DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.029

HSV_1-TK基因转导人肺腺癌细胞 A549体内外表达的研究

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

提 要 目的: 观察 TK基因转导 A549细胞后在体外和体内的表达。方法: 将已构建的逆转录病毒表达载体 PLXSN-TK用电穿孔法转化 A549细胞,原位杂交检测 TKmRNA在 A549-TK细胞和由它接种裸鼠形成肿瘤组织中的表达。斑点杂交检测外源基因在细胞中整合。并体外观察 A549-TK细胞对 GCV的敏感性。结果: 原位杂交表明 A549-TK细胞及由其所形成的肿瘤组织中 TKmRNA表达阳性,对照细胞无表达,斑点杂交证明 A549-TK细胞中有 TK基因整合。A549-TK细胞对 GCV的敏感性是亲代细胞的 46倍。结论: TK基因在 A549-TK细胞中表达阳性,转基因细胞对 GCV敏感。

关键词 肺肿瘤;基因转移;基因表达;丙氧鸟苷
中图法分类号 R734.2

HSV_1-TK基因是一个药敏基因,已被广泛用于多种肿瘤的治疗研究,我们将该基因导入人肺腺癌 A549细胞,观察了体内外转基因细胞对 TK的表达情况,并观察了对抗病毒药 GCV(丙氧鸟苷)的敏感性,现报告如下。

1 材料与方法

主要试剂及来源: 重组逆转录病毒表达载体 PLXSN-TK由本人构建, A549肺癌细胞由呼吸所保存, G418购自 Sigma公司, GCV购自瑞士 Reche公司。

TKCDNA探针用地高辛标记,裸小鼠购自学校动物中心。电穿孔仪 Bio-Red公司产品。

5× 10^6培养细胞悬液 0.8 ml+ 10 μg PLXSN-TK质粒混匀,电击条件 1250 v, 25 μF, 0.7 ms,电击前后冰浴 10 min,然后培养, G418筛选数周得到抗性克隆。另外按相同条件电转化空载体作为对照。

A549、A549-PLXSN、A549-TK 3种细胞与 TK探针原位杂交检测 TKmRNA表达,参照姜伯等[1]方法; 3种细胞常法提取 DNA后与探针作斑点杂交。

设 GCV(0, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 2000, 4500 μmol/L 8个浓度点), A549、A549-PLXSN、A549-TK 3种细胞接种在 96孔板上, 2500 cell/孔,每个浓度点每种细胞设三复孔,细胞贴壁后培养 1~2 d,然后加入不同浓度 GCV, 2 d换一次液作用 5 d用 MTT法测活细胞数。

A549-TK、A549二种细胞分别接种于裸鼠腹部皮下左右侧,共 3只裸鼠,每点接种细胞数为 10^7/0.2 ml, 2周后取瘤组织低温冰冻切片,用 TK探针检测两种组织片中 TKmRNA表达。

2 结果

电击结果见表 1。

表 1 PLXSN-TK、PLXSN电击转化 A549细胞效率

Tab 1 The efficiency of transformation of plamsids PLXSN-TK, PLXSN into A549 cells by electroporation resistant colony number

Condition of electro-transfor mation			Number of resistant colony	
			A549-TK	A-PLXSN
800 v	25 μF	0.8 ms	0	0
1250 v	25 μF	0.8 ms	14	11
1650 v	25 μF	0.7 ms	10	9
2200 v	25 μF	0.7 ms	6	7

A549、A549-PLXSN、A549-TK对 GCV敏感性用 IC50表示,分别为 4157.24、4176.17、90.82 μmol/L,从 IC50看 A549TK细胞比 A549细胞对 GCV敏感性提高 46倍。每个浓度点对细胞生长抑制率见图 1。

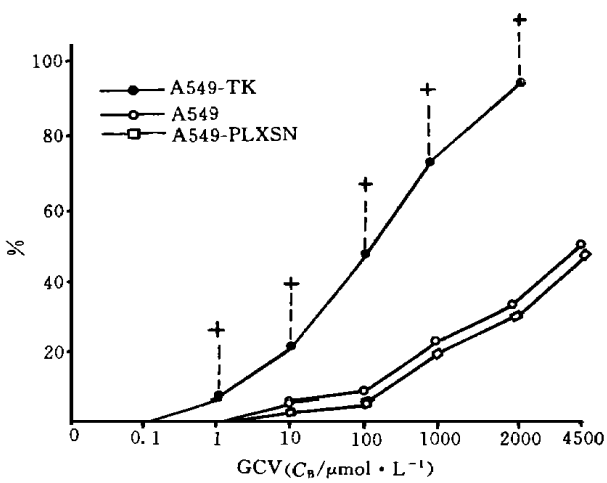


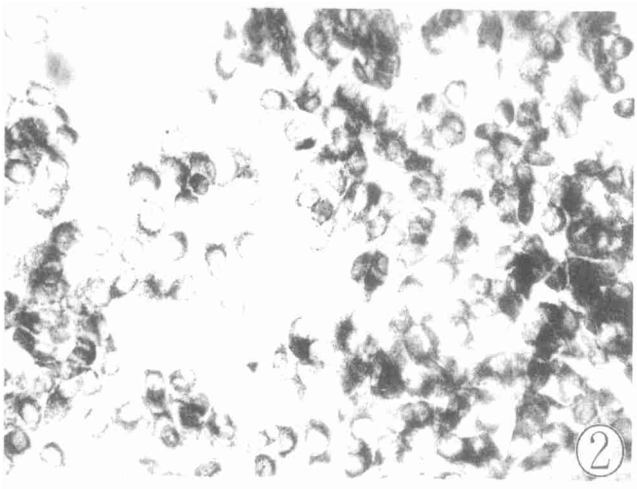
图 1 GCV对三种细胞生长抑制率

Fig 1 Inhibition of proliferation rate of three kinds of cells by GCV

* 何祥梁,男, 36岁,主治医师,博士研究生

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

原位杂交结果表明 A549-TK细胞及由其形成肿瘤组织杂交均呈强阳性,对照细胞及组织均阴性,见图 2、3 斑点杂交,A549-TK细胞中有 TKCNA整合,对照细胞无整合,见图 4



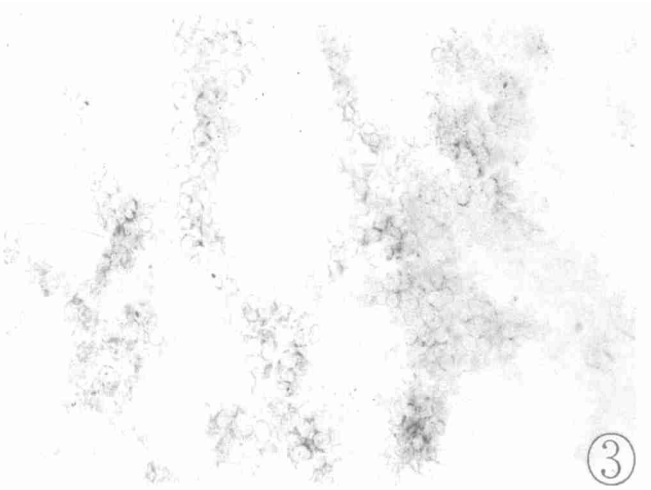


图 2 A549-TK细胞原位杂交 (NBT染色× 400)

Fig 2 ***In situ*** **hyhridization in A549-TK cell** (NBT stain× 400)

图 3 A549-TK细胞接种裸鼠肿瘤组织原位杂交 (NBT染色× 400)

Fig 3 ***In situ*** **hyhridization in tumor tissue formed by inoclulation A549-TK cells** (NBT stain× 400)



图 4 三种细胞 DNA与 TK基因特异探针斑点杂交 1A: 50μg A549-TK细胞 DNA; 1B: 3μg PLXSN-TK质粒 DNA阳性对照; 2、3为 A549、A549-PLXSN细胞 DNA

Fig 4 Dot blot hybridization of DNA from three kinds of cells with TK gene specific probe

1A: 50μg A549-TK cells DNA; 1B: 3μg PLXSN-TK plasmids DNA positive control; 2、3 A459, A549-PLXSN cells DNA

3 讨论

自从 1986年 Moolten[2]首先研究用 TK基因转导纤维肉瘤并使之获得 GCV敏感性后,国内外许多学者用 TK基因对几乎遍及各系统的肿瘤都进行了广泛的研究,都不同程度地获得了对 GCV的敏感性[3,4]。HSV1-TK基因治疗肿瘤机理为该基因表达产物 TK酶能将 GCV磷酸化为一磷丙氧鸟苷,后者被体内磷酸酶继续磷酸化为二、三磷酸核苷,后者为细胞毒药物,能抑制细胞 DNA聚合酶活性,使 DNA合成受阻,导致细胞死亡,因此 TK基因被称为自杀基因。哺乳动物也存在 TK基因,但序列和表达产物完全不同。我们用 HSV1-TK转导 A549肺腺癌细胞,不但转导成功,也获得了对 GCV的敏感性,虽然与 Osaki等[5]报道提高 1 000倍, Kumgai[6]报道提高 500倍有差距,但比亲代细胞提高了 46倍。本试验也提示电转化效率并不随电压增高而增高,每种细胞有适合自己的最适电转化电压。G418筛选抗性克隆一般对照细胞 5 d全部死亡,而抗性细胞经过全量筛选 7~ 9 d后改维持量,维持了二周细胞既不增长又不死亡,然后撤去 G418改为普通培养基细胞增殖很快,这种细胞再加 G418就不再被杀死,也就是得到了抗性克隆。从细胞和组织原位杂交看, A549-TK细胞有强阳性表达,对照细胞无表达,这说明外源基因已稳定整合入细胞基因组中, Zhang等[7]发现 TK基因转染仅对离体细胞有效,而当细胞接种到了活体后敏感性就丢失,所谓基因沉默 (Gene silence)。我们的结果与大多数作者一样 TK基因在体外都有表达,这为以后进行动物实验和进入临床试验提供了证据。

参考文献

1 姜 伯,张来历,周殿元.分子生物学常用实验方法.北京:人民军医出版社, 1996. 137~ 139

2 Moolten F L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted TK gene: paradigm for a prospective cancer control strategy. Cancer Res, 1986, 46(10): 5276

3 Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, *et al*. Regression of es-

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

tablished macroscopic liver metastases after *in situ* transduciton of a suicide gene. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(15): 7024

4 Eric A, Beverly L, Scott M, *et al*. Adenovirus-mediated genetherapy for head and neck squemous cell carcinomas. Ann Otol Rhinol Laryngal, 1996, 105(5): 562

5 Osaki T, Tanio Y, Tachibana I, *et al*. Gene therapy for carcino-embryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of HSV_1-TK gene. Cancer Res, 1994, 54(20): 5258

6 Kumgai T, Tario Y, Osqki T, *et al*. Eradication of myc-over expressing small-cell lung cells transfected with HSV-TK gene containing myc-max response elements. Cancer Res, 1996, 56(2): 354

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

(收稿: 1999-02-24;修回: 1999-04-12)

(编辑　陈聪莲)

Studies on the expression of HSV_1-TK gene *in vitro* and *in vivo* after transduction into human pulmonary carcinoma cell line A549

He Xiangliang, Guo Xianjian, Huang Guijun (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To observe the expression of TK gene *in vitro* and *in vivo* after it being transduced into A549 cells. Methods: The constructed retroviral vector PLXSN-TK was transduced into A549 cells by electro-transformation. The TK mRNA expression in A549-TK cells and tumor tissue formed by itself in nude mice was determined with *in situ* hybridization. Recombination of TK gene into cells is examined with blot hybridization. Sensitivity of A549-TK cells to GCV was also observed *in vitro*. Results: *In situ* hybridization showed that A549-TK cells and tumor tissue positively expressed TK mRNA while the control cells did not. Blot hybridization showed that TK gene was recombined in A549-TK cells. The sensitivity of A549-TK cells to GCV was 46 times higher than that of parental cells. Conclusion: TK gene is positively expressed in A549-TK cells and the sensitivity to GCV is also obtained by A549-TK cells.

Key words pulmonary tumor; gene transfer; gene expression; ganciclovir

(上接 374页)

心内膜弹力纤维增生症可与其他先天性心脏病并存,如主动脉缩窄。单纯性心内膜弹力纤维增生症多无特征性改变,临床诊断主要依据以下几个方面:① 有急性或反复充血性心力衰竭发作,特别是 6个月以下的婴儿;② 心脏增大而无杂音;③ X线示心脏中度至高度增大,伴左或右心缘局限性搏动减弱;④ 心电图示心室肥厚和 ST-T改变;⑤ 超声心动图示心腔扩大,心内膜增厚[2,3]。由此可见,其诊断指标缺乏特异性,尤其当合并其他先天性心脏病时,其表现可相互影响或被掩盖,使诊断更为困难。如本组例 2患者,其临床特征虽与以上几点部分相符,但因合并预激综合征,心电图有继发性 ST-T改变,使本病的心电图改变不明显;同时由于阵发性室上性心动过速反复发作,其心脏增大尚不能除外心动过速性心肌病,故需要更特异的诊断方法确诊。

EMB作为一种检查诊断方法,可为 65% ~ 85%的心肌病患者提供病理学诊断证据,并可用于病因学研究,尤其适用于心内膜心肌病变[4];本组 2例患者,经 EMB均作出了病理学诊断,表明 EMB对确诊心内膜弹力纤维增生症具有重要价值,故对临床上怀疑本病者应争取做 EMB,以便明确诊断,及早给予相应治疗。根据对此 2例患者 EMB的体会,我们认为,在对心内膜弹力纤维增生症行 EMB时,应特别注意本病心内膜结构上的特殊性,即心内膜增厚、表面光滑而硬,在钳取组织时应根据手感适当用力,既保证取出心内膜心肌组织,又不至于发生心脏穿孔。此外,EMB也有一定的局限性,其取材体积小、数量少,当病变呈局灶性或不均匀分布时,易得出假阴性结果,故在分析结果时应引起注意。

关键词　心内膜心肌活检;心内膜弹力纤维增生症

中图法分类号　R446.8; R542.43

参考文献

1 Spivak E M, Nikolaeva T N, Spivak L A. A case of isolated fibroelastosis of the right ventricular endocardium in the child with early congenital carditis. Pediatr, 1991, 34(4): 82

2 Ino T, Benson L N, Freedom R M, *et al*. Nature history and prognostic risk factors in endocardial fibroelastosis. Am J Cardiol, 1988, 62(7): 431

3 常泰吉,朱鸿良,薛　慈,等.小儿先天性心脏病.合肥: 安徽科学技术出版社, 1982. 220~ 223

4 宋治远.心内膜心肌活检术.见: 赵　学 主编.现代介入心脏病学实用技术.重庆: 重庆出版社, 1997. 197~ 200

(收稿: 1998-09-05;修回: 1999-02-02)

(编辑　冷怀明)

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