

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)15-1382-05

重组腺病毒介导的反义 *c-myc* 基因对 HL-60 细胞增殖及细胞周期的影响陈 龙¹ 陈洁平¹ 林 展² (¹ 第三军医大学西南医院肿瘤血液科 重庆 400038 ; ² 中国医学科学院协和大学肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京 100021)Effects of recombinant adenovirus encoding antisense *c-myc* on proliferation and cell cycle of HL-60 cellsCHEN Long¹, CHEN Jie-Ping¹, LIN Chen²¹Department of Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China, ²National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

【Abstract】AIM: To investigate the effect of recombinant adenovirus encoding antisense *c-myc* (Ad-Asc-*c-myc*) on the proliferation and cell cycle of HL-60 cells and to study the molecular mechanism of the effects *in vitro*. METHODS: The HL-60 cells were transfected with Ad-Asc-*c-myc* and protamine sulfate. The growth of HL-60 cells was observed by MTT assay and the changes of cell cycle were analyzed by flow cytometer in HL-60 cells. The transcription of *c-myc* was assessed by RT-PCR and immunocytochemical technique was used to test *c-myc* and proliferating cell nuclear antigen. RESULTS: The growth of HL-60 cells was markedly inhibited by Ad-Asc-*c-myc*. Flow cytometry analysis showed that the Ad-Asc-*c-myc* transfection arrested HL-60 cells in G0/G1 phase, reduced S phase and increased apoptosis rate. Transcription of *c-myc* was inhibited in the transfected HL-60 cells. Immunocytochemical detection demonstrated that the Ad-Asc-*c-myc* transfection suppressed the expression of *c-myc* and PCNA in HL-60 cells. CONCLUSION: Ad-Asc-*c-myc* can block cell cycle progression and inhibit the proliferation of HL-60 cells *in vitro*. The biological effects of Ad-Asc-*c-myc* may be associated with the expression of *c-myc* gene and PCNA.

【Keywords】Ad-Asc-*c-myc*; *c-myc*; HL-60 cells; cell cycle【摘要】目的 观察重组反义 *c-myc* 腺病毒(Ad-Asc-*c-myc*)对

收稿日期 2005-01-31; 修回日期 2005-03-15

通讯作者 陈洁平. Tel. (023) 68754129 Email. chenjp@yaho.com.cn

作者简介 陈 龙(1966-)男(汉族)四川省射洪县人. 硕士生(导师 陈洁平)主治医师. Tel. (0931) 8975260 Email. longxuanfen2002@yahoo.com.cn

急性早幼粒白血病 HL-60 细胞周期及增殖的影响, 探讨其作用的分子机制. 方法 将 Ad-Asc-*c-myc* 与鱼精蛋白硫酸盐(Protamine sulfate)混合后转染 HL-60 细胞, MTT 法观察细胞生长曲线, 流式细胞仪检测细胞增殖周期, RT-PCR 检测 *c-myc* 转录变化, 免疫细胞化学检测 *c-myc* 及增殖细胞核抗原(PCNA)表达变化. 结果 Ad-Asc-*c-myc* 转染 HL-60 细胞后, 细胞生长受抑, 细胞周期呈现 G1 期延长、S 期缩短, 增殖指数逐渐下降, 出现大量凋亡细胞. *c-myc* 基因转录及表达下降, PCNA 表达降低. 结论 Ad-Asc-*c-myc* 可使 HL-60 细胞的生长减缓, 增殖能力降低, 凋亡细胞增加. 其生物学活性与 HL-60 细胞 *c-myc* 和 PCNA 表达受抑有关.

【关键词】重组反义 *c-myc* 腺病毒; *c-myc* 基因; HL-60 细胞; 细胞周期

【中图分类号】R733.71

【文献标识码】A

0 引言

在人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞中 *c-myc* 基因异常高表达是恶性肿瘤细胞维持生长的重要原因, 与急性早幼粒白血病的发展及预后关系密切^[1]. 其表达产物 *c-myc* 通过对细胞周期素及生长相关靶基因的调控使细胞持续增殖、分化障碍、凋亡受阻^[2]. 我们利用重组反义 *c-myc* 腺病毒转染 HL-60 细胞, 观察细胞增殖及周期的变化, 为重组反义 *c-myc* 腺病毒(adenovirus encoding antisense *c-myc*, Ad-Asc-*c-myc*)基因治疗急性早幼粒白血病提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 鱼精蛋白硫酸盐为 Lymphomed 公司产品. Ad-Asc-*c-myc* 重组 *Lac-Z* 腺病毒(recombinant adenovirus encoding *Lac-Z*, Ad-*LacZ*)由 E1 和 E3 区缺失的复制缺陷型腺病毒构建而成, 分别为编码反义 *c-myc* 基因及 *LacZ* 基因的重组腺病毒载体, 由中国医学科学院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室构建. HEK293 细胞(CRL-1597), 为转化有腺病毒 E1 区的人胚肾细胞系, 培养条件为 DMEM 高糖培养液, 含 100 mL/L 胎牛血清. HL-60 细胞为人急性早幼粒白血病细胞, 培养条件为 RPMI 1640 培养液, 含 100 mL/L 胎牛血清. 两者均在 37℃, 50 mL/L CO₂ 饱和湿度环境中培养.

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒的扩增、滴度测定及鉴定 在 HEK293 细胞中进行扩增. 将扩增后病毒以倍比法稀释后, 用 HEK293 细胞进行滴度测定, 取接近 100% 细胞病变的病毒稀释度, 按公式计算. 采用酚-氯仿法在病毒液中提取病毒 DNA, 用反义 *c-myc* 基因引物及腺病毒基因 E2b 区引物进行 PCR 鉴定.

1.2.2 重组腺病毒对 HL-60 转染效率的测定 转染效率的检测采用重组腺病毒 Ad-LacZ(含报告基因 *LacZ*) 按感染强度(multiplicity of infection, MOI) 100 感染细胞. 50 μ L 无血清培养液中加入病毒液及鱼精蛋白硫酸盐 300 mg/L 混合, 室温下放置 15 min 后, 加入 HL-60 细胞中, 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂ 培养 1 h, 加入含 100 mL/L 胎牛血清 RPMI 1640 培养液继续培养. 48 h 后用 10 g/L 多聚甲醛固定转染细胞. 加入 X-gal 染液置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱 2~4 h, 弃去上清, 用 PBS 洗 2 次, 显微镜下随机选 3 个高倍视野, 每视野计数细胞. 蓝染的细胞即 *LacZ* 基因阳性细胞. 分别计算蓝染细胞的百分率.

1.2.3 Ad-Asc-*myc* 对转染 HL-60 细胞 *c-myc* 转录及表达的影响 取转染后第 1, 3, 5 日细胞, 提取并纯化细胞系的总 RNA. RNA 提取按 Tripure(罗氏公司)试剂说明. RT-PCR 按 Promega 公司 Access RT-PCR M-MLV 逆转录试剂盒说明. RT-PCR 条件: 48 $^{\circ}$ C 45 min 一个循环; 94 $^{\circ}$ C 2 min 一个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 68 $^{\circ}$ C 2 min 40 个循环; 68 $^{\circ}$ C 7 min 一个循环. 14 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 采用 α -tubulin 为内参照.

PCR 引物序列: *c-myc* (250 bp): 上游: 5'-CTCTCAACGACAGCAGCCCG-3'; 下游: 5'-CCAGTCTCAGACCTAGTGA-3'; α -tubulin (410 bp): 上游: 5'-CTCATCACAGGCAAGGAAGAT-3'; 下游: 5'-TTAAGGTAAAGTGTAGGTTGGG-3'. 转染后 36 和 72 h 细胞涂片, 用丙酮固定. *c-myc* mAb(北京中山)的稀释度 1:100, 对照组设为 Ad-LacZ 组, 免疫细胞化学染色. 阳性判断采用常规标准.

1.2.4 Ad-Asc-*myc* 对 HL-60 细胞生长的抑制作用

采用圆底 96 孔板, 每孔接种细胞 5000 个, 重组腺病毒按 MOI 100 混合鱼精蛋白硫酸盐 300 mg/L 转染细胞. 于不同时间点每孔加入噻唑蓝(MTT)溶液, 4 h 后离心弃上清, 另加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μ L 振荡数分钟后酶标仪检测每孔吸光度(A). 根据时间及 A 值绘制生长曲线.

1.2.5 流式细胞仪检测 Ad-Asc-*myc* 对 HL-60 细胞周期的影响 重组病毒转染细胞, 分别取转染后 2, 4 和 6 d 细胞, PBS 清洗, 700 mL/L 乙醇固定, 离心弃乙

醇后 PBS 清洗, 加入 RNA 酶 37 $^{\circ}$ C 作用 2 h, 加入碘化丙啶(100 mg/L) 100 μ L 混匀置冰上 30 min 后流式细胞仪检测. 根据所得各周期细胞百分率代入下面公式得出增殖指数(proliferation index, PI).

$$PI(\%) = \frac{S + G2M}{G0/G1 + G2M} \times 100\%$$

S, G0, G1, G2, M: Cell percentage of S, G0, G1, G2, M phase respectively.

1.2.6 Ad-Asc-*myc* 对 HL-60 细胞核增殖抗原的影响 转染后 36 和 72 h 细胞涂片, 用丙酮固定. 小鼠抗人 PCNA 抗体 IgG(武汉博士德)的稀释度 1:100, 对照组设为 Ad-LacZ 转染组, 阳性判断采用常规标准.

统计学处理: 采用 SPSS 8.0 统计软件对不同时间点测得数据用重复测量方差分析进行总体分析, 用 *t* 检验对各时间点的差别进行探索性分析.

2 结果

2.1 重组腺病毒滴度及鉴定 Ad-Asc-*myc*, Ad-LacZ 重组腺病毒, 经 293 细胞繁殖后制备成病毒储存液. 倍比稀释法测定重组腺病毒滴度分别为 Ad-Asc-*myc*: 2.3×10^{12} pfu/L, Ad-LacZ: 1.3×10^{13} pfu/L. 提取各重组腺病毒 DNA, 分别以腺病毒及反义 *c-myc* 引物进行 PCR 鉴定, Ad-Asc-*myc* 可见腺病毒及反义 *c-myc* 608 bp 扩增条带, Ad-LacZ 可见腺病毒 800 bp 扩增条带.

2.2 重组腺病毒的转染效率 采用插入 *LacZ* 报告基因 Ad-LacZ 加入鱼精蛋白硫酸盐辅助转染, 以 Ad-LacZ MOI 100 分别转染 HL-60 细胞. 48 h 后进行 X-gal 染色, 单独使用 Ad-LacZ 转染 HL-60 细胞, 转染效率为 (35.9 \pm 3.3)%, Ad-LacZ + 鱼精蛋白硫酸盐时重组腺病毒对 HL60 细胞的转染效率 (79.8 \pm 5.7)%,

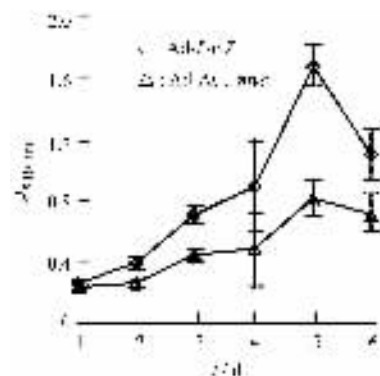


Fig 1 Anti-proliferative effect of Ad-Asc-*myc* on HL-60 cells ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

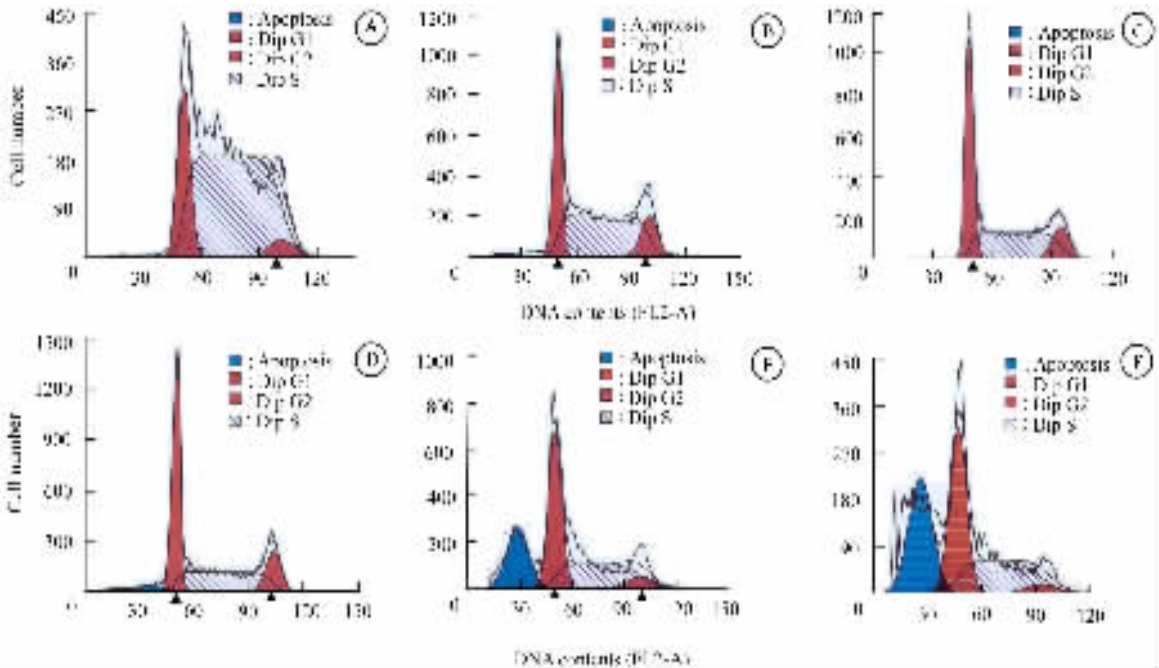
图 1 Ad-Asc-*myc* 对 HL-60 细胞增殖的抑制作用

鱼精蛋白硫酸盐辅助转染可明显提高重组腺病毒对 HL-60 细胞的转染效率 ($t=34.4, P<0.01, n=3$).

2.3 Ad-Asc-myc HL-60 细胞生长的抑制 MMT 法对 Ad-LacZ, Ad-Asc-myc 感染 HL-60 细胞生长情况进行检测, Ad-LacZ, Ad-Asc-myc 在 MOI:100 下转染 HL-60 细胞第 2~6 日, 第 5 日 Ad-LacZ 与 Ad-As

c-myc 组 A 值相差显著 ($t=10.08, P<0.01$). 最大细胞生长抑制率约为 51% (Fig 1).

2.4 细胞周期变化 G1 期延长, S 期缩短, 细胞阻滞于 G1 期, 增殖指数逐渐下降, 出现大量凋亡细胞 (Fig 2, Tab 1).



A: Ad-LacZ 2 d; B: Ad-LacZ 4 d; C: Ad-LacZ 6 d; D: Ad-Asc-myc 2 d; E: Ad-Asc-myc 4 d; F: Ad-Asc-myc 6 d. Flow cytometry analysis showed that Ad-Asc-myc arrested HL-60 cells in G0/G1 phase, reduced S phase and increased apoptosis rate.

Fig 2 Flow cytometry analysis of HL-60 cells infected with Ad-Asc-myc

图 2 Ad-Asc-myc 转染 HL-60 细胞后流式细胞仪分析细胞周期变化

表 1 Ad-Asc-myc 转染对 HL-60 细胞周期分布的影响

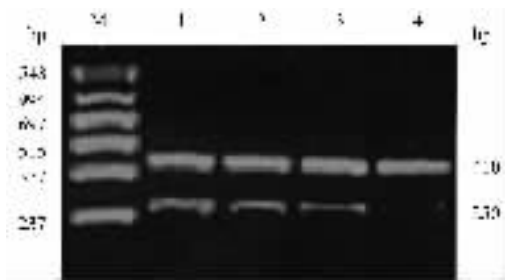
Tab 1 Cell cycle distribution of HL-60 cells infected with Ad-Asc-myc

Group	Cell cycle			PI (%)
	G0/G1	S	G2 + M	
Ad-LacZ, 2 d	20.2	75.4	4.4	324.4
Ad-Asc-myc 2 d	43.1	41.9	13.0	97.8
Ad-LacZ, 4 d	28.7	58.2	13.1	171.1
Ad-Asc-myc, 4 d	51.9	40.6	7.6	81.0
Ad-LacZ, 6 d	43.2	44.5	12.4	101.2
Ad-Asc-myc, 6 d	53.4	41.1	5.6	79.2

S, G0, G1, G2, M: Cell percentage of S, G0, G1, G2, M phase respectively.

2.5 Ad-Asc-myc 对 HL-60 细胞 *c-myc* 基因转录及蛋白表达的的影响 分别提取 Ad-Asc-myc (MOI:100) 处理组 1, 3, 5 d 及对照组的细胞的总 RNA 进行 RT-PCR 分析, 结果显示, 在对照组 HL-60 细胞中 *c-myc* 基因 mRNA 转录水平表达较高, 经 Ad-Asc-myc 处理后 *c-myc* 基因 RT-PCR 扩增产物 (250 bp) 随时间

延长逐渐下降 (Fig 3). 细胞免疫细胞化学染色方法处理 Ad-Asc-myc (MOI:100) 转染组及对照组 3 d 的细胞, 可见对照组细胞核及胞质内少量棕黄色颗粒, 多数细胞呈阴性或弱阳性反应. Ad-Asc-myc 处理的 HL-60 细胞胞核、胞质内棕黄色颗粒较对照组明显增多. 阳性细胞数增加, 强阳性细胞多见 (Fig 4 A, B).

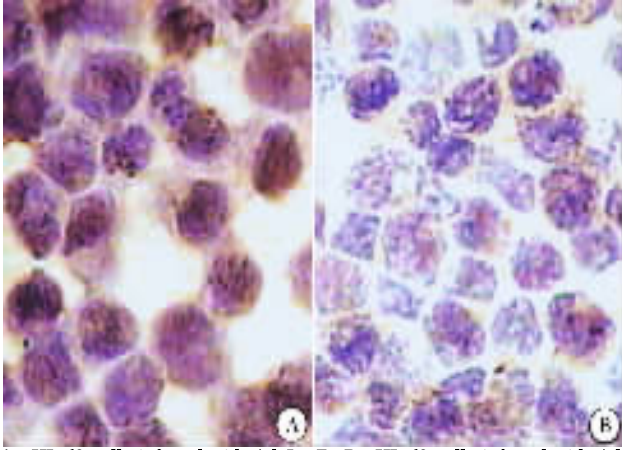


M: DNA marker; 1: Control; 2: 1 d; 3: 3 d; 4: 5 d.

Fig 3 RT-PCR analysis of expression of *c-myc* gene in the HL-60 cells infected with Ad-Asc-myc

图 3 RT-PCR 分析 Ad-Asc-myc 转染 HL-60 细胞后 *c-myc* 基因表达

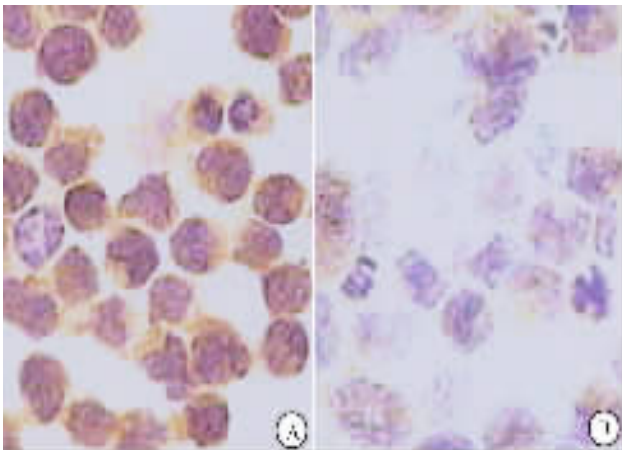
2.6 Ad-Asc-myc 对 HL-60 细胞核增殖抗原的影响 免疫细胞化学染色处理 Ad-Asc-myc (MOI 100) 组及对照组转染 3 d 的细胞,可见对照组细胞核及胞质内大量棕黄色颗粒,多数细胞呈阳性或强阳性反应。Ad-Asc-myc 处理的 HL-60 细胞核、胞质内棕黄色颗粒较对照组明显减少。阴性细胞数增加 (Fig 5 A B)。



A: HL-60 cells infected with Ad-LacZ; B: HL-60 cells infected with Ad-Asc-myc.

Fig 4 Expression of *c-myc* protein in the HL-60 cells infected with Ad-Asc-myc DAB $\times 1000$

图4 免疫细胞化学染色分析 Ad-Asc-myc 对 HL-60 细胞 *c-myc* 蛋白表达的影响



A: HL-60 cells infected with Ad-LacZ; B: HL-60 cells infected with Ad-Asc-myc.

Fig 5 Expression of PCNA protein in the HL-60 cells infected with Ad-Asc-myc DAB $\times 1000$

图5 免疫细胞化学染色分析 Ad-Asc-myc 对 HL-60 细胞 PCNA 蛋白表达的影响

3 讨论

HL-60 细胞系的 *c-myc* 基因通过同源染色区 (HSR) 和双微体 (DMS) 等方式明显扩增,并出现高水平的转录,其 mRNA 水平增加 15~35 倍。*c-myc* 反式激活区作用于靶基因特异性 DNA 序列 (E 框) 激活细胞周期素基因及生长基因^[3],它还可以通过 Inr 等

途径抑制生长抑制基因的表达,使细胞渡过 G/S 期,免于分化成熟及凋亡,进入无限增殖^[4]。

反义核酸技术为抑制 *c-myc* 异常高表达提供了一个良好方法^[5]。腺病毒载体具有遗传毒性低、宿主细胞广、滴度高、装载容量大、既可感染增殖期细胞又可感染静止期细胞等优势,已在临床基因治疗中得到广泛使用^[6]。本实验重组反义 *c-myc* 腺病毒采用 *c-myc* 基因含有起始密码子第二外显子及其两侧部分内含子序列共 1.53 kb 片段与复制缺陷 V 型腺病毒构建而成,实验证明具有抑制 *c-myc* 表达的作用。目前将重组反义 *c-myc* 腺病毒用于早幼粒白血病细胞的治疗实验尚未见报道。

多聚阳离子可与细胞表面带负电荷糖蛋白相互吸引,将多聚阳离子与腺病毒载体混合可提高腺病毒转染效率^[7]。我们利用多聚阳离子复合物辅助重组反义 *c-myc* 腺病毒转染早幼粒白血病细胞,提高了载体的转染效率,克服了腺病毒对早幼粒白血病细胞转染效率较低的缺点,基因在细胞内表达稳定。实验观察到 *c-myc* 基因转录及表达受抑,细胞增殖变缓,出现 G1/G0 期阻滞,增殖指数与对照组相比明显下降,凋亡细胞增多。

PCNA 是核内酸性蛋白质,它的出现和细胞增殖有关,从细胞周期 G1 期开始增加,S 期达高峰。对 PCNA 的研究表明,PCNA 可以作为细胞增殖的一个指标^[8]。在急性白血病中,白血病细胞的增殖速度并不快于相应的正常骨髓细胞,白血病细胞数目的增加在于肿瘤细胞凋亡调节障碍。PCNA 的表达和患者外周血白细胞计数无关,而和骨髓中幼稚细胞百分率相关,它反映的是处于增殖状态的白血病细胞。未转染重组反义 *c-myc* 腺病毒 HL-60 细胞增殖旺盛,大量细胞处于 S 期,PCNA 阳性细胞在 90% 以上,转染后 HL-60 受抑 PCNA 阳性细胞明显减少,表明细胞增殖能力降低。本实验通过重组腺病毒介导反义 *c-myc* 基因作用于早幼粒 HL-60 细胞,观察到 *c-myc* 基因表达降低,转染细胞生长、增殖受抑,细胞大量凋亡。表明 Ad-Asc-myc 可能在白血病的基因治疗方面有良好的应用前景。

【参考文献】

- [1] Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, et al. The proto oncogene *c-myc* in hematopoietic development and leukemogenesis [J]. *Oncogene*, 2002; 21(21): 3414-3421.
- [2] Mata GE, Cuendet M, Sher D, et al. Brusatol-mediated induction of leukemic cell differentiation and G(1) arrest is associated with down-regulation of *c-myc* [J]. *Leukemia*, 2002; 16(11): 2275-2284.

- [3] Boxer LM, Dang CV. Translocation involving c-myc and c-myc function[J]. *Oncogene*, 2002; 20(40): 5595-5610.
- [4] Gartel AL, Shchors K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes[J]. *Exp Cell Res*, 2003; 283(1): 17-21.
- [5] Li KL, Charles MR. Antisense technology in molecular and cellular bioengineering[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2003; 14: 505-511.
- [6] Pfeifer A, Verma IM. Gene therapy: Promises and problems[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2001; 2: 177-211.

- [7] Fukuhara H, Hayashi Y, Yamamoto N, et al. Improvement of transduction efficiency of recombinant adenovirus vector conjugated with cationic liposome for human oral squamous cell carcinoma cell lines[J]. *Oral Oncol*, 2003; 39(6): 601-609.
- [8] Lin CW, Manshouri T, Jilani I. Proliferation and apoptosis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndrome[J]. *Leuk Res*, 2002; 26(6): 551-559.

编辑 甄志强

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2005)15-1386-01

HSV-tk 基因对乳腺癌细胞的体外作用

杨生玺¹, 蒋虹² (青海大学¹医学院生物教研室,²附属医院高压氧科, 青海 西宁 810001)

【关键词】乳腺癌细胞, HSV-tk 基因

【中图分类号】R73-3 【文献标识码】B

1 实验资料 逆转录病毒载体、细胞株 PA317, NIH3T3 和小鼠乳腺癌细胞 MA782/5S-8102 由东南大学医学院遗传中心惠赠。按常规方法扩增、抽提、纯化质粒 DNA 片段、回收 HSV-tk 片段。在 T4 DNA Ligase 的作用下定向克隆入逆转录病毒载体 pMNSM 中 SV40 启动子下游的多克隆位点。重组质粒转化 JM109 菌后经克隆筛选、鉴定获重组质粒 pMNS-tk-M。以脂质体法将上述重组质粒 DNA 转染至逆病毒包装细胞 PA317。以含 400 mg/L G418 的 DMEM 选择培养基培养 14 d 获 G418 抗性克隆 PA317/tk 细胞 NIH3T3 细胞为靶细胞在 Polybrene 存在条件下测定、计算病毒滴度。病毒滴度 (CFU/mL) = 细胞克隆平均数 × 病毒液稀释倍数。选择高滴度的病毒上清 (含聚凝胺 800 mg) 转染 MA782/5S-8102。以 G418 终浓度为 800 mg/L 的 DMEM 选择培养 14 d 获 G418 抗性细胞 MA782/5S-8102/tk。MA782/5S-8102/tk 和 MA782/5S-8102 各以 1.3×10^4 细胞数接种于 96 孔板, 加入 GCV, 并使终浓度分别为 0, 0.001, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 5, 10, 50 和 100 mg/L, 每组设 3 个复孔, 37°C, 50 mL/L CO₂ 条件下细胞培养箱内培养, 72 h 后以 MTT 法测活细胞数, 计算各孔细胞存活率 = $\frac{A_{\text{实验组}}}{A_{\text{对照组}}} \times 100\%$ 。采用脂质体法将逆转录病毒载体 GINatk 导入 PA317 细胞, 命名为 PA317/tk。根据 HSV-tk 基因设计的引物 PCR 扩增产物大小为 404 bp。经 PCR 扩增, 载体 GINatk 和抗性细胞 PA317/tk 细胞均出现阳性条带, 而 PA317

细胞未出现相应条带。重组逆转录病毒转染后获 G418 抗性克隆 MA782/5S-8102/tk, 体外传代 10 代以上未见 G418 抗性消失。PCR 检测, HSV-tk 基因已整合至 MA782/5S-8102 细胞基因组 DNA 中, 有 404 bp 阳性条带, MA782/5S-8102 无 tk 条带。当 GCV 浓度为 0.001 mg/L 时, MA782/5S-8102/tk 细胞的生长受到轻度抑制; 当 GCV 浓度为 0.01 mg/L 时, MA782/5S-8102/tk 细胞的生长受到明显抑制; 随着 GCV 浓度的递增, 细胞生长抑制程度越明显。当 GCV 浓度达 10 mg/L 时, MA782/5S-8102/tk 细胞生长受到完全抑制。而 MA782/5S-8102 细胞才出现轻微的细胞毒性作用, 细胞存活率为 95%。二者间差异非常显著性 ($P < 0.01$)。说明 MA782/5S-8102/tk 细胞在 GCV 攻击后生长明显受到抑制。

2 讨论 tk 基因是药敏基因疗法所应用的目的基因的一种。疱疹病毒的 tk 基因与哺乳动物细胞内的 tk 基因不同, 它可以催化一些核苷类似物 (nucleotide analogs, Nas) 的磷酸化, 如 ACV, GCV 等^[1,2]。终产物 NasTP 可干扰、抑制宿主细胞 DNA 的合成, 最终导致细胞死亡。因此 HSV-tk 基因治疗有其独特的优点。将外源基因转入靶细胞是基因治疗的基础和关键步骤^[3]。我们应用逆转录病毒载体 GINatk 转染包装细胞 PA317, 逆转录病毒经包装后可达到一定的产病毒滴度。在此基础上如有条件进行超速离心、透析等纯化、浓缩处理, 将有可能提高病毒滴度到较高水平, 从而满足今后临床治疗的需要。GCV 不仅可以诱导 MA782/5S-8102/tk 细胞本身死亡, 还可诱导其周围的 MA782/5S-8102 细胞死亡, 说明 HSV-tk/GCV 系统存在旁观者效应^[3]。

【参考文献】

- [1] 胡铁山, 李贵涛. HSV-tk/GCV 自杀基因系统对骨肉瘤细胞体外杀伤效应[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(3): 204-207.
- [2] 谢苏庆, 许国铭, 李兆申, 等. 逆转录病毒介导单纯疱疹病毒-胸苷激酶基因治疗胰腺癌的实验研究[J]. 中华消化杂志, 2000; 20(1): 11-13.
- [3] 杨生玺, 张丽珊. 自杀基因靶向核素治疗肿瘤研究进展[J]. 国外医学·肿瘤学分册, 2002, 29(4): 243-245.

编辑 潘伯荣

收稿日期 2005-04-13; 修回日期 2005-04-25

作者简介 杨生玺 (1963-), 男 (汉族), 青海省西宁市人。本科, 副教授。Tel. (0971) 6143631 Email. yangjiang63@126.com