

HSV-TK基因在膀胱癌小鼠体内的转移和丙氧鸟苷治疗效果

自杀基因体内应用的关键因素是基因转移效率。本实验应用3种不同方法体内转移真核表达载体HyTK基因,探讨HSV-TK基因在膀胱癌动物体内的转移途径以及HSV-TK/GCV(丙氧鸟苷)系统对膀胱癌的体内治疗效果。

1 材料和方法

1.1 材料

重组质粒PLSN(HyTK),内含与潮霉素磷酸转移酶基因相融合的I型单纯疱疹病毒-胸苷激酶(HSV1-TK)基因,由新桥医院脑外科黄其林博士惠赠,所用细胞株均为本院肾病中心实验室冻存,T739同基因鼠购自第三军医大学动物所,脂质体购自宝灵曼公司,质粒提取试剂购自Promega公司。丙氧鸟苷(GCV)购自罗氏公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒DNA的提取 按试剂盒说明书操作,经琼脂糖电泳鉴定并测定D(λ)值。

1.2.2 重组质粒的包装和转染 用DMEM、10%小牛血清培养包装细胞PA317,脂质体介导将载体转染PA317细胞,于含潮霉素B(400 mg/L)培养液中筛选3周,扩增培养克隆细胞,收集培养上清,0.45 μ m过滤后获得逆转录病毒上清。

1.2.3 病毒浓缩和滴度测定 低温离心法浓缩病毒上清,浓缩前后分别测定病毒滴度。滴度测定以NIH3T3为靶细胞,在聚凝胶(Polybrene)存在条件下,计算克隆形成数,以cfu/ml表示。

1.2.4 动物模型的建立 T739同基因鼠24只,雌雄不限,4~6周龄,体质量30~60 g。以3%戊巴比妥钠腹腔麻醉(30 mg/kg·b.w.),背部备皮,常规消毒后,皮下注射含 2×10^5 T739肿瘤细胞PBS悬液,成瘤后用卡尺测量肿瘤体积, $V = \text{短径}^2 \times \text{长径} \times 0.5236$ 。

1.2.5 分组及实验方法 动物随机分为4组,每组6只。裸DNA组:瘤内分3处注射100 μ g裸质粒DNA;脂质体复合物组:30 μ g DNA +150 μ g脂质体分3处瘤内注射;逆转录病毒组: 2×10^6 cfu/ml分3处瘤内注射;空白对照组:等体积生理盐水瘤内注射。第2天所有动物给予GCV 40 mg/kg·b.w.,腹腔注射,共6 d,测量肿瘤体积变化,记录动物存活天数。在动物将死亡时予以处死,取标本作病理检查。

1.2.6 统计学处理 所有实验数据进行t检验。

2 结果

2.1 重组逆转录病毒的包装和病毒滴度的测定

用脂质体将HSV-TK转染至包装细胞PA317中,经潮霉素B筛选3周后,形成数个具有潮霉素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

培养并收集病毒上清，测得病毒滴度为 2×10^5 cfu/ml，经浓缩可提高1个数量级。

2.2 动物成瘤情况

注射肿瘤细胞后约1周，动物100%成瘤，背部皮下可触及肿瘤，直径5~8 mm。治疗前各组肿瘤平均体积无明显差异，治疗后脂质体复合物组、逆转录病毒组大体可见肿瘤坏死，肿瘤生长明显受到抑制，抑瘤率分别为54%、68%。与对照组差异显著($P < 0.05$)，尤以逆转录病毒组明显($P < 0.01$)。而裸DNA组与对照组无显著差异($P > 0.05$)

2.3 GCV治疗前后肿瘤体积变化

见图1。

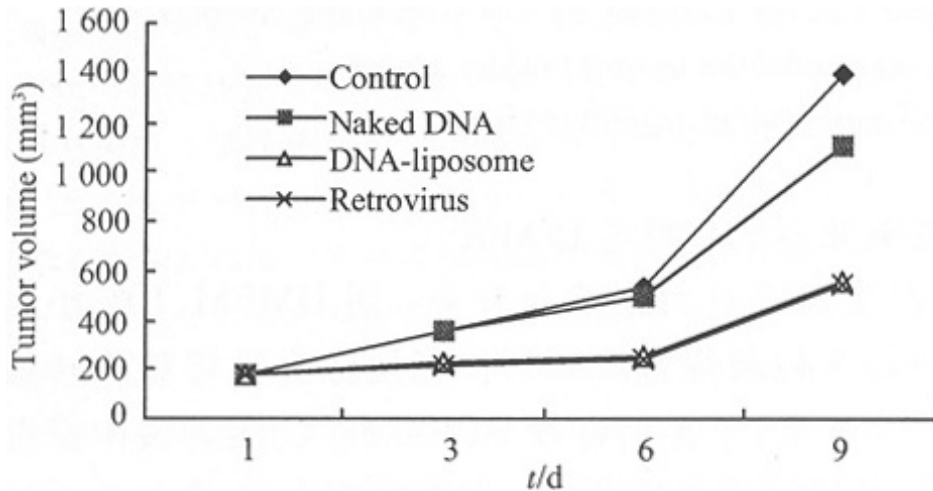


图1 治疗前后肿瘤体积变化

Fig.1 The change of the tumor volume before and after treatment

2.4 动物存活天数

对照组、裸DNA组、脂质体复合物组、逆转录病毒组平均存活天数分别为 (18.5 ± 2.95)、(20.0 ± 2.83)、(23.8 ± 3.13)、(26.7 ± 3.08) d。后两者分别平均延长28.81%、44.16%，与对照组差异显著($P < 0.05$)，而裸DNA组与对照组无显著差异($P > 0.05$)

2.5 肿瘤组织病理

光镜下肿瘤在脂质体复合物组、病毒感染组可见点、片状坏死，并有炎性细胞浸润，主要为淋巴细胞，部分细胞可见凋亡小体形成。而对照组、裸DNA组肿瘤虽然有肿瘤的中心坏死，但没有炎性细胞浸润。

3 讨论

HSV-TK/GCV系统是目前肿瘤自杀基因治疗中应用最广泛、最有前途的方法之一。它通过胸苷激酶的表达，将无毒的化学前体GCV磷酸化，阻止DNA复制，导致细胞死亡。HSV-TK/GCV系统不仅能杀灭表达TK阳性细胞，而且引起相邻TK阴性细胞死亡，产生“旁观者效应”，已应用于多种肿瘤的基因治疗，体外、体内均显示了明显的杀伤效应，并有临床应用的成功报告[1]。在膀胱癌中，体外实验显示明显治疗效果[2]，但体内效果报道较少。我们的实验显示脂质体、逆转录病毒能有效体内转移TK基因，联合GCV治疗能抑制肿瘤生长，明显延长动物存活时间。

直接注射裸DNA的最主要优点是简单方便，并且产生的免疫效应少，结合膀胱肿瘤可反复灌注的特点，将是最佳的方法之一。现有研究表明，仅有血管平滑肌和横纹肌细胞能够摄取裸DNA，其他细胞摄取效果均差，认为骨骼肌中的横管结构是提高其基因转移效率的内在基础[3]。实验显示其与对照组无明显差异，可能与质粒的浓度、剂量、载体基因的启动子、重复注射等因素有关[4]。进一步研究其基因转移效率及应用条件

对于膀胱癌临床基因治疗有一定意义。

阳离子脂质体介导基因转移技术是目前应用较多、很有发展前途的非病毒转移方法，利用此类载体已成功地将IL-2基因导入前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌细胞，并获得较高水平的表达[5]。脂质体复合物几无抗原性，毒性低，可包裹大kb基因，无论是体外、体内基因转移都是有效的，尽管效率较低，但可通过调整DNA/脂质体比例、增加导向性连接抗体、重复应用或靶向性连接启动子来提高转染效率[6]。同时，由于脂质体的安全性，结合膀胱癌特点，可以通过反复应用提高效率。Princer等[7]在腹腔肿瘤模型中反复注射DNA脂质体复合物，GCV治疗后，取得与逆转录病毒介导同样的效果，但其特异性差，在肝、脾、肺等发现少量转染细胞，如果通过反复膀胱灌注，则可克服这种缺点。实验提示脂质体复合物介导的基因转移是有效的，可通过不同途径提高其转移效率[8]，为进一步研究奠定基础。

基因治疗成功应用的主要障碍在于缺乏安全而有效的转移方法。本实验在体外由脂质体介导成功转染病毒辅助包装细胞，由于逆转录病毒滴度较低，因此目前应用于膀胱癌体内基因治疗多用腺病毒载体[9]，腺病毒载体具有基因容量大、滴度高、宿主细胞广泛等特点，但其外源基因表达时间短，无肿瘤特异性，可诱导抗病毒免疫是其主要缺点。而逆转录病毒能将目的基因整合入靶细胞染色体中，可获得持久而稳定的表达。同时，逆转录病毒只能转染分裂期细胞，对于膀胱癌而言，其细胞增殖活跃，而正常移行上皮细胞处于相对静止状态，因此，具有一定的肿瘤特异性，非常适合于膀胱癌的治疗。本实验显示了逆转录病毒介导的基因转移在膀胱癌体内治疗作用，通过进一步的离心、透析纯化处理，有可能将病毒滴度提高到较高水平[10]，满足临床治疗需要。

自杀基因治疗的优点就是旁观者效应的存在，其机制主要为：(1)细胞间的密切接触：通过细胞间的缝隙连接传递毒性物质；(2)免疫因素：报道主要有局部淋巴细胞、NK细胞的浸润；(3)诱导细胞的凋亡；(4)血管因素：血管内皮细胞转染了TK细胞，引起血管的损伤、栓塞，导致肿瘤的缺血、坏死。转染TK的实验标本在光镜下可见肿瘤点、片状坏死伴淋巴细胞浸润，细胞的坏死一方面可引起非特异性免疫反应，吸引免疫效应细胞至肿瘤所在部位发挥作用，另一方面，可使大量肿瘤抗原突然而有效地呈现于免疫系统，产生特异性抗肿瘤免疫。提示免疫因子参与杀伤效应，但是否与凋亡有关，尚待进一步研究。

实验结果表明，脂质体、逆转录病毒在膀胱癌动物体内成功介导转移TK基因，HSV-TK/GCV系统在膀胱癌体内有治疗作用，为膀胱癌的临床基因治疗打下基础。

参考文献：

- [1] Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, et al. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses[J]. Gene Ther, 2000, 11(16): 2197- 205.
- [2] 叶 钢, 金锡御, 饶亚兰, 等. HSV-TK/GCV系统体外对膀胱癌细胞的旁观杀伤作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2001, 22(5): 284-7.
Ye G, Jin XY, Rao YL, et al. HSV-TK/GCV system-mediated bystander tumoricidal effect on bladder cancer cells[J]. Chin J Urol, 2001, 22(5): 284-7.
- [3] Fazio VM, Fazio S, Rinaldi M, et al. Accumulation of human apo-lipoprotein-E in rat plasma after in vivo intramuscular injection of naked DNA[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 200(1): 298-305.
- [4] Yang JP, Huang L. Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA[J]. Gene Ther, 1996, 3(3): 542- 8.
- [5] Horiguchi Y, Larchian WA, Kaplinsky R, et al. Intravesical liposome-mediated interleukin-2 gene therapy in orthotopic murine bladder cancer model[J]. Gene Ther, 2000, 7(10): 844-51.
- [6] Susumu S, Kazuyuki F, Akira K, et al. Inhibition of tumor growth by direct intratumoral gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene with DNA-liposome complexes[J]. Gene Ther, 1996, 7(1): 223-30.
- [7] Princer F, Lechanteur C, Lopez M, et al. Similar efficiency of DNA-liposome

complexes and retrovirus-producing cells for HSV-TK suicide gene therapy of peritoneal carcinomatosis[J]. J Drug Target, 2000, 8(2): 79-89.

[8] Larchian WA, Horiguchi Y, Nair SK, et al. Effectiveness of combined interleukin 2 and B7.1 vaccination strategy is dependent on the sequence and order: a liposome-mediated gene therapy treatment for bladder cancer[J]. Clin Can Res, 2000, 6(7): 2913-20.

[9] Sutton MA, Freund CT, Berkman SA, et al. In vivo adenovirus-mediated suicide gene therapy of orthotopic bladder cancer[J]. Mol Ther, 2000, 2(3): 211-7.

[10] Kruse CA, Lamb C, Hogan S, et al. Purified herpes simplex thymidine kinase retroviral particles. II. Influence of clinical parameters and bystander killing mechanisms[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(1): 118-27.

参考文献:

[1] Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, et al. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses[J]. Gene Ther, 2000, 11(16): 2197-205.

[2] 叶 钢, 金锡御, 饶亚兰, 等. HSV-TK/GCV系统体外对膀胱癌细胞的旁观杀伤作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2001, 22(5): 284-7.

Ye G, Jin XY, Rao YL, et al. HSV-TK/GCV system-mediated bystander tumoricidal effect on bladder cancer cells[J]. Chin J Urol, 2001, 22(5): 284-7.

[3] Fazio VM, Fazio S, Rinaldi M, et al. Accumulation of human apolipoprotein-E in rat plasma after in vivo intramuscular injection of naked DNA[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 200(1): 298-305.

[4] Yang JP, Huang L. Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA[J]. Gene Ther, 1996, 3(3): 542-8.

[5] Horiguchi Y, Larchian WA, Kaplinsky R, et al. Intravesical liposome-mediated interleukin-2 gene therapy in orthotopic murine bladder cancer model[J]. Gene Ther, 2000, 7(10): 844-51.

[6] Susumu S, Kazuyuki F, Akira K, et al. Inhibition of tumor growth by direct intratumoral gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene with DNA-liposome complexes[J]. Gene Ther, 1996, 7(1): 223-30.

[7] Princer F, Lechanteur C, Lopez M, et al. Similar efficiency of DNA-liposome complexes and retrovirus-producing cells for HSV-TK suicide gene therapy of peritoneal carcinomatosis[J]. J Drug Target, 2000, 8(2): 79-89.

[8] Larchian WA, Horiguchi Y, Nair SK, et al. Effectiveness of combined interleukin 2 and B7.1 vaccination strategy is dependent on the sequence and order: a liposome-mediated gene therapy treatment for bladder cancer[J]. Clin Can Res, 2000, 6(7): 2913-20.

[9] Sutton MA, Freund CT, Berkman SA, et al. In vivo adenovirus-mediated suicide gene therapy of orthotopic bladder cancer[J]. Mol Ther, 2000, 2(3): 211-7.

[10] Kruse CA, Lamb C, Hogan S, et al. Purified herpes simplex thymidine kinase retroviral particles. II. Influence of clinical parameters and bystander killing mechanisms[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(1): 118-27.