DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.021
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
872 2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)07-0872-03

HSV_1-TK/GCV系统对人肺腺癌细胞A549生物学特性的影响

何祥梁,郭先健,黄桂君 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 观察转TK基因肺癌细胞对丙氧鸟苷(GCV)的敏感性及TK/GCV系统杀灭肿瘤细胞机制。方法 观察转TK基因、转空载体A549细胞(下分别简称A549-TK、A549-pLXSN)和A549细胞形态学改变、生长增殖特性。GCV对3种细胞生长抑制(MTT法)。电镜、流式细胞仪观察A549-TK、A549细胞经50 μmol/L GCV作用3 d后细胞凋亡。结果 转基因细胞变为不规则,呈多角型,透亮度下降,体外增殖能力下降,A549-TK,A549-pLXSN,A549 3种细胞倍增时间分别为42.35、41.75、36.18 h。依据IC50,A549-TK细胞对GCV敏感性比A549细胞提高46倍,电镜发现A549-TK细胞有凋亡小体,核呈半月征等,流式细胞仪发现A549-TK、A549细胞亚G_0G_1期分别为(12.21±1.76)%、(1.32±0.47)%,两者比较$P<0.01$。结论 A549-TK细胞获得了对GCV敏感性,TK/GCV杀灭肿瘤细胞与诱导凋亡有关。

关键词:肺肿瘤;基因转移;基因治疗;丙氧鸟苷
中图法分类号:R394.2;R734.2 文献标识码:A

Effects of HSVl-TK/GCV system on biological characters of human pulmonary adenocarcinoma cell A549

HE Xiang-liang, GUO Xian-jian, HUANG Gui-jun (Research Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the sensitivity of TK gene—transferred pulmonary carcinoma cells to GCV and study the mechanism of TK/GCV system killing carcinoma cells. Methods The morphism and reproduction competency of A549 cell, A549 cell transferred with TK gene (A549-TK) and A549 cell transferred with vacant vector (A549-pLXSN) were observed. The inhibitory effect of GCV on the 3 cells was studied with MTT assay. The apoptosis of A549-TK cell and A549 cell the treated with 50 μmol/L GCV for 3 days was observed with electron microscope and flow cytometer. Results Under the effect of GCV, A549-TK and A549-pLXSN cells became irregular, polyangular, and opaque. The reproduction competency decreased and the doubling time of cells of A549-TK, A549-pLXSN and A549 cell were 42.35, 41.75 and 36.18 h respectively, and the sensitivity of A549-TK cell to GCV was 46 times higher than that of A549 cell. Apoptotic bodies and semilunar features of cell nucleus were found under electron microscope. Flow cytometer revealed that G_0G_1 subphase of A549-TK, A549 cells were (12.21±1.76)%, (1.32±0.47)% respectively ($P<0.01$). Conclusion A540-TK cell have acquired sensitivity to GCV and TK/GCV killing carcinoma cell was relative to induced cell apoptosis.

Key words: pulmonary carcinoma; gene transferring; gene therapy; ganciclovir

HSV_1-TK(Herpes simplex virus type-Ⅰ thymine kinase)基因是目前药敏基因中研究最多的一个,已被广泛应用于多种肿瘤,如脑胶质瘤、黑色素瘤,卵巢癌等。本实验应用该基因转染人肺腺癌细胞A549,观察了转基因细胞生物学特性变化,现报告如下。

作者简介:何祥梁(1964—),男,江苏省瑞昌县人,博士,主治医师,讲师,主要从事肺癌基因治疗方面的研究,发表论文10篇,现在第一军医大学附属珠江医院呼吸科,广州 510282。电话:(020)85143373

收稿日期:1999-11-15;修回日期:2000-04-14

1 材料与方法

1.1 主要材料

人肺腺癌细胞A549购自上海细胞所,A549-TK、A549-pLXSN均由作者本人在构建含TK基因逆转录病毒表载体后用电穿孔法转化筛选及保存。细胞培养基RPMI-1640、胰蛋白酶购自GIBCO公司,MTT(Sigma),丙氧鸟苷(Ganciclovir,GCV)购自瑞士Roche公司。

1.2 方法

1.2.1 将A549-TK、A549-pLXSN、A549 3种细胞按10^4/孔接种在2块24孔培养板,各15个孔,观察细胞形态学、生长增殖特性,

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

每天取每种细胞 3 个孔胰酶消化, 苔盼兰染色计数活细胞, 倍增时间 Td(h)=(T.lg2)/(lgN/No)。

1.2.2　3 种细胞对 GCV 敏感性观察, 分别将 A549-TK, A549-pLXSN, A549 3 种细胞按 2 500/孔, 接种于 96 孔板上培养 1~2 d 后, 设 GCV 0、0.1、1、10、100、1 000、2 000、3 000、3 500、4 500 μmol/L 10 个浓度点, 每点设 3 复孔, 加GCV 培养 5 d, 用 MTT 法测活细胞数, 并设不加药对照, 细胞生长抑制率=(1− 对照组 D_λ/实验组 D_λ)×100%。

1.2.3　取 70%融合的 A549-TK、A549 两种细胞各 1 瓶, 换含 50 μmol/L GCV 培养 3 d 后, 收集细胞沉淀, 加入戊二醛 4 ℃固定 4 h, 1% OSO_4 溶液再固定, 环氧树脂 Epon812 包埋, Reichert-Jung. E 型超薄切片机切片, 醋酸铀染色, Philip EM400 型电镜观察细胞超微结构变化。

1.2.4　取 50%~60%融合的 A549-TK、A549 两种细胞各 1 瓶, 去旧培养基, 换含 50 μmol/L GCV 培养 4 d 后收集细胞, 70% 乙醇固定后, 用碘化丙啶进行荧光染色, 经 180 目尼龙网过滤, 用 FACS400 型流式细胞仪测定每个细胞的荧光强度。数据经微机用细胞周期分析 COTFT 分析求出。统计学分析采用配对计量资料 Student's t test。

2　结果

转基因细胞 A549-TK, A549-pLXSN 与亲代细胞 A549 比较, 生物学特性有些差别, 转基因细胞外观变为不规则, 呈多角型, 易空泡化, 透亮度下降, 体外增殖速度减慢, 上述 3 种细胞倍增时间分别为 42.35、41.75、36.18 h。

A549-TK, A549-pLXSN, A549 细胞对 GCV 敏感性用 IC50 表示分别为 90.82、4 157.24、4 176.17 μmol/L, 从 IC50 看, A549-TK 细胞比 A549 细胞对 GCV 敏感性提高 46 倍, 转空载体、亲代细胞基本相同。

电镜观察结果显示, A549-TK 细胞有凋亡变化特征, 如细胞核皱缩, 半月征, 凋亡小体形成等改变, A549 细胞无这些变化, 见图 1。

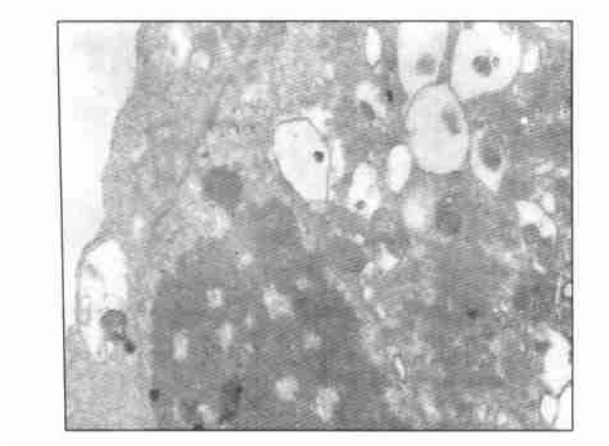


图 1　A549-TK 细胞凋亡特征, 凋亡小体, 胞核半月征均同时存在　(TEM× 8 000)

Fig 1　Apoptotic feature of A549-TK cell, showed apoptotic body, semilunar feature in cell nucleus　(TEM× 8 000)

流式细胞仪检测结果显示 A549-TK 细胞经 50 μmol/L GCV 作用 3 d 后在直方图上出现亚 G_0G_1 峰, 该峰由凋亡细胞形成; A549 细胞无该峰出现。A549-TK、A549 细胞亚 G_0G_1 期分别为 (12.21±1.76)%、(1.32±0.47)%, 两者比较, 差异非常显著(P<0.01)。

3　讨论

HSV_1-TK 基因作用为众多药敏基因之一, 目前研究应用最多, 它主要用于肿瘤和 AIDS 的治疗研究, 有些国家已批准进入临床治疗试验, 如脑胶质瘤、黑色素瘤、卵巢癌等。到 1997 年底, 全世界有超过 40 个临床应用该基因治疗患者的记录[1]。肺癌应用该基因治疗国外也有不少报道。我们体外观察到 A549-TK、A549-pLXSN 细胞生物学特性发生改变, 如外形变为不规则, 呈多角形, 易空泡化, 细胞透亮度下降, 增殖速度减慢, 这与 Smythe[2] 报道相同, 可能与转入的外源基因由于随机整合对细胞本身相邻基因发生影响, 或者是由于其表达产物的作用。

TK 基因杀灭肿瘤细胞的机制为, TK 基因表达产物 TK 酶能将前药 GCV 磷酸化为一磷酸化物, 后者在体内磷酸激酶等作用下转变为二磷酸化物, 并进一步磷酸化为三磷酸化物, 为细胞毒性药物, 抑制 DNA 合成, 导致细胞死亡。观察 A549-TK 细胞对 GCV 的敏感性, 我们发现当 GCV 浓度 1 μmol/L 时, 培养 3 d 后出现部分细胞漂浮、脱落, 聚集成团, 最后死亡, 当浓度为 10 μmol/L 或以上时, 这一现象更加明显, 而对照细胞不受 GCV 浓度升高而变化。通过MTT 法测活细胞数, 我们发现 GCV 对 A549-TK、A549-pLXSN、A549 3 种细胞的半数抑制浓度 IC50 分别为 90.82、4157.24、4176.17 μmol/L, A549-TK 细胞对 GCV 敏感性比 A549 细胞提高了 46 倍。Smythe[3] 报道 GCV 对 A549 细胞转 TK 基因后的 IC50 为 75 μmol/L, 而亲代细胞 IC50> 2 000 μmol/L 以上。与我们的结果较为接近, 他也发现转 TK 基因的卵巢癌细胞对 GCV 仍很抵抗, 他解释这种差异可能是细胞膜对病毒的结合力不同, 导致进入细胞的病毒量差异, 所以 TK 基因在不同细胞中拷贝数不同, 表达产物产量差别很大, 导致不同细胞类型转基因后对 GCV 敏感性差别很大。

为了探讨 TK/GCV 杀灭肿瘤细胞的机制, 我们用电镜观察 A549-TK、A549 两种细胞经 GCV 作用 3 d 后细胞超微结构变化及流式细胞仪检测细胞周期、直方图等。因为目前认为该系统杀灭肿瘤的机制之一是诱导了细胞凋亡, TK^+ 细胞凋亡时产生的凋亡小体被邻近 TK^-细胞吞噬, 导致后者也被杀灭[4,5]。我们的实验结果也确实发现了 A549-TK 细胞出现了凋亡, 如电镜发现有凋亡小体、核呈半月征, 核浓缩等, 对照细胞无这些发现。流式细胞仪发现 A549-TK 细胞直方图上有

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

亚 G_0G_1 峰，该峰由凋亡细胞形成，而 A549 细胞无该峰。说明了 A549-TK 细胞出现了凋亡变化，因此我们的实验结果也支持 TK/GCV 系统杀灭肿瘤细胞与诱导细胞凋亡有关。

参考文献：

[1] K-H plate. Foreilling. Suicide gene against brain tumors[J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(1): 3—5.

[2] Smythe W R, Hwang H C, Amin K M, *et al*. Use of recombinant adenovirus to transfer the herpes simplex virus thymidine kinase gene to thoracic neoplasms: an effective *in vitro* drug sensitization system[J]. Cancer Res, 1994, 50(12): 2 055—2 061.

[3] Smythe W R, Hwang H C, Elshami A A, *et al*. Differential sensitiviy of thoracic malignant tumors to adenovirus mediated drug sensitizations gene therapy[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1995, 109(6): 626—632.

[4] Wolfgang H, Lucia M, Vincenzo P, *et al*. HSV-TK/GCV mediated apoptotic death of bystander cells[J]. Cancer Res, 1996, 56(15): 2 679—2 684.

（编辑 薛国文）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)09-0874-01

中心吸引器管接口污染调查

Survey on the contamination of the opening of central aspirator

练向群，张 翼，朱 敬 （解放军第 202 医院，沈阳 110003）

中心吸引器是外科手术室必备设施，除用于正常的术中出血和冲洗吸引外，还常用于吸痰、胃肠减压和电灼烟雾的吸引，因此确保吸引器管上下接口的清洁是保证手术及治疗质量，防止医院感染的重要环节。为此我们分别于 1996 年 6、12 月两次对本院部分手术间的中心吸引器接口分 30 次，各自进行细菌数检测及乙肝表面抗原测定；同时以调查形式统计了 96 人次对中心吸引器接口处理的使用方法。现将结果报告如下。

1 调查方法

用无菌生理盐水棉签将吸引器的上接口（即墙壁接口）管腔内外两面依次涂抹 2 遍，用无菌操作方法装入试管，另取一棉签同法将下接口（与手术台连接口）管腔内外两面采样、送检。经 35℃ 24 h 细菌培养的计数。同法采样检测乙肝表面抗原。

2 结果

吸引器下接口细菌数＞ 60 CFU/cm² 有 28 次，占总数的 50.90%，结果见表 1。

表 1 吸引器管上、下接口检测结果

检测项目	细菌数（CFU/cm²）		HBsAg	
	≤2	＞2	阴性	阳性
吸引器管上接口	0	55(100%)	32(84.21%)	6(15.79%)
吸引器管下接口	0	55(100%)	38(100.00%)	0(0.00%)

作者简介：练向群（1964—），女，江苏省南京市人，主管护师。电话：(024)23053546

收稿日期：2000-05-24；修回日期：2000-08-09

96 人次使用吸引器方法调查中，吸引器下接管为一次性使用占 98.37%，上接口手术完毕后均消毒占 95.76%。

3 讨论

吸引器管接口正常有细菌寄居，不同部位、不同术间带菌数量也不同[1]。常规Ⅱ类切口术间带菌数目多于Ⅰ类切口术间。倘若下接管反复使用不消毒，则加剧了手术逆行感染的机会。据国内外学者研究，即使反复清洗也会有顽固菌群寄居，成为细菌逆行侵入的门户，如果清洗不彻底还将会成为细菌繁殖的培养基，当使用带菌的吸引器连接管时，便增加了手术逆行交叉感染的机会，尤其当乙肝表面抗原阳性时，如不弃之或消毒灭菌处理，则造成的危害会更加严重。因此，在吸引器连接管的应用中，有条件的则应 1 人 1 管，否则，用后清水冲洗干净，浸泡于 2% 的戊二醛内 15 min 或 0.5%“84”液中 5 min。清水冲净凉干，甲醛薰蒸 12 h 后备用。上接口手术完毕后巡回护士应用 0.5%“84”液或过氧乙酸反复擦拭。

通过以上的调查分析，旨在揭示手术期的感染防护；提高护理质量；提高全体护理人员对清洁、消毒、灭菌之重要性的认识，防止感染机遇，使不必要的污染状况得到有效的控制，从而避免院内交叉感染的发生。

关键词：中心吸引管；污染；调查
中图法分类号：R197.59 文献标识码：B

参考文献：

[1] 薛广波 主编. 实用消毒学[M]. 北京：人民军医出版社，1993. 325.

（编辑 陈聪连）

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