁观者效应影响的观察

MTT 测值后按公式计算得各组杀伤率，HSV-TK/GCV 基因对 BIU-87 细胞无论在对照组还是治疗组杀伤比例大于 TK 阳性细胞的比例，即 GCV 可引起未转染 TK 基因的 BIU-87 细胞杀死，证明两组都存在“旁观者效应”。杀伤率随 BIU87-TK 细胞比例的提高而提高，在 BIU87-TK 比例为 20%、40%、60% 时，治疗组明显高于对照组（$P<0.05$），在对照组中，当 BIU87-TK 细胞达到 80% 时，可发挥最大杀伤作用；而在治疗组中，BIU87-TK 细胞占 60% 时便接近最大作用（图 4）。

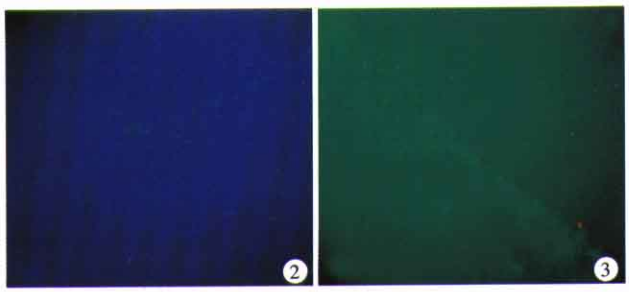


图 2 对照组荧光染料传递到伤沿 1～2 列细胞 （EnVision × 100）

Fig 2 Fluorescence dye loaded in the 1-2 lines of the cells near the scraping in the control group （EnVision × 100）

图 3 10 μmol/L ATRA 作用 24 h 染料传输到临近 4～6 列 （EnVision × 100）

Fig 3 Fluorescence dye loaded in the 4-6 lines of the cells from the scraping after 10 μmol/L ATRA therapy for 24 h (EnVision × 100)

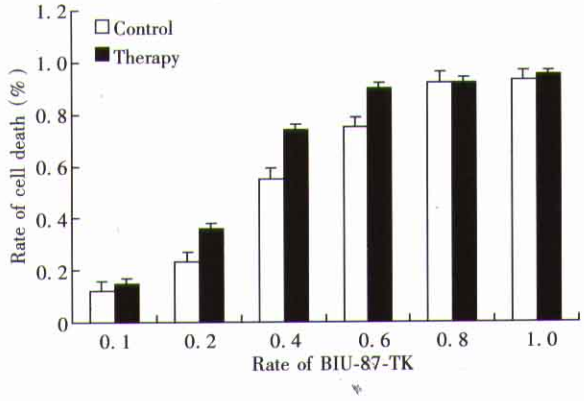


图 4 ATRA 增强 HSV-TK/GCV 旁观者效应影响

Fig 4 The enhanced bystander effect of HSV-TK/GCV by ATRA

3 讨论

HSV-TK 基因转导治疗肿瘤显示了较好的临床应用前景。实验已证实，“旁观者效应”即转染细胞使未转染细胞杀死是治疗肿瘤的另一重要途径，它与转染效率被看成肿瘤自杀基因治疗成功的两大要素[3]。在目前基因转染效率还不尽人意的情况下，旁观者效应的作用越来越受重视，探讨旁观者效应机制及如何提高旁观者效应具有重要意义。TK 基因使 GCV 代谢成磷酸化 GCV，磷酸化 GCV 抑制肿瘤细胞 DNA 合成，使转染 TK 基因的肿瘤细胞“自杀”。大量实验已证实许多细胞膜表达缝隙连接蛋白，在相邻细胞间相互锚定形成缝隙连接通道，允许小于 1.5×10^3 的物质通过，由于磷酸化 GCV 分子量约 350～540，很容易通过缝隙连接细胞间通讯传递到未转染 TK 基因的细胞内，使之死亡。缝隙连接细胞间通讯（GJIC）是实现旁观者效

应的主要机制之一[4]。

维甲酸是目前发现能显著改善细胞间通讯功能的物质之一，在许多肿瘤细胞中已发现有此改善作用，但在膀胱癌中未见报道[5,6]。划痕标记染料示踪技术实验应用的 Lucifer-Yellow 染料分子量约 450，只能通过缝隙连接传递，不能直接通过胞膜传递，染料传递的速率直接反应了 GJIC 功能。本实验结果显示 BIU-87 细胞间通讯功能弱，染料传输到邻近 1～2 列细胞，细胞间通讯功能弱可以解释 TK 基因治疗膀胱碍旁观者效应不明显的原因。经维甲酸处理后，染料传输到里划痕 4～6 列细胞。全反式维甲酸可以显著改善 BIU-87 细胞 GJIC 功能。

通过含 TK 的 BIU-87 细胞和 BIU-87 亲本细胞按不同比例混合培养，观察 ATRA 对旁观者效应的影响，由实验结果可见 ATRA 显著增强了 HSV-TK/GCV 的旁观者杀伤作用。当 BIU87-TK 占 60%时几乎杀伤所有肿瘤细胞，发挥最大功效；而对照组要 TK 阳性细胞占 80%时才发挥最大杀伤作用。维甲酸改善细胞 GJIC 功能的同时提高 HSV-TK/GCV 的旁观者效应，说明了缝隙连接细胞间通讯在旁观者效应的重要作用，为我们进一步深入认识自杀基因旁观者效应机制及如何提高疗效提供依据。

参考文献：

[1] 叶 钢，金锡御，饶亚兰，等. HSV-TK/GCV 系统体外对膀胱癌细胞的旁观者杀伤作用[J]. 中华泌尿外科杂志，2001，22(5)：284－287.
[2] 刘为池，叶 钢，张荣贵. 逆转录病毒介导 HSV-TK 基因治疗膀胱癌及旁观者效应的观察[J]. 重庆医学，2003，32(2)：132－134.
[3] 刘为池，叶 钢. 自杀基因治疗旁观者效应的研究进展[J]. 国外医学：泌尿系统分册，2000，20(增刊)：121－123.
[4] Zhang L, Wikenheiser K A, Whitsett J A, *et al*. Limitations of retrovirus-mediated HSV-TK gene transfer to pulmonary adenocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(5): 563－574.
[5] Bex V, Mercier T, Chaumontet C, *et al*. Retinoic acid enhances connexin43 expression at the post-transcriptional level in rat liver epithelial cells [J]. Cell Biochem Funct, 1995, 13(1): 69－77.
[6] Wang Z, Zhang Z, Liu Y, *et al*. Effect of retinoic acid and its complexes with transition metals on human bladder cancer cell line EJ *in vitro*[J]. Urol Res, 2000, 28(3): 191－195.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2005)05-0387-01

个案与短篇

肺结核继发曲菌感染7例临床分析

Clinical analysis of pulmonary tuberculosis followed by aspergillosis in seven cases

蔡 颖，吴小梅，揭晓敏，赵庆波，邓 珂 （解放军第324中心医院感染科，重庆 400020）

近年来，肺结核继发曲菌感染的病例时有所见。现将我院经手术证实的7例分析报告如下，以引起同道的注意和重视。

1 临床资料

1.1 一般资料

7例患者中，男性6例，女性1例，年龄28～35岁。全部患者均经过含 RFP 化疗方案治疗过。疗程最短者1年10个月，最长者5年。7例患者术前痰厚涂片中，抗酸杆菌全部呈阳性，4例术前发生过与体位变化关系密切的反复大咯血，2例术前反复发生过中等量咯血，1例反复发生过小量咯血。

1.2 病理检查

4例术后标本证实为结核性纤维厚壁空洞，2例为结核性干酪厚壁空洞，1例为球形干酪坏死病灶。全部术后标本中均查见曲菌球或曲菌。

2 讨论

曲菌属丝状真菌，在自然界广泛存在。曲菌多为寄生菌，常寄生在人的上呼吸道，一般情况下不致病，但当机体免疫功能下降或长期使用抗生素、激素等药物时，可致发病。肺曲菌感染有原发感染和继发感染两种，以后者多见，可继发于肺结核、支气管扩张、肺囊肿、慢性肺炎、结节病、矽肺等。多数学者认为[1-3]，继发性肺曲菌感染与机体内菌群失调和免疫功能低下有关。

利福平(RFP)自1962年应用于临床以来，由于其杀灭结核杆菌的作用强大、毒性较低、价格便宜等优点，在抗结核治疗中得到了广泛的运用。但与此同时，肺结核继发肺曲菌感染有逐年增加的趋势。文献[2]报道，RFP 对人体的 T 淋巴细胞 E 玫瑰花的形成有明显的抑制作用，从而导致机体免疫功能下降，这可能是造成肺结核继发肺曲菌感染的重要原因。同时，由于 RFP

（下转391页）

作者简介：蔡 颖(1970－)，女，四川省兴文县人，主治医师，主要从事感染病方面的研究与临床工作，发表论文7篇。电话：(023)68762081

收稿日期：2003-09-02；修回日期：2004-12-20