

HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌移植瘤的研究

黄洪章¹, 王安训², 李 苏³, 陈剑经³, 邝珠玢³

(中山大学 1. 附属第二医院口腔颌面外科, 广东 广州 510120 2. 附属第一医院口腔科, 3. 肿瘤防治中心)

摘要:【目的】探讨腺病毒介导单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(AdCMVHSV-TK)/丙氧鸟苷(GCV)自杀基因系统对口腔鳞癌移植瘤的治疗作用。【方法】Tca8113 细胞接种于裸鼠右侧腋下, 移植瘤形成时随机分成 4 组: ①空白对照组, ②AdCMVHSV-TK 对照组(2×10^9 PFU, 瘤内注射), ③GCV 对照组(25 mg/kg, Bid \times 6 腹腔注射), ④AdCMVHSV-TK/GCV 治疗组, 并开始治疗。观察肿瘤的生长状态、计算抑瘤率和肿瘤群体倍增时间; 观察肿瘤的组织病理学改变; 高效液相色谱法(HPLC)检测 GCV 的体内代谢。【结果】与对照组比较, AdCMVHSV-TK/GCV 治疗组肿瘤的生长受到抑制($P < 0.001$), 抑瘤率达 90.69%, 肿瘤的群体倍增时间延长; 肿瘤组织中可见灶性坏死及淋巴细胞浸润; HPLC 检测显示治疗组肿瘤组织中存在 GCV 和磷酸化 GCV, 血液中仅有 GCV, 而对照组肿瘤组织和血液均只能检测到 GCV。【结论】AdCMVHSV-TK/GCV 系统对口腔鳞癌移植瘤具有强的抑瘤作用。

关键词: 自杀基因; 单纯疱疹病毒胸苷激酶基因; 基因治疗; 口腔肿瘤

中图分类号: R739.86 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)05-0372-03

The Therapeutic Efficacy of AdCMVHSV-TK/GCV System on the Treatment of Oral Squamous Carcinoma Xenografts HUANG Hong-zhang¹, WANG An-xun², LI Su³, CHENG Jian-jing³, KUANG Zhu-ji³. (1. Department of Oral Maxillofacial Surgery, Second Affiliated Hospital, 2. Department of Oral Maxillofacial Surgery, First Affiliated Hospital, 3. Tumor Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract 【Objective】To investigate the therapeutic efficacy of adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase (AdCMVHSV-TK)/ganciclovir(GCV) system on the treatment of oral squamous carcinoma xenografts. 【Methods】Tca8113 cells were inoculated subcutaneously in the right flank of BALB/c nude mice. Mice were randomly assigned into 4 groups after xenografts became palpable(eighth day) and treated: ① control, ② AdCMVHSV-TK(2×10^9 PFU, intratumorally) only, ③ GCV (intraperitoneally, 25 mg/kg, twice daily for 6 days) only, ④ AdCMVHSV-TK/GCV. The tumor growth was observed and inhibition rate and tumor doubling time were calculated; Tumor histopathological changes were studied and the metabolism of GCV *in vivo* was detected by high performance liquid chromatography (HPLC). 【Results】Compared to the other three control groups mice treated with AdCMVHSV-TK/GCV system demonstrated significant tumor regression ($P < 0.001$), the tumor doubling time prolonged and the inhibition rate was 90.69%; Substantial tumor necrotic area and infiltrative lymphocytes around necrotic area under light microscope were found. In AdCMVHSV-TK/GCV treated group only GCV peak was found in blood, but another peak (phosphorylated GCV) appeared in tumor tissue; only GCV was found in both blood and tumor tissue in the control group. 【Conclusion】AdCMVHSV-TK/GCV suicide gene system has strong tumor inhibition effect on oral squamous carcinoma xenografts.

Key words: suicide gene; herpes simplex virus thymidine kinase gene; gene therapy; mouth neoplasms

单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK)/丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)自杀基因系统应用于多种恶性肿瘤的治疗研究^[1,2], 并取得了良好的体外杀伤作用和体内抑瘤效果。在口腔鳞癌方面, HSV-TK/GCV 系统的应用研究还较少, 且结果不一致^[3,4], 作者的研究显示 HSV-TK/GCV 对口腔鳞癌具有强的体外杀伤作用, 但旁观者效应差, 其杀伤作用主要通过磷酸化 GCV, 抑制 DNA 合成, 阻断细胞周期于 S 期, 从而导致细胞死亡^[5,6]。在此基础上本文

进一步研究腺病毒介导(adenovirus-mediated)单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 AdCMVHSV-TK/GCV 系统对口腔鳞癌的体内抑瘤效果及治疗机理。

1 材料和方法

1.1 材料

BALB/c 裸小鼠(6~8 周, 体质量 20~30 g, SPF 级, 雌性, 共 30 只)购自原中山医科大学实验动物中心, Tca8113 细胞株(何荣根教授惠赠), 重组腺病毒 AdCMVHSV-TK(许德华教授提供)采用

收稿日期: 2002-01-08

基金项目: 211 工程基金资助项目(99074); 中山医科大学博士启动基金资助项目(072014)

作者简介: 黄洪章(1952-), 男, 广东潮阳人, 教授, 博士生导师

常规方法扩增、纯化及滴度测定^[7],其滴度为 2×10^{13} PFU/L (plaque forming units), GCV 为 Sigma 公司产品。

1.2 口腔鳞癌裸鼠移植瘤模型的建立及治疗

于 BALB/c 裸小鼠右侧腋下接种 Tca8113 细胞 5×10^6 个细胞/只,肿瘤形成直径约 5 mm 时开始治疗(第 8 天),随机分组如下:①空白对照组,② GCV 对照组,③ AdCMVHSV-TK 对照组,④ AdCMVHSV-TK/GCV 组,每组 7 只。第③,④组瘤内注射 AdCMVHSV-TK 2×10^9 PFU (接种第 8 天);第②,④组腹腔注射 GCV 25 mg/kg, bid (接种第 9~15 天);其余组分别在相同时间给予瘤内注射和/或腹腔注射等量 PBS。

1.3 观察肿瘤的生长状况

接种第 8 天开始测量肿瘤的最大直径(a)和最大横径(b),每 3 天测量 1 次:①计算肿瘤的体积 [$V=1/2(a \times b^2)$],描绘肿瘤的生长曲线,对生长曲线进行拟合($y=a \times e^{kt}$),计算群体倍增时间($T=\ln 2/K$);②接种第 29 天全部处死动物,计算抑瘤率(抑瘤率=1-实验组体积变化/对照组体积变化);对各组肿瘤体积的大小进行单因素方差分析。

1.4 肿瘤组织病理学改变

接种第 15 天,于注射 GCV 1 h 后处死部分动物,每组 1 只,取部分肿瘤组织,100 mL/L 甲醛固定,石蜡包埋,HE 染色,光镜下观察肿瘤组织病理学改变。

1.5 检测 GCV 代谢

分别取接种第 15 天处死动物的肿瘤组织和血液标本,①肿瘤组织的处理:取 2 g 肿瘤组织,剪成小块,用组织匀浆器匀浆组织,加入 PBS 缓冲液定容至 2 mL,用超声波继续破碎细胞,离心 12 000 r/min, 4 °C, 10 min($r=7$ cm, 以下相同);取 0.5 mL 上清,加入 1 mol/L HClO₄ 0.5 mL 沉淀蛋白,离心;上清用 KOH (pH 5.4)调至 pH 3.4,离心;取 20 μL 上清直接进样,高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)检测。②血样品的处理:处死动物后裸鼠心脏取血 0.5 mL 于抗凝管;取 0.5 mL 血浆,加入 1 mol/L HClO₄ 0.5 mL 沉淀蛋白,其余步骤同上。HPLC 检测条件:色谱柱 C18, 250 mm×0.5 μm;流动相为 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 3.0);流速为 1 mL/min;检测波长为 254 nm。观测各样本的色谱峰。

2 结果

2.1 肿瘤的生长曲线

各处理组移植瘤成瘤率为 100%。肿瘤的生长曲线如图 1。由图可见对照组、重组腺病毒处理组和 GCV 处理组肿瘤的生长迅速,其群体倍增时间分别为 3.08 d, 2.99 d, 3.13 d; HSV-TK/GCV 治疗组肿瘤的生长明显受到抑制,其群体倍增时间为 5.24 d, 抑瘤率为 90.69%。对第 29 天各组肿瘤的体积进行单因素方差分析:3 个对照组之间肿瘤体积无明显差异 ($P > 0.05$), HSV-TK/GCV 治疗组与 3 组对照组比较均存在显著性差异 ($P < 0.001$)。

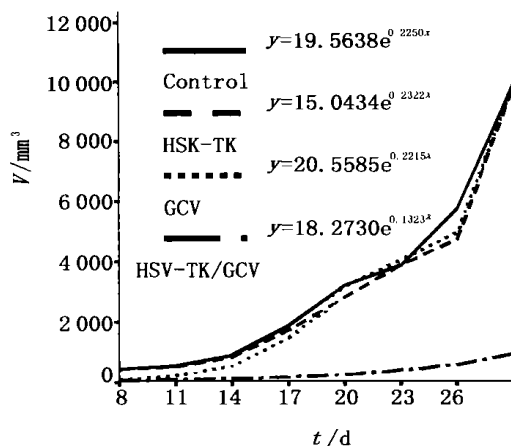


图 1 AdCMVHSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌移植瘤后肿瘤生长曲线

Fig 1 Tumor growth curves of the xenografts after treated with AdCMVHSV-TK/GCV system

2.2 组织病理学改变

对照组、HSV-TK 组、GCV 组肿瘤组织生长活跃,可见较多的瘤巨细胞、核分裂相多见,未见组织坏死或炎症细胞浸润; HSV-TK/GCV 组可见肿瘤内有灶性坏死,坏死灶及其周围可见淋巴细胞浸润(图 2)。

2.3 GCV 的体内代谢

HPLC 检测可见 GCV 色谱峰的保留时间为 4.35 min, 磷酸化 GCV 色谱峰的保留时间为 4.61 min(图 3)。瘤体组织中 GCV 组仅检测到 GCV; HSV-TK/GCV 组可检测到 GCV 和磷酸化的 GCV。血液中均只能检测到 GCV。

3 讨论

研究显示 HSV-TK/GCV 系统对多种恶性肿瘤的移植瘤具有明显的抑制作用。O'Malley 等^[3]

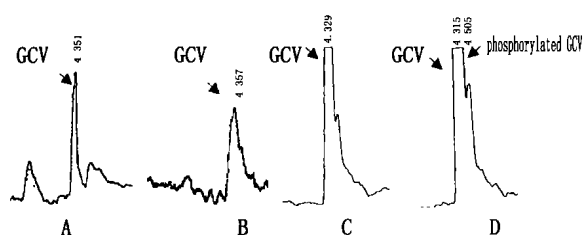


图3 AdCMVHSV-TK/GCV系统治疗口腔鳞癌移植瘤后GCV的代谢

Fig 3 Metabolism of GCV in AdCMVHSV-TK/GCV treated xenografts

A: blood in GCV control group; B: blood in HSV-TK/GCV treated group; C: tumor tissue in GCV control group; D: tumor tissue in HSV-TK/GCV treated group; HPLC method

应用腺病毒介导的 HSV-TK 基因转染口腔癌, 并给予 GCV 25 mg/kg, 每天 2 次, 共 6 d, 治疗后肿瘤明显消退, 动物荷瘤存活期延长, 组织学检查可见肿瘤坏死区。然而孙春晓等^[4]应用非腺病毒为载体的 HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌 Tca8113 细胞株时, 400 μ mol/L GCV 治疗 4 d, 其杀伤作用仅为 29%, 这可能与 Tca8113 细胞的体外倍增时间较长有关(43.5 h), 但也可能与该研究应用的载体转染率低有关。本研究中空白对照组肿瘤生长迅速, 重组腺病毒组和 GCV 组对肿瘤的生长无明显抑制; 经 HSV-TK/GCV 治疗后移植瘤的生长受到显著抑制, 肿瘤的体积明显小于对照组, 肿瘤的倍增时间延长为 5.24 d, 与对照组比较其抑瘤率高达 90.69%。因此 HSV-TK/GCV 系统对口腔鳞癌具有强的体内抑瘤作用, 但研究中也发现该系统治疗后肿瘤并不能完全消退。

高效液相色谱法是检测药物代谢和药代动力学的常用方法, 应用 HPLC 检测肿瘤组织及血液中 GCV 的代谢, 对于检测瘤内自杀基因酶的活性水平, 评价基因治疗的疗效, 以及监测 HSV-TK/GCV 治疗的全身毒性非常重要。研究发现应用 HSV-TK/GCV 系统治疗移植瘤后肿瘤组织中存在 GCV 和磷酸化 GCV, 血液中无磷酸化 GCV 出现^[8]。本研究也得到同样的结果。因此应用 HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌移植瘤时只会对肿瘤组织局部产生细胞毒作用, 而全身毒性非常低。

HSV-TK/GCV 系统治疗恶性肿瘤时, 转染 HSV-TK 基因的细胞可磷酸化 GCV, 从而对该细胞产生直接的杀伤作用。研究还显示 HSV-TK/GCV 系统可使宿主获得对肿瘤的特异性免疫^[9,10]。Ramesh 等^[9]用 HSV-TK/GCV 治疗恶性

肿瘤时发现瘤体组织发生了出血坏死, 进一步检测发现局部有 TNF- α 释放, 其来源为局部浸润的单核细胞, 且局部浸润的单核细胞和 T 细胞是对照组的 2~3 倍。Yamamoto 等^[10]应用 HSV-TK/GCV 治疗胃癌时发现宿主产生了肿瘤特异性细胞毒 T 细胞, 以 CD8⁺ 细胞 (cluster differentiation antigen, T 细胞分化群抗原) 为主, CD8⁺ 淋巴细胞除具有直接细胞毒作用外, 尚能够产生一些细胞因子, 诱导其他细胞的抗肿瘤效应。本研究也得到相似的结果, HSV-TK/GCV 治疗后口腔鳞癌移植瘤肿瘤组织内有灶性坏死, 坏死灶周围可见淋巴细胞浸润。因此 HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌时可刺激机体免疫系统, 从而增强该系统的治疗疗效。

(本文图 2 见封 2. Fig. 2 Show n in inside front cover)

参考文献:

- [1] Haberkorn U, Khazaie K, Morr I, *et al.* Ganciclovir uptake in human mammary carcinoma cells expressing herpes simplex virus thymidine kinase[J]. Nucl Med Biol, 1998, 25(4): 367.
- [2] Beck C, Cayeux S, Lupton SD, *et al.* The thymidine kinase/ganciclovir-mediated "suicide" effect is variable in different tumor cells[J]. Hum Gen Ther, 1995, 6(2): 1525.
- [3] O'Malley B W, Copy K A, Chen S H, *et al.* Combination gene therapy for oral cancer in a murine model[J]. Cancer Res, 1996, 56(8): 1737.
- [4] 孙春晓, 何荣根, 张志愿, 等. HSV-TK/GCV 系统对 ACC-M 细胞作用的体外试验[J]. 口腔颌面外科杂志, 1999, 9(1): 26.
- [5] 黄洪章, 王安训. 腺病毒介导 HSV-TK/GCV 系统治疗舌癌的实验研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2001, 36(6): 457.
- [6] 王安训, 黄洪章. 腺病毒介导 HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌机制的研究[J]. 中山医科大学学报, 2002, 22(1): 53.
- [7] 许德华, 戈凯, 蒋琼, 等. 含 CD 自杀基因腺病毒载体的构建及其应用[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(2): 164.
- [8] Haberkorn U, Altmann A, Morr I, *et al.* Monitoring gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase in hepatoma cells; uptake of specific substrates[J]. J Nucl Med, 1997, 38(2): 287.
- [9] Ramesh R, Marrogi A J, Munshi A, *et al.* In vivo analysis of the 'bystander effect': a cytokine cascade[J]. Exp Hematol, 1996, 24(7): 829.
- [10] Yamamoto S, Suzuki S, Hoshino A, *et al.* Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cell induces tumor-specific cytotoxic-T cells in mice[J]. Cancer Gene Ther, 1997, 4(2): 91.

(编辑 刘清海)

成肌细胞培养的重复肌块法 (正文见第 339 页)

Better Method in Myoblast Cell Culture with Small Muscle Pieces Reuse (Text in page 339)



图 1 重复使用肌块培养的成肌细胞

图 2 重复使用肌块培养的成肌细胞 desmin 免疫组化染色 (100 倍)

图 3 重复肌块培养的成肌细胞 dystrophin 免疫荧光染色

Fig. 1 The myoblast cells cultured with the reused muscle pieces (100 ×)

Left: the first time used cells; Right: the 6th time used cells

Fig. 2 Immunohistochemical stain of desmin of the myoblast cells cultured by the reused muscle pieces (100 ×)

Left: the first time used cells; Right: the 6th time used cells

Fig. 3 Immunofluorescence stain of dystrophin of the myoblast cells cultured with the reused muscle pieces (100 ×)

Left: the first time used cells; Right: the 6th time used cells

HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌移植瘤的研究 (正文见第 372 页)

The Therapeutic Efficacy of AdCMVHSV-TK/GCV System on the Treatment of Oral Squamous Carcinoma Xenografts (Text in page 372)

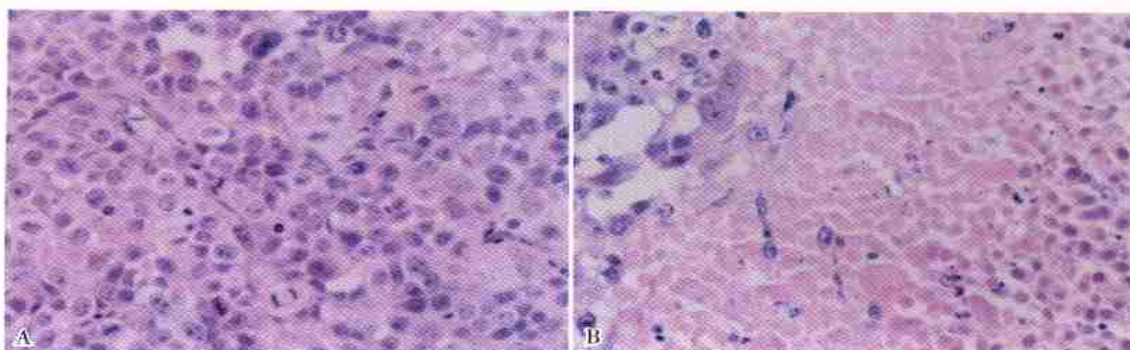


图 2 AdCMVHSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌移植瘤后组织病理学改变

Fig. 2 Histopathological changes of xenografts after treated with AdCMVHSV-TK/GCV system

A: Control; B: HSV-TK/GCV treated group (HE, × 100).