

AdKDR-CDglyTK融合基因系统对胃癌 MGC-803 细胞体的外杀伤作用

周广军, 黄宗海, 俞金龙, 厉周, 苏国强(南方医科大学珠江医院普外科, 广东 广州 510282)

摘要:目的 探讨腺病毒介导血管内皮生长因子第二受体(亦即酪氨酸激酶受体(kinase domain-containing receptor, KDR))启动子驱动的 CDglyTK 融合基因体系对人胃癌细胞株 MGC-803 的杀伤作用。方法 将质粒 pAdEasy-KDR-CDglyTK 在 293 细胞内包装、扩增后, 体外感染表达 KDR 的 MGC-803 细胞株, 并给予不同浓度的前药 5-FC 和/或更昔洛韦, 观察该体系对 MGC-803 细胞株的杀伤效应及其旁观者效应, 并以流式细胞仪检测细胞周期的变化, 电镜观察细胞的病变。结果 所得病毒滴度为 2.0×10^{12} pfu/ml。MGC-803 细胞株感染率随腺病毒滴度的递增而增加。融合基因的疗效优于任一单自杀基因($P < 0.001$)。将感染腺病毒的细胞与未感染细胞以不同比例混合培养, 观察到该体系明显的旁观者效应。流式细胞术检测表明该体系抑制 MGC-803 细胞 DNA 的合成, 表现为 G_1 期细胞比率增多及 S 期细胞减少($P < 0.001$)。同时, 电镜下可见 MGC-803 细胞有凋亡和坏死改变。结论 腺病毒介导 KDR 启动子驱动的 CDglyTK 融合基因体系可以有效地杀伤人胃癌细胞。

关键词:胃肿瘤; KDR 启动子; 自杀基因治疗; 腺病毒

中图分类号: R730.59 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)04-0402-04

In vitro killing effect of adenovirus-mediated fusion gene system driven by KDR promoter on gastric cancer cells

ZHOU Guang-jun, HUANG Zong-hai, YU Jin-long, LI Zhou, SU Guo-qiang

Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To evaluate the killing effect of adenovirus (Ad)-mediated double suicide gene driven by kinase domain-containing receptor (KDR) promoter on gastric cancer MGC-803 cells. **Methods** The 293 packaging cells were transfected by the plasmids pAdEasy-KDR-CDglyTK to generate infectious viruses. The gastric cancer MGC-803 cells were infected by the Ad followed by treatment with 5-FC and/or ganciclovir at different concentrations. The cell-killing effects were evaluated and the bystander effects analyzed after coculture of the cells without AdKDR-CDglyTK infection with the infected cells at different ratios. The cell cycle distribution was detected by flow cytometry and the pathological changes of the cells were observed by electron microscopy. **Results** The infection rate of the resultant recombinant Ad in the cells increased gradually with increment of the multiplicity of infection (MOI) of the Ads. The killing effect of CD/TK fusion gene on the MGC-803 cells was much stronger than that of either of the single suicide gene ($P < 0.001$), and considerable bystander effect was observed. The Ad infection caused MGC-803 cell growth arrest at G_1 phase with onset of apoptotic and necrotic morphologies of the cells as seen under electron microscope. **Conclusions** The CD/TK fusion gene system driven by the KDR promoter possesses effective killing effect on the KDR-expressing gastric cancer MGC-803 cells.

Key words: gastric neoplasm; KDR promoter; suicide gene therapy; adenovirus

胃癌是影响人类健康的常见恶性肿瘤之一, 其早期诊断困难, 治疗不尽如人意。近年来, 随着分子生物学及基因工程的迅速发展, 基因治疗已成为恶性肿瘤的有效治疗手段之一, 在众多的基因治疗方法中, 自杀基因疗法引起了许多学者的兴趣, 成为近年基因治疗的研究热点^[1-3]。本研究采用了腺病毒介导酪氨酸激酶受体(kinase domain-containing receptor, KDR)启

动子调控的 CD/TK 融合双自杀基因, 观察了该体系对高表达 KDR 的人胃癌细胞株 MGC-803 的杀伤作用, 旨在体外水平探讨该自杀基因体系治疗人胃癌的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pAdEasy-KDR-CDglyTK 为珠江医院普外科保存, 293 细胞引自美国 ATCC 全球生物资源中心, MGC-803 细胞购自中山大学细胞库。1640、小牛血清为 Gibco 公司产品; 转染试剂 PolyFect 购自 QIAGEN 公司; 更昔洛韦(ganciclovir, GCV)为 Roche Pharma (Switzerland) 公司产品, 5-FC 购自 Sigma 公司。

收稿日期: 2005-03-01

基金项目: 国家 863 计划生物和现代农业科技研究基金项目 (2001AA217171) 广东省自然科学基金重点项目 (013072)

Supported by Biological and Modern Agriculture Technology Research Foundation of National 863 Project (2001AA217171) and Natural Science Foundation of Guangdong Province (013072).

作者简介: 周广军 (1969-), 男, 在读博士研究生, 副主任医师, 电话: 020-61643211, E-mail: zhougj81@163.com

1.2 实验方法

1.2.1 重组腺病毒的包装、扩增与纯化 重组腺病毒滴度测定 重组腺病毒的鉴定 见参考文献 [4]

1.2.2 重组腺病毒对 MGC-803 细胞感染率的测定 MGC-803 细胞以含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养。取对数生长期的上述细胞,以 2×10^5 个细胞数接种于 6 孔培养板,待细胞丰度达约 90%,加入不同感染复数(MOI)的目的腺病毒,加少许培养基振荡 2~3 h 后,补足培养基继续在 37 °C、5%CO₂ 孵箱内培养 3 d 后在荧光显微镜下计数绿色荧光蛋白(GFP)阳性细胞百分比。

1.2.3 不同浓度的前药对细胞的杀伤效应 将 MGC-803 以 1×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中,次日丰度达约 80%,用 MOI=100 的重组腺病毒感染,培养 24 h 后弃去培养液,分别加入以 5%血清培养基稀释的不同浓度的前药 GCV 和 5-FC,设 GCV 组、5-FC 组、GCV+5-FC 组、阴性对照及空白对照组,加药 72 h 后,以 MTT 法检测细胞生长抑制率。

1.2.4 旁观者效应(bystander effect) 分别取对数生长期的转基因和未转基因细胞,以不同比例进行混合,以 1×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中,24~48 h 后,于不同组分别加入 GCV 以及 5-FC 的混合液,GCV 浓度为 100 mg/L,5-FC 浓度为 2000 mg/L。72 h 以后以 MTT 法检测细胞存活率。

1.2.5 前药对 MGC-803 细胞周期的影响 将转基因 MGC-803 细胞在培养瓶中培养至指数生长期,以每孔 5×10^5 个细胞接种于 24 孔培养板中,设未加药对照组和治疗组(GCV 40 mg/L,5-FC 250 mg/L),加药 24 h 后收集细胞。PBS 洗 2 次,加冷无水乙醇至终浓度为 70%,4 °C 固定过夜,离心去乙醇,PBS 洗 2 次;加入 RNase 200 μl(1 g/L),37 °C 1 h,离心去 RNase;加入碘化丙啶(PI) 800 μl 染色 30 min;流式细胞仪(Counter 公司)检测。

1.2.6 电镜观察药物作用后 MGC-803 细胞的变化 转基因细胞接种于 75 ml 培养瓶,待丰度达 80% 给以前药,使其终浓度为 GCV:100 mg/L、5-FC 2000 mg/L。培养 48h 后收集细胞,1000 r/min 离心后,立即行 0.5%戊二醛固定过夜,0.5 mol/LPBS 冲洗后,10 g/L 锇酸固定 2 h,丙酮脱水,环氧树脂包埋,超薄切片及铀铅染色,透射电镜(EM-109 型)观察。

1.3 统计学处理

应用 SPSS10.0 软件进行数据处理,采用两独立样本 *t* 检验和完全随机设计方差分析。显著性水准为 0.05。

2 结果

2.1 重组腺病毒的包装、扩增、纯化以及滴度测定

重组腺病毒质粒经 *Pac* I 酶切后用 PolyFect 转染试剂转染 293 细胞,24 h 后可见 GFP 荧光表达,3~5 d 表达达到高峰,7~10 d 可收集细胞,反复扩增后氯化铯密度梯度离心后所得重组腺病毒滴度为 2×10^{12} pfu/ml。

2.2 重组腺病毒的感染效率

采用不同 MOI 的重组腺病毒感染 MGC-803 细胞,96 h 后观察发现:细胞的感染率随腺病毒滴度的增加而递增,当 MOI=1 时,仅少数细胞有荧光;当 MOI=100 时,约 96%的细胞有 GFP 表达;MOI=200 时,几乎所有的细胞均被感染见图 1。

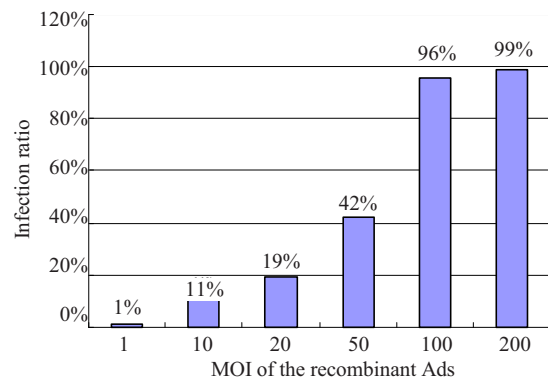


图 1 重组腺病毒对 MGC-803 细胞的

Fig.1 Infection rate of the recombinant Ads in various cells

2.3 重组腺病毒对 MGC-803 细胞的体外抑制效应

以 MOI=100 的重组腺病毒 Ad-KDR-CDglyTK 感染 MGC-803 细胞,加入不同浓度的前药培养 96 h 后,MTT 法检测细胞生长抑制率。结果发现,随着前药浓度的增加,细胞存活率呈下降趋势。当联合应用 GCV 和 5-FC 的浓度分别为 100 mg 和 2000 mg 时,细胞生存率仅约为 5%。而单用浓度 100 mg/L 的 GCV 时,MGC-803 细胞生存率为 25%,单用浓度为 2000 mg/L 的 5-FC,细胞生存率为 20%,与联合用药时相比,均有显著性差异(*P* 均 <0.001)见图 2。

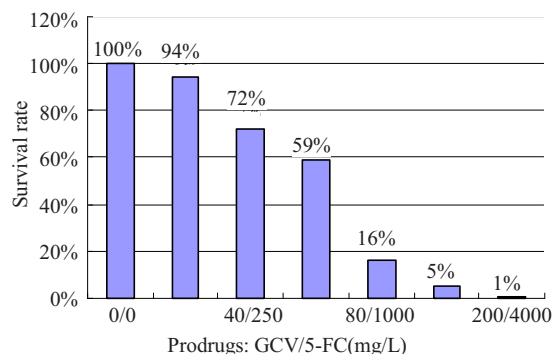


图 2 不同浓度的前药对转基因 MGC-803 细胞的抑制效应

Fig.2 Effect of the prodrugs at different concentrations on the infected MGC-803 cells

2.4 旁观者效应

将感染腺病毒的 MGC-803 细胞与未感染腺病毒的细胞以不同比例混合培养,加入 GCV(100 mg/L) 以及 5-FC(2000 mg/L)的混合液。结果发现,随着转基因细胞比例的增加,不仅细胞存活率逐渐下降,而且可以观察到该体系明显的旁观者效应。当转基因细胞的比例为 5%、10%、20%、40%和 80%时, MGC-803 细胞存活率分别为 83%、44%、29%、8%和 3%。

2.5 重组腺病毒对 MGC-803 细胞周期的影响

转基因 MGC-803 细胞给以前药 GCV 40 mg/L ; 5-FC 250 mg/L 处理 24 h 后,流式细胞仪检测发现:未加药对照组和治疗组处于 S 期比率分别为 38.4%、63.6%($P<0.001$),处于 G₂ 期比率分别为 15.3%、0.1% ($P<0.001$)。

2.6 前药处理后 MGC-803 细胞的电镜观察

细胞体收缩、染色体边聚,并且有染色体固缩于核的两边,呈电子密度增强,有的胞核形态不规则,核发生碎裂,胞浆内可见多个电子密度增强的核碎片,有的可见凋亡小体。

3 讨论

近些年来,研究者在如何提高自杀基因针对肿瘤细胞的基因转移、基因表达效率上做了大量的工作,并取得了丰硕的成果。为了提高自杀基因的靶向性,有学者利用肿瘤细胞特异的启动子来调控目的基因,从而使目的基因在特定的肿瘤组织中表达。目前较常用的有甲胎白蛋白(AFP)启动子介导自杀基因治疗肝癌^[5],采用癌胚抗原(CEA)启动子介导自杀基因治疗大肠癌等^[6]。血管内皮生长因子(VEGF)是肿瘤细胞系中的一种新型生长因子,其受体 KDR 在肿瘤血管及肿瘤组织细胞中均高表达,而正常组织表达甚微或不表达^[7]。有研究证明,VEGF 与其受体 KDR 在胃癌细胞中广泛表达^[8]。基于此,KDR 可作为胃癌基因治疗的理想启动子。本实验采用的 AdKDR-CdglyTK 融合基因系统,不仅将 KDR 基因启动子引入该系统驱动自杀基因的治疗,并且利用了腺病毒载体滴度高,对上皮来源的细胞具有特殊亲和力的优势。我们将重组腺病毒感染表达 KDR 的胃癌细胞 MGC-803,发现当 MOI=100 时,约 96%的细胞有 GFP 表达;MOI=200 时,几乎所有的细胞均被感染,证实该系统对胃癌 MGC-803 细胞有较高的感染率。

本研究发现,单用浓度 100 mg/L 的 GCV 时,转基因 MGC-803 细胞生存率为 25%,单用浓度为 2000 mg/L 的 5-FC,生存率为 20%,而二者联合时,其生存率约为 5%($P<0.001$)。两种前药联合作用的效果明显优于任一单一药物,说明双自杀基因的疗效要明显高

于单自杀基因。HSV-tk/GCV、CD/5-FC 是目前研究最多的自杀基因系统。TK 基因通过编码产生胸苷激酶特异地将核苷类似药物前体(如丙氧鸟苷)磷酸化,进而在细胞内代谢成三磷酸丙氧鸟苷,后者抑制细胞 DNA 聚合酶的功能或竞争性的渗入细胞 DNA,使其合成终止,导致细胞死亡^[9]。CD 基因通过编码胞嘧啶脱氨酶将无毒的前体药物 5-FC 代谢成抗 DNA 合成的药物 5-FU,达到杀死肿瘤细胞的作用^[10]。联合应用 CD/5-FC 和 HSV-tk/GCV 系统,前者产生的 5-FU 可抑制胸苷酸合成酶,减少胸腺嘧啶生成,相应减少在 HSV-tk 活性部位胸腺嘧啶和 GCV 的竞争,从而增强 HSV-tk/GCV 系统的效应。已有学者报道两者的联合治疗对包括胃肠道肿瘤、乳腺癌及脑胶质瘤等在内的实体瘤具有明显的协同作用,并能减少肿瘤细胞抗药性的产生^[11-12]。我们的实验结果也进一步证实了 AdKDR-CdglyTK 融合基因系统治疗胃癌具有基因联合治疗的优势。

实验中,我们将感染重组腺病毒的 MGC-803 细胞和未感染的细胞以不同的比例混合培养,经前药治疗后,观察到该体系具有明显的旁观者效应。当转基因细胞的比例为 40%时, MGC-803 细胞存活率已降至 8%,即被杀灭的细胞数远超过表达自杀基因的细胞数。这正体现了自杀基因治疗的优势所在,可以使其能较好的应用于体内治疗。关于旁观者效应的机制目前尚不完全清楚。引发旁观者效应的主要原因包括:可溶性激活的前药(如 5-FU)在细胞-细胞之间自由弥散而产生的单纯弥散作用,GCV 的磷酸化产物经不同细胞之间的裂隙连接形成的“代谢协作”管道扩散而产生的代谢协作作用,也可能与免疫介导作用及细胞凋亡有关。

通过流式细胞仪检测,我们发现转基因 MGC-803 细胞经前药治疗后,细胞 DNA 被阻止于 S 期,提示细胞 DNA 的合成被抑制,进而引起细胞凋亡或/和坏死。同时,经透射电镜观察,发现经该体系治疗后的转基因 MGC-803 细胞可见凋亡和坏死的发生。这些现象提示细胞的凋亡有可能是 AdKDR-CdglyTK 融合基因系统杀伤胃癌细胞的机制之一。

我们的研究表明,AdKDR-CdglyTK 融合基因系统可以有效地杀伤胃癌 MGC-803 细胞。但关于其作用机制,以及最佳前药浓度和用药时机的选择等,仍有待于进一步深入研究。且该系统治疗胃癌的体内研究远比体外实验复杂,也将是我们今后探讨的方向。

参考文献:

- [1] DeFatta RJ, Li Y, De Benedetti A. Selective killing of cancer cells based on translational control of a suicide gene [J]. Cancer Gene

- Ther, 2002, 9(7): 573-8.
- [2] Binley K, Askham Z, Martin L, et al. Hypoxia-mediated tumour targeting [J] Cancer Gene Ther, 2003, 10(7): 540-9.
- [3] Gilles SI, Romain S, Casellas P, et al. Mutation analysis in the coding sequence of thymidine kinase 1 in breast and colorectal cancer [J] Int J Biol Markers, 2003, 18(1): 1-6.
- [4] 汤福祥, 郑 权, 黄宗海, 等. 应用改进的 AdEasy 系统制备重组腺病毒 [J] 第一军医大学学报, 2003, 23(5) 501-3.
Tang TX, Zheng Q, Huang ZH, et al. Construction of recombinant adenovirus using modified AdEasy system [J] J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 501-3.
- [5] He TC, Zhou S, Costa LT, et al. A simplified system for generation recombinant adenovirus [J] Proc Nati Acad Sci USA, 1998, 95: 2509-14.
- [6] 黄宗海, 陈 治, 钱伟峰等. 血管内皮细胞生长因子及其受体在大肠癌组织中的表达 [J] 第一军医大学学报, 2001, 21(3): 206-8.
Huang ZH, Chen Z, Qian WF, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor in colorectal carcinoma [J] J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(3): 206-8.
- [7] 苏国强, 黄宗海, 刘志锋, 等. 重组腺病毒驱动 KDR-CDglyTK 融合基因系统对 MCF-7 细胞及血管内皮细胞的靶向杀伤作用 [J] 第一军医大学学报, 2004, 24(12): 1346-9.
Su GQ, Huang ZH, Liu ZF, et al. Adenovirus-mediated CDglyTK fusion gene system driven by KDR promoter selectively kills MCF-7 breast cancer cells and vascular endothelial cells [J] J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(12): 1346-9.
- [8] Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cell [J] World J Gastroenterol, 2002, 8(6) 994-8.
- [9] Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, et al. Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinases/ganciclovir-triggered activation of apoptosis [J] Cancer Res, 2000, 60(12): 3212-7.
- [10] Greco O, Dachs GU. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives [J] J Cell Physiol, 2001, 187(1): 22-36.
- [11] Lechanteur C, Delvenne P, Princen F, et al. Combined suicide and cytokine gene therapy for peritoneal carcinomatosis [J] Gut, 2000: 47(3): 343-8.
- [12] Uckert W, Kammertons T, Haack K, et al. Double suicide gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells *in vivo* [J] Hum Gene Ther, 1998, 9(6): 855-65.

睡眠呼吸暂停综合征简介

李涛平(南方医科大学南方医院呼吸科, 广东 广州 510515)

睡眠医学是一个新兴的综合性学科,涉及到临床呼吸、心血管、消化、血液、泌尿、内分泌、耳鼻喉、口腔、妇产科、小儿科、精神科等各个学科。睡眠呼吸暂停综合征(SAHS)是引起临床很多疾病的独立始动因素,充分认识可以改变人们对很多疾病发生、发展的传统观念。

SAHS是指在睡眠中反复出现10秒以上的呼吸停止。当这种呼吸暂停频繁发生,可导致间断、频繁发生的呼吸衰竭,机体严重缺氧通过神经、内分泌、化学等调节系统使全身各器官系统功能及病理改变,从而引发各种相关疾病,病人表现出一系列的相关症状。如在心血管系统可引起各种心律失常、心衰,严重者可以引起夜间猝死;呼吸系统可以引起夜间哮喘、肺心病、重叠综合征等;在脑神经系统,是脑中风的主要原因,还可以引起脑白质变性;可以因严重的低氧导致大脑半球特别是皮层和皮下功能的损害,引起老年痴呆,在儿童可影响智力发育、反应迟钝、记忆力下降而出现痴呆;在内分泌系统,SAHS还可以引起糖、脂肪、蛋白三大代谢紊乱,引起代谢紊乱综合症、糖尿病等;SAHS对血液系统同样有影响,可以导致红细胞增多、血液粘滞度增高,可以引起阵发性夜间睡眠血红蛋白尿等疾病;临床研究还发现消化系统的胃食道反流征也与SAHS有关;同时,SAHS还是夜间遗尿、失眠多梦、男性性功能、生殖功能障碍的主要原因。很多疾病如脑肿瘤等也可以引起SAHS相互影响形成恶性循环。因此,及时诊断和治疗SAHS对有效治疗相关疾病是非常重要的。