文章编号:1000-5404(2013)23-2547-04

论著

# 不同拷贝数 CArG/5HRE + HSV-TK 系统辅助伽玛刀杀伤 C6 胶质瘤的初步研究

姚一搏[1],许民辉[2],耿明英[2],谭 勇[3],李飞鹏[2],沈光建[2] (236400 安徽 临泉,安徽省临泉县人民医院神经外科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:神经外科[2],核磁共振室[3])

[摘要] **目的** 研究不同拷贝数 CArG/5HRE + HSV-TK 系统辅助伽玛刀杀伤 C6 胶质瘤效果,寻求伽玛刀条件下对胶质瘤杀伤更有效的适宜拷贝数 CArG/5HRE + HSV-TK 系统。**方法** 在 Wistar 大鼠颅内 C6 胶质瘤模型的基础上,构建不同拷贝数 CArG/5HRE + HSV-TK 质粒(空质粒转染 + 伽玛刀照射组、HSV-TK + 伽玛刀照射组、4CArG/5HRE 启动子 + 伽玛刀照射组、9CArG/5HRE 启动子 + 伽玛刀照射组、12CArG/5HRE 启动子 + 伽玛刀照射组),通过脂质体转染到大鼠颅内胶质瘤组织中,对瘤组织伽玛刀放射外科治疗后取大鼠肿瘤组织。通过对瘤组织常规病理、瘤体细胞凋亡、HSV-TK mRNA 及蛋白表达的观察,确定不同拷贝数 CArG/5HRE + HSV-TK 系统辅助伽玛刀诱导 HSV-TK 表达及对 C6 胶质瘤杀伤效果。**结果** 各组肿瘤细胞均可见凋亡、破坏,CArG/HRE 双启动子 + 伽马刀照射组更为明显($P < 0.05$),尤以 9CArG/5HRE 启动子 + 伽马刀照射组最为突出,凋亡率为(0.71 ± 0.12)% ($P < 0.05$);CArG/HRE 双启动子 + 伽马刀照射组中 HSV-TK mRNA 及蛋白表达较无启动子组明显增加($P < 0.05$),9CArG/5HRE 启动子 + 伽马刀照射组最为明显,HSV-TK mRNA 的相对表达量为(0.84 ± 0.09,$P < 0.05$)。**结论** 在 SRS 治疗条件下,CArG/HRE 双启动子能促进目的基因 HSV-TK 的表达,增加对 C6 胶质瘤细胞的杀伤,其中,9CArG/5HRE 双启动子的作用最明显。

[关键词] CArG/HRE;HSV-TK;胶质瘤;伽玛刀
[中图法分类号] R73-362; R730.56; R730.264 [文献标志码] A

# Cytotoxic effect of gamma knife assisted with different copy numbers of CArG/5HRE + HSV-TK system on C6 glioma cells

Yao Yibo[1], Xu Minhui[2], Geng Mingying[2], Tan Yong[3], Li Feipeng[2], Shen Guangjian[2] ([1]Department of Neurosurgery, People's Hospital of Linquan County, Linquan, Anhui Province, 236400; [2]Department of Neurosurgery, [3]MRI Room, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the cytotoxic effect of gamma knife assisted with different copy numbers of CArG/5HRE + herpessimplex virus-thymidine kinase (HSV-TK) system on C6 glioma cells. **Methods** Intracranial C6 glioma model was established in Wister rats. The recombinant plasmids with different copy numbers of CArG/5HRE and suicide gene HSV-TK were artificially constructed. These different recombinant plasmids were transfected into C6 glioma rats with GCV injected abdominally afterward. After Gamma knife, tumor tissue of rats was collected, and then the killing effect of the tumor was decided by conventional pathology, tumor cell apoptosis and the expression of HSV-TK gene. **Results** The destruction and apoptosis of tumor cells were observed in all group, and more obvious in the groups containing CArG/HRE promoter ($P < 0.05$), especially in 9CArG/5HRE group ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression of HSV-TK was increased significantly in groups containing CArG/HRE promoter ($P < 0.05$), especially in 9CArG/5HRE group ($P < 0.05$). **Conclusion** Under stereotactic radiosurgery (SRS) treatment, CArG/HRE double promoter significantly promotes the expression of target gene HSV-TK, and enhances the killing effect to C6 glioma cells. The effect of 9CArG/5HRE double promoter is identified as the most significant.

[**Key words**] CArG/HRE;herpessimplex virus-thymidine kinase;glioma;Gamma knife

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2009BB5315). Corresponding author:Shen Guangjian,E-mail: littlep7273@sina.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5315)
[通信作者] 沈光建,E-mail: littlep7273@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131022.1553.022.html(2013-10-22)

虽然立体定向放射外科技术(stereotactic radiosurgery,SRS,包括伽玛刀,X刀等)已大量应用于胶质瘤辅助治疗中,但效果并不明显[1]。有报道显示,利用基因工程技术,使肿瘤细胞表达自杀基因或肿瘤杀伤因子,可增强SRS对肿瘤的杀伤[2-3];而嵌入辐射敏感即早基因启动子CArG或/和缺氧敏感启动子HRE则是实现放射治疗后转移基因高效表达的重要途径[4-6]。为此,根据SRS的特点,本研究将不同拷贝数的CArG加入缺氧最敏感的5HRE拷贝上构成辐射-缺氧双敏感性启动子,借助于单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpessimplex virus-thymidine kinase,HSV-TK),观察其辅助伽玛刀杀伤C6胶质瘤的效果,旨在为选择SRS治疗胶质瘤合适的增效手段提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

空质粒、HSV-TK质粒及不同拷贝数CArG/5HRE + HSV-TK系统由上海生工工程公司构建并鉴定,C6胶质瘤细胞株购自中科院上海细胞研究所,1.5T核磁共振为西门子公司生产,中国OUR-XGD伽玛刀。

### 1.2 实验动物及分组

30只1.5月龄雄性Wistar大鼠,体质量200~250 g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。分为空质粒转染 + 伽玛刀照射组、HSV-TK + 伽玛刀照射组、4CArG/5HRE启动子 + 伽玛刀照射组、9CArG/5HRE启动子 + 伽玛刀照射组、12CArG/5HRE启动子 + 伽玛刀照射组。大鼠在麻醉和建模中都有死亡,在建模成功后分为5组,每组5只。

### 1.3 荷瘤动物模型的建立

Wistar大鼠1%戊巴比妥钠按40 mg/kg腹腔注射麻醉后固定于立体定向架,剪去头顶毛发,碘酒和乙醇消毒皮肤后铺无菌洞巾,于中线眼裂后作一长约1.0 cm切口,分离皮肤暴露前囟,取其前方1.0 mm,向右旁开1.0 mm,钻孔至硬膜,孔径1.0 mm。微量注射器吸入吹打混匀细胞悬液5 μL,垂直进针至硬膜下2 mm,注入细胞悬液,注射时间持续5 min,以骨腊封闭骨窗,逐层缝合关颅。根据预实验MRI肿瘤观察结果,于荷瘤后13 d进行实验。

### 1.4 重组质粒转染肿瘤及肿瘤的伽玛刀照射

荷瘤后13 d,原骨窗口入路,微量进样器缓慢、多角度注入瘤体20 μL 5种不同质粒和脂质体的混合液,缓慢退针。骨蜡封闭骨窗,缝合皮肤,酒精消毒。转染后按100 mg/(kg·d)腹腔注射羟甲基无环鸟苷(GCV),至实验结束。转染后3 d,实验组动物固定于适配固定装置上[7],行MRI定位及肿瘤的伽玛刀放射。瘤体中心剂量30 Gy,边缘剂量15 Gy。照射完毕,动物于28 ℃室温观察苏醒,分笼饲养。

### 1.5 检测指标

照射第3天,断头活杀动物。迅速剥取脑组织,大体观察后,于冰块上切取肿瘤组织。部分肿瘤组织分块保存于液氮中,另一些肿瘤组织则脱水、石蜡包埋。

1.5.1 常规病理 石蜡切片,常规HE染色、封片,显微镜下观察肿瘤细胞变化。

1.5.2 肿瘤细胞凋亡 采用原位TUNEL法。石蜡切片脱蜡至水化,蛋白酶K消化,TUNEL反应液和Streptavidin-HRP液中孵育,DAB显色,苏木精复染,中性树胶封片,光镜观察。随机选取5个非重叠高倍镜(×400)视野,计数凋亡肿瘤细胞数与肿瘤细胞总数,计算凋亡率:凋亡肿瘤细胞数/肿瘤细胞总数×100%。

1.5.3 HSV-TK mRNA的表达 采用Sybr荧光定量实时PCR测定。Trizol提取总RNA。逆转录过程按试剂盒说明书操作。HSV-TK基因上游引物:5′-CCGAGCCGATGACTTACTGG-3′,下游引物:5′-CGGTCACGGCATAAGGCA-3′,片段大小162 bp;内参为β-actin,上游引物:5′-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3′,下游引物:5′-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3′,片段大小150 bp。配置定量PCR反应体系。PCR扩增条件设置:94 ℃ 4 s,94 ℃ 20 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环35次,72 ℃检测信号。根据所得Ct值,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算目的基因的相对表达量。

1.5.4 HSV-TK蛋白 采用免疫组织化学和Western blot检测。免疫组织化学采用S-P法,步骤参照使用说明书。Western blot法简述如下:提取细胞蛋白并定量。将细胞蛋白50 μg/mL进行SDS-PAGE电转移2 h,SDS-PAGE分离后的凝胶中蛋白电转移至硝酸纤维素滤膜(nitrocellulose filter membrane,NC),将NC膜放入封闭液室温置摇床1 h,然后将NC膜放入稀释的HSV-TK抗体液中4 ℃孵育过夜,用TBS缓冲液洗膜5 min×3次,再将NC膜移入用TBS以1∶1 000稀释的羊抗兔IgG-HRP二抗室温孵育1 h,ECL化学发光系统检测。凝胶图像处理系统分析目的条带的灰度值。

### 1.3 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件,进行组间比较$t$检验。

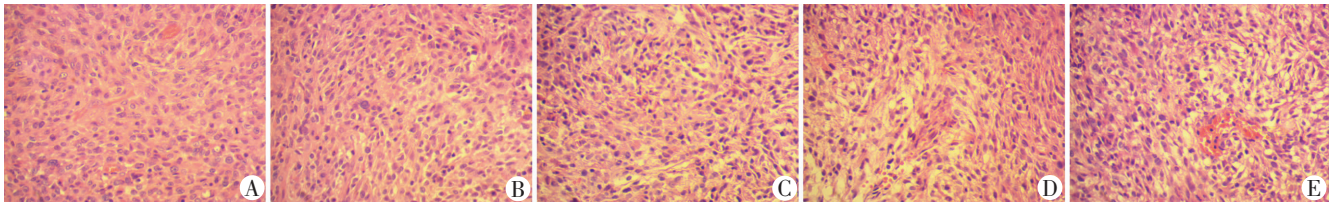
## 2 结果

### 2.1 常规病理观察

各组肿瘤细胞均有不同程度的破坏,分布于整个肿瘤区域。与空质粒转染 + 伽玛刀照射组和HSV-TK + 伽玛刀照射组相比,含不同拷贝数CArG/5HRE双启动子 + 伽玛刀照射组细胞排列更为稀疏,细胞破坏象更多,其中以9CArG/5HRE启动子 + 伽玛刀照射组最为明显。空质粒转染 + 伽玛刀照射组分别与HSV-TK + 伽玛刀照射组、4CArG/5HRE启动子 + 伽玛刀照射组、12CArG/5HRE + 伽玛刀照射组比较相差不明显(图1)。

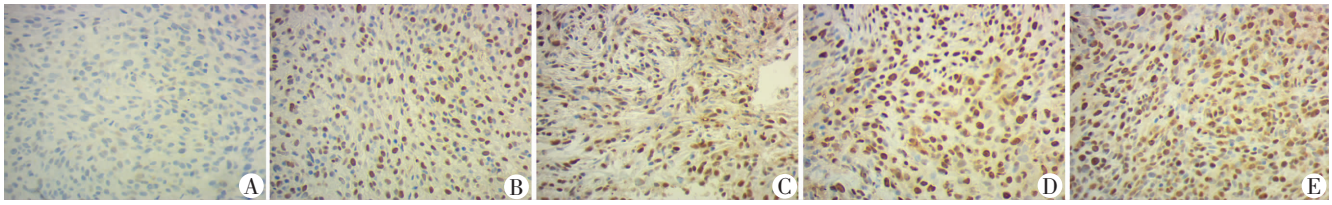
### 2.2 肿瘤细胞凋亡

各组肿瘤细胞均显示不同程度的凋亡,分布于整个肿瘤区域。与空质粒转染 + 伽玛刀照射组和HSV-TK + 伽玛刀照射组相比,含不同拷贝数CArG/5HRE双启动子 + 伽玛刀照射组肿瘤细胞凋亡明显增加($P<0.05$),且9CArG/5HRE启动子 + 伽玛刀照射组均明显高于4CArG/5HRE启动子 + 伽玛刀照射组和12CArG/5HRE启动子 + 伽玛刀照射组($P<0.05$)。空质粒转染 + 伽玛刀照射组与HSV-TK + 伽玛刀照射组、4CArG/5HRE启动子 + 伽玛刀照射组与12CArG/5HRE + 伽玛刀照射组比较相差不明显($P>0.05$,图2,表1)。




A：空质粒转染＋伽玛刀照射组；B：HSV-TK＋伽玛刀照射组；C：4CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组；D：9CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组；E：12CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组

**图 1　HE 染色观察各组大鼠颅内胶质瘤组织的病理变化**　（×400）




A：空质粒转染＋伽玛刀照射组；B：HSV-TK ＋伽玛刀照射组；C：4CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组；D：9CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组；E：12CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组

**图 2　各组大鼠颅内胶质瘤细胞凋亡情况**　（TUNEL ×400）

**表 1　各组细胞凋亡率、HSV-TK mRNA 及 HSV-TK 蛋白表达的比较**（$n=5, \bar{x}\pm s$）

| 组别 | 细胞凋亡率(%) | HSV-TK mRNA 相对表达量 | HSV-TK/GAPDH 蛋白灰度值 |
|---|---|---|---|
| 空质粒转染＋伽玛刀照射组 | 0.21±0.06 | – | – |
| HSV-TK ＋伽玛刀照射组 | 0.23±0.08 | 0.25±0.07 | 0.37±0.10 |
| 4CArG/5HRE 启动子＋伽玛刀照射组 | 0.39±0.07$^{ab}$ | 0.65±0.08$^{bc}$ | 0.74±0.03$^{bc}$ |
| 9CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组 | 0.71±0.12$^{a}$ | 0.84±0.09$^{c}$ | 0.99±0.11$^{c}$ |
| 12CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组 | 0.49±0.07$^{ab}$ | 0.73±0.05$^{bc}$ | 0.83±0.06$^{bc}$ |

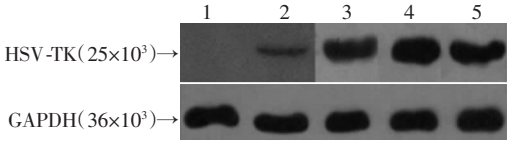
a：$P<0.05$，与空质粒转染＋伽玛刀照射组及 HSV-TK＋伽玛刀照射组比较；b：$P<0.05$，与 9CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组比较；c：$P<0.05$，与 HSV-TK＋伽玛刀照射组比较

### 2.3　HSV-TK mRNA 的表达

空质粒转染＋伽玛刀照射组未见 HSV-TK mRNA 的表达。HSV-TK＋伽玛刀照射组见 HSV-TK mRNA 少量表达，含不同拷贝数 CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组较之更明显（$P<0.05$），且 9CArG/5HRE 启动子＋伽玛刀照射组明显高于 4CArG/5HRE＋伽玛刀照射和 12CArG/5HRE 启动子＋伽玛刀照射组（$P<0.05$）。4CArG/5HRE 启动子＋伽玛刀照射组和 12CArG/5HRE 启动子＋伽玛刀照射组间则相差不明显（$P>0.05$，表 1）。

### 2.4　HSV-TK 蛋白在 C6 胶质瘤组织中的表达水平

Western blot 检测结果显示，空质粒转染＋伽玛刀照射组未见 HSV-TK 蛋白的表达。HSV-TK＋伽玛刀照射组见少量 HSV-TK mRNA 的表达，含不同拷贝数 CArG/5HRE 启动子＋伽玛刀照射组较之更为明显（$P<0.05$），且 9CArG/5HRE 启动子＋伽玛刀照射组明显高于 4CArG/5HRE 启动子＋伽玛刀照射组和 12CArG/5HRE 启动子＋伽玛刀照射组（$P<0.05$）。4CArG/5HRE 启动子＋伽玛刀照射组和 12CArG/5HRE 启动子＋伽玛刀照射组间相差不明显（表 1、图 3）。




1：空质粒转染＋伽玛刀照射组；2：HSV-TK ＋伽玛刀照射组；3：4CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组；4：9CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组；5：12CArG/5HRE 启动子＋伽马刀照射组

**图 3　Western blot 检测各组大鼠 HSV-TK 蛋白的表达**

## 3　讨论

长期以来，放射治疗作为恶性脑瘤的综合治疗手段之一，在提高患者生存期、改善生存质量上发挥了重要作用。SRS 是传统放射治疗技术的进一步发展，因其疗效好和副反应小等，不逊于传统放射治疗技术，已大量应用于恶性脑瘤的治疗。不过，临床实践发现，SRS 技术对胶质瘤的治疗并未取得理想的效果。Szeifert 等[1]的研究资料显示，放射外科治疗后Ⅰ、Ⅱ级星形胶质细胞瘤的控制率为 60% ~70%，而高级别肿瘤患者，平均生存期为 14 个月，5 年生存率仅为 25%。对于 SRS 治疗胶质瘤效果不佳的主要原因，目前认为有：①一些恶性脑瘤呈侵袭性生长，并无清楚的边界。采用 SRS 治疗技术时，未落入设定射野的周围侵袭灶只接受低剂量照射，致使一些放射抗拒细胞加速再增殖；②乏氧及其他一些原因使一些肿瘤细胞对电离辐射具有相当的抵抗性，而受周围正常组织的限制，放射剂量又不可能无限增加。一般认为，这些缺点已非 SRS 技术本身所能克服，需要其他与之适配的辅助方

法和措施。Niranjan 等[2-3]观察发现,SRS 复合 TNF-α 基因及其他基因治疗大鼠移植性胶质母细胞瘤的效果明显好于单纯使用 SRS 者,表明利用基因工程技术,使肿瘤细胞定向表达自杀基因或肿瘤杀伤因子而对肿瘤进行二次杀伤,是一种有效的 SRS 辅助治疗技术。不过该技术存在着转移基因表达调控的问题,即转移基因在靶组织中高效、长时、定向表达。

CArG 是即刻早期基因启动子的放射敏感性元件,具有辐射可诱导性,其核心为 CCA/T6GG;HRE 为缺氧敏感性增强子,其核心为 TACGTGC,能通过与缺氧环境下细胞产生的缺氧诱导因子特异性结合而诱导下游基因表达。在实体肿瘤的放射治疗中,由于同时存在电离辐射和肿瘤缺氧两种因素,嵌入 CArG 或/和 HRE 来调控转移基因的表达成为许多学者的主张[5-11]。对 SRS 来说,构建 CArG/HRE 缺氧辐射敏感双启动子更为合理。因为,与普通放疗不同,SRS 是单次照射,如果仅使用 CArG 启动子,则缺乏长时的刺激因素,使转移基因的高效表达难以维持。而缺氧是 SRS 治疗前后持续存在的病理因素,并随治疗时间的延长而加剧。加入 HRE 启动子则可充分地利用这一病理因素,使之成为转移基因表达的长时的刺激因素。本研究发现,导入不同拷贝数 CArG/5HRE 双启动子后,在 SRS 治疗条件下,目的基因 HSV-TK 的表达明显增加,对胶质瘤细胞的杀伤也明显增强,支持了上述推论,为 SRS 的增效治疗提供了线索。有文献报道改变该 CArG 反应盒的数目,可以引起基因启动子放射诱导活性显著改变;5 拷贝 HRE 的缺氧诱导活性最高[8,12-13]。对不同拷贝数 CArG/5HRE 的研究结果表明,在 SRS 条件下,9CArG/5HRE 启动子 + 伽玛刀照射组诱导的目的基因的表达和对肿瘤组织杀伤明显优于 4CArG/5HRE 启动子 + 伽玛刀照射组和 12CArG/5HRE 启动子 + 伽玛刀照射组,而 4CArG/5HRE 启动子 + 伽玛刀照射组和 12CArG/5HRE 启动子 + 伽玛刀照射组则无明显差异。本研究中对肿瘤的杀伤力没有伴随 CArG 拷贝数的增加逐渐增强,推测原因:①本实验中,对肿瘤的杀伤效果是由自杀基因表达和伽玛刀放射共同作用的结果;②自杀基因蛋白在肿瘤组织中的表达需要丰富的原料和适宜的环境,肿瘤组织在伽玛刀放射条件下不能提供充足的自杀基因蛋白合成原料,伽玛刀放射条件下也无法提供适宜的目的基因表达环境。由于 SRS 治疗剂量依具体情况差别很大,伽玛刀放射剂量的不同对肿瘤的杀伤效果也不同,因此这一结果为具体情况下合适拷贝数 CArG/5HRE 启动子的采用提供了选择。另外 CArG 放射敏感性元件核心 CCA/T6GG 中,通过人工改变 A/T 的拷贝数能否改变 CArG 放射敏感性值得进一步研究。

总之,本研究初步证实了不同拷贝数 CArG/5HRE 双启动子驱动的自杀基因 HSV-TK 辅助 SRS 治疗胶质瘤具有潜在的可行性,其中 9CArG/5HRE 启动子组对目的基因的诱导和肿瘤的杀伤更为有效。目前的研究尚未能得到更长时效的观察结果,对临近脑组织的影响也未涉及,有待进一步研究。

## 参考文献:


[1] Szeifert G T, Prasad D, Kamyrio T, *et al*. The role of the Gamma Knife in the management of cerebral astrocytomas[J]. Prog Neurol Surg, 2007, 20: 150-163.

[2] Niranjan A, Moriuchi S, Lunsford L D, *et al*. Effective treatment of experimental glioblastoma by HSV vector-mediated TNF alpha and HSV-tk gene transfer in combination with radiosurgery and ganciclovir administration[J]. Mol Ther, 2000, 2(2): 114-120.

[3] Niranjan A, Wolfe D, Tamura M, *et al*. Treatment of rat gliosarcoma brain tumors by HSV-based multigene therapy combined with radiosurgery[J]. Mol Ther, 2003, 8(4): 530-542.

[4] Kufe D, Weichselbaum R. Radiation therapy: activation for gene transcription and the development of genetic radiotherapy-therapeutic strategies in oncology[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2(4): 326-329.

[5] Staba M J, Mauceri H J, Kufe D W, *et al*. Adenoviral TNF-alpha gene therapy and radiation damage tumor vasculature in a human malignant glioma xenograft[J]. Gene Ther, 1998, 5(3): 293-300.

[6] 吕星, 邢瑞云, 路萍, 等. OSM 对黑色素瘤的抑制作用与基因-放射治疗效果[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(1): 27-30.

[7] 耿明英, 姚一搏, 沈光建, 等. 适配小型动物及临床伽玛刀立体定向头架固定装置的研制[J]. 重庆医学, 2013, 42(3): 336-337, 347.

[8] Ruan H, Wang J, Hu L, *et al*. Killing of brain tumor cells by hypoxia-responsive element mediated expression of BAX[J]. Neoplasia, 1999, 1(5): 431-437.

[9] 司英健, 光丽霞, 袁发焕, 等. 缺氧反应元件增强单纯疱疹病毒胸苷激酶/GCV 对乏氧环境 Ewing 肉瘤细胞杀伤作用的研究[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(8): 616-620.

[10] Greco O, Joiner M C, Doleh A, *et al*. Hypoxia- and radiation-activated Cre/loxP 'molecular switch' vectors for gene therapy of cancer [J]. Gene Ther, 2006, 13(3): 206-215.

[11] 王卫东, 陈正堂, 李德志, 等. 缺氧及辐射双敏感性启动子增强抑瘤素 M 表达治疗肺癌的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(4): 240-243.

[12] Scott S D, Joiner M C, Marples B. Optimizing radiation-responsive gene promoters for radiogenetic cancer therapy[J]. Gene Ther, 2002, 9(20): 1396-1402.

[13] Scott S D, Greco O. Radiation and hypoxia inducible gene therapy systems[J]. Cancer Metastasis Rev, 2004, 23(3/4): 269-276.


(**收稿**:2013-06-22;**修回**:2013-08-29)

(编辑 王小寒)