DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.004
第26卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 4
2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

文章编号:1000-5404(2004)04-0287-04

论著

自杀基因引导的旁观者效应对鼠膀胱癌的作用

叶 钢,刘为池,张荣贵 (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 研究单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, *HSVtk*)基因联合丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)治疗对膀胱癌的旁观者效应。方法 用逆转录病毒载体 *HSVtk* 转染鼠源性膀胱癌细胞株T739,体外检测其对GCV的敏感性。将不同比例的T739和T739TK细胞共培养观察体外旁观者效应。在同基因鼠,将不同比例的T739和T739TK细胞混合建立膀胱癌腹腔肿瘤模型。当肿瘤B超显示0.5~0.8 cm,腹腔GCV给药6 d,然后观察肿瘤大小变化及动物存活时间。结果 转染 *HSVtk* 基因的T739细胞对GCV的敏感性,RT-PCR分析证实TK基因mRNA的表达。细胞混合培养发现,当T739TK细胞占10%强时就可显示出明显的旁观者效应。在GCV的作用下,动物体内肿瘤生长受到显著抑制,动物存活时间明显延长,证明存在体内旁观者效应。结论 转染 *HSVtk* 基因的鼠膀胱癌细胞可引导产生体内外旁观者效应,这种效应有助于加强 *HSVtk*/GCV 系统对膀胱肿瘤的抗癌作用。

关键词:膀胱癌;逆转录病毒;旁观者效应;*HSVtk*;丙氧鸟苷
中图法分类号:R-332;R329.24;R737.14 文献标识码:A

Bystander effect induced by suicide gene on mouse bladder cancer

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

Abstract: Objective To determine the bystander effect of therapy with herpes simplex virus thymidine kinase (*HSVtk*) gene combined with ganciclovir (GCV) on mouse bladder cancer. Methods Mouse bladder cancer cell line (T739) was transfected with retroviral vector *HSVtk* gene. The sensitivity of T739TK cells to GCV was detected *in vitro*. Bystander effect *in vitro* in co-cultured mixtures of T739TK and T739 cells at different ratios or at the same ratio in culture bottles of different size was determined. In the mouse model of bladder tumor, mixtures of T739 and T739TK cells were implanted beneath the peritonea of syngeneic mice. When tumors grew to the size of 0.5—0.8 cm, intraperitoneal administration of GCV was carried out for 6 d. Changes of tumor size and survival rate of mice were observed. Results T739 cells retrovirally transfected with the *HSVtk* gene became sensitive to low concentrations of GCV. Analysis by RT-PCR confirmed *HSVtk* expression in the transfected T739TK cells. An absolute bystander effect was observed in the mixed culture of cells *in vitro* when the *HSVtk* gene transferred cells were at the ratio of above 10%. The tumor growth in the animal model was significantly inhibited by GCV, demonstrating the existence of bystander effect *in vivo*. The survival time of mice was prolonged after administration of GCV. Conclusion The *in vitro* and *in vivo* bystander effects exist in mouse bladder cancer transfected with *HSVtk* gene, enhancing the role of *HSVtk*/GCV system for the treatment of bladder carcinoma.

Key words: bladder cancer; retrovirus; bystander effect; *HSVtk*; ganciclovir

转染单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, *HSVtk*)基因的肿瘤细胞可获得对丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)的杀伤敏感性,此外,*HSVtk*/GCV系统通过旁观者效应(bystander effect)杀伤周围没有转染 *HSVtk* 的癌细胞。这已在多种癌症体外体内实验中观察到。本研究将逆转录病毒载体TK基因转入鼠膀胱癌细胞,通过体内、体外实验观测 *HSVtk*/GCV 的旁观者效应。

1 材料和方法

1.1 材料

重组逆转录病毒质粒PL(HyTK)SN由新桥医院脑外科黄其

基金项目:重庆市科技基金资助项目(1997-53)
Supported by the Funds for Sci & Tech Research of Scientific Committee of Chongqing (1997-53)
作者简介:叶 钢(1958—),男,四川省乐山县人,博士,主任医师,教授,从事肿瘤基因治疗和免疫治疗方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68774924
通信作者:张荣贵,电话:(023)68774624
收稿日期:2002-06-21;修回日期:2003-11-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

林博士惠赠，其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。鼠原性膀胱癌细胞株T739由第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心宋波赠送。PA317，NIH3T3细胞均为本科实验室冻存。T739同基因鼠购自学校实验动物中心。GCV购自罗氏公司。引物：P1 5′-CCGGC-CCTCACCCTCATCTT，P2 5′-CCGATTGACTTTGTGCCTTCCT，由上海肿瘤研究所设计合成。

1.2 重组载体对T739细胞的转染与筛选

脂质体法将重组质粒转入PA317包装细胞，在含潮霉素B(400 mg/L)培养液中筛选3周，扩增阳性克隆细胞，收集过滤(0.45 μm)后获得逆转录病毒上清。用病毒上清感染T739细胞，在37 ℃，5% CO_2 的培养箱中吸附20 h；第2天于含潮霉素B(400 mg/L)的培养筛选培养3～4周，扩增阳性克隆获得转染HSV-TK基因膀胱癌细胞，命名为T739-TK细胞。RT-PCR检测T739TK细胞中TK基因的转入和表达。

1.3 T739-TK细胞对GCV的杀伤敏感性

将对数期生长的T739TK和T739细胞分别制成1×10^5/ml的细胞悬液，按1×10^5个细胞加入24孔培养板内，24 h后，加入含不同浓度GCV(0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μg/ml)的培养液，各浓度设3个平衡孔，每2天更换1次含GCV的培养液。96 h后，0.2%台盼蓝染色，计算每一浓度下三孔T739TK及T739活细胞平均数占对照组细胞总数的百分比。

1.4 旁观者效应的体外实验

将T739和T739-TK细胞制成1×10^5/ml的细胞悬液，然后将T739-TK细胞按不同比例与T739细胞混合，接种于24孔板共同培养，每孔细胞总数2×10^5个。T739TK细胞所占比例为0%、10%、20%、30%……90%、100%，各比例设3个平衡孔。混合培养24 h后，换用含GCV 4 μg/ml的培养液。每2天更换1次含GCV的培养液。于96 h后胰酶消化各孔细胞，制备单细胞悬液，加入0.2%台盼蓝，在血细胞计数板上计数。计算三孔活细胞平均数占各自对照组活细胞总数的百分比。

1.5 旁观者效应与细胞间距离的关系

将T739和T739TK细胞制成1×10^5/ml的细胞悬液，然后将其按各50%混合，均匀接种于96(7 mm)孔板、24(16 mm)孔板、6(35 mm)孔板、直径65 mm的培养皿，各设3个复孔。每孔细胞总数1×10^5个，但细胞培养液量不同。24 h后换用含GCV 4 μg/ml的培养液，96 h后胰酶消化各孔细胞，制备单细胞悬液，加入0.2%台盼蓝染色计数。

1.6 旁观者效应的体内实验

T739同基因鼠，雌雄不限，4～6周龄，体质量30～60 g。动物随机分为5组。3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉。常规备皮消毒，打开腹腔，将T739 TK细胞与T739亲代细胞按不同比例混合，以总量为2×10^5细胞数，注射于壁层腹膜下，缝合皮肤。B超监测成瘤情况。各组中T739TK细胞所占比例分别为：0%、10%、30%、50%、100%。当肿瘤直径达到0.5～0.8 cm，各组动物(n=6)均给予GCV 40 mg·kg^{-1}·d^{-1} GCV腹腔注射，共6 d。B超测量肿瘤长短径，公式计算肿瘤体积(V)，V=短径^2×长径×0.523 6。同时动态观测记录动物存活情况。濒死时处死动物，取肿瘤、肝脏等做病检。濒死判断标准：不能走动，不吃不喝，仅有呼吸心跳。

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 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 T739TK细胞对GCV的敏感性

T739TK细胞分别以0.25～8.0 μg/ml的GCV处理4 d后，均表现出对GCV的杀伤敏感性。随着浓度的增大，杀伤作用逐渐增强，当浓度大于4.0 μg/ml时其作用趋于稳定(图1)。而T739细胞在各个剂量的GCV作用下生长均良好。

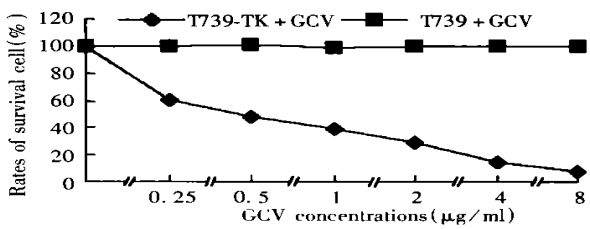


图1 不同浓度GCV作用对细胞生长的影响(4 d时)

Fig 1 Effects of different concentrations of GCV on cell growth (4 d)

2.2 体外旁观者效应(图2)

将T739TK细胞按不同比例与T739细胞混合后，在含GCV 4 μg/ml的培养液作用下，4 d时发现：含有10%的T739TK细胞就可杀伤近40%左右的细胞，当T739TK细胞占50%时，则有75%左右的细胞被杀伤，T739TK细胞占90%时，细胞几乎全部死亡。在T739TK细胞所占比例为0%的对照实验组，同样浓度的GCV则不出现细胞毒作用。

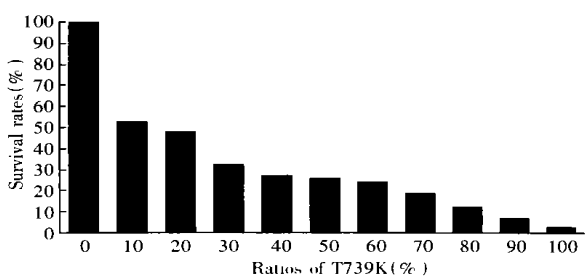


图2 GCV(4 μg/ml)对不同比例的T739TK与T739细胞混合培养的杀伤作用

Fig 2 Killing effect of GCV (4 μg/ml) on different ratios of T739TK and T739 cells

2.3 旁观者效应与培养细胞密度的关系

实验各组细胞经处理，发现96孔培养板中活细胞最少，直径65 mm培养皿中活细胞数最多，说明旁观者效应除与T739TK

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞比例成正相关外, 还与细胞密度相关(图 2)。

2.4　体内旁观者效应(表 1)

注射肿瘤细胞后约一周, 腹部 B 超探测动物 100% 成瘤。GCV 治疗前各组肿瘤平均体积无明显差异, 治疗后腹腔肿瘤生长明显受到抑制, 即使 T739TK 细胞只有 10% 亦显示出显著的抑瘤作用($P<0.01$), 随着 T739TK 细胞比例增高, 抑制作用越明显。而且, 动物存活时间明显延长(表 2)。

表 1　不同比例转染细胞腹腔肿瘤体积变化表($\bar{x}\pm s$, mm^3)

Tab 1　Changes of tumor volume in abdominal cavity induced by different ratios of T739TK cells ($\bar{x}\pm s$, mm^3)

Group ($n=6$)	Pre-treatment	Post-treatment	Inhibition rate(%)
0%TK	90.16±28.80	621.88±125.99	00.00
10%TK	90.11±12.74	378.98±59.41 *	46.67
30%TK	77.60±26.97	320.26±55.96 *	54.36
50%TK	74.79±12.76	243.99±82.06 *	68.18
100%TK	89.6±28.73	104.75±18.75 *	97.15

*: $P<0.01$, *vs* 0%TK group

表 2　不同基因转移效率动物存活时间表

Tab 2　Animal survival time after treatment with different ratios of T739TK cells

Group ($n=6$)	Average survival day ($\bar{x}\pm s$)	Survival rate (%)
0%TK	18.83±1.83	0.00
10%TK	23.67±2.07 *	25.70
30%TK	28.33±3.14 **	50.45
50%TK	34.17±2.04 **	81.47
100%TK	39.33±4.18 **	108.87

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* 0%TK group

2.5　肿瘤病理

混合有 T739TK 细胞的腹腔肿瘤, 在光镜下可见点、片状坏死, 并有炎性细胞浸润, 主要为淋巴细胞浸润。而且, 随着 T739TK 细胞比例增高而更加明显(图 3)。

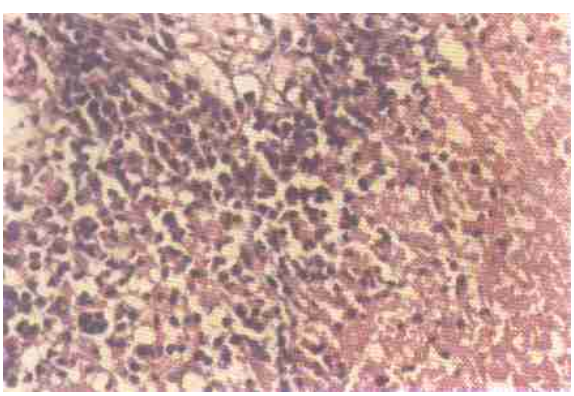


图 3　病理分析显示肿瘤片状坏死伴淋巴细胞浸润　(HE× 400)

Fig 3　Extensive necrosis of tumor with lymphocyte infiltration　(HE× 400)

3　讨论

本实验将逆转录病毒载体 *HSVtk* 基因成功导入 T739 细胞。提取 T739TK 细胞 RNA, RT-PCR 证实 TK 基因插入和 mRNA 的表达。体外实验表明, GCV 对 T739TK 细胞具有显著杀伤作用, 而 T739 细胞的生长却不受 GCV 的影响。表明 GCV 对肿瘤细胞的毒性作用是 *HSVtk* 基因特异表达的结果。

自杀基因抗癌治疗的特点在于, 不但能杀伤转入目的基因的肿瘤细胞, 而且这种杀伤作用能波及周围不含自杀基因的细胞, 这就是"旁观者效应"。本研究体外实验显示: GCV 不仅导致 T739TK 细胞死亡, 而且与其混合培养的 T739 细胞也出现死亡。当 T739TK 细胞占混合细胞的 10%时, 低浓度的 GCV 就可使 40%的以上的细胞死亡, 提高 T739TK 细胞的比例, 杀伤效应增高。这与文献[1~3]报道的膀胱癌体外实验结果一致。

自杀基因引导的体内旁观者效应已在脑胶质瘤、肺癌、肝癌、结肠癌、卵巢癌、骨肉瘤、前列腺癌、黑色素瘤等[4~7]的动物模型中得到证实。不过, 对膀胱癌的体内研究不多见。Sutton 等[8]用人膀胱癌细胞(MBT-2)鼠皮下致瘤, 局部注射腺病毒载体 TK 基因加 GCV 治疗, 发现肿瘤生长被显著抑制、体积明显缩小, 动物存活时间明显延长。Akasaka 等[9]建立鼠膀胱癌原位模型, 经尿道灌注腺病毒载体 HSV-TK 基因, GCV 治疗后, 肿瘤生长显著抑制。不过, 他们的研究没有涉及体内旁观者效应。本实验发现含有 T739TK 细胞成瘤后, 在 GCV 攻击下, 肿瘤生长被显著抑制或停止生长, 动物存活时间较对照组明显延长。表明自杀基因引导的旁观者效应能显著抑制体内膀胱肿瘤的生长。一般认为, 含 *HSVtk* 基因的细胞至少占要 10%左右才能引导体内旁观者效应, 本实验结果与之吻合, 当 T739TK 细胞只有 10%就显示出了显著的抑瘤作用。赵亚刚等[10]用肝癌实验, 含 TK 基因细胞占 20%的情况下却没有出现旁观者效应。结果的差异可能与所用癌细胞不同有关。

目前, 对"旁观者"效应的机制还没搞清楚, 研究者提出了如下几种解释: ①细胞间的密切接触, 通过缝隙连接传递毒性物质或临近细胞吞噬死亡细胞碎片而引起死亡。②免疫因素, 尤其是体内旁观者效应。③诱导细胞的凋亡。④血管因素, 肿瘤血管内皮坏死, 缺血导致细胞死亡。本研究用不同体积的培养皿做 T739 和 T739TK 细胞混合培养, 人为降低细胞密度、减少细胞间的接触。结果显示: 培养皿体积越小, 细胞彼此接触增多, 活细胞越少; 反之, 细胞存活越多。提示细胞间接触是旁观者效应存在的条件, 因为要产生缝隙连接, 细胞得有紧密接触。此外, 肿瘤病理检查见大量单核细胞浸润, 提示免疫因素参与了体内旁观者效应。

T739TK 细胞在体外经 GCV 处理 96 h 后, 95%以

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

上的细胞死亡。但用100% T739 TK 细胞体内成瘤后，GCV 治疗6 d 亦无1例出现肿瘤缩小或消退。提示TK 基因在体内发挥作用受到多种复杂因素的影响。Zhang 等[11]发现TK 基因转染仅对离体细胞有效，而当细胞接种到活体后敏感性就消失，即所谓的基因沉默(gene silence)。本研究体内外治疗效果的差异可能与部分细胞丢失 TK 基因，或处于不同时期 T739TK 细胞不表达或少量表达有关。

参考文献：

[1] Slade N, Galetic I, Kapitanovic S, *et al*. The efficacy of retroviral herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer and ganciclovir treatment on the inhibition of melanoma growth *in vitro* and *in vivo*[J]. Arch Dermatol Res, 2001, 293(10): 484－490.

[2] 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杀伤作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2001, 22(5): 284－287.

[3] 谢文练, 梅 桦, 湛道明, 等. 逆转录病毒载体介导HSV-TK 基因在膀胱癌细胞的表达和作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 1997, 18(9): 549－552.

[4] Moriuchi S, Krisky D M, Marconi P C, *et al*. HSV vector cytotoxicity is inversely correlated with effective TK/GCV suicide gene therapy of rat gliosarcoma[J]. Gene Ther, 2000, 7(17): 1483－1490.

[5] Walling H W, Swarthout J T, Culver K W. Bystander-mediated regression of osteosarcoma *via* retroviral transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase and human interleukin-2 genes[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(2): 187－196.

[6] Baque P, Pierrefite C V, Gavelli A, *et al*. Naked DNA injection for liver metastases treatment in rats[J]. Hepatology, 2002, 35(5): 1144－1152.

[7] Misra V, Klamut H J, Rauth A M. Expression of the prodrug-activating enzyme DT-diaphorase *via* Ad5 delivery to human colon carcinoma cells *in vitro*[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(2): 209－217.

[8] Sutton M A, Freund C T, Berkman S A, *et al*. *In vivo* adenovirus-mediated suicide gene therapy orthotopic bladder cancer[J]. Mol Ther, 2000, 2(3): 211－217.

[9] 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.

[10] 赵亚刚, 张学庸, 惠宏襄, 等. 逆转录病毒介导的 HSV-tk/GCV 对肝癌细胞的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 1999, 7(2): 113－115.

[11] Zhang L, Wikenheiser K A, Whitsett J A. Limitations of retroviral-mediated HSV-tk gene transfer to pulmonary adenocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(5): 563－574.

(编辑 冷怀明)

(上接286页)

吸机辅助呼吸。

3.3 保持胸腔闭式引流管通畅

以利通气和胸腔引流，严防引流管脱落、扭曲、阻塞及引流液逆流。认真观察水柱波动情况及引流液的性质。鼓励病人深呼吸，定时翻身拍背，协助排痰，促进肺复张，预防术后肺部并发症。

3.4 保持有效的胃肠引流，减轻吻合口张力

胃肠减压应持续3～5 d。保持胃管引流通畅，持续负压吸引，观察引流液的颜色及量。

3.5 饮食护理

为病人制订详细的饮食计划，指导病人正确进食。可先饮水，后逐渐改为全流质、半流质、普食。严密观察患者有无呛咳、吞咽困难、胸痛、胸闷等不适。观察病人的大便性状，及时调整进食量及间隔时间。

4 吻合口瘘的观察及护理

4.1 观察

早期吻合口瘘，多有全身症状及术侧局部症状。中期吻合口瘘，多为局限性脓胸或脓气胸。如出现不明原因的体温升高、胸痛、呼吸急促，不能平卧，呼氧后呼吸状态不能改善，听诊肺呼吸音减弱等应警惕有无胸内吻合口瘘。

4.2 处理

确诊后需立即重新放置胸腔闭式引流管。患者取半坐卧位，密切观察水柱波动情况、引流物的性质、量，妥善固定引流管，防止液面过高，不利于引流。

4.3 控制感染

根据药敏结果，选择对致病菌敏感的抗菌素。

4.4 实施胃肠外营养

病人应禁食水，给予静脉营养。必要时中心静脉置管。也可空肠造瘘进行管饲流质或半流质饮食，但应尽早自主进食以维持较好的营养。

4.5 做好心理护理

术前解释治疗方案，教会病人深呼吸、有效的咳嗽、床上排便、如何配合插胃管，认真讲解持续减压、禁食、口腔护理的重要性。出现吻合口瘘，病程延长，患者心理负担加重，要理解病人的痛苦，耐心开导，鼓励病人树立信心，积极配合治疗。

5 体会

吻合口瘘死亡率高，重在预防。术前加强口腔护理、改善营养；术后合理抗感染，保持引流通畅，防治感染，合理进食，密切观察等都将对防治吻合口瘘起到积极的作用。

关键词：吻合口瘘；食管癌术后
中图法分类号：R473.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 方兰花, 蒋小英. 食管癌根治术后并发吻合口瘘的预防护理[J]. 实用护理杂志, 2002, 18(5): 30－31.

[2] 邹 卫. 普胸外科围手术期处理[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2000. 162.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net