维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)04 - 0513 - 03

HSV - tk/GCV 系统对鼠膀胱癌的自杀基因治疗研究

张荣贵,叶 钢,刘为池

(第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

【摘 要】目的:在体外和体内水平建立膀胱癌的单纯疱疹病毒 - 胸苷激酶/丙氧鸟苷(herpes simplex virus type thymidine Kinase /ganciclovir, HSV - tk/GCV)自杀基因系统,并验证该系统的有效性。方法:用逆转录病毒载体 HSV - TK 转染鼠膀胱癌细胞株 T739,体外检测其对 GCV 的敏感性,在同基因鼠,分别建立 T739 和 T739 - TK 膀胱癌腹腔肿瘤模型。当 B 超显示肿瘤直径约 0.5~0.8cm 时,腹腔 GCV 给药 6 天,然后观察肿瘤大小变化及动物存活时间。结果:GCV 对 T739 - TK 细胞有显著杀伤作用,而对 T739 细胞的生长无影响,成功的建立了 T739 同基因鼠膀胱癌腹腔肿瘤模型,体内实验得到相应结果,转染了 TK 基因的 T739 鼠肿瘤明显变小,甚至消失,而未转染 TK 基因的 T739 鼠肿瘤继续增大,GCV 对其无明显治疗作用,转染了 TK 基因的 T739 鼠存活时间显著延长。结论:在体外和体内水平,表达 TK 基因的肿瘤细胞均被 GCV 有效杀伤,这表明 HSV - tk/GCV 系统有可能成为基因治疗膀胱癌的有效方法。

【关键词】HSV - TK 基因;膀胱癌;基因治疗;丙氧鸟苷

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 03 - 16

Suicide gene therapy for mouse bladder cancer using HSV - tk/GCV system

ZHANG Ronggui, et al

(*Department of Urology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a suicide gene therapy system HSV - tk/GCV for bladder cancer, a treatment in vitro as well as in vivo and to test its efficacy. *Methods*: Mouse bladder cancer cell line (T739) was transfected with retroviral vector HSV - tk gene. The sensitivity of T739 - TK cells to GCV was detected in vitro. In the mouse model of bladder tumor, T739 or T739 - TK was implanted beneath the peritoneum of syngeneic mice. When tumors grew to the size of 0.5~0.8cm, intraperitoneal administration of GCV was carried out for 6 days. Changes of tumor size and survival rate of mice were observed. *Results*: RT - PCR showed that TK gene was transferred into the T739 cell and expressed successfully. In vitro, T739 - TK cells became sensitive to low concentrations of GCV. In vivo studies showed similar result. Significant tumor inhibition was found in the T739 - TK group after administration of GCV, and the survival time of mice was prolonged. *Conclusion*: Tumor cells expressing HSV - tk gene were eradicated by administration of GCV in vitro as well as in vivo.

【Key words】HSV - TK; Bladder cancer; Gene therapy; Ganciclovir(GCV)

基因治疗是当前肿瘤治疗前沿课题,其中自杀基因的应用尤为引人嘱目,我们对单纯疱疹病毒 - 胸苷激酶/丙氧鸟苷自杀基因系统在膀胱癌治疗作用进行了初步的研究[1],本文主要介绍其对鼠膀胱癌的体内外杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

重组逆转录病毒载体 PL(HyTK)SN 质粒由新桥医院脑外科黄其林博士惠赠,内含潮霉素磷酸转移酶和 TK 融合基因。T739、NIH3T3 和 PA317 细胞为本实验室保存。丙氧鸟苷(Ganciclovir, GCV)为瑞士罗氏公司产品。T739 同基因鼠购自第三军医大学动物所。DOTAP 宝灵曼公司产品。潮霉素 B 和质粒提取试剂盒购自美国 Promega 公司。RNA、RT - PCR 试剂盒,100bp DNA Ladder 购自北京博大公司。引物:P1:5′ CCGGCCCTCACCCTCATCTT, P2:5′ CCGATTGACTTTGTGCCTTCCT,由上海肿瘤研究所设计合成。

1.2 细胞转染

重组载体对 T739 细胞的转染与筛选脂质体介导法用

作者介绍:张荣贵(1976 -),男,主治医师,硕士,主要研究方向:泌尿系统肿瘤基因治疗。

基金项目:重庆市科技基金资助项目(1997 - 53)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

DOTAP试剂将重组子转染包装细胞 PA317，扩潮霉素 B400mg/L 中筛选培养，直到出现抗潮霉素 B 的阳性克隆细胞，扩增培养潮霉素 B 抗性克隆，收集细胞培养上清，过滤后即获得所需要逆转录病毒上清。用病毒上清液感染 50% 贴壁生长的 T739 细胞，在 37℃，5% CO_2 的培养箱吸附 20h；第二天于含潮霉素 B400mg/L 的培养液中筛选培养，约筛选 3 周左右，撤除潮霉素 B，更换普通培养液，细胞长满后扩增培养，获得转染 HSV_1－tk 基因的鼠膀胱癌细胞，命名为 T739－TK 细胞。RT－PCR 检测 T739－TK 细胞中 TK 基因的表达。

1.3 GCV 对转染 HSV－tk 基因的 T739－TK 细胞的杀伤作用

将对数期生长的鼠膀胱癌细胞株 T739 和 T739－TK 细胞分别制成 1×10^5/ml 的单细胞悬液，按 1×10^5 个细胞加入 24 孔培养板内，用含 10% 灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液，在 37℃，5% CO_2 培养箱中分别培养，24h 后加入含不同浓度 GCV(0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0μg/ml)的培养液，各浓度设三个平衡孔。96h 后胰酶消化制备单细胞悬液，台盼蓝染色计数活细胞。计算每一浓度下三孔 T739－TK 及 T739 的活细胞平均数占对照组细胞总数的百分比。细胞存活率(%)＝(实验组活细胞数/对照组活细胞数)×100%。

1.4 HSV－tk 基因膀胱癌的体内治疗作用

T739 同基因鼠 16 只，雌雄不限，4－6 周龄，体重 25－55g，以剂量为 30mg/kg、浓度为 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉，腹部备皮，动物随机分为两组。常规消毒后，分别按下方法于壁层腹膜下微量注射器注射细胞：

T739 组：注射含 2×10^5 T739 细胞的 PBS 悬液。

T739－TK 组：注射含 2×10^5 T739－TK 细胞的 PBS 悬液。

待实验动物腹腔可扪及肿瘤后，卡尺测量肿瘤各径线，计算体积：V＝短径^2×长径×0.5236，第二天所有动物即给予 GCV40mg/kg/d 腹腔注射，观察肿瘤体积变化，记录动物存活天数。濒死判断标准：不能走动、不吃不喝、仅有呼吸心跳。

病理检查：动物临死前处死，取新鲜标本病理检查，观察病理变化情况。

计算抑瘤率及生存延长率。抑瘤率＝(对照组治疗前后体积变化值－处理组治疗前后体积变化值)/对照组治疗前后体积变化值×100%，生存延长率＝(处理组平均存活天数－对照组平均存活天数)/对照组平均存活天数×100%。

1.5 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 Excel 统计软件进行 t 检验。

2 结 果

2.1 GCV 对 T739－TK 细胞的体外杀伤作用

T739－TK 和 T739 细胞分别以不同浓度 GCV 进行处理。在 0.25～8.0μg/ml 的 GCV 浓度间，均表现出对 T739－TK 细胞有杀伤作用，当浓度为 0.25μg/ml 时有较强的抑制作用，随着浓度的增大，杀伤作用渐增强，当浓度大于 4.0μg/ml 时其作用趋以稳定。而 T739 细胞在各个剂量的 GCV 作用下生长均良好，未见细胞死亡。

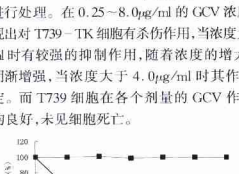


图 1 不同浓度 GCV(0.25－8.0μg/ml)作用对细胞生长的影响(4d)

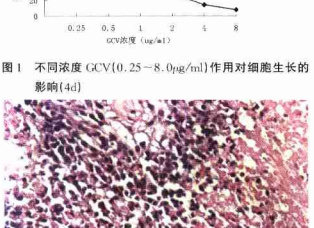


图 2 转 TK 基因经 GCV 治疗后，肿瘤呈片状坏死伴淋巴细胞浸润、凋亡小体形成 (HE×400)

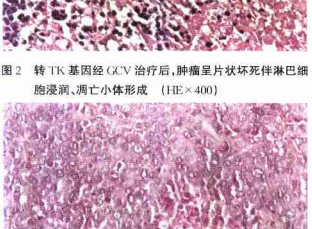


图 3 未转染 TK 基因经 GCV 治疗后，肿瘤见中心坏死，无炎细胞浸润及凋亡小体形成 (HE×400)

2.2 体内实验

注射肿瘤细胞后约 1 周，动物 100% 成瘤，腹部 B 超可见肿瘤向腹腔内生长，未见播散及腹水形成，

维普资讯 http://www.cqvip.com

治疗前各组肿瘤平均体积无明显差异，治疗后局部腹腔肿瘤生长明显受到抑制($P<0.01$)。腹腔肿瘤大小变化情况见下表 1，动物存活时间见表 2。

表 1 腹腔肿瘤体积变化表($\bar{x}\pm s$，mm^3)

组 别	治疗前	治疗后	抑瘤率%
T739 组	90.16±28.80	621.88±125.99	00.0
T739－TK 组	89.6±28.73	104.75±18.75*	97.15

*($P<0.01$)，vs0% TK group

表 2 动物存活时间表

组 别	平均存活天数	生命延长率%
T739 组	18.83±1.83	0.0
T739－TK 组	39.33±4.18**	108.87

**($P<0.01$)，vs0% TK group

2.3 肿瘤组织病理

光镜下腹腔肿瘤在 TK 存在组可见点、片状坏死，并有炎性细胞浸润及凋亡小体形成，主要为淋巴细胞，未转染 TK 基因腹腔肿瘤经 GCV 治疗后，肿瘤见中心坏死，无炎细胞浸润及凋亡小体形成(见图 2、3)。

3 讨 论

基因治疗是近些年来发展起来的很有应用前景的新方法，是生命科学研究和实践结合的前沿课题[2]。具体而言，通过自杀基因选择性导入肿瘤细胞并在肿瘤细胞中表达，其产物能使无毒的药物前体转变成细胞毒性物质，从而达到选择性杀伤肿瘤细胞而减少或避免对正常细胞或组织损伤的目的[3]。

1986 年 Moolten[4] 首先应用 TK 基因进行肿瘤治疗研究以来，该基因已被广泛应用于各种肿瘤治疗研究。到 1997 年为止，全世界应用 TK 基因进行临床实验记录超过 40 个，主要对象为癌和 AIDS 患者。自杀基因体内治疗作用已经在脑胶质瘤、黑色素瘤、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、肝癌等的动物模型中得到证实[5~8]。但关于膀胱癌的体内研究报道较少，本实验采用 DOTAP 试剂将含 HSV－tk 基因的逆转录病毒载体成功的导入 T739 细胞，提取 T739－TK 细胞 RNA，RT－PCR 证实有 TK 基因的插入并有其 mRNA 的表达。体外实验表明，GCV 对 T739－TK 细胞有显著杀伤作用，而对 T739 细胞的生长无影响。我们成功的建立了 T739 同基因鼠膀胱癌腹腔肿瘤模型，经 GCV 治疗后，转染了 TK 基因的 T739 鼠肿瘤明显变小，甚至消失，而未转染 TK 基因的 T739 鼠肿瘤继续增大，GCV 对其无明显治疗作用，转染了 TK 基因的 T739 鼠存活时间显著延长。病理结果提示免疫因素参与了肿瘤的杀伤作用，细胞凋亡也存在于肿瘤的杀伤作用中。

通过实验证实了 HSV－tk/GCV 系统不仅在体外对 T739－TK 有杀伤作用，而且能有效的杀伤体内转 TK 基因的实体瘤，从而为进一步进行肿瘤原位模型的治疗奠定了基础，也为这一基因治疗方法最终走向临床打下了基础。

参 考 文 献

[1] 张荣贵，叶 钢，刘为池. HyTK 基因转导联合丙氧鸟苷(GCV)对鼠膀胱癌细胞 T739 的体外杀伤作用[J]. 第三军医大学学报，2004；26(3)：214－216.

[2] Avalosse B, Dupont F, Bumy A. Gene therapy for cancer [J]. Current Opin Oncology, 1995；7(1)：94－100.

[3] Ezzeddine ZT, martuza RL, Platika D, et al. Selective killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer of the herpes simple virus thymidine kinase gene[J]. New BIOL, 1991；3(11)：608.

[4] Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes simplex virus thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy[J]. Cancer Res, 1986；46(10)：5276－5281.

[5] Rainov NG. A phase Ⅲ clinical evaluation of herpes simplex virus Ⅰ type thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme[J]. Hum Gene Ther, 2000；11(17)：2389－2401.

[6] Morris JC, Ramsey WJ, Wildner O, et al. A phase I study of intralesional administration of an adenovirus vector expressing the HSV－1 thymidine kinase gene (AdV. RSV－TK) in combination with escalating doses of ganciclovir in patients with cutaneous metastatic malignant melanoma[J]. Hum Gene Ther, 2000；11(3)：487－503.

[7] Ayala G, Wheeler TM, Shalev M, et al. Cytopathic effect of in situ gene therapy in prostate cancer[J]. Hum Pathol, 2000；31(7)：866－870.

[8] Hasenburg A, Tong XW, Rojas－Martinez A, et al. Thymidine kinase gene therapy with concomitant topotecan chemotherapy for recurrent ovarian cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2000；7(6)：839－844.