维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)04-0417-04

体内转导逆转录病毒 HSVtk 基因对鼠膀胱癌生长的影响

叶 钢,刘为池,张荣贵

(第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

【摘 要】目的:观测瘤体和腹腔内注射逆转录病毒载体 HSVtk 基因对膀胱癌的作用。方法:用鼠膀胱癌细胞(T739)分别建立鼠背部和腹腔肿瘤模型。含 HSVtk 基因的病毒上清瘤体和腹腔内注射,联合丙氧鸟苷(ganciclovir,GCV)治疗观察肿瘤大小及动物存活时间。结果:接种后约 1 周所有动物长出肿瘤。HSVtk/GCV 处理后,组织原位杂交显示瘤细胞内 HSVtk 基因 mRNA 表达。背部和腹腔肿瘤生长明显受到抑制,动物平均存活时间延长($P<0.05$)结论:瘤体和腹腔内注射逆转录病毒载体能将 HSVtk 基因导入膀胱癌细胞,联合 GCV 治疗显示出较强的抑瘤效应。

【关键词】膀胱癌;逆转录病毒;HSVtk;丙氧鸟苷;基因治疗

【中国图书分类法分类号】R737.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-11-12

Effect of retroviral HSVtk gene transfer on mice bladder tumor growth in vivo

YE Gang, et al

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

【Abstract】*Objective*: To evaluate the effectiveness of intratumoral and intraperitoneal injection with retrovirus HSVtk gene on mouse bladder cancer. *Methods*: Subcutaneous and intraperitoneal bladder tumor was respectively established with mouse cancer cell line (T739) in syngeneic mice. Direct intratumor injection of retroviral HSVtk into the subcutaneous tumor was performed. In peritoneum cavity tumor model, HSVtk gene was transferred by intraperitoneal injection of retrovirus vector carrying HSVtk gene. After GCV therapy the tumor volume and animal survival time were monitored. *Results*: Both animal models were successfully induced in all mice within one week following subcutaneous and intraperitoneal injection of T739 cells. Compared with control animals, the tumor growth in both models was significantly inhibited with HSVtk/GCV system, and also the animal survival time was prolonged with administration of GCV($P<0.05$). Tissue hybridization in situ confirmed the expression of HSVtk gene in mouse bladder tumors. *Conclusion*: Bladder tumor inoculated in mice can be retrovirally transfected with HSVtk gene by intra-tumor or intra peritoneal injection. Combined with administration of GCV, HSVtk gene significantly inhibits the bladder tumor growth.

【Key words】Bladder cancer; Retrovirus; HSVtk; GCV; Gene therapy

瘤体注射或腹腔内灌注病毒介导的单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSVtk)基因已在鼠肿瘤模型中获得有效表达,联合丙氧鸟苷(ganciclovir,GCV)治疗后已显示出对黑色素瘤、结肠癌、间皮瘤、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、淋巴瘤等肿瘤的治疗效应。膀胱癌多数为腔内实体肿瘤,经尿道膀胱灌注和经内窥镜瘤体注射均可转导目的基因,而且安全可靠,副作用更小。本研究分别建立鼠膀胱癌背部和腹腔模型,观测瘤体注射和腹腔内灌注逆转录病毒载体 HSVtk 基因联合 GCV 对膀胱癌的作用。

作者介绍:叶 钢(1958-),男,博士,教授,主任医师,主要研究方向:肿瘤基因治疗和免疫治疗。

基金项目:重庆市科委攻关项目资助课题(1997-53)。

1 材料和方法

1.1 材料

重组逆转录病毒质粒载体 PL(HyTK)SN 由新桥医院脑外科黄其林博士惠赠,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(HSV_1-TK)基因。鼠膀胱癌细胞株 T739 由第三军医大学西南医院泌尿外科宋波赠送。同基因鼠来自第三军医大学动物所,饲养符合 SPF 标准。GCV 购自罗氏公司。

1.2 动物模型

T739 同基因鼠,4~6 周龄,体重 30~60g,雌雄不限。3%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔麻醉。常规腹部备皮消毒后,打开腹腔,用 23G 针头将 T739 肿瘤细胞悬液(2×10^5)注射于壁层腹膜下,缝合皮肤。B 超监测成瘤情况,成瘤后

维普资讯 http://www.cqvip.com

B超测量肿瘤长短径,公式计算肿瘤体积,V=短径^2×长径×0.5236。

瘤体注射实验用鼠背部肿瘤模型。动物麻醉后,背部备皮,常规消毒,将 2×10^5T739 细胞悬液注射于右侧皮下,成瘤后用卡尺测量肿瘤大小,按公式计算体积。

1.3 重组质粒的包装和筛选

提取重组质粒 DNA 并测定 OD 值。酶切电泳鉴定。脂质体法将重组逆转录病毒质粒 PL(HyTK)SN 导入 PA317 包装细胞,于 DMEM、10% 小牛血清培养,用潮霉素 B(400mg/L)筛选,扩增阳性克隆细胞,细胞快长满时收集上清,0.45μm 过滤后获得逆转录病毒上清。

1.4 逆转录病毒浓缩和滴度的测定

病毒浓缩用透析袋法。分装后液氮保存,留小量测定病毒滴度。取对数生长期的 NIH3T3 细胞,用病毒上清液 0.1ml 按 1:10 稀释,分别加入单层 NIH3T3 细胞,37℃ 吸附 2h,加入含 10%灭活小牛血清的 DMEM 全培养液培养 48h。胰酶消化细胞,转入含潮霉素 B400mg/L 的培养液中选择培养,第 2 周观察抗潮霉素 B 的细胞克隆数。

1.5 腔内灌注实验

成瘤后 B 超测量肿瘤大小,当肿瘤长至 0.5～0.8cm,动物随机分为 3 组(n=7):单次病毒感染组给予 2×10^6cfu/ml 病毒上清腹腔注射,重复感染组 5 天后再次腹腔内注入病毒上清,连续 2 次;对照组注入等量生理盐水。第 1 次处理后的第 2 天,所有动物给予 GCV(40mg/kg/d)腹腔注射,共 6 天。重复感染组接着第 2 次感染和治疗,其余两组继续相同治疗。初次治疗后 6 天,12 天测量肿瘤大小变化。同时动态观测记录动物存活情况。濒死时处死动物,计录腹水量,取肿瘤、肝脏备检。濒死判断标准:不能走动,不吃不喝,仅有呼吸心跳。

1.6 瘤体注射实验

当背部肿瘤长到 0.5～0.8cm 时,动物随机分为 2 组,每组 6 只。逆转录病毒组:2×10^6cfu/ml 于 3 个方向注射入瘤体内;对照组用等体积生理盐水瘤内注射。次日所有动物给予 GCV40mg/(kg·d)腹腔注射,共 6 天。治疗后第 6 天,9 天测量肿瘤体积变化,同时观测记录动物存活天数。濒死时处死动物,取标本备检。取肿瘤、肝脏等做病检。

1.7 计算抑瘤率、生存延长率

抑瘤率(inhibited rate)=(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(survival rate)=(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%。

1.8 组织原位杂交检测肿瘤 TK 基因 mRNA 的表达

2 结 果

2.1 重组逆转录病毒包装和滴度测定

重组质粒(含 HSV-TK)转染 PA317 细胞,潮霉素 B 筛选 3 周后形成抗性细胞克隆,挑选培养增克隆,收集过滤获得病毒上清。测定病毒滴度,最高为 6×10^5cfu/ml,经浓缩后提高一个数量级。

2.2 肿瘤模型情况

背部皮下或壁层腹膜下注射 T739 膀胱癌细胞后约 1 周,所有动物长出肿瘤,成瘤率 100%。背部皮下可触及肿瘤,直径约 5～8mm。腹部 B 超可见肿瘤向腹腔内生长,大小约 6～10mm,与背部肿瘤相比大小无显著差异($P<0.05$)。成瘤后动物行为无特殊改变。

2.3 腔内单次灌注 HSVtk 基因对肿瘤的影响(表 1)

腹腔肿瘤模型建立后,B 超检测各组肿瘤体积无明显差异。腔内注射逆转录病毒 HSVtk 1 次并 GCV 治疗 6 天后,肿瘤生长明显受到抑制,约为对照组的 1/2 多(213.53/387.57mm^3),12 天后肿瘤体积是对照组的 1/2.5(435.88/1004.23mm^3。动物存活时间 31.14±2.67 天,而对照组为 20.71±2.36 天,生存延长率为 55.19%。

2.4 腔内重复灌注 HSVtk 基因对肿瘤的影响

与对照组比较,重复灌注治疗显著抑制肿瘤增长,12 天后肿瘤体积只有对照组的 1/2.2(441.09/1004.23mm^3);动物存活时间 33.00±2.94 天,比对照组平均多 12 天($P<0.05$)。但与单次灌注感染比较,无论是抑制肿瘤生长还是延长动物存活时间,两组结果相差不显著($P>0.05$)。抑瘤率分别为 65%、64%;平均存活时间分别为 31.14±2.67 天、33.00±2.94 天,延长率分别为 55.19%、58.93%。

表 1 GCV 治疗前后腹腔肿瘤体积变化表($\bar{x}\pm s$,mm^3)

组别	治疗前	治疗后 6 天	治疗后 12 天
对照组	124.13±29.66	387.57±89.40	1004.23±251.49
单次感染组	127.45±23.69	213.53±60.45*	435.88±85.59*
重复感染组	123.55±27.24	218.46±43.61*	441.09±60.57*

*与对照组相比差异显著($P<0.05$)

表 2 GCV 治疗前后背部肿瘤体积变化表($\bar{x}\pm s$,mm^3)

组别	治疗前	治疗后 6 天	治疗后 12 天
对照组	158.96±53.25	449.22±77.59	1483.62±357.57
逆转录病毒组	176.65±78.25	268.74±88.49*	443.29±78.34*

*与对照组相比差异显著($P<0.05$)

2.5 瘤体内注射 HSVtk 基因对肿瘤的影响

GCV 治疗前后背部肿瘤体积变化见表 2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

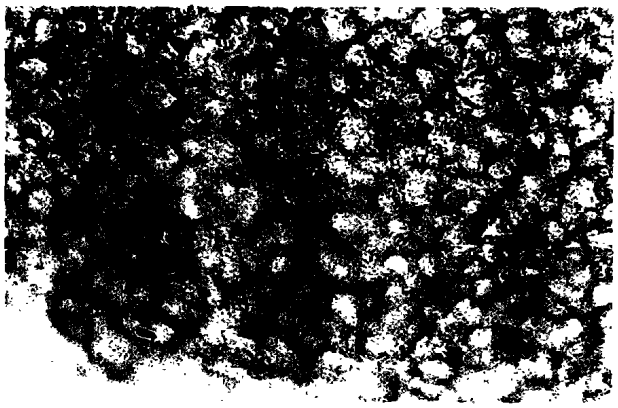
GCV 治疗前，背部皮下肿瘤体积无明显差异。GCV 治疗 6 天后，逆转录病毒组肿瘤生长明显受到抑制，与对照组相差显著（$P<0.05$）。抑瘤率为 68%。对照组、逆转录病毒组动物平均存活天数分别为 18.5 ±2.95、26.7 ± 3.08 天。后者比对照组平均延长 44.16%，相差显著（$P<0.05$）。

2.6 病理

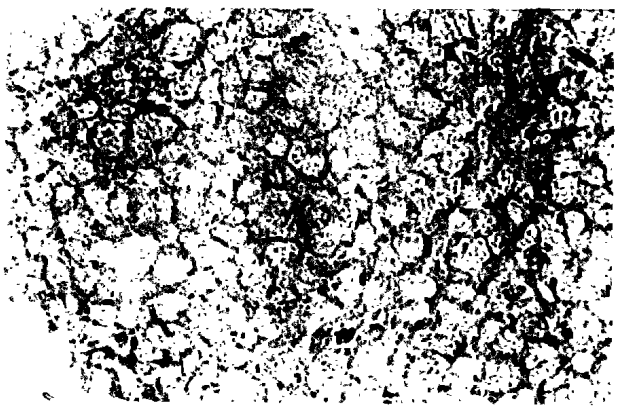
背部肿瘤和腹腔肿瘤出现点状或片状坏死，并有炎性细胞浸润，主要为淋巴细胞。对照组肿瘤没有此现象。肝脏标本未见肿瘤转移和炎性改变。

2.7 组织原位杂交检测 TK 基因 mRNA 的表达

在逆转录病毒介导的基因转移标本中，可检测到 TK 基因 mRNA 在胞浆中的表达，而对照组阴性表达（图 1）。



A



B

图 1 A. 转 TK 基因肿瘤，组织原位杂交阳性表达，B. 对照组。显色 ×400

3 讨 论

HSVtk/GCV 系统是肿瘤基因治疗中应用最广泛的方法之一。HSVtk 基因表达的胸苷激酶，能将无毒的抗病毒药物 GCV 磷酸化，磷酸化的 GCV 能阻止 DNA 复制，导致细胞死亡。HSVtk/GCV 系统已应用于多种肿瘤的基因治疗，体外、体内均显示出抗癌效应。目前一些肿瘤的研究已进入临床试验。

HSVtk 基因治疗体内应用的关键是将外源目的基因导入靶细胞中并使之得以安全而有效的表达。目前常用的操作方式有体外体内（ex - vivo）两步法和体内原位（insitu）治疗法[1,2]。后者具体方式有：（1）腔道内灌注，如注入胸腹腔、呼吸道、膀胱、关节腔、脑室等；（2）肿瘤直接注射；（3）肿瘤所在器官选择性血管内注入。膀胱经尿道与外界相同，易于经尿道灌注和经内窥镜瘤体注射，因此，体内原位基因疗法非常适合于膀胱癌。

由于原位膀胱癌模型的建立和监测存在条件限制，本实验将 T739 细胞注射于壁层腹膜下建立膀胱癌腹腔模型，其具有类似膀胱肿瘤相对隔离的环境，肿瘤生长和动物生存期一致性好，便于动态检测等特点。本实验发现，鼠腹腔内成瘤后，腹腔注入逆转录病毒载体 HSVtk 基因，在 GCV 攻击下，肿瘤体积不到对照组的一半，生长明显受到抑制，且动物存活时间比对照组长 11 天。显示出一定的抑瘤效应。

kasaka S[3]、Sutton[4] 建立鼠原位膀胱癌模型，经尿道灌注腺病毒载体 HSVtk 基因感染膀胱癌细胞，获得有效表达。虽然腺病毒载体的转染率较高，但是其介导的目的基因不能整合到细胞基因组中，仅做为染色体附加物而存在。因此，不能长时间表达目的基因。为了治疗膀胱癌或防止其复发，时常需反复应用，但重复感染会诱导抗腺病毒免疫反应[5]，使重复治疗受限。而逆转录病毒载体能将目的基因整合到细胞染色体中，可获得持久而稳定的表达[6]。另外，逆转录病毒只感染分裂期细胞，膀胱癌细胞增殖活跃，而正常移行上皮细胞处于相对静止状态，因此，具有一定的肿瘤特异性。本实验中，组织原位杂交检测到 HSVtk 基因 mRNA 在部分肿瘤细胞中的表达，说明逆转录病毒载体能将 HSVtk 基因导入膀胱肿瘤细胞并有效表达。

除外原位癌，多数膀胱肿瘤以实体瘤形式生长，故只有外层癌细胞容易与病毒上清接触，加上膀胱具有排泄特性，这些不利于 HSVtk 基因转入肿瘤细胞。但若联合瘤体注射将会增强治疗效果。因此，本研究进行了瘤体注射实验。鼠背部瘤体内注射逆转录病毒 HSVtk 基因加 GCV 治疗，肿瘤生长显著被抑制、体积缩小，长期观察生存期较对照组明显延

维普资讯 http://www.cqvip.com

长。结果与类似文献报道一致[7]，表明瘤体注射同样能将病毒载体 HSVtk 基因导入膀胱肿瘤并发挥作用。我们发现，瘤体注射与腹腔灌注实验一样，虽然 HSVtk/GCV 系统能显著抑制膀胱癌生长，但均不能使肿瘤停止增长或消退。可能解释是两种治疗操作的感染率低以及 HSVtk 基因的体内作用受到多种复杂因素的影响。尽管如此，本结果提示，膀胱内灌注加上经内窥镜直视下瘤体注射会提高 HSVtk 基因的转导和抗癌效应。

逆转录病毒载体只感染处于分裂期细胞，虽然膀胱肿瘤生长旺盛，但对于每个癌细胞而言，则可能处于不同的细胞周期中，加上实体瘤与病毒上清接触面积有限，一次感染只是少数细胞获得目的基因。故一般来说，重复灌注能提高目的基因转染率，增强抗肿瘤效应。Toyokawa 等[8]在肝癌腹水模型中，多次腹腔注射逆转录病毒使动物存活时间比单次灌注延长。Princer 等[9]在腹腔肿瘤模型中用逆转录病毒介导 HSVtk 基因，GCV 治疗后，取得与 DNA 脂质体复合物反复注射同样的效果。然而，本实验显示单次和多次腹腔注射感染治疗没有明显差别。其原因可能与转染效率较低，肿瘤类型，GCV 用药时间间隔等因素有关。另外，由于 HSVtk/GCV 系统的体内效应低，随着肿瘤负荷的增加，使得重复应用的效果大大降低而无从显现。

参 考 文 献

[1] Badiavas E V, Falanga V. Gene therapy[J]. J Dermatol, 2001;28(6):175-192.

[2] Anonymous Human gene transfer protocols: summary table[J]. Hum Gene Ther, 2000;11:2619-2621.

[3] Akasaka S, Suzuki S, Shimizu H, et al. Suicide gene therapy for chemically induced rat bladder tumor entailing instillation of adenoviral vector[J]. Jpn J Cancer Res, 2001;92(5):568-575.

[4] Sutton MA, Berkman SA, Chen SH, et al. Adenovirus-mediated suicide gene therapy for experimental bladder cancer [J]. Urology, 1997;49(2):173-180.

[5] Vorburger Stephan A, Hunt Kelly K. Adenoviral gene therapy[J]. Oncologist, 2002;7(28):46-59.

[6] Wysocki PJ, Grabarczyk P, Mackiewicz A, et al. Recent developments in retroviral gene delivery systems [J]. Expert Opin Biol Ther, 2001;1(16):911-3.

[7] Sutton MA, Freund CT, Berkman SA, et al. In vivo adenovirus-mediated suicide gene therapy for orthotopic bladder cancer[J]. Mol Ther, 2000;2(3):211-217.

[8] Toyokawa Y, Kuriyama S, Tsujinoue H, et al. Retrovirus-mediated in vivo gene therapy using the herpes simplex virus thymidine kinase gene against carcinomatous peritonitis [J]. Scand j Gastroenterol, 2000;35(8):852-860.

[9] Princer F, Lechanteur C, Lopez M, et al. Similar efficiency of DNA-Liposome complexes and retrovirus-producing cells for HSV-TK suicide gene therapy of peritoneal carcinomatosis [J]. Drug Target, 2000;8(2):79-89.