DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.024
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
170 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0170-03

HSV-TK/GCV系统治疗鼠膀胱癌细胞T739旁观者效应的实验研究

张荣贵[1],叶 钢[2],刘为池[2],肖 亚[2],张艮甫[2],汪泽厚[2] (第三军医大学:[1]成都军医学院47医院外三科,成都 610500;[2]附属新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

提 要:目的 为探讨HSV-TK/GCV系统治疗鼠膀胱癌细胞T739的旁观者效应。方法 台盼蓝染色计数法对GCV单独作用T739-TK细胞、T739细胞或其两者按不同比例混合在不同容积等情况下的杀伤作用进行研究。结果 HSV-TK/GCV系统有效的杀伤T739-TK细胞,且这种作用有明显的旁观者效应,旁观者效应的强弱与T739-TK细胞所占比例以及细胞间接触程度成正相关。结论 HSV-TK/GCV系统不仅能有效的杀伤T739-TK细胞,而且对T739细胞有明显的旁观者效应。

关键词:膀胱癌;HSV-TK基因;旁观者效应;丙氧鸟苷(GCV)
中图法分类号:R329.25;R373;R737.14 文献标识码:A

Bystander effects of HSV-TK/GCV system on murine bladder carcinoma cell line T739 *in vitro*

ZHANG Rong-gui, YE Gang, LIU Wei-chi, XIAO Ya, ZHANG Yin-fu, WANG Ze-hou (Department of Urology, 47th Hospital, Military Medical College of Chengdu, Third Military Medical University, Chengdu 610500, China)

Abstract: Objective To investigate the bystander effects of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir (HSV-TK/GCV) system on murine bladder carcinoma cell line T739 *in vitro*. Methods The killing effects of GCV on T739-TK cells alone, the mixture of T739-TK and T739 cells at different ratios, or the mixture of them at ratio of 1∶1 in different volumes were observed. Results The T739 cells transferred with HyTK gene were killed in the presence of GCV in a dose dependent manner and the effect was stable and great when GCV at 4.0 μmol/L. The HSV-TK/GCV system killed the T739-TK cells greatly in manners of dose- and time-dependence. In the mixed culture of T739-TK and T739 cells at different ratios, GCV (4.0 μmol/L) killed not only T739-TK cells, but also neighboring cells without HyTK transfection by the bystander effect and the apoptotic rate was elevated with the increase of T739-TK proportion. When the 2 cells were mixed equally, the large volume the medium were, the more living cells left. The results indicated that bystander effect of HSV-TK/GCV system had not only a positive correlation with the proportion of T739-TK, but also a negative correlation with the interspace of action. Conclusion HSV-TK/GCV system can effectively kill the HSV-TK-transferred T739-TK cells and nearby T739 cells without the transfection by the bystander effect *in vitro*.

Key words: bladder carcinoma; HSV-TK gene; bystander effect; ganciclovir

肿瘤的自杀基因治疗是目前肿瘤防治研究中的一个活跃领域,HSV-TK/GCV是典型的自杀基因系统。对不同恶性肿瘤细胞的体外及体内实验研究发现,在有效的药物前体丙氧乌苷(GCV)作用下,转染了HSV-TK基因的肿瘤细胞对未转染HSV-TK基因的肿瘤细胞可产生旁观者效应,本实验就HSV-TK/GCV系统治疗鼠膀胱癌细胞T739的旁观者效应以及旁观者效应在细胞不同混合比例及混合容积等情况下的杀伤作用进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

鼠膀胱癌细胞株T739细胞和转导HyTK基因(内含潮霉素磷酸转移酶与HSV-TK基因融合基因)的T739-TK细胞均由本人保存,GCV为瑞士罗氏公司产品。

作者简介:张荣贵(1976-),男,内蒙古察右中旗人,硕士,医师,主要从事泌尿系肿瘤基因治疗的研究。电话:(028)3016659

收稿日期:2001-06-05;修回日期:2001-10-12

1.2 细胞培养

鼠膀胱癌细胞株T739细胞、转导HyTK基因的鼠膀胱癌细胞株T739细胞(T739-TK),分别用含10%灭活小牛血清的RPMI1640培养液,在37 ℃、5% CO_2孵箱中进行培养。

1.3 GCV对转染HSV-TK基因的T739-TK细胞的杀伤作用

24孔培养板内,每孔分别加入1×10^5个T739-TK或T739细胞,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 d更换一次含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。

$$细胞存活率=\frac{实验组活细胞数}{对照组活细胞数}\times 100\%$$

1.4 T739-TK细胞与T739膀胱癌细胞共培养实验

1.4.1 旁观者效应与细胞混合比例的关系 先将各细胞制成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

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

个。T739-TK 细胞所占比例为 0%、10%、20%..... 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。于 96 h 后胰酶消化各孔细胞, 制备单细胞悬液, 0.2%台盼蓝染色计数。计算细胞存活率。

1.4.2　旁观者效应与细胞间距离大小(容积)的关系　　细胞同上, 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, 每孔接种细胞总数 2×10^5个, 各设3 个平衡孔。24 h后换用含 GCV 4μg/ml 的培养液, 96 h后胰酶消化各孔细胞, 制备单细胞悬液, 0.2% 台盼蓝染色计数。

2　结果

2.1　GCV 对T739-TK 细胞的体外杀伤作用

T739-TK 细胞和 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, 均表现出对转导 TK 基因的 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, 细胞存活率与作用剂量和时间有明显的依赖性, 当浓度大于 4.0 μg/ml 时其作用趋于稳定。4.0μg/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。而未转导TK 基因的T739 细胞在各个剂量的GCV 作用下生长均良好, 未见细胞死亡。见图 1、2。

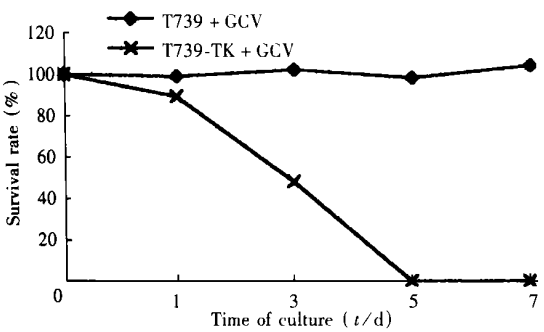


图 1　GCV(4.0 μg/ml)长期作用下的细胞生长曲线

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

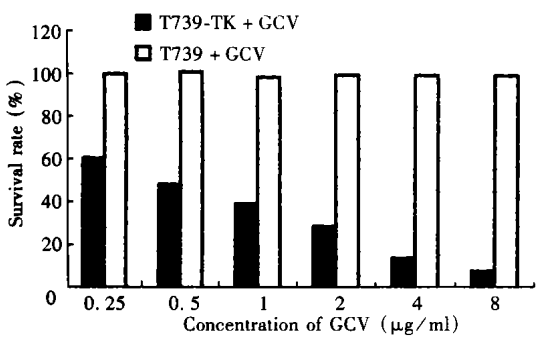


图 2　不同浓度 GCV(0.25~8.0 μg/ml)作用(4 d)对细胞生长的影响

Fig 2　Effect of GCV at 0.25~8.0 μg/ml on the cell survival rates for 4 d

2.2　旁观者效应

2.2.1　与比例的关系　　将 T739-TK 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 时仅有 10%的 T739-TK 细胞就可杀伤近 40% 左右的细胞, 而 T739-TK 细胞占 50%时, 则有 75% 的左右的细胞被杀伤, T739-TK 细胞占90%时, 细胞几乎全部死亡; 而同样接种, 不加 GCV 的对照组细胞则不出现细胞毒作用, 细胞生长良好。表明具有旁观者效应。结果见图 3。

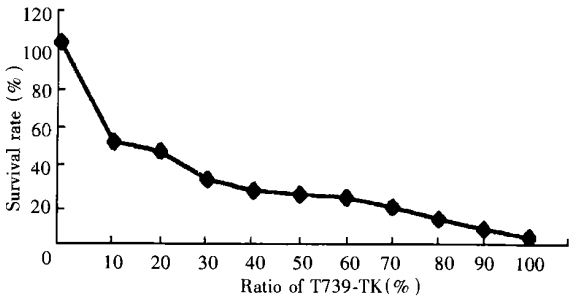


图 3　GCV(4.0 μg/ml)对不同比例的 T739-TK 细胞与 T739 细胞混合培养产生的杀伤作用

Fig 3　The killing effects of GCV(4.0 μg/ml) on a mixture of T739-TK and T739 cells in different ratio

2.2.2　与容积的关系　　实验各组细胞经处理, 96 h 后胰酶消化各孔细胞, 制备单细胞悬液, 0.2% 台盼蓝染色计数, 发现 96 孔培养板中活细胞数最少, 直径 65 mm 培养皿中活细胞数最多, 说明旁观者效应除与细胞比例成正相关外, 还与作用的空间距离成负相关。见图 4。

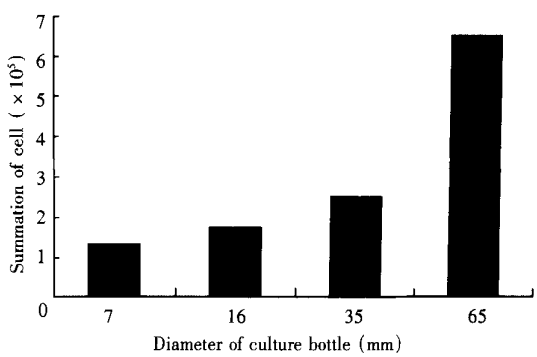


图 4　GCV(4.0 μg/ml)对 T739-TK 细胞与 T739 细胞 50%比例混合在不同体积下培养产生的杀伤作用

Fig 4　The killing effects of GCV(4.0 μg/ml) on a equal ratio mixture of T739-TK and T739 cells in different volume

3　讨论

将转染 TK 基因的肿瘤细胞与未转染的肿瘤细胞按一定比例混合后共同培养, 不仅转染细胞被杀灭, 而且两者接触相邻未转染的肿瘤细胞也大量死亡, Moolten[1] 首先观察到了这种现象, 当转导了自杀基因的细胞仅占肿瘤细胞的 10%时, 便可观察到, 1992 年 Culver 等[2] 发现只有一部分肿瘤细胞转导 HSV-TK, 应用 GCV

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

后却引起戏剧性的肿瘤抑制或退缩，不但转基因的肿瘤细胞被杀死，而且周围大量未转染的细胞也被杀死，故把这种现象称为“旁观者效应”。本实验研究结果发现，GCV 不仅可诱使 T739-TK 细胞本身死亡，还可使其周围未转导 HSV-TK 基因的 T739 细胞死亡。T739-TK 细胞占混合细胞的 10%时，低浓度的 GCV 就可使 40% 的以上的细胞杀灭，提高 T739-TK 细胞的比例，杀伤效应增高，说明 HSV-TK/GCV 系统存在旁观者效应。旁观者效应的存在，大大增强了 HSV-TK/GCV 系统体外治疗膀胱癌的效果。

旁观者效应的机制现在仍不清楚，目前认为与下列因素有关：①细胞间通讯，特别是缝隙连接的存在，允许磷酸化的 GCV 等在细胞间交流有关；转导了自杀基因的肿瘤细胞产生的毒性代谢产物经过缝隙连接转移至邻近细胞，这种转移由细胞间连接子介导[3,4]；②与细胞凋亡有关[5]；③与免疫调节有关[6]。我们的实验结果表明旁观者效应除与细胞比例成正相关外，还与作用的空间距离成负相关。实验中将 T739 和 T739-TK 细胞等浓度按各 50%混合，等量均匀接种于不同体积容器，经 GCV 处理后发现 96 孔培养板中活细胞数最少，直径 65 mm 培养皿中活细胞数最多，由此推测细胞间的紧密接触缝隙连接建立的多少是发生此现象的主要因素。Bi 等[7]将转染 TK 基因的 HTI1 080 细胞(TK^+)与未转染 TK 基因的 HTI1 080 细胞(TK^-)混合培养，并加入 ^3H 标记的 GCV，结果发现除了 TK^+ 的细胞可掺入 ^3H 标记的 GCV 代谢产物外，与其相接触的 TK^- 细胞也可掺入 ^3H 标记的 GCV 代谢产物，而未接触的 TK^- 细胞内则没有，此结论也说明了这一点。

通过实验，使我们对 HSV-TK/GCV 系统的作用及其机制增加了认识，为进一步研究以及设法提高其作用效果奠定了基础。

参考文献：

[1] Moolten F L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes simplex virus thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy[J]. Cancer Res, 1986, 46(10): 5 276—5 281.

[2] Culver K W, Ram Z, Walbridge S, *et al*. In vivo gene transfer with retroviral vector producer cells for treatment of experimental brain tumors[J]. Science, 1992, 256(5 063): 1 550—1 552.

[3] Namba H, Tagawa M, Iwadate Y, *et al*. Bystander effect-mediated therapy of experimental brain tumor by genetically engineered tumor cells [J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(1): 5—11.

[4] James F, Fred G, Barker L, *et al*. The extent of heterocellular communiation mediated by gap junctions is productive of bystander tumor cytotoxicity *in vitro*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(26): 11 071—11 075.

[5] Hamel W, Magnelli L, Chiarugi V P, *et al*. Herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells [J]. Cancer Research, 1996, 56(15): 2 697—2 702.

[6] Yamamoto S, Suzuki S, Hoshino A, *et al*. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cell induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice[J]. Cancer Gene Ther, 1997, 4(2): 91—96.

[7] Bi W L, Parysek L M, Warnick R, *et al*. *In vitro* evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV-TK retroviral gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 1993, 4(6): 725—732.

（编辑 谢义霞）

（上接 169 页）

例数的 45.7%(16/35)和 40%(14/35)，而小细胞肺癌检出率低，为 14.3%(5/35)。活检过程中发生气胸 4 例(6.7%)，均在 1 周内自行吸收。未发现大出血者。

表 2 60 例肺癌并胸腔积液患者胸膜活检结果

胸膜活检次数	胸膜活检病理结果(例次)			
	胸膜组织慢性炎症	癌疑	找到癌细胞	其它 *
1 次	6	4	11	2
2 次	14	3	11	6
3 次	16	5	11	4
≥4 次	22	4	2	7
合计	58	16	35	19

*：包括骨骼肌、血凝块、纤维组织等

2 讨论

胸膜活体组织检查在肺、胸膜疾病中具有重要意义。胸腔积液包括渗出液和漏出液，胸膜活检对渗出液的病因诊断意义大，通过胸膜活检不仅可以作出疾病的诊断(胸膜恶性病变或炎性病变，主要是结核性病变)，而且对肺、胸膜肿瘤病变可能获得病理组织学分型[1]，为治疗及估计预后提供重要的依据。

我们的体会是胸腔穿刺胸膜活检术是一种简单、易行、安全的检查方法，患者痛苦小，并发症少，阳性率高，可对原因不明的胸腔积液做进一步鉴别诊断，并有助于病理组织学分型[2]，所需工具价格低廉，尤其适合在基层推广使用。可以反复多次进行，如本组 60 例经 1～3 次胸膜活检可确诊者 33 例(55%)，经过 3 次以上活检仍有 2 例获得确诊。经过多次胸膜活检并不增加气胸及出血等并发症的发生率。对于包裹性积液或少量胸腔积液或胸腔积液分隔患者最好由 B 超定位穿刺，增加安全性，减少并发症的发生[3]。在不同穿刺点及胸膜的不同部位取材，可以减少漏诊。胸膜活检中腺、鳞癌检出率较高小细胞肺癌阳性率低，可能与腺、鳞癌向胸膜直接蔓延快、发生率高，而小细胞肺癌主要呈浸润性生长，向淋巴道、血道转移有关[3]。这一结果与我们在胸腔镜中所观察的腺、鳞癌胸膜转移呈弥漫型结节而小细胞肺癌难以观察到胸膜转移灶结果一致。另外，操作者的熟练程度和操作技巧也是提高肺癌检出率和防止并发症的重要因素。

关键词：肺癌；胸腔积液；胸膜活检
中图法分类号：R734.204 文献标识码：B

参考文献：

[1] Maitre B, Atassi K, Housset B. Diagnosis of pleurisy[J]. Rev Prat, 1997, 47(12): 1 298—1 303.

[2] Kohman L J. Thoracoscopy for the evaluation and treatment of pleural space disease[J]. Cheast Surg Clin N Am, 1994, 4(3): 467—479.

[3] Buscarini L, Cavanna L. Ultrasound and ultrasonically guided biopsy in oncohematology[J]. Haematologica, 1991, 76(1): 53—64.

（编辑 薛国文）

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