DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.022
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
766 2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)08-0766-03

ACV治疗转TK基因人肺腺癌细胞A549裸鼠皮下成瘤的实验研究

何祥梁,郭先健 (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 观察活体内转TK基因肺腺癌细胞对ACV(无环鸟苷)的敏感性。方法 转TK基因肺腺癌细胞A549-TK、亲代细胞A549分别接种于裸鼠腹部皮下左右侧成瘤后,给予腹腔注射ACV治疗2周,测量治疗前后肿瘤大小,并做病理观察。结果 A549-TK细胞接种的肿瘤治疗前后体积增大不明显($P>0.05$);A549细胞接种的肿瘤治疗后体积明显大于治疗前,光镜发现A549-TK细胞接种的肿瘤有局部坏死,胞核裂解、消失。结论 转TK基因肺腺癌细胞接种裸鼠所形成的肿瘤能被ACV治疗抑制生长。

关键词:肺癌;HSV1-TK基因;基因治疗;无环鸟苷;腺癌
中图法分类号:R730.261;R730.59;R734.2 文献标识码:A

Study of ACV treatment of subcutaneous tumors induced with inoculation of pulmonary adenocarcinoma cells A549-TK in nude mice

HE Xiang-liang, GUO Xian-jian (Institue of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the sensitivity of pulmonary adenocarcinoma cell A549 transfected with TK gene to acyclovir ACV in nude mice. Methods A549-TK, A549-cells were inoculated into left and right abdominal wall in nude mice respectively. When the tumors grew to certain volume, animals were treated with ACV injection into the abdominal cavity for 2 weeks, the diameter of tumor was measured before and after ACV treatment. The tumor tissues were examined pathologically with light microscope. Results The tumors induced with inoculation of A549-TK cells showed no significant increase of their volume after ACV treatment ($P>0.05$) but those induced with inoculation of A549 cells demonstrated an obvious increase in their volume after treatment. Light microscopy revealed local necrosis, karyoklasis and nuclear disappearance. Conclusion The growth of tumor induced with inoculation of A549-TK cells could be inhibited with ACV treatment in nude mice.

Key words: pulmonary carcinoma; TK gene; gene therapy; acyclovir; adenocarcinoma

TK基因作为研究最多的自杀基因,已进行了多种肿瘤体内外治疗研究,美国FDA早已批准该基因可以进入临床治疗试验,如脑胶质瘤、黑色素瘤、卵巢癌等。为了探索该基因治疗肺癌的效果,旨在为该基因进入临床治疗肺癌奠定基础,我们将TK基因转入人肺腺癌细胞A549在裸鼠体内进行试验,现报告如下。

1 材料与方法

RPMI1640、0.25%胰蛋白酶均为Gibco公司产品,ACV为进口分装。A549-TK、A549均为作者转染保存,BALB/c裸小鼠购于第三军医大学实验动物中心。

取对数生长中晚期A549-TK、A549 2种细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,用PBS洗2遍,离心,留细胞沉淀,用无血清的RPMI1640培养基重悬细胞,细胞密度达5×10^7/ml BALB/c裸小鼠9只(第1批6只,第2批3只),雌雄不拘,4~5周龄,平均重量为(19.8±1.5)g,确定左右侧分别接种A549-TK、A549细胞,每

作者简介:何祥梁(1964—),男,江西省瑞昌县人,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内科,广州 510282。电话:(020)85143373

收稿日期:1999-10-11;修回日期:2000-05-21

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

个点接种细胞 10^7/0.2 ml, 其中 3 只裸鼠各接种 4 个点, 另 6 只裸鼠每只接种 2 个点。自接种之日起每天观察肿瘤结节生长情况, 待大部分肿瘤在(0.5 ~ 1)cm×(0.5 ~ 1)cm(长×宽)之间, 开始治疗, 按 ACV 100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, 腹腔注射, 每天上下午各 1 次, 连续 2 周。治疗前及治疗结束时均用卡尺测量肿瘤长宽, 并拍照。肿瘤体积按 $V = 1/2((长^2 \times 宽)\ mm^3$ 公式计算, 肿瘤体积大小用配对计量资料 Student's t 检验分析。病理观察: 治疗结束后无菌取出肿瘤组织, 10%福尔马林固定 24 h, 石蜡包埋切片, HE 染色, 普通光镜下观察, 请病理专家鉴定。

2　结果

2.1　裸鼠体内成瘤情况及治疗前后肿瘤大小的变化

将 A549-TK, A549 2 种瘤细胞接种裸鼠后成瘤时间、肿瘤发生频率、ACV 治疗前后体积分别进行统计, 见表 1。裸鼠体内成瘤见图 1, 表示其中 1 只裸鼠治疗前后肿瘤变化。

表 1　裸鼠体内成瘤情况及治疗前后肿瘤变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Tumors igenesis and volume changes of tumor before and after ACV treatment in nude mice($\bar{x} \pm s$)

Cells inoculated	Number of cells (1×10^7)	Incidence of tumor	Time of tumor formation(d)	Volume of tumor (mm^3)	
				Pre-treatment	Post-treatment
A549-TK	1.0	12/12	7±3	224±151	258±167
A549	1.0	12/12	6±2	243±173	953±412 *

*: $P < 0.01$ *vs* pre-treatment

从表 1 中可看出, 裸鼠皮下接种 1×10^7 个细胞(A549-TK 或 A549), 100%能长出肿瘤, 平均长出肉眼可见肿瘤时间, A549-TK 为(7±3) d, A549 为(6±2) d, 两种瘤细胞接种裸鼠后成瘤时间差别不显著($P > 0.05$)。A549-TK 细胞接种的肿瘤 ACV 治疗后体积变化不明显($P > 0.05$)。A549 细胞接种的肿瘤 ACV 治疗后体积明显大于治疗前($P < 0.01$)。

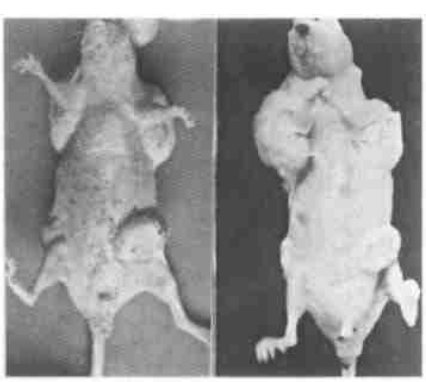


图 1　裸鼠治疗前后体积变化情况

Fig 1　Changes of tumor volume before and after ACV treatment in nude mice

从图 1 中可看出, 右侧肿瘤(A549)治疗后体积明显大于治疗前($P < 0.01$)。左侧肿瘤(A549-TK)治疗前后体积变化不明显($P < 0.005$)。

2.2　肿瘤组织学观察

A549-TK 细胞接种的肿瘤经 ACV 治疗后, 组织切片中有散在小片状坏死区, 细胞形态结构模糊不清, 胞核裂解、消失。A549 细胞接种的肿瘤经 ACV 治疗后, 组织切片中细胞形态结构均正常。见图 2, 图 3。

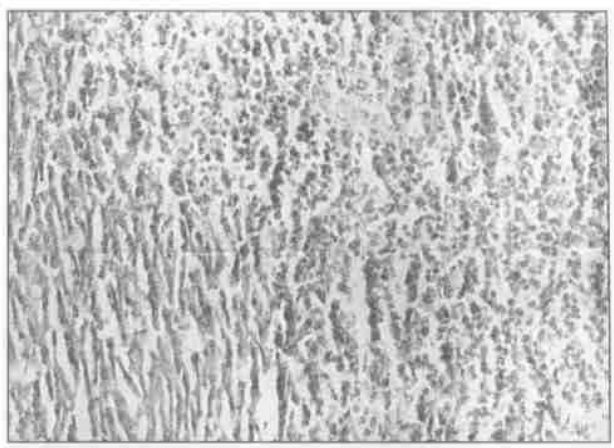


图 2　A549-TK 细胞成瘤经 ACV 治疗的组织学变化(HE×400)

Fig 2　Morphological changes of A549-TK cells inoculated tumors after ACV treatment (HE×400)

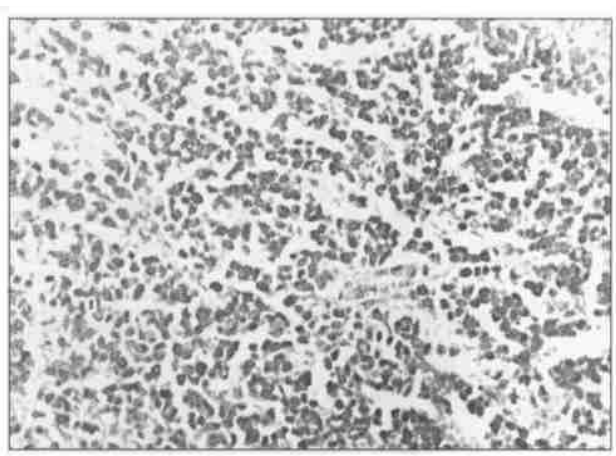


图 3　A549 细胞成瘤经 ACV 治疗的组织学变化(HE×400)

Fig 3　Morphological changes of A549 cells inoculated tumors after ACV treatment (HE×400)

3　讨论

近 10 年来, TK 基因在体内进行了很多肿瘤的治

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

疗实验,虽然报道不一,但转基因细胞都不同程度获得了对ACV的敏感性,能使动物体内的肿瘤停止生长、退化或完全消失[2,3]。我们应用肺腺癌细胞转TK基因后接种裸鼠皮下,与亲代细胞对照,腹腔给予ACV注射,能使A549-TK细胞接种的肿瘤停止生长,治疗前后体积变化不明显($P<0.05$),而亲代细胞接种所形成的肿瘤则明显增大($P<0.01$),不受治疗影响。虽然不能达到使肿瘤退化或消失,但也说明在体内可以抑制肿瘤生长。

目前,活体内基因转移有3种方式:①向肿瘤组织内注射病毒上清液;②向肿瘤内注射包装细胞;③用表达TK基因的肿瘤细胞直接接种。我们采用第3种方式,应该说肿瘤组织细胞全部表达TK基因,而前两种方式还存在病毒感染效率低下的问题,所以表达细胞阳性率不会太高。我们所采用的细胞转TK基因后对ACV的敏感性比亲代细胞提高40多倍,与Smythe[3]报道的相似。A549细胞本身对ACV极不敏感。一般大多数研究者报道不同类型的肿瘤细胞转TK基因后,对GCV(丙氧鸟苷)或ACV的敏感性比亲代细胞提高102-3倍,因此我们的治疗效果受到限制。肿瘤组织病理检查结果表明A549-TK细胞形成的肿瘤ACV治疗后组织中明显出现细胞坏死,组织结构模糊不清,而A549细胞接种的肿瘤细胞、组织结构完全正常,进一步说明ACV诱导了活体内转TK基因的肺癌细胞死亡。TK基因杀灭肿瘤细胞,特别是活体内肿瘤组织细胞的机制除TK酶外,特异性主动免疫反应起了主要作用[4,5]。TK基因表达细胞被ACV作用后产生凋亡,这种凋亡细胞分泌细胞因子如IL-1、TNFα等进入肿瘤组织,导致免疫活性细胞如$CD4^+$、$CD8^+$、NK等细胞聚集,这些免疫活性细胞也释放细胞因子,导致肿瘤组织出血坏死,局部出现炎症反应,单核细胞侵润,免疫调节分子如B7-1、B7-2、ICAM等表达上调,使肿瘤组织局部微环境由免疫抑制变为免疫激发状态,所以说ACV的毒性作用仅表现在早期对TK表达细胞的杀伤,而机体的免疫反应在这一体系中发挥了持久的抗肿瘤作用。

参考文献:

[1] Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, *et al*. Regression of established macroscopic liver metastases after *in situ* transduction of a suicide gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(8): 7 024—7 029.

[2] Lvarez R D, Curile D T. A phaseⅠ study of recombinant adenovirus vector-mediated intraperitoneal delivery of HSV-TK gene and intravenous gancciclovir for previously treated ovarian and extraovarian cancer patient[J]. Human Gene Therapy, 1997, 8(3): 283—287.

[3] Smythe W R, Hwang H C, Elshami A A, *et al*. Differential sensitivity of thoracic malignant tumors to adenovirus-mediated drug sensitization gene therapy[J]. J Thorac Cardiovascular Surg, 1995, 109(4): 626—630.

[4] Ramesh R, Marrogi A J, Munshi A, *et al*. *In vivo* analysis of the bystander effect: a cytokine cascade[J]. Exp Hematol, 1996, 24(7): 829—838.

[5] Freeman S M, Ramesh R, Marrogi A J, *et al*. Immune system in suicide-gene therapy[J]. Lancet, 1997, 394(9 044): 2—3.

(编辑 薛国文)

(上接759页)

之恢复咬合关系及咀嚼功能。完成锤造全冠:适当降低咬合面高度,减轻牙冠受力。

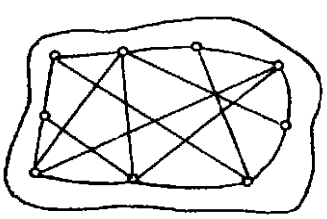


图1 桩钉固位支架横截面

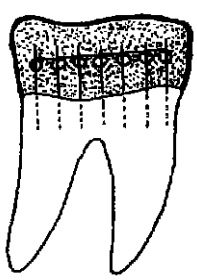


图2 临床牙冠形成

2 疗效判断标准及结果

成功:冠套完好,无主观症状,功能良好,计40牙(75.4%);稍差:邻接关系不良,有食物嵌塞,计9牙(16.7%);失败:修复体脱落,计4牙(7.7%)。

3 讨论

本法固位较常规疗法固位好,恢复良好的咀嚼功能,疗法简单,便于掌握和推广。注意要点:螺纹钉的选择以0.7~0.8 mm为之适宜。BA树脂恢复冠,加压整塑,防上出现气泡。锤造适当降咬合面及恢复邻接关系。

关键词:螺纹钉BA桩-冠;修复;残根残冠

中图法分类号:R783 文献标识码:B

参考文献:

[1] 张震霞,徐 双,王善昌.预成金属全冠在后牙残根残冠修复中的应用[J].实用口腔医学杂志,1997,13(3):187—189.

[2] 陈志勇,李文荟.用银汞合金桩-冠联合体修复后牙残根残冠(附118例临床观察)[J].口腔医学,1996,16(2):93.

(编辑 张大春)

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