

腺病毒介导 HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌机制的研究

王安训¹, 黄洪章²

(中山医科大学 1. 附属第一医院口腔科, 广东 广州 510080; 2. 孙逸仙纪念医院口腔颌面外科)

摘要: 【目的】研究腺病毒介导的单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(AdCMV HSV-TK)/丙氧鸟苷(GCV)系统治疗口腔鳞癌细胞的作用机制。【方法】HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌细胞(Tca 8113 细胞株)后分别应用³H-TdR 掺入法、流式细胞仪(FCM)、TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick End Labeling)法和透射电镜等方法进行检测。【结果】HSV-TK/GCV 系统治疗后:³H-TdR 掺入法显示掺入率下降,GCV 为 5×10^{-4} mol/L 时掺入率随感染复数(MOI)的上升而显著下降($P < 0.001$);与对照组比较,FCM 显示 S 期比率显著升高($P < 0.001$), $G_2 + M$ 期比率下降为 0($P < 0.001$), G_1/G_0 期的改变不明显($P > 0.05$);透射电镜及 TUNEL 法检测均未见凋亡细胞。【结论】口腔鳞癌细胞经 HSV-TK/GCV 系统治疗后 DNA 的合成受抑制,细胞周期阻滞于 S 期,但无明显诱导细胞凋亡作用。

关键词: 自杀基因; 基因疗法; 胸苷激酶; 口腔肿瘤

中图分类号: R739.86 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)01-0053-03

Therapeutic Mechanism of Adenovirus Mediated HSV-TK/GCV for Oral Squamous Carcinoma Cells *in Vitro*

WANG An-xun¹, HUANG Hong-zhang². (1. Department of Oral Maxillofacial Surgery, First Affiliated Hospital, 2. Department of Oral Maxillofacial Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To determine the therapeutic mechanism of adenovirus mediated herpes simplex virus thymidine kinase (AdCMV HSV-TK)/ganciclovir (GCV) suicide gene therapy for oral squamous carcinoma cells (Tca 8113 cell line) *in vitro*. 【Methods】³H-thymidine(³H-TdR) incorporation assay, flow cytometry(FCM), transmission electron microscope and TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay were used to detected the changes of Tca 8113 cells after treated with AdCMV HSV-TK/GCV system. 【Results】After treated with AdCMV HSV-TK/GCV system, the ³H-TdR incorporation rate decreased and significant decreased between different multiple of infection (MOD) at GCV 5×10^{-4} mol/L ($P < 0.001$). Compared with control groups the AdCMV HSV-TK/GCV treated cells accumulated in S phase of cell cycle ($P < 0.001$), $G_2 + M$ phase dropped to zero ($P < 0.001$), and G_1/G_0 phase didn't change ($P > 0.05$). Apoptotic cells can't be found in AdCMV HSV-TK/GCV treated cells under transmission electron microscope and TUNEL assay. 【Conclusion】The killing effects of HSV-TK/GCV system on oral squamous carcinoma cells maybe inhibit DNA synthesis block cell cycle in S phase, but can't induce apoptosis.

Key words: suicide gene; gene therapy; thymidine kinase; mouth neoplasms

腺病毒介导的单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(adenovirus mediated herpes simplex virus thymidine kinase, AdCMV HSV-TK)/丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)系统是目前研究较为广泛的自杀基因治疗系统,研究发现该系统对多种恶性肿瘤细胞株具有明显的杀伤作用,并已开始应用于临床试验^{1,2}, HSV-TK/GCV 系统主要通过磷酸化 GCV 而起到杀伤作用。为了进一步研究 HSV-TK/GCV 系统对口腔鳞癌杀伤作用的机制,本研究采用³H-TdR 掺入法、流式细胞仪(FCM)、TUNEL 法和透射电镜等手段进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

LS6000 型液闪仪(Bechman 公司), 2T-II 型多头细胞样品收集器(浙江绍兴东浦医疗仪器厂),流式细胞仪(counter 公司),透射电镜(JEM-1200EX, JOEL, 日本)。TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick End Labeling, 末端脱氧核苷酸转移酶原位标记)试剂盒(宝灵曼公司),³H-TdR(氚标胸腺嘧啶核苷,中国科学院原子能所),丙氧鸟苷(GCV, Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 ³H-TdR 检测 DNA 的合成 Tca 8113 细胞(何荣根教授惠赠)接种于 96 孔板(5×10^3 /孔), 24 h 后感染不同感染复数(multiple of infection,

收稿日期: 2001-03-23

基金项目:“211 工程”基金资助项目(99074);中山医科大学校基金资助项目(072014)

作者简介:王安训(1970-),男,福建南安人,主治医师,博士

MOI)的AdCMV HSV-TK(许德华教授提供), 24 h后去培养液, 加入含不同浓度 GCV 的培养液, 继续培养 48 h 后加入 $1.85 \times 10^4 \text{ Bq } ^3\text{H-TdR}$, 孵育 6 h, 胰酶消化, 多头细胞收集器抽滤细胞于滤纸上, 烘干, 加入 5 mL 闪烁液, LS6000 液闪仪测各样本的 CPM。计算各处理组的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率($^3\text{H-TdR}$ 掺入率=实验组 CPM/对照组 CPM $\times 100\%$), 对 GCV 为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的各处理组进行统计学分析。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期的改变 (1)分组: ①对照组, ②HSV-TK 对照组, ③GCV 对照组, ④HSV-TK/GCV 治疗组。(2)Tca 8113 细胞接种于 25 mL 培养瓶, 24 h 后感染 MOI 30 的 AdCMV HSV-TK(第②, ④组); 24 h 后去培养液, 加入含 GCV ($5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)的培养液(第③, ④组), 于加药后 96 h 收集细胞, PBS 洗 2 次后, 加终浓度为 70% 的冷无水乙醇, 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 PI 800 μL 染色 30 min; 流式细胞仪检测, 从打印的 DNA 含量直方图分析得到细胞周期各时相的百分比。对各治疗组细胞周期的改变进行统计学分析。

1.2.3 细胞凋亡的检测 Tca 8113 细胞接种于 25 mL 培养瓶, 24 h 后感染 MOI 30 的 AdCMV HSV-TK; 24 h 后去培养液, 加入含 GCV ($5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)的培养液, 继续培养 48 h 后分别进行以下检测: ①透射电镜观察细胞超微结构的改变: 收集细胞, PBS 洗 3 次后, 800 r/min ($r = 10 \text{ cm}$)离心 5 min, 去上清; 加入 25 mL/L 戊二醛固定液, 4°C 2~6 h; 吸去固定液, PBS 洗 1 次; 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。②应用 TUNEL 法定量检测细胞凋亡情况: 收集细胞, 用含 10 g/L 牛血清白蛋白的 PBS 于 4°C 洗 2 次, 加入 100 μL 新鲜配制的 40 g/L 多聚甲醛, 室温下固定 1 h; PBS 洗 2 次; 每管加入 100 μL 1 mL/L triton X-100/1 g/L 柠檬酸钠, 冰浴放置 2 min, PBS 洗 2 次, 重悬于 50 μL TUNEL 反应液(设阴性对照组), 37°C 1 h; PBS 洗 2 次, 最后加入 PBS 250 μL , FCM 检测; 比较对照组和实验组之间细胞凋亡率的改变。

2 结果

2.1 AdCMV HSV-TK/GCV 系统对 Tca 8113 细胞

胞 DNA 合成的抑制作用

HSV-TK/GCV 系统治疗 Tca8113 细胞后 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率的改变如表 1, GCV 浓度为 0 时, $^3\text{H-TdR}$ 掺入率随着 MOI 的增加而呈上升趋势; HSV-TK/GCV 系统治疗后 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率下降, 随着 GCV 浓度及 MOI 的加大, 下降越明显; 对 GCV 为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的各 MOI 处理组进行单因素方差分析和最小显著差法(LSD)两两比较可见: 与 MOI 0 对照组比较, 其余 MOI 组(除 MOI 为 1 外)的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率均显著下降($P < 0.001$)。

表 1 AdCMV HSV-TK/GCV 系统治疗 Tca 8113 细胞后 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率的改变

Table 1 The changes of $^3\text{H-TdR}$ incorporation rate for Tca 8113 cells after treated with AdCMV HSV-TK/GCV ($\%$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

AdCMV HSV-TK MOI	GCV			
	0 mol/L	10^{-5} mol/L	10^{-4} mol/L	$5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$
0	100.0	89.0	84.6	91.9 ± 1.1
1	105.0	95.0	87.0	80.9 ± 3.0
10	106.1	81.7	84.1	43.9 ± 3.0 ¹⁾
20	148.0	83.4	84.1	32.9 ± 1.1 ¹⁾
40	135.9	78.5	72.4	26.8 ± 4.0 ¹⁾
50	171.2	67.1	46.8	27.3 ± 3.0 ¹⁾

1) Compared with MOI 0 control group, $P < 0.001$

2.2 AdCMV HSV-TK/GCV 治疗 Tca 8113 细胞后细胞周期的改变

Tca 8113 细胞经 AdCMV HSV-TK/GCV 处理 96 h 后细胞周期变化如表 2。对各治疗组细胞周期进行单因素方差分析和 LSD 最小显著差法分析。与对照组比较, 含 HSV-TK 基因的重组腺病毒组和 GCV 组对 Tca 8113 细胞周期的影响不明显($P > 0.05$)。与对照组、含 HSV-TK 基因的腺病毒组和 GCV 组比较, AdCMV HSV-TK/GCV 治疗组 S 期的比率明显上升($P < 0.001$); $G_2 + M$ 期的比率则几乎降为 0($P < 0.001$); G_1/G_0 期的变化不明显($P > 0.05$), 也即治疗后阻滞细胞周期于 S 期。

2.3 细胞凋亡的研究

2.3.1 透射电镜 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; 与对照组比较, HSV-TK/GCV 治疗组可见较多的坏死细胞(图 1)。

表 2 AdCMV HSV-TK/GCV 系统治疗 96 h 对 Tca 8113 细胞周期的影响

Table 2 The changes of cell cycle in Tca 8113 cells after treated with AdCMV HSV-TK/GCV for 96 h (% , $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

	Control	GCV	AdCMV HSV-TK	AdCMV HSV-TK/GCV
G_1/G_0	55.3±0.3	54.1±0.5	55.2±0.6	54.4±1.6
S	36.3±0.2	37.0±0.4	35.8±1.5	45.2±1.7 ¹⁾
G_2+M	8.4±0.3	8.8±0.3	9.0±0.4	0.4±0.4 ¹⁾

1) Compared with control group, $P < 0.001$

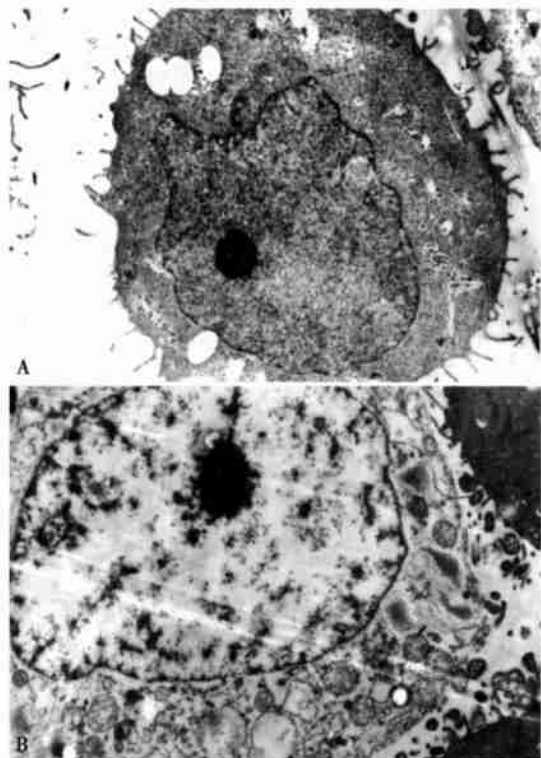


图 1 AdCMV HSV-TK/GCV 治疗 Tca 8113 细胞后透射电镜下细胞超微结构的改变

Fig. 1 The ultrastructural changes of Tca 8113 cells treated with AdCMV HSV-TK/GCV under transmission electronic microscope

A: Control group; B: HSV-TK/GCV-treated group; $\times 4000$

2.3.2 TUNEL 法 对照组细胞凋亡率为 5%, HSV-TK/GCV 系统治疗后细胞凋亡率为 5.7%。两组的凋亡率差异不明显(图 2)。

3 讨论

作者研究已显示 HSV-TK/GCV 系统对转染的口腔鳞癌细胞具有一定的杀伤作用, 杀伤作用具

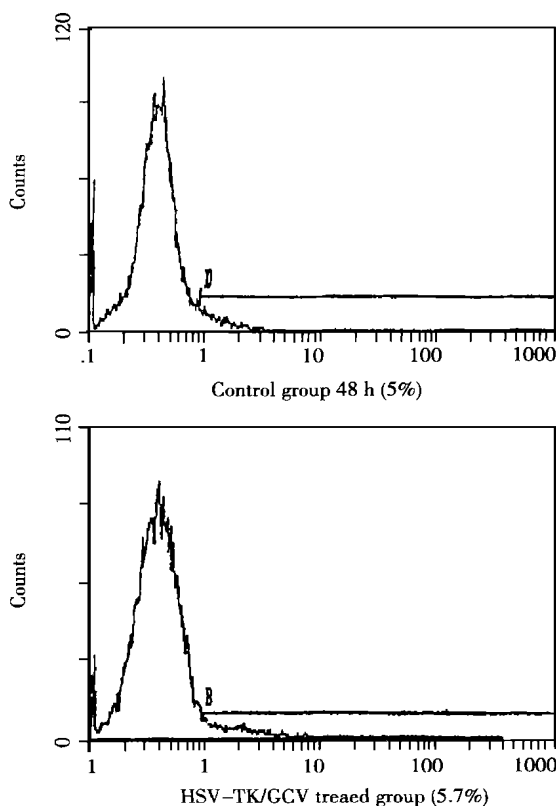


图 2 AdCMV HSV-TK/GCV 治疗 Tca 8113 细胞后 TUNEL 法检测细胞凋亡

Fig. 2 Apoptosis was detected by TUNEL assay in Tca 8113 cells treated with AdCMV HSV-TK/GCV

有时间和 GCV 剂量依赖性, 但该系统的旁观者效应差(另文发表), 因此必须进一步研究其作用机制。

本研究发 现口腔鳞癌细胞经 HSV-TK/GCV 系统治疗后³H-TdR 掺入率下降, 也即 DNA 的合成受抑制, ³H-TdR 掺入率的下降具有 GCV 剂量依赖性, 该结果与体外研究结果相符, 也即 HSV-TK/GCV 系统的细胞毒作用具 GCV 浓度依赖性。研究还发现对照组中³H-TdR 掺入率随着 MOI 的增加而呈上升趋势。许多研究也发现同样的问题^{3,4}, 这可能是 TdR 是 HSV-TK 基因表达酶的良好底物, HSV-TK 可迅速代谢胸苷, 因此修饰的细胞增强了摄取 TdR 的能力。

对肿瘤细胞周期动力学的研究有助于明确抗癌药物的作用机制。许多研究发现^{5,6} HSV-TK/GCV 系统治疗恶性肿瘤后可阻滞细胞周期于 S 期, 然而 Kaneko 等⁷的研究却发现 HSV-TK/GCV 系统治疗肝癌细胞后 G₂ 期上升, 他认为这种

(下转第 59 页 to page 59)

- [2] 何瑶, 胡品津, 何兴祥, 等. 广东地区幽门螺杆菌空泡毒素基因亚型及其与胃肠疾病的关系[J]. 胃肠病学, 2000, 5(2): 72.
- [3] Wee A, The M, Raju G C. Expression of HLA-DR antigen in different histological types of gastric polyp[J]. J Clin Pathol. 1992, 45(6): 509.
- [4] Bodmer W F. The HLA system: structure and function[J]. J Clin Pathol. 1987, 40: 948.
- [5] Wee A, Teh M, Kang J Y. Association of Helicobacter pylori with HLA-DR antigen expression in gastritis[J]. J Clin Pathol. 1992, 45(1): 30.
- [6] Engstrand L, Scheynius A, Pahlson C, et al. Association of cam pylobacter pylori with induced expression of class II transplantation antigens on gastric epithelial cells[J]. Infect Immun. 1989, 57(3): 827.
- [7] Fan X, Crowe S E, Behar S, et al. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of Helicobacter pylori and induction of apoptosis in gastric epithelial cells; a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage[J]. J Exp Med. 1998, 187(10): 1659.
- [8] Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, et al. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive Helicobacter pylori strains[J]. Gut. 1997, 41(4): 442.
- [9] Gunn M C, Stephens J C, Stewart J A D, et al. The significance of cagA and vacA subtypes of Helicobacter pylori in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration[J]. J Clin Pathol. 1998, 51(10): 761.

(编辑 黄小延)

(上接第 55 页 from page 55)

差异的原因可能是使用的细胞株具有 DNA 修复系统效率的差异以及细胞周期循环关卡的功能状态不同。本研究也发现 HSV-TK/GCV 系统治疗 Tca 8113 细胞后, S 期比率显著升高, G₂ + M 期比率下降为 0, G₁/G₀ 期的改变不明显, 因此该系统的杀伤作用具有细胞周期(S 期)特异性。

许多研究认为^[8] HSV-TK/GCV 治疗系统引起的细胞毒与 DNA 损伤诱发的凋亡有关。Li 等^[9] 对乳腺癌的研究发现 HSV-TK/GCV 可激发 p53 非依赖性凋亡。Craperi 等^[5] 研究也显示 HSV-TK/GCV 诱导细胞凋亡不依赖于 p53 和 Bcl-XL 的表达, 但与 BAX 诱导有关, GCV 治疗后可迅速激活 BAX 基因。但本研究对 HSV-TK/GCV 治疗后 Tca 8113 细胞的凋亡进行定性和定量研究均发现该系统并无明显体外诱导细胞凋亡的作用。由于细胞凋亡在旁观者效应中起重要作用^[10], 这可能导致了该系统旁观者效应差。

综上所述, 腺病毒介导的 HSV-TK/GCV 自杀基因系统对口腔鳞癌细胞具有一定的杀伤作用, 该杀伤作用可能与抑制 DNA 合成, 阻滞细胞周期于 S 期有关, 但与细胞凋亡无关。

参考文献:

- [1] Herman J R, Adler H L, Aguilar-Cordova E, et al. In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial[J]. Hum Gen Ther. 1999, 10(7): 1239.
- [2] 许道松, 伍新尧, 钟女奇, 等. 用融合自杀基因“靶向治疗”CEA 阳性肿瘤[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(1): 79.
- [3] 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.
- [4] Rosolen A, Frascelta E, Di-Frascesco C, et al. In vitro and in vivo antitumor effects of retrovirus-mediated herpes simplex thymidine kinase gene transfer in human medulloblastoma[J]. Gene Ther. 1998, 5(1): 113.
- [5] Craperi D, Vicat J M, Nissou M F, et al. Increased bax expression is associated with cell death induced by ganciclovir in a herpes thymidine kinase gene-expressing glioma cell line[J]. Hum Gen Ther. 1999, 10(4): 679.
- [6] Fick J, Barker F G, Dazing P, et al. The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92(24): 11071.
- [7] Kaneko Y, Tsukamoto A. Gene therapy of hepatoma: bystander effects and non-apoptotic cell death induced by thymidine kinase and ganciclovir[J]. Cancer Lett. 1995, 96(1): 105.
- [8] Colombo B M, Benedetti S, Ottolenghi S, et al. The “bystander effect”: association of U-87 cell death with ganciclovir-mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect in athymic mice[J]. Hum Gen Ther. 1995, 6(6): 763.
- [9] Li P X, Ngo D, Brade A M, et al. Differential chemosensitivity of breast cancer cells to ganciclovir treatment following adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer[J]. Cancer Gene Ther. 1999, 6(2): 179.
- [10] Andrade Rozental AF, Rozental R, Hopperstad MG, et al. Gap junctions: the “kiss of death” and “kiss of life”[J]. Brain Res Brain Res Rev. 2000, 32(1): 308.

(编辑 刘清海)