DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.011
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
214 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)03-0214-03

HyTK基因转导联合丙氧鸟苷对鼠膀胱癌细胞的体外杀伤作用

张荣贵,叶 钢,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 探索HyTK基因转导丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)对鼠膀胱癌细胞的影响。方法 脂质体介导法将PL(HyTK)SN质粒转染PA317细胞,潮霉素B筛选,直到出现抗性克隆,扩增培养,NIH3T3细胞测定病毒滴度,用逆转录病毒上清液感染T739细胞,潮霉素B筛选,直到出现抗性克隆,扩增培养,命名为T739-TK。RT-PCR对T739-TK细胞进行鉴定。然后观察其在体外膀胱癌细胞的杀伤作用。结果 RT-PCR证实HyTK基因已插入T739细胞并有其mRNA的表达,经不同浓度GCV处理后的T739-TK细胞均表现出有杀伤作用,而T739细胞在各个剂量的GCV作用下生长均良好。结论 GCV对转导了HyTK基因的T739细胞有显著杀伤作用。

关键词:膀胱癌;基因治疗;HyTK基因;逆转录病毒载体;丙氧鸟苷(GCV)
中图法分类号:R73-36; R730.59; R737.14 文献标识码:A

The killing effects of ganciclovir on HyTK gene-transduced murine bladder cancer cell line T739 cells *in vitro*

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

Abstract: Objective To investigate the effects of the HyTK gene transduction on murine bladder carcinoma cells *in vitro*. Methods The retroviral vector plasmid PL(HyTK)SN was transfected into packaging cell line PA317 using the liposome method. The obtained recombinant retroviral supernatant fluid was used to infect murine bladder cancer cell line T739 cells. B-resistant colonies, named as T739-TK, were obtained after hygromycin B selection. The integration and expression of HyTK gene in T739-TK cells were identified by RT-PCR. The *in vitro* killing effects of GCV on T739-TK cells were observed. Results RT-PCR showed that HyTK gene was inserted into T739 cells successfully and there was mRNA expression of HyTK gene. *In vitro*, T739-TK cells expressed the killing effects after treatment with GCV of different concentrations. However, T739 cells grew well at different doses of GCV. Conclusion GCV has obvious killing effect on HyTK gene transfected T739 cells *in vitro*.

Key words: bladder carcinoma; gene therapy; HyTK gene; retroviral vector; ganciclovir

肿瘤的基因治疗是目前肿瘤防治研究的一个活跃领域[1]。我们采用逆转录病毒介导的HyTK/GCV系统,并对鼠源性膀胱癌细胞T739进行研究,结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

重组逆转录病毒载体 PL(HyTK)SN质粒来源于新桥医院脑外科,内含潮霉素磷酸转移酶和TK融合基因。T739、NIH3T3和PA317细胞均为本实验室保存。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。丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)为瑞士罗氏公司产品。RNA、RT-PCR试剂盒,100 bp DNA Ladder购自北京博大公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒(HyTK)的大量提取和纯化 按试剂盒说明操作。

1.2.2 重组体导入PA317包装细胞和筛选 脂质体介导法用DOTAP试剂将重组子转染包装细胞PA317,于潮霉素B 400 mg/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。

1.2.3 逆转录病毒滴度的测定 按文献[2]方法操作。

1.2.4 PA317-TK病毒上清对T739细胞的转染与筛选 ①用逆转录病毒上清液感染50%贴壁生长的T739细胞,在37 ℃,5%CO_2的培养箱吸附20 h;②第2天于含潮霉素B 400 mg/L的培养液中筛选培养,每2~3天换1次培养液,同时筛选培养未用病毒上清感染的T739细胞作为阴性对照;③待阴性对照组T739细胞全部死亡(约10 d),转染的T739细胞出现潮霉素B抗性克隆继续维持筛选;④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。

转染逆转录病毒载体Ⅰ型单纯疱疹病毒-胸苷激酶(HSV1-TK)基因的鼠膀胱癌细胞T739命名为T739-TK。

1.2.5 RT-PCR检测 mRNA提取、RT反应以及PCR反应均按试剂盒说明操作。

作者简介:张荣贵(1976-),男,内蒙古察右中旗人,硕士,医师,主要从事泌尿系统肿瘤基因治疗方面的研究。电话:(023)68774624
通信作者:叶 钢,电话:(023)68774924
收稿日期:2003-01-22;修回日期:2003-06-20

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

引物: P1: 5′-CCGGCCCTCACCCTCATCTT-3′

P2: 5′-CCGATTGACTTTGTGCCTTCCT-3′

循环参数如下: 94 ℃, 预变性 5 min; 94 ℃, 50 s; 退火温度 60 ℃, 约 50 s; 72 ℃, 延伸 1 min, 以上反应循环 32 圈; 72 ℃, 再延伸 8 min。

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

T739-TK 和 T739 细胞分别制成 1×10^5/ml 的单细胞悬液, 将 T739-TK(或 T739)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, 2 d 换一次含 GCV 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, 在血细胞计数板上计数。计算每一浓度下 3 孔 T739-TK 及 T739 的活细胞平均数占对照组细胞总数的百分比。

2　结果

2.1　重组逆转录病毒包装和病毒滴度的测定

脂质体介导法将 HSV-TK 转移至 PA317 细胞中, 经潮霉素 B 筛选 3 周后, 形成数十个具有潮霉素 B 抗性的细胞克隆, 而未转导的 PA317 细胞, 在相同浓度潮霉素 B 的作用下, 1 周左右全部死亡, 选择克隆的 PA317 细胞, 传代培养, 得到了稳定的产病毒细胞株 PA317-TK。测定病毒滴度, 最高者为 6×10^5 cfu/ml, 以 1∶10 稀释的 PA317-TK 病毒上清感染 T739 细胞, 经潮霉素 B 筛选获得了转染 HSV-TK 基因的细胞株 T739-TK。

2.2　RT-PCR 对 T739-TK 细胞的鉴定

用合成的 cDNA 行 PCR 检测, 特异性扩增出 681 bp 的 HyTK 基因片段, 而其亲代 T739 细胞则未扩出此片段, 从而证实有 HyTK 基因的插入并有其 mRNA 的表达。

2.3　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 0.25～8.0 μg/ml 的 GCV 浓度间, 均表现出对 T739-TK 细胞有杀伤作用, 当浓度为 0.25 μg/ml 时有较强的抑制作用, 随浓度的增大, 杀伤作用渐增强, 当浓度大于 4.0 μg/ml 时其作用趋于稳定。4.0 μg/ml 的 GCV 作用 1 d 后的 T739-TK 细胞生长明显抑制, 细胞开始死亡, 变圆上浮或出现聚集成团, 2～3 d 细胞大量死亡, 5 d 左右细胞全部死亡, 未见贴壁生长的细胞。而 T739 细胞在各个剂量的 GCV 作用下未见细胞死亡, 见图 1、2。

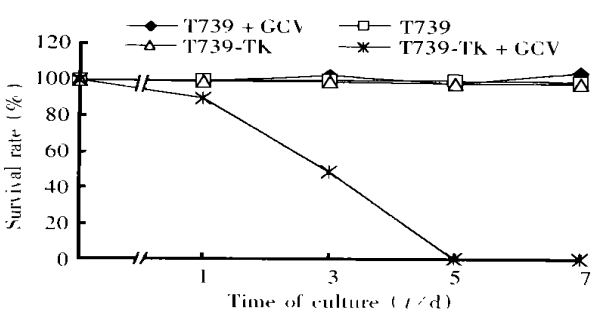


图 1　GCV(4.0 μg/ml)长期作用下的细胞生长曲线

Fig 1　Growth curve of T739 cells in the medium pre-treated with GCV(4.0 μg/ml)

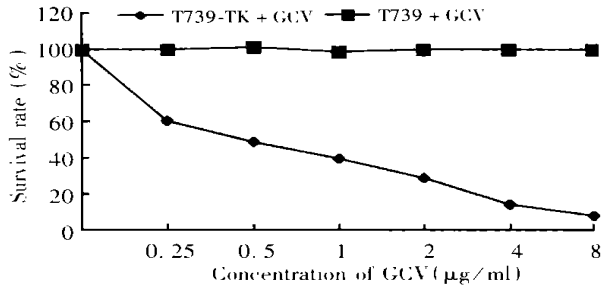


图 2　不同浓度 GCV(0.25～8.0 μg/ml)作用对细胞生长的影响(4 d)

Fig 2　Effects of GCV at different concentrations(0.25～8.0 μg/ml) on the cell survival rates on day 4

3　讨论

膀胱癌是泌尿系统中最常见的肿瘤。大部分膀胱肿瘤为移行细胞癌, 初发为表浅性并且局部切除治疗效果良好, 但有 50%～57% 患者术后复发, 并且有 15%～25% 的病例向高级、高期进展。膀胱癌的发病难以预测, 且易复发。目前尽管有放疗、化疗、免疫治疗和手术治疗等各种措施, 但没有哪种办法能从根本上治疗膀胱癌。近年来, 随着分子生物学技术和理论的飞速发展, 使基因治疗这一新型治疗方法成为可能, 肿瘤的基因治疗研究也成为目前肿瘤防治研究的一个活跃领域。

基因治疗的关键之一是将外源性目的基因导入靶细胞中并使之得以有效的表达, 目前自杀基因的转导系统主要有病毒类载体和非病毒类载体系统。逆转录病毒载体是目前基因治疗中应用最广泛、最有效且使用最多的基因转移方法。逆转录病毒载体经包装细胞包装后, 形成的重组病毒颗粒感染靶细胞, 可将外源目的基因高效地导入靶细胞, 并可使目的基因整合到靶细胞染色体中得以稳定的表达。当前关于逆转录病毒人们担心的问题主要是其能形成有复制能力的病毒和导致基因插入突变[3]。本实验中应用了逆转录病毒载体 LXSN 和包装细胞 PA317, 二者在构建上已尽量除去了产生复制活性病毒所需的条件, 安全性较高, 并且此系统已获准多项人体基因治疗[3～5]。

GCV 是核苷的类似物, 单纯疱疹病毒Ⅰ型胸苷激酶基因编码的胸苷激酶能将其磷酸化, 当 GCV 进入 HSV-TK 基因转染的细胞内, 在 HSV-TK 催化下先形成单磷酸化 GCV, 随之进一步转化为二磷酸化合物, 后者在细胞二磷酸脱氧核苷激酶的作用下转化成三磷酸化 GCV。GCV-TP 能抑制细胞内 DNA 聚合酶的功能, 并作为三磷酸脱氧胸苷的竞争抑制物掺入线状 DNA

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

中,终止 DNA 链的延长,也可干扰细胞分裂时 DNA 的合成,阻止 DNA 合成并使 DNA 发生断裂,最终导致细胞死亡[6,7]。虽然 GCV 也能抑制宿主细胞 DNA 复制,但是因其在病毒感染的细胞中可被 TK 酶所激活而磷酸化,其抑制病毒 DNA 聚合酶所需浓度,远低于抑制正常细胞 DNA 聚合酶的浓度,故而 GCV 对正常细胞基本无毒性。

自从1986年Moolten[7]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,美国等国家正式批准该基因进入临床治疗肿瘤,包括脑胶质瘤、黑色素瘤、前列腺癌、卵巢癌等。关于膀胱癌的治疗报道较少,Sutton 等[8]用腺病毒载体 HSV-TK 基因转染人类膀胱癌细胞(MBT-2),GCV 治疗96 h 后,95%的癌细胞死亡;鼠体皮下致瘤,局部注射 ADV/RSV-TK 加 GCV 治疗,肿瘤生长被显著抑制、体积明显缩小,长期观察结果显示治疗组生存期较对照组明显延长,且对鼠体无明显毒副作用。近来 Sutton 等[9]又完成了鼠体原位膀胱癌模型的建立,经 ADV/RSV-TK 加 GCV 系统治疗后得到了同样结果,进一步验证了有效性,为临床实验奠定了理论及实践依据。本实验中采用不同浓度 GCV 对 T739 细胞和 T739-TK 细胞分别进行体外杀伤。结果显示:在 GCV 作用下,未转导 HyTK 基因的 T739 细胞在形态和数量上与对照组细胞无明显差异,长期作用对细胞的生长也无影响;而转导了 HyTK 基因的 T739 细胞则变化较大,且细胞存活率与作用剂量及时间有明显依赖性,当 GCV 浓度为4 μg/ml 时,5 d 左右细胞全部死亡,其结果与文献报道大致相仿。表明了膀胱癌 T739 细胞对 GCV 的敏感性差,而转染了 HyTK 基因的 T739 细胞对 GCV 的化学敏感性较强,且在一定 GCV 剂量范围内无明显毒副作用,由此说明膀胱癌 T739 细胞对 GCV 的敏感性是由 HyTK 基因的转导而赋予的。

实验结果表明逆转录病毒介导的HSV-TK/GCV 系统对体外鼠膀胱癌细胞有显著杀伤作用,提示该措施可能适用于治疗膀胱癌,并为开展该治疗奠定了体外实验基础。

参考文献:

[1] 何祥梁, 郭先健, 黄桂君. HSV_1-TK 基因转导人肺腺癌细胞A549体内外表达的研究[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(5): 375—377.

[2] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 319—320.

[3] Miller A D. Retrovirus packaging cells[J]. Hum Gene Ther, 1990, 1(1): 5—14.

[4] Miller A D, Rosman G J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression[J]. Biotechniques, 1989, 7(9): 980—982, 984—986, 989—990.

[5] Recombinant DNA Advisory Committee[J]. ORDA reports. Hum Gene Ther, 1995, 6(4): 535—539.

[6] Furman P A, Mcguirt P V, Keller P A, *et al*. Inhibition by ganciclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpes virus genetic information[J]. Virology, 1980, 102(2): 420—430.

[7] Moolten F L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy[J]. Cancer Res, 1986, 46(10): 5276—5281.

[8] Sutton M A, Berkman S A, Chen S H, *et al*. Adenovirus-mediated suicide gene therapy for experimental bladder cancer[J]. Urology, 1997, 49(2): 173—180.

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

(编辑 张大春)

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是:凡是可以使用阿拉伯数字,而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字:

1 公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如:公元前5世纪、20世纪90年代、1995年6月8日 14时30分。

表示年份要写全称,1995年不能写成95年或'95年;1953—1958年不能写成1953—58年。年月日可以写成1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如:13时45分8秒可以写成13:45:08。

2 计数和计量(整数、小数、分数、百分数、约数)包括序数、编号 4位和4位以上的数字采用三位分节法,不用"千分撇",节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙(如2 431改为2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节,也不加千分撇。尾数"0"多,5位以上的数字,可以用"万""亿"表示,但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示,例如3 579 000可写成357.9万但不能写成3百57万千或357万9千。

本刊编辑部

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