

文章编号:1005-6947(2005)11-0842-05

· 实验研究 ·

# 双自杀基因系统对体内外胆管癌抑制作用的实验研究

董涇青<sup>1</sup>, 马道新<sup>2</sup>, 刘茂玲<sup>1</sup>, 邹声泉<sup>1</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 普通外科, 湖北 武汉 430030; 2. 山东大学齐鲁医院 肿瘤中心, 山东 济南 250012)

**摘要:**目的 观察胞嘧啶脱氨酶基因(CD)和单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV-tk)双杀基因对胆管癌细胞和裸鼠胆管癌移植瘤的抑制作用。方法 在脂质体介导下将质粒pWZLneoCDglytk转入胆管癌QBC939细胞,经G418筛选获得稳定表达双自杀基因的QBC939/CD+tk细胞株,RT-PCR法鉴定CD和tk基因的表达。体外给予前体药物5-氟胞嘧啶(5-Fc)和/或丙氧鸟苷(GCV),作用于QBC939/CD+tk细胞,MTT法测定细胞抑制率。裸鼠皮下注射QBC939/CD+tk细胞,成瘤后腹腔注射前体药物,用药前后测量移植瘤的大小判断疗效。结果 CD和tk基因在QBC939/CD+tk细胞中获得稳定表达。联合5-Fc和GCV与任何单一药物相比,在较小剂量下可产生较强的抑制作用。随着药物浓度的提高,对细胞生长的抑制作用也相应地提高。前体药物对QBC939/CD+tk细胞早期生成的移植瘤抑制作用明显,肿瘤可完全消失,并观察到明显的局部旁观者效应。结论 双自杀基因系统在体内外对胆管癌细胞和裸鼠移植瘤均有明显的抑制效果,旁观者效应也很明显。

**关键词:**胆管肿瘤/药物疗法;基因,肿瘤抑制

**中图分类号:**R735.8; Q343.1 **文献标识码:**A

## Repressing effects of double suicide genes system on human cholangiocarcinoma in vivo and in vitro

DONG Jing-qing<sup>1</sup>, MA Dao-xin<sup>2</sup>, LIU Mao-ling<sup>1</sup>, ZOU Sheng-quan<sup>1</sup>

(1. Department of General Surgery, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Tumor Center, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract: Objective** To investigate the repressing effects of cytosine deaminase (CD) and herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) double suicide genes coexpression system on human cholangiocarcinoma QBC939 cells and QBC939 cells transplanted tumor in nude mice. **Methods** CD and HSV-tk double suicide genes were transferred into QBC939 cells using liposomes. After G418 selection, the positive clones of QBC939/CD+tk cells were picked up and cultured. The expression of CD and HSV-tk genes was confirmed by RT-PCR. In vitro, the QBC939/CD+tk cells were treated with 5-Fc and/or GCV, and the cytotoxicity efficacy was evaluated by microculture tetrazolium test (MTT) method. The QBC939/CD+tk cells were inoculated subcutaneously into nude mice, and when the tumors were palpable, 5-Fc and GCV were injected intraperitoneally, and the volumes of transplanted tumors were measured before and after medication.

**Results** Double suicide genes were stably expressed in QBC939/CD+tk cells. The repressing capability of combination of 5-Fc and GCV on QBC939/CD+tk cells was more effective than that of using either 5-Fc or GCV alone. The increase of cell-repressing was associated with increase the concentration of the prodrug. The repressing effect of combination of the 2 prodrugs on early period of transplantation tumor was obvious,

**基金项目:**国家863高技术研究发展计划资助项目(2002AA214061)。

**收稿日期:**2005-07-26; **修订日期:**2005-08-08。

**作者简介:**董涇青(1974-),男,山东青岛人,华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生,主要从事肝胆胰外科的临床和科研方面的研究。

**通讯作者:**邹声泉 电话:027-83663815(O); E-mail:sqzou@tjh.tjmu.edu.cn。

even complete abolition of tumor was noted, and moreover a marked local bystander effect was observed.

**Conclusions** In vitro and in vivo, the cell-repressing efficacy of double suicide gene system on cholangiocarcinoma cells and the transplanted tumor of nude mice was significant, and the bystander effect was obvious.

**Key words:** Bile Duct Neoplasms/drug ther; Genes, Tumor Suppressor

**CLC number:** R735.8; Q343.1

**Document code:** A

自杀基因治疗成为近年来肿瘤基因治疗的热点,研究显示双自杀基因比单自杀基因对肿瘤有更好的疗效。本研究采用脂质体将双自杀基因胞嘧啶脱氨酶基因(cytosine deaminase, CD)和单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-tk)导入胆管癌细胞,并将稳定转染后的胆管癌细胞注射裸鼠皮下,建立移植瘤模型,应用两种前药5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-Fc)和丙氧鸟苷(Ganciclovir, GCV)进行干预,观察双自杀基因系统在体内外对胆管癌的抑制作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

pWZLneoCDglytk质粒为山东大学齐鲁医院肿瘤中心保存,QBC939细胞由第三军医大学王曙光教授赠送,脂质体为Roche公司产品,胎牛血清、RPMI 1640培养基和Trizol试剂为GIBCO公司产品,MTT,G418和前体药物5-Fc为Sigma公司产品,前体药物GCV为Roch Syntex公司产品,各种限制性核酸内切酶、聚合酶为TOYOBO公司产品,PCR引物由上海生工生物技术公司合成。

### 1.2 质粒提取及酶切鉴定

用Promega质粒大提试剂盒提取质粒pWZLneoCDglytk,分别用BamH I和EcoR I双酶切和BamH I单酶切鉴定,酶切产物进行1%的凝胶电泳。

### 1.3 脂质体转染QBC939细胞,筛选及鉴定

使用脂质体DOSPER Liposomal Transfection Reagent,按照说明书进行转染。转染48h后,在RPMI 1640培养液中加入含G418 800 μg/mL的10%胎牛血清进行筛选培养,出现QBC939/CD + tk细胞克隆后扩大培养。PCR鉴定:应用Trizol试剂提取QBC939/CD + tk细胞的RNA,用RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(Fermentas公司)进行逆转录反应,再进行PCR扩增,扩增产物进行1%凝胶电泳。

### 1.4 前体药物GCV和/或5-Fc对QBC939/CD + tk细胞和QBC939细胞的抑制作用

1.4.1 MTT法测定细胞抑制率 分别取 $10^4$ 个QBC939/CD + tk细胞和QBC939细胞接种于96孔板,QBC939/CD + tk细胞和QBC939细胞各分3组:GCV组,5-Fc组和GCV + 5-Fc组。给予不同浓度的药物(GCV 0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL; 5-Fc 20, 40, 60, 80, 100, 120 μg/mL),以不加药物的QBC939细胞为空白对照孔。MTT法测定吸光度(OD值)。细胞抑制率 = (对照孔OD值 - 实验孔OD值) × 100% / 对照孔OD值。

1.4.2 旁观者效应的检测 按每孔 $10^4$ 个细胞,将QBC939/CD + tk细胞/QBC939细胞按以下比率混合(0:100, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 70:30, 100:0),然后分3组加药:GCV(0.01 μg/mL) + 5-Fc(20 μg/mL)组、GCV(1 μg/mL) + 5-Fc(60 μg/mL)组、GCV(100 μg/mL) + 5-Fc(120 μg/mL)组。MTT法测定吸光度。

### 1.5 前体药物GCV和5-Fc对裸鼠胆管癌移植瘤的抑制作用及旁观者效应

1.5.1 前体药物GCV和5-Fc对裸鼠胆管癌移植瘤的抑制作用 每只裸鼠皮下注射 $2 \times 10^6$ 个QBC939/CD + tk细胞,共12只,接种后4周,分3组加药:GCV(20 mg/kg体重) + 5-Fc(150 mg/kg体重)组,GCV(50 mg/kg体重) + 5-Fc(300 mg/kg体重)组,GCV(100 mg/kg体重) + 5-Fc(600 mg/kg体重)组。对照组每只裸鼠皮下注射 $2 \times 10^6$ 个QBC939细胞,共4只,接种后4周给予GCV(50 mg/kg体重)和5-Fc(300 mg/kg体重)。4组裸鼠均为腹腔注射,连续21d,停药7d观察肿瘤大小。

1.5.2 前体药物GCV和5-Fc对裸鼠胆管癌移植瘤的抑制作用的旁观者效应 将20只裸鼠分5组:A组和D组(对照组)为 $2 \times 10^6$ 个QBC939/CD + tk细胞接种裸鼠右侧背部皮下;B组为 $1 \times 10^6$

个 QBC939/CD + tk 细胞和  $1 \times 10^6$  个 QBC939 细胞混合接种裸鼠右侧背部皮下; C 组为  $2 \times 10^6$  个 QBC939/CD + tk 细胞接种裸鼠左侧背部皮下,  $2 \times 10^6$  个 QBC939 细胞接种裸鼠右侧背部皮下; E 组为  $2 \times 10^6$  个 QBC939 细胞接种裸鼠右侧背部皮下。接种后 2 周, A, B, C, E 组均给予腹腔注射 GCV (50 mg/kg 体重) 和 5-Fc (300 mg/kg 体重) 共 0.2 mL, D 组注射生理盐水 0.2 mL。连续 21 d, 停药 7 d 观察肿瘤大小。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件包进行统计学处理, 组间数据比较采用析因设计的双因素方差分析及非参数检验。

## 2 结果

### 2.1 质粒的酶切鉴定

提取纯化的质粒 pWZLneoCDglytk 用 BamH I 和 EcoR I 双酶切, 酶切产物电泳结果有 3 个条带, 第 1 条带约 5.68 kb (双酶切后的质粒片段), 第 2 条带约 1.28 kb (CD 基因), 第 3 条带约 1.13 kb (tk 基因); 用 BamH I 单酶切所得产物电泳结果有 2 个条带, 第 1 条带约 6.81 kb (单酶切后的质粒片段), 第 2 条带约 1.28 kb (CD 基因), 与双酶切电泳图的第 2 条带平行 (见图 1), 结果证明质粒提取纯化正确。

M: Marker (DL2000); 1: BamH I 和 EcoR I 双酶切产物, 双酶切后的质粒片段、CD 基因和 tk 基因; 2: BamH I 单酶切产物, 单酶切后的质粒片段和 CD 基因

图 1 pWZLneoCDglytk 的 BamH I 和 EcoR I 双酶切和 BamH I 单酶切电泳图

### 2.2 目的基因的整合及鉴定

提取转染有双自杀基因的 QBC939/CD + tk 细胞的 RNA, 经 RT-PCR 反应扩增, 产物进行 1% 凝胶电泳,  $\beta$ -actin 内参条带清晰, 证明 RT-PCR 全过程操作正确, 1.28 kb (CD 基因) 和 1.13 kb (tk 基因) 处各有一阳性条带 (图 2), 说明目的基因已整合入 QBC939/CD + tk 细胞并稳定表达。

M: Marker (Marker II); 1: tk 基因,  $\beta$ -actin (内参); 2: CD 基因,  $\beta$ -actin (内参)

图 2 RT-PCR 鉴定 CD 和 tk 基因在 QBC939/CD + tk 细胞中的表达

### 2.3 前体药物 GCV 和/或 5-Fc 对 QBC939/CD + tk 细胞和 QBC939 细胞的抑制作用

前体药物对于 3 组 QBC939 细胞均无明显抑制作用。QBC939/CD + tk 细胞组中, 单独使用 GCV 组, 在  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  的剂量下细胞抑制率为 51%, 当剂量增加到  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 抑制率为 91%; 单独使用 5-Fc 组,  $60 \mu\text{g}/\text{mL}$  剂量时, 抑制率为 44%, 剂量增加到  $120 \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 抑制率升到 90%; 联合用药组的抑制作用明显增强, 在低浓度 GCV ( $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 5-Fc ( $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的条件下有 59% 的细胞被抑制, 在中浓度 GCV ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 5-Fc ( $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的条件下有高达 86% 的细胞被抑制。QBC939/CD + tk 细胞组中, 联合用药组与两个单独用药组比较, 细胞抑制率明显升高, 差别有显著性 ( $P < 0.05$ )。QBC939/CD + tk 细胞组中, 单独使用 GCV 组和单独使用 5-Fc 组的细胞抑制率相比较, 差别无显著性 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 前体药物 GCV 和/或 5-Fc 对 QBC939/CD + tk 细胞的抑制作用的旁观者效应

对于同一比例混合的细胞, 低浓度 GCV ( $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 5-Fc ( $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组与中浓度 GCV ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 5-Fc ( $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组和高浓度 GCV ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ )

mL) + 5-Fc (120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组相比,前体药物的抑制作用明显减低 ( $P < 0.01$ )。而中浓度和高浓度两组之间相比,抑制作用的差别无显著性 ( $P > 0.05$ )。从中浓度组看,当 QBC939/CD + tk 细胞在混合细胞中所占比例为 5% 时,前体药物对混合细胞的抑制率为 15%; 比例达 20% 时,有 40% 的混合细胞被抑制; 当比例达 50% 时,抑制率可到 85%; 但是当比例超过 50% 以后,前体药物对各组细胞的抑制作用无明显差别。

### 2.5 前体药物 GCV 和 5-Fc 对裸鼠胆管癌移植瘤的抑制作用

实验组和对照组成瘤时间均为 1 周左右,4 周后肿瘤体积约达 400  $\text{mm}^3$ ,在给予前体药物后,实验组生长速度明显减慢,但均未完全消失; 而对照组继续生长。治疗结束后 1 周(第 8 周)与治疗前(第 4 周)相比较,低剂量组与中剂量组和高剂量组相比,差别有显著性 ( $P < 0.05$ ); 中剂量和高剂量组瘤体有不同程度的减小,但两组之间差别无显著性 ( $P > 0.05$ )。

### 2.6 前体药物 GCV 和 5-Fc 对裸鼠胆管癌移植瘤的抑制作用的旁观者效应

A 组(QBC939/CD + tk 细胞)用药后肿瘤逐渐缩小,消失,停药后未见复发,与对照 D 组(停药 1 周体积 1 348  $\text{mm}^3$ ) 和 E 组(停药 1 周体积 1 307  $\text{mm}^3$ ) 均有显著差别 ( $P < 0.01$ )。局部旁观者效应组 B 组在治疗期间生长非常缓慢,停药 1 周的体积为 145  $\text{mm}^3$ ,与 A 组和 D, E 组相比差别有显著性 ( $P < 0.01$ ); 远处旁观者效应组 C 组左侧肿瘤缩小,消失; 右侧继续生长,停药 1 周体积(1 281  $\text{mm}^3$ ) 与对照组差别无显著性 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

胆管癌术前早期确诊率低,手术切除率较低,放、化疗的治疗效果不佳,迫切需要新的治疗方法,基因治疗就成为关注的热点。基因治疗常见方法之一就是自杀基因治疗 (suicide gene therapy), 又称前药敏感基因疗法 (prodrug sensitivity gene therapy), 是将自杀基因导入肿瘤细胞,由自杀基因所编码的酶可以将无毒或低毒的前体药物在肿瘤细胞内代谢为毒性代谢产物,进而抑制肿瘤细胞<sup>[1,2]</sup>。

目前发现的自杀基因中,研究较多的是胞嘧啶脱氨酶基因 (cytosine deaminase, CD) 和单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 (herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-tk)<sup>[3,4]</sup>。CD 基因编码的胞嘧啶脱氨酶将胞嘧啶代谢为尿嘧啶,使 5-Fc 转化为细胞毒性代谢产物 5-Fu,而发挥细胞毒作用<sup>[5]</sup>。HSV-tk 基因编码的胸苷激酶,可以催化核酸类似物代谢为二磷酸核苷衍生物,后者在体内进一步转化为对细胞有明显毒性的三磷酸核苷<sup>[6]</sup>。

本研究用脂质体将双自杀基因转入 QBC939 细胞,经过长期筛选获得 QBC939/CD + tk 细胞。经 RT-PCR 鉴定,双自杀基因 CD 和 HSV-tk 在 QBC939/CD + tk 细胞中稳定表达。证明用阳离子脂质体做载体将外源基因转入肿瘤细胞是安全有效的。

本研究结果显示,在体外实验中,对于未转染自杀基因的 QBC939 胆管癌细胞,使用前药 GCV 和/或 5-Fc 无明显治疗效果; 而对于转染自杀基因后的 QBC939/CD + tk 细胞,单独应用 GCV 或 5-Fc 即可以产生明显的抑制作用; 随着药物浓度的增加,抑制作用也增强。自杀基因的联合应用,对于不同的自杀基因系统来说,不同的酶-前药系统各有特点,HSV-tk/GCV 系统直接抑瘤作用明显,CD/5-Fc 系统旁观者效应突出<sup>[7]</sup>,利用其互补性联合应用,可达到最佳抑瘤效果。Hajri 等<sup>[8]</sup>联合 CD 和 tk 双自杀基因用与胰腺癌的治疗,比单一用药可明显提高治疗效果。本研究的体外实验也显示,联合使用 GCV 和 5-Fc 组比单独使用 GCV 组或 5-Fc 组的细胞抑制率明显提高; 联合使用 GCV 和 5-Fc 组只需要很小的剂量就能达到明显的抑瘤效果; 联合使用 GCV 和 5-Fc 组可以产生明显的旁观者效应。其意义在于只需要将双自杀基因转染少量的胆管癌细胞,就会对临近的胆管癌细胞产生广泛抑制作用,明显扩大双自杀基因的作用,在一定程度上弥补了脂质体转染效率低的缺点。

本研究的体内实验显示,对于 QBC939/CD + tk 细胞接种 2 周所生成的肿瘤,联合应用 GCV 和 5-Fc 连续 3 周腹腔内注射,肿瘤可以完全被抑制甚至消失,停药后无复发,说明双自杀基因体系体内治疗的有效性。但是对于 QBC939/CD + tk 细胞接种

4周所生成的肿瘤,在相同剂量和时间的前药治疗下,虽然使肿瘤的生长受到抑制,但没有使肿瘤完全消失,考虑可能是治疗开始时瘤体已经较大,体内情况较体外复杂,可能存在肿瘤间质细胞的影响等其他因素,前药不能完全作用于全部肿瘤细胞。本实验中,尽管B组肿瘤未完全消失,但生长非常缓慢,说明即使是在免疫缺陷的裸鼠体内,也存在较明显的局部旁观者效应。C组显示对侧(右侧)转染阴性的肿瘤虽然较对照组稍小,但生长减缓并不明显,说明裸鼠体内的远处旁观者效应并不明显。

从体内外实验可以看出CD和HSV-tk双自杀基因共表达系统对QBC939胆管癌细胞及其裸鼠移植瘤有较强的抑制作用和明显的局部旁观者效应,双自杀基因系统与单自杀基因系统相比,前体药物的用量明显减少,大大降低了前体药物的毒副作用,同时也减少了肿瘤细胞对治疗药物的耐药性,为进一步的临床应用奠定一定的实验基础。

#### 参考文献:

[1] 邹声泉. 胆道外科[A]. 见: 邹声泉, 龚建平. 外科学-前沿与争论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 602.

[2] Yazawa K, Fisher WE, Brunnicardi FC. Current progress in sui-

cide gene therapy for cancer [J]. World J Surg, 2002, 26(7): 783-789.

- [3] Brade AM, Szmitko P, Ngo D, *et al.* Heat-directed suicide gene therapy for breast cancer [J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(4): 294-301.
- [4] Misumi M, Suzuki T, Moriuchi S, *et al.* In vitro thymidine kinase/ganciclovir-based suicide gene therapy using replication defective herpes simplex virus-1 against leukemic B-cell malignancies (MCL, HCL, B-CLL) [J]. Leuk Res, 2003, 27(8): 695-699.
- [5] Ueda K, Iwashashi M, Nakamori M, *et al.* Carcinoembryonic antigen-specific suicide gene therapy of cytosine deaminase/5-fluorocytosine enhanced by the cre/loxP system in the orthotopic gastric carcinoma mode [J]. Cancer Res, 2001, 61(16): 6158-6162.
- [6] Park HS, Cheon J, Cho HY, *et al.* In vivo characterization of a prostate-specific antigen promoter-based suicide gene therapy for the treatment of benign prostatic hyperplasia [J]. Gene Ther, 2003, 10(13): 1129-1134.
- [7] Hoganson DK, Batra RK, Olsen JC, *et al.* Comparison of the effects of three different toxin genes and their levels of expression on cell growth and bystander effect in lung adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 1996, 56(6): 1315-1323.
- [8] Hajri A, Wack S, Lehn P, *et al.* Combined suicide gene therapy for pancreatic peritoneal carcinomatosis using BGTG liposomes [J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(1): 16-27.

## 2006 中国实验外科暨肿瘤外科论坛征文通知

为展示我国外科各专业领域近年来的新进展、新成果,中华医学会外科学分会实验外科学组定于2006年4月在石家庄召开中华医学会2006中国实验外科暨肿瘤外科论坛。本次会议将邀请外科学界院士和知名专家作专题演讲。凡参会者均颁发国家继续教育学分证书和中华医学会论文证书。现将征集论文的有关事宜通知如下:

1. 征文内容:(1)外科基础(休克、感染、创伤、移植、营养、监护等)研究;(2)肿瘤外科的临床研究、实验研究;(3)血管、甲状腺、乳腺、肝胆胰脾胃肠、腹壁等的临床研究、实验研究;(4)外科各专业领域的新理论、新技术、新方法;(5)实验动物和动物模型;(6)其他。

2. 征文要求:(1)论文请寄全文及800字以内的摘要各1份(自留底稿)。摘要应包括文题,作者单位,邮编,姓名及论文目的、方法、结果、结论等。无摘要者恕不受理。(2)论文要求科学性强、数据可靠、重点突出、文字精练。论文须由作者所在单位审查盖章同意,并在信封正面注明“会议征文”字样;(3)欢迎在基层医院临床一线工作的外科医师踊跃投稿,介绍解决临床疑难问题的工作经验;(4)征文截稿日期:2005年12月20日;(5)来稿请寄:石家庄市和平西路215号河北医科大学附属第二医院外科吕海涛、张建生医生收;邮政编码:050000,电话:0311-87222283。

中华医学会外科学分会实验外科学组

2005年10月