

HSV-TK 基因在膀胱癌小鼠体内的转移和丙氧鸟苷治疗效果

刘为池,叶钢,张荣贵(第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

摘要:目的 探讨 HSV-TK 基因在膀胱癌动物体内的转移途径,观察 HSV-TK/GCV(丙氧鸟苷)系统体内治疗的效果。方法 在 T739 同基因鼠膀胱癌皮下肿瘤模型中,以裸质粒 DNA 瘤内直接注射、脂质体包裹和逆转录病毒介导等 3 种不同方法转移 HyTK 基因,观察丙氧鸟苷对膀胱癌的治疗效果。结果 脂质体复合物组及逆转录病毒组背部肿瘤生长减慢,抑瘤率分别为 54%、68%;动物平均存活时间分别比对照组延长 28.81%、44.16%。结论 脂质体、逆转录病毒介导的基因转移是膀胱癌基因治疗的有效手段。

关键词:膀胱癌;基因治疗;脂质体;逆转录病毒;单纯疱疹病毒-胸苷激酶

中图分类号:Q786;R737.14 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2002)01-0041-02

In vivo HSV-TK gene transfer and the therapeutic effects of ganciclovir on bladder cancer in mice with HSV-TK gene transfer

LIU Wei-chi, YEGang, ZHANG Rong-gui

Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Abstract Objective To explore an effective method for in vivo HSV-TK gene transfer and observe the therapeutic effect of ganciclovir (GCV) on bladder cancer in mice after receiving such gene transfer therapy. Methods Mice models bearing subcutaneous tumors of bladder cancer were established in 24 syngeneic mice, and HSV-TK gene transfer was performed by means of naked DNA plasmids, DNA-liposome complex or retroviral mediators respectively. GCV treatment was administered in all the mice and its effect on the growth of the tumor was subsequently observed. Results Gene transfer therapies by DNA-liposome complex and retroviral mediators both significantly inhibited the growth of the tumor by 54% and 68% respectively, and the survival of the mice was prolonged by 28.81% and 44.16% ($P < 0.05$). The effect of gene transfer by naked DNA plasmids was not obvious ($P > 0.05$). Conclusion Gene transfer therapies by DNA-liposome complex and retroviral vector supplemented by GCV treatment are effective therapeutic modalities against bladder cancer.

Key words bladder cancer; gene therapy; liposome; retrovirus; herpes simplex virus thymidine kinase

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_{260} 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,在聚凝胺 (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

收稿日期:2001-09-28

基金项目:重庆市科委基金(1997-53)

作者简介:刘为池(1969-),男,广西玉林人,1993年毕业于第一军医大学,在读硕士,主治医师,电话 023-68755000-74624

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 5~8mm。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。

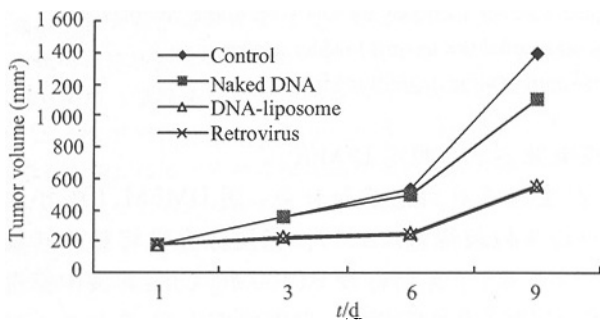


图 1 治疗前后肿瘤体积变化

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。

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

(下转 44 页)

3 讨论

合征的诊断并不困难,但需要外科医生经常保持警惕。严重腹部创伤后腹内压力升高是一常见的现象,但腹腔内压力升高至临床上出现腹腔间室综合征则是一个动态的病理生理过程。简单而客观的检测腹腔内压力的方法是向留置在膀胱的气囊导管内注入 100ml 等渗盐水,以耻骨联合为零点,测量所传导的腹膜腔内的压力。手术后腹腔内压力一般在 1.47kPa (15cmH₂O) 之内。一般认为,当腹腔内压力在 2.45kPa (25cmH₂O) 之上时,根据患者的临床表现,应当采取腹腔减压手术,以避免发展成为临床上的腹腔间室综合征。

在治疗方面,早期预防是个关键,有部分早期轻症患者在给予减慢输液速度、镇静、吸氧、改善体位等一般处理后,症状明显好转。故当患者有腹腔间室综合征早期表现时,及时监测腹内压,尽早手术,可避免发展成为临床上的腹腔间室综合征。腹腔间室综合征一般发生在伤后 48h 之内,但是若出现腹腔内出血不止、急性肾衰、腹内压呈持续上升趋势情况时,则宜尽快手术。手术原则是腹腔减压:清除腹腔内积血、取除腹腔内的纱布垫、止血,然后再缝合创缘;假如腹内脏器肿胀明显或有可能再次发生腹腔间室综合征以及再次以纱布垫堵塞者,则宜无张力缝合腹壁。减压要彻底、充分。对 2 例重症患者我们应用消毒的输液袋整形后缝合于切口创缘,暂时性关腹,

症状消失后再采取腹壁减张缝合,效果良好。亦有报道游离植皮关腹以达到减压目的^[6]。由于腹腔内脏器多数水肿严重,手术中要注意轻柔操作,以免造成肠瘘。对于再次发生的腹腔间室综合征要给予足够的重视,争取早期手术减压,而此时患者多数已较危重,死亡率较高。

参考文献:

- [1] IvaturyRR, DiebelL, PorterJM, et al. Intra-abdominal hypertension and the abdominal compartment syndrome [J]. *Surg Clin North Am*, 1997, 77(4):783-33.
- [2] MayberryJC, GoldmanRK, MullinsRJ, et al. Surveyed opinion of American trauma surgeons on the prevention of abdominal compartment syndrome [J]. *J Trauma*, 1999, 47(3):509-13.
- [3] BurchJM, MooreEE. The abdominal compartment syndrome [J]. *Surg Clin North Am*, 1996, 76(4):833-42.
- [4] RidingsPC, BloomfieldGL, BlocherCR, et al. Elevated intra-abdominal pressure and renal function [J]. *Ann Surg*, 1982, 196(5):594-7.
- [5] 黄志强. 肝外伤治疗观念上的转变 [J]. *中华创伤杂志*, 2000, 16(5):318-9.
- [6] GhimentonF, ThomsonSR. Abdominal content containment: practicalities and outcome [J]. *Br J Surg*, 2000, 87(2):106-9.

(上接 42 页)

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] SandmairAM, LoimasS, PuranenP, 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.

- YeG, JinXY, RaoYL, et al. HSV-TK/GCV system-mediated bystander tumoricidal effect on bladder cancer cells [J]. *Chin J Urol*, 2001, 22(5):284-7.
- [3] FazioVM, FazioS, RinaldiM, 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] YangJP, HuangL. Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumoral injection of free DNA [J]. *Gene Ther*, 1996, 3(3):542-8.
- [5] HoriguchiY, LarchianWA, KaplinskyR, et al. Intravesical liposome-mediated interleukin-2 gene therapy in orthotopic murine bladder cancer model [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(10):844-51.
- [6] SusumuS, KazuyukiF, AkiraK, 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] PrincerF, LechanteurC, LopezM, 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] LarchianWA, HoriguchiY, NairSK, 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] SuttonMA, FreundCT, BerkmanSA, et al. *In vivo* adenovirus-mediated suicide gene therapy of orthotopic bladder cancer [J]. *Mol Ther*, 2000, 2(3):211-7.
- [10] KruseCA, LambC, HoganS, 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.