

8-Br-cAMP 联合 HSV-TK/GCV 治疗舌鳞癌 移植瘤的研究

王安训, 温映萍, 李 苏, 黄洪章

(中山大学附属第一医院口腔科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨 8-Br-cAMP 联合单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV-TK)/丙氧鸟苷(GCV)对舌鳞癌移植瘤的治疗作用。【方法】舌鳞癌 Tca8113 细胞接种于 28 只裸鼠右侧腋下, 随机分成 4 组进行治疗: 对照组, 8-Br-cAMP 组, HSV-TK/GCV 组, 8-Br-cAMP 联合 HSV-TK/GCV 组; 观察肿瘤的生长状态、计算抑瘤率和群体倍增时间; 观察肿瘤的组织病理学及超微结构改变。【结果】与对照组比较, 8-Br-cAMP 和 HSV-TK/GCV 单独应用时肿瘤的生长明显受到抑制 ($P < 0.01$), 肿瘤的群体倍增时间延长; 析因分析显示两者间存在协同的抑瘤作用 ($P < 0.01$)。光镜下对照组和 8-Br-cAMP 组无明显差别, HSV-TK/GCV 组和 8-Br-cAMP 联合 HSV-TK/GCV 组肿瘤组织中可见囊性变和大片的灶性坏死; 透射电镜显示 8-Br-cAMP 对舌癌细胞具有诱导分化作用。【结论】8-Br-cAMP 与 HSV-TK/GCV 系统具有协同的抑制舌鳞癌移植瘤生长作用。

关键词: 8-Br-cAMP; 自杀基因; 单纯疱疹病毒胸苷激酶基因; 基因疗法; 舌肿瘤

中图分类号: R739.86 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2003)01-89-04

The Combination of 8-Br-cAMP and HSV-TK/GCV System in the Treatment of Tongue Squamous Carcinoma Xenografts

WANG An-xun, WEN Ying-ping, LI Su, HUANG Hong-zhang

(Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the therapeutic efficacy of combination therapy with 8-Br-cAMP (8-Bromo3':5'-cyclic adenosine monophosphate) and herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK)/ganciclovir (GCV) system in the treatment of tongue squamous carcinoma xenografts. 【Methods】 Tca8113 cells were inoculated subcutaneously in the right flank of BALB/c nude mice. Mice were randomly assigned to 4 groups and treated: Control group, 8-Br-cAMP group, HSV-TK/GCV group, 8-Br-cAMP + HSV-TK/GCV group. Observe the tumor growth and calculate the inhibition rate and tumor doubling time; Observe tumor histopathological changes. Transmission electron microscope was used to analyze the changes of Tca8113 cells after treated with 8-Br-cAMP. 【Results】 Compared with control group, mice treated with 8-Br-cAMP or HSV-TK/GCV system demonstrated significant tumor regression ($P < 0.01$) and prolonged tumor doubling time. Factorial analysis showed that synergetic anticancer effect existed between 8-Br-cAMP and HSV-TK/GCV system. Cyst-formation and substantial tumor necrotic area were observed under light microscope in HSV-TK/GCV group and 8-Br-cAMP + HSV-TK/GCV group. A series of cell morphological changes, such as more tonofilaments and well-differentiated organelle, were observed after treated with 8-Br-cAMP. 【Conclusion】 8-Br-cAMP and HSV-TK/GCV system have synergetic anticancer effect on tongue squamous carcinoma xenografts.

收稿日期: 2002-08-02

基金项目: 广州市科委科研基金资助项目(010448170)

作者简介: 王安训(1970-), 男, 福建南安人, 博士, 主治医师; 温映萍, 广东省第二中医院口腔科; 李 苏, 中山大学附属肿瘤防治中心; 黄洪章, 中山大学附属第二医院口腔科, 导师。

Key words: 8-Br-cAMP; suicide gene; herpes simplex virus thymidine kinase gene; gene therapy; tongue neoplasms

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003,24(1):89-91, back coloured page 6]

研究显示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)对舌鳞癌具有强的体外杀伤作用和体内抑瘤效果,但旁观者效应差,其主要原因与舌癌细胞缺乏间隙连接有关^[1,2]。8-Br-cAMP是一种良好的诱导分化剂,它可诱导间隙连接蛋白的表达,恢复间隙连接及间隙连接通讯,从而提高 HSV-TK/GCV 系统的旁观者效应^[3,4]。本文在此基础上进一步研究 8-Br-cAMP 联合 HSV-TK/GCV 系统对舌鳞癌的体内抑瘤效果。

1 材料和方法

1.1 材料

BALB/c 裸小鼠(6~8周,体重 20~30 g, SPF 级,雌性,共 28 只)购自中山大学北校区实验动物中心, Tca8113 细胞株(舌鳞癌细胞株,何荣根教授惠赠),含 HSV-TK 基因的重组腺病毒(Ad-CMVHSV-TK,许德华教授提供)采用常规方法扩增、纯化及滴度测定^[1],其滴度为 2×10^{13} PFU/L (plaque forming units/per liter), GCV、8-Br-cAMP (Sigma 公司);透射电镜(JEM-1200EX, JOEL, 日本)。

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 2×10^6 个细胞/只,随机分组如下:①空白组(8 只),②8-Br-cAMP 组(8 只),③ HSV-TK/GCV 组(6 只),④8-Br-cAMP + HSV-TK/GCV 组(6 只)。于接种第 2 天始第②及④组腹腔注射 8-Br-cAMP (60 mg/kg, 每天 1 次,共 7 d);于接种第 8 天第③及④组瘤内注射 AdCMVHSV-TK (2×10^9 PFU);于接种第 9 天始第③及④组腹腔注射 GCV (25 mg/kg, 每天 1 次,共 6 d);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 35 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 8-Br-cAMP 和 HSV-TK/GCV 系统的抑瘤作用进行析因分析。

1.4 观察肿瘤细胞形态学改变

接种第 15 天取 8-Br-cAMP 治疗组及对照组移植瘤(各 2 只),加入前固定液,10 g/L 锇酸固定 1~2 h;常规乙醇脱水;LR White 渗透包埋,56 °C 聚合 24-36 h;超薄切片,铀铅双染;透射电镜观察肿瘤细胞超微结构。取第 35 天各组肿瘤组织,100 g/L 福尔马林固定,石蜡包埋,HE 染色,光镜下观察肿瘤组织病理学改变。

2 结果

2.1 8-Br-cAMP 和 HSV-TK/GCV 系统对舌癌移植瘤的抑制作用

肿瘤的生长曲线如图 1。由图可见:与对照组比较,8-Br-cAMP 治疗组、HSV-TK/GCV 治疗组及 8-Br-cAMP 联合 HSV-TK/GCV 治疗组肿瘤的生长均明显受到抑制,其群体倍增时间延长,分别为 3.2, 3.6, 4.0, 5.0 d;抑瘤率分别为 76%, 74%, 86%。

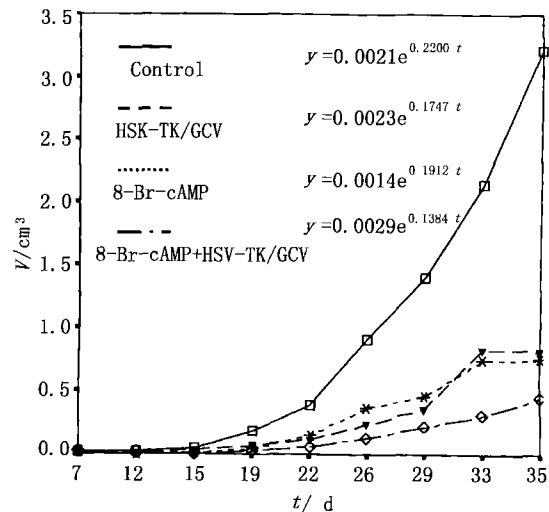


图 1 舌鳞癌移植瘤的生长曲线

Fig.1 Tumor growth curves of the tongue carcinoma xenografts

对 8-Br-cAMP 和 HSV-TK/GCV 系统第 35 天肿瘤的体积进行析因分析(表 1):单独应用 8-Br-cAMP 或 HSV-TK/GCV 系统均可对肿瘤产生明显的抑瘤作用($P < 0.01$),两者间存在着协同的

抑瘤作用($P < 0.01$)。

2.2 肿瘤细胞形态学改变

光镜下对照组和8-Br-cAMP组的差别不明显,肿瘤细胞排列紧密,可见瘤巨细胞和核分裂相;HSV-TK/GCV组和联合治疗组可见肿瘤内灶性坏死及囊性变(图2)。

透射电镜下对照组细胞核大而不规则,核仁多,核膜凹陷,胞浆内有较多的游离核糖体,张力原纤维少见;8-Br-cAMP治疗组肿瘤细胞出现一定的分化,胞质中出现较多的张力原纤维,细胞器增多,细胞间可见较多的桥粒和发育不良的间隙连接,同时可见较多的凋亡细胞(图3)。

表1 8-Br-cAMP和HSV-TK/GCV系统抑瘤作用的析因分析

Table 1 Factorial analysis showed the interaction between 8-Br-cAMP and HSV-TK/GCV

Source	DF	SS	MS	F value	P
Corrected Model	3	29.333			
8-Br-cAMP(A)	1	12.015	12.015	136.683	0.01
HSV-TK/GCV(B)	1	10.888	10.888	123.863	0.01
(AB)	1	6.429	6.429	73.132	0.01
Error	20	1.758	0.088		

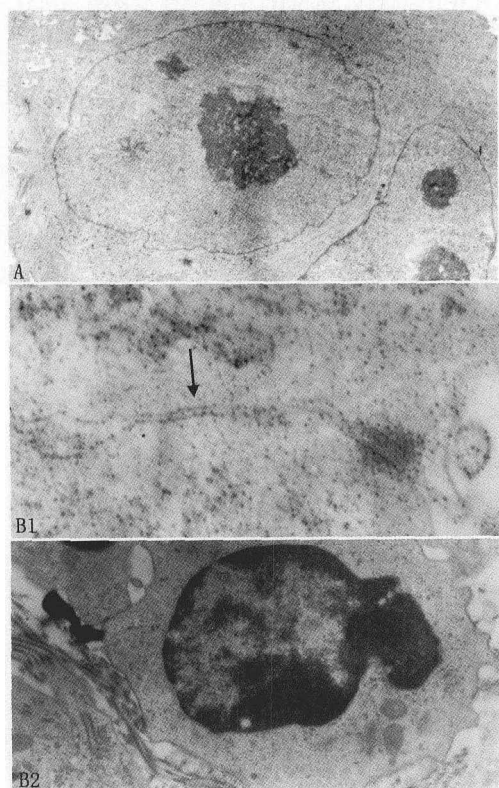


图3 8-Br-cAMP处理后Tca8113细胞超微结构的改变

Fig.3 The ultrastructural changes of Tca8113 cells treated with 8-Br-cAMP under transmission electron microscope

A. Control group ($\times 3000$); B. 8-Br-cAMP treated group: B1: gap junction and desmosome, $\times 35000$; B2: apoptosis, $\times 8000$

3 讨论

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。作者应用腺病毒介导的HSV-TK基因(2×10^9 PFU)转染舌鳞癌细胞,并给予GCV 25 mg/kg,每天2次,共6d,治疗后移植瘤的生长受到显著抑制,肿瘤的倍增时间延长^[2]。本研究中将GCV的量改为每天1次,其移植瘤的生长也显著受到抑制。HSV-TK/GCV的治疗机理主要是^[5];HSV-TK基因通过将GCV磷酸化从而对转染的细胞产生杀伤作用,同时通过旁观者效应对邻近未转染的细胞也产生杀伤作用。由于体内基因治疗时其转染率通常很低,一般小于10%,因此旁观者效应在HSV-TK/GCV基因治疗时起重要的作用,旁观者效应依赖于间隙连接蛋白基因(connexin, Cx)的表达和间隙连接介导的细胞间隙连接通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)^[6]。作者研究已发现单独的HSV-TK/GCV系统对Tca8113细胞的旁观者效应差,这可能与Tca8113细胞间隙连接蛋白表达低以及缺乏间隙连接有关^[1]。研究显示采用间隙连接蛋白Cx基因转染或化学药物诱导Cx基因的表达可提高HSV-TK/GCV的旁观者效应^[7]。

8-Br-cAMP为蛋白激酶A(PKA)R II亚基位点选择性结合的cAMP类似物,对多种癌细胞具有抑制生长和促进分化的效应。体外实验显示^[4]8-Br-cAMP可上调舌癌细胞Cx43基因的表达,诱导舌癌细胞分化以及形成间隙连接;同时可提高HSV-TK/GCV系统的旁观者效应。虽然已有许多关于

(下转插页6 to back coloured page 6)

The Combination of 8-Br-cAMP and HSV-TK/GCV System in the Treatment of Tongue Squamous Carcinoma Xenografts (Text in page 96)

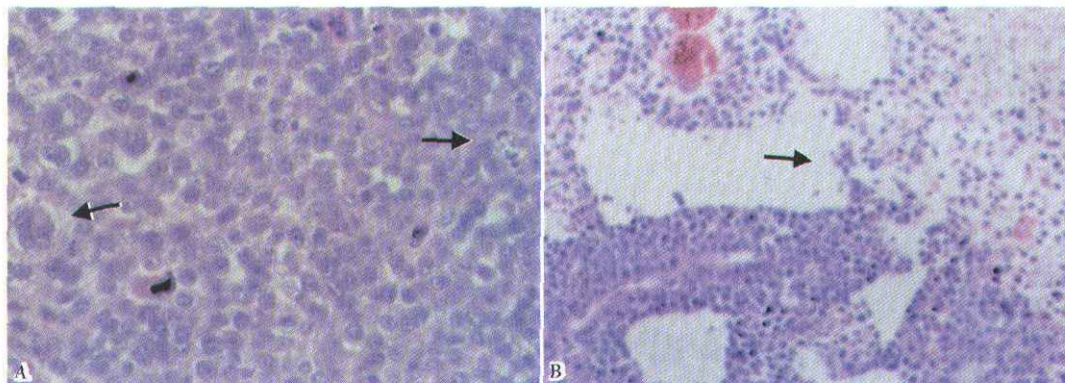


图 2 舌鳞癌移植瘤的组织病理学改变(HE, ×200)

Fig. 2 Histopathological change of tongue carcinoma xenografts

A: Control group (→ showed the huge tumor cells and mitosis)

B: HSV-TK/GCV treated group (→ showed pseudocysts and foci necrosis)

(上接第 91 页 from page 91)

8-Br-cAMP 诱导分化和抑制肿瘤细胞生长的体外研究,但关于 8-Br-cAMP 在裸移植瘤中的应用仍未见报道,本文参照其类似物 8-Cl-cAMP 的动物实验^[8],采用 60 mg/kg,每天 1 次,共 7 d,结果显示 8-Br-cAMP 对舌鳞癌移植瘤的生长具有明显的抑制作用,肿瘤的倍增时间延长,抑瘤率达 76%;透射电镜显示 8-Br-cAMP 可诱导舌鳞癌细胞的分化和凋亡。为了进一步研究 8-Br-cAMP 对 HSV-TK/GCV 抑瘤的增强作用,本研究将两者联合应用于舌鳞癌移植瘤,结果显示联合应用具有明显的抑瘤作用,抑瘤率达 86%,两者间存在协同的抑瘤作用。以上结果提示,8-Br-cAMP 可提高 HSV-TK/GCV 治疗舌鳞癌的抑瘤作用。

(本文图 2 见该页上方. Fig. 2 shown in upper part of this page)

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 黄洪章,王安训,李 苏,等. HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌移植瘤的研究[J]. 中山医科大学学报,2002,23(5):372.

- [3] Chen T C, Hinton D R, Zidovetzki R, *et al.* Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas[J]. *Lab Invest.* 1998,78(2): 165.
- [4] 黄洪章,王安训. 8-Br-cAMP 提高 HSV-TK/GCV 自杀基因系统旁观者效应的研究[J]. 口腔颌面外科杂志,2002,12(1):5.
- [5] 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,2002,23(1):53.
- [6] Yang L, Chiang Y, Lenz H J, *et al.* Intercellular communication mediates the bystander effect during herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir-based gene therapy of human gastrointestinal tumor cells[J]. *Hum Gen Ther.* 1998,9(5): 719.
- [7] Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, *et al.* Bystander killing of cancer cells by herpes virus thymidine kinase gene is mediated by connexins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996. 93(5): 1831.
- [8] 詹京辉,方家椿,石永进,等. 8-氯腺苷对小鼠肝癌 H₂₂ 细胞的抑瘤作用研究[J]. 中国药理学通报,1996,12(1):71.

(编辑 刘清海)