

转TK基因的人结肠癌细胞对多种原药敏感性的研究*

蒋琼** 戈凯 许德华 郑仲承 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 构建了含有单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV-TK)的重组逆转录病毒载体LTKSN. 经PA317细胞包装后, 感染人结肠癌细胞株LoVo. 用G418筛选到稳定表达HSV-TK基因的细胞克隆LoVo/LTKSN. LoVo/LTKSN与野生型LoVo细胞相比, 生长曲线无明显差异, 细胞形态亦无改变. 细胞毒试验证明LoVo/LTKSN对GCV的敏感性很高, 半杀伤浓度 IC_{50} 为 $0.5\mu\text{mol/L}$, 比野生型细胞提高了4000倍以上. 三种不同的原药GCV, ACV和BVDU对LoVo/LTKSN具有效果不等的杀伤作用. BVDU和GCV联合作用效果更好. 旁杀伤效果十分明显, 低浓度GCV就可以将含10% LoVo/LTKSN的混合细胞中的大部分肿瘤细胞杀死.

关键词: 人结肠癌细胞, HSV-TK基因, 基因治疗

肿瘤基因治疗是目前医学研究领域倍受关注的前沿课题. 单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因HSV-TK及原药GCV系统是最早应用于治疗肿瘤的自杀基因系统^[1]. 我们在细胞水平上进行了人结肠癌基因治疗的实验研究, 发现表达HSV-TK基因的人结肠癌细胞可对几种基本无毒的原药产生高度敏感性而致死. 多种原药联合使用效果更好, 而且这一作用有十分明显的旁杀伤效应.

1 材料和方法

1.1 主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA连接酶、Taq DNA聚合酶购自Promega公司; 总RNA抽提试剂TRIzolTM、基因组DNA抽提试剂DNAzolTM、cDNA合成试剂盒、转染用试剂LipofectAmine、G418购自GIBCO BRL公司, Polybrene、MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)、Thiazyl blue(噻唑蓝)、BVDU(5-(2-bromovinyl)-2'-deoxy-uridine)、ACV(acyclovir, 无环鸟苷)购自Sigma公司, GCV(ganciclovir, 丙氧鸟苷)由Syntex公司惠赠.

1.2 质粒、细胞株 含HSV-TK基因的pBluescript-TK为本组构建, 逆转录病毒载体LXSN, 逆转录病毒包装细胞PA317, 小鼠成纤维细胞株NIH3T3由上海第二医科大学陈诗书教授惠赠. 人结肠癌细胞株LoVo由上海第二医科大学周光炎教授惠赠, 细胞培养于RPM1640+10%小牛血清中.

* 国家“八六三”项目资助课题(863-102-16-05)

** 通讯联系人

收稿日期: 1996-03-18, 修回日期: 1996-07-22

1.3 质粒构建及鉴定 用 EcoR I 和 BamH I 从 pBluescript-TK 质粒中切出含 HSV-TK 基因的片段,克隆入 LXSXN 载体,得到重组逆转录病毒载体 LTKSN. 用酶切鉴定.

1.4 病毒包装、滴度测定及感染人结肠癌细胞 用 Lipofect Amine 将 LTKSN 质粒转染逆转录病毒包装细胞 PA317,经 G418 筛选获得稳定表达株,取细胞培养上清液,测定病毒滴度^[2],并感染培养于含 8 $\mu\text{g/ml}$ polybrene 培养液中的人结肠癌细胞 LoVo,48h 后换用含 200 $\mu\text{g/ml}$ G418 培养液,培养约二星期后,筛选抗性细胞克隆.

1.5 鉴定 TK 基因的整合及表达 (1)分别取 LoVo 和 LoVo/LTKSN 细胞各 5×10^6 个,用试剂 DNAzo 1TM 抽提基因组 DNA 作为模板,用 TK 基因 5' 端和 3' 端引物进行 PCR;(2)分别取 LoVo 和 LoVo/LTKSN 细胞各 2×10^6 个,用 TRIzo 1TM 抽提总 RNA,用 cDNA 合成试剂盒以 Oligo(dT) 为引物合成 cDNA 第一条链,并以此为模板,进行 PCR 反应. 此外,以 pBlue-script-TK 为模板在同样条件下进行 PCR 反应,作为阳性对照. PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环.

TK 基因 5' 端引物:GCG CGT ATG GCT TCG TAC CC

TK 基因 3' 端引物:TCC TTA CGT GTT TCA GFT AGC CTC

1.6 细胞形态观察 将 LoVo 和 LoVo/LTKSN 细胞分为两组,一组加 5 $\mu\text{mol/L}$ GCV,一组不加,培养 72 h 后,分别于相差显微镜下和电镜下观察其形态变化.

1.7 细胞生长曲线的测定 MTT 法^[3],以培养天数为横坐标,578 nm 波长下的吸光度为纵坐标,绘成曲线.

1.8 比较 LoVo 和 LoVo/LTKSN 细胞对不同原药的敏感性 MTT 法测定 GCV、ACV 和 BV-DU 对 LoVo 及 LoVo/LTKSN 细胞的半杀伤浓度 IC_{50} .

1.9 BV-DU 和 GCV 联合使用 选择 BV-DU 浓度为 0.03 $\mu\text{mol/L}$,分别与不同浓度的 GCV 混合,MTT 法测定此时 GCV 对 LoVo/LTKSN 的半杀伤浓度.

1.10 旁杀伤实验 将 LoVo/LTKSN 细胞和野生型 LoVo 细胞混合后铺 96 孔板;比例分别为 0 : 100,1 : 99,3 : 97,10 : 90,33 : 67,50 : 50 和 100 : 0. 各设两组,一组加 20 $\mu\text{mol/L}$ GCV,一组不加,6 d 后,用 MTT 法测定活细胞数.

2 结 果

2.1 TK 基因整合及表达的鉴定 重组逆转录病毒载体 LTKSN 经酶切鉴定构建正确. 用 PA317 包装后,重组病毒滴度为 1×10^5 cfu/ml. 将病毒感染 LoVo 细胞并用 G418 长期筛选得到稳定的转基因细胞克隆 LoVo/LTKSN. 以 LoVo/LTKSN 细胞基因组 DNA 及以 cDNA 为模板的 PCR 反应都得到 TK 基因片段(Fig. 1a,1b),说明 HSV-TK 基因已整合入 LoVo 细胞并表达. 在相同条件下,以 LoVo 基因组 DNA 和 cDNA 为模板的 PCR 反应未见产物,说明 LoVo 细胞本身并不含有 HSV-TK 基因.

2.2 形态比较 如 Fig. 2a, Fig. 2b 所示,在正常培养条件下,LoVo 和 LoVo/LTKSN 细胞基本无区别;在 20 $\mu\text{mol/L}$ GCV 存在时,LoVo 形态无明显改变(Fig. 2c),而 LoVo/LTKSN 细胞形态却发生明显改变,细胞整体轮廓模糊,细胞膜变形,呈树枝突起,细胞内出现很多颗粒状物质及空泡,细胞间出现丝状纤维,并有细胞碎片出现(Fig. 2d).

2.3 生长曲线比较 由 Fig. 3 看出,LoVo 与 LoVo/LTKSN 细胞具有相似的生长曲线,说明 HSV-TK 基因的导入对人结肠癌细胞株 LoVo 的生长能力并无明显影响.

2.4 GCV, ACV 和 BV-DU 对 LoVo 及 LoVo/LTKSN 细胞杀伤的 IC_{50} 比较 如 Fig. 4a 所示,

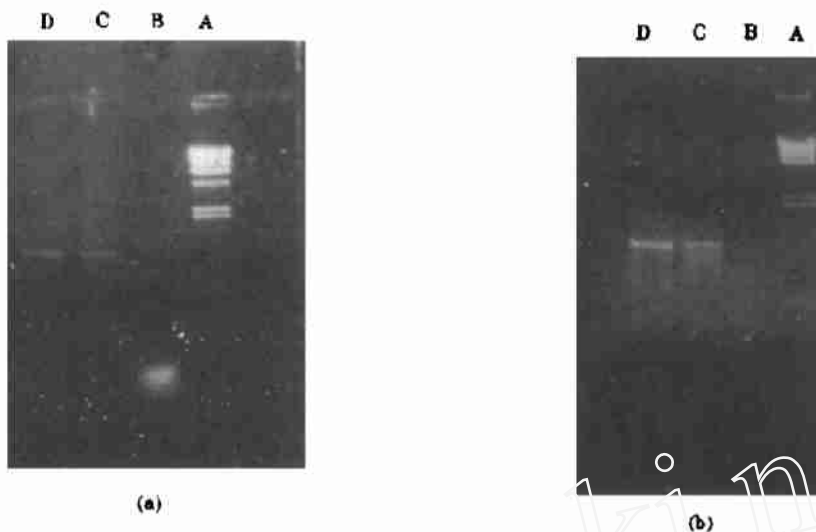


Fig. 1 Identification of the integration and expression of *TK* gene

(a) Identification of the integration of *TK* gene

- A: Lambda DNA(Hind III)
- B: PCR products using LoVo genomic DNA as template
- C: PCR products using LoVo/LTKSN genomic DNA as template
- D: PCR pro/acti using pBluescript-*TK* plasmid DNA as template

(b) Identification of the expression of *TK* gene

- A: Lambda DNA (Hind III)
- B: RT-PCR products using LoVo cDNA as template
- C: RT-PCR products using LoVo/LTKSN cDNA as template
- D: PCR products using pbluescript-*TK* plasmid DNA as template

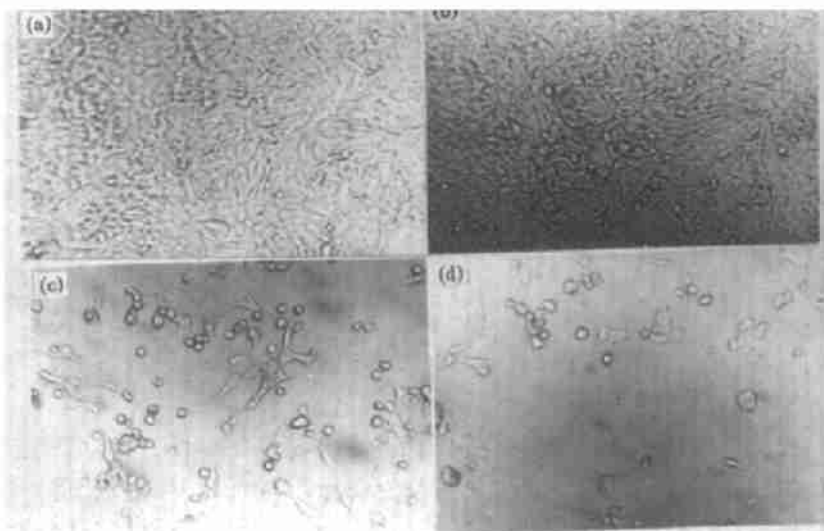


Fig. 2 The morphology of LoVo and LoVo/LTKSN cells(Phase-contrast microscope photos)

- (a)LoVo cells (b)LoVo/LTKSN cells
- (c)LoVo cells ,treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ GCV for 3 days
- (d)LoVo/LTKSN cells , treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ GCV for 3 days

GCV 对 LoVo 的 $IC_{50} > 2000 \mu\text{mol/L}$, 而 LoVo/LTKSN 的 IC_{50} 为 $0.5 \mu\text{mol/L}$, HSV-TK 基因的导入使 LoVo 细胞对 GCV 的敏感性提高了 4000 倍以上, 差异非常明显. ACV 对 LoVo 的 IC_{50} 浓度约为 $1400 \mu\text{mol/L}$, 对 LoVo/LTKSN 的半杀伤浓度为 $6.8 \mu\text{mol/L}$, 敏感性提高 200 多倍 (Fig. 4b). BVDU 对 LoVo/LTKSN 的半杀伤浓度很低, 约为 $0.13 \mu\text{mol/L}$. 随着浓度的升高, BVDU 对 LoVo/LTKSN 杀伤更多, 但当浓度到达 $3 \mu\text{mol/L}$ 以上, 杀伤的细胞不再增多 (Fig. 4c).

2.5 BVDU 与 GCV 联合使用 如 Fig. 5 所示, 在

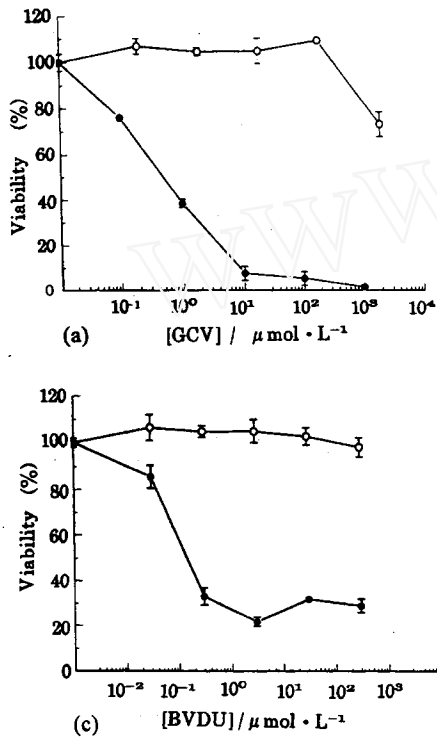


Fig. 3 Growth curve of LoVo and LoVo/LTKSN cells
●—● LoVo/LTKSN; ○—○ LoVo

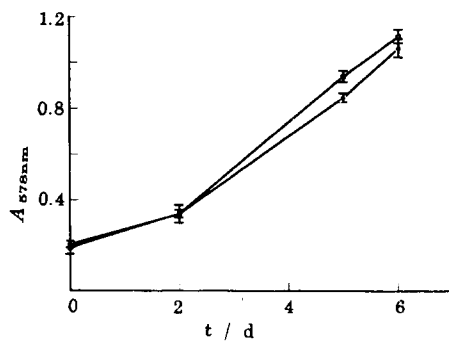


Fig. 4 Fifty% growth inhibitory concentration of different drugs for LoVo and LoVo/LTKSN cells
(a)GCV (b)ACV (c)BVKU
●—● LoVo/LTKSN; ○—○ LoVo

BVDU 浓度为 $0.03 \mu\text{mol/L}$ 时, GCV 对 LoVo/LTKSN 的半杀伤浓度降低了 2.5 倍, 由原来的 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 降为 $0.2 \mu\text{mol/L}$, 说明 BVDU 和 GCV 联合使用效果更好.

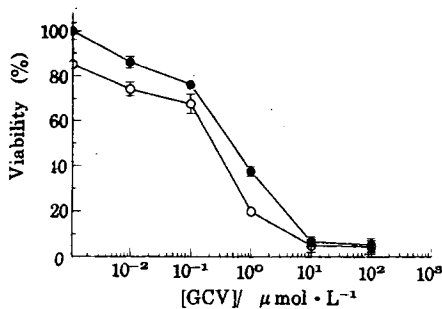


Fig. 5 Relative survival of LoVo and LoVo/LTKSN cells in the presence of BVDU and GCV
●—● GCV; ○—○ GCV+BVDU

2.6 测定 LoVo/LTKSN 的旁杀伤效应 Fig. 6

所示,在低浓度 GCV 存在时,仅有 10% 的 LoVo/LTKSN 细胞就能有效杀死大部分与之混合的肿瘤细胞,表明这个体系具有很好的旁杀伤效应。

3 讨 论

单纯疱疹病毒的胸苷激酶 HSV-TK 可以催化核苷类似物 GCV, ACV 和 BVDU 等原药的磷酸化,而哺乳动物的 TK 酶则不能。正常情况下, GCV, ACV 和 BVDU 等对哺乳动物细胞无明显的毒性,而磷酸化的原药在很低浓度下就有明显的细胞毒性。因此,将 HSV-TK 基因转入肿瘤细胞,使之对基本无毒的原药产生高度敏感性,从而产生自杀效应^[4]。美国 FDA 已经批准将这种系统用于恶性肿瘤的基因治疗试验。

结/直肠癌是常见的恶性肿瘤,而且很多会发生肝转移,在经济发达国家中已是致死率为第 1 或 2 位的恶性内脏肿瘤。在我国,结/直肠癌的发病率与死亡率也有上升趋势,因而引起人们普遍的关注^[5]。

本工作在细胞水平上探讨了利用 HSV-TK/GCV 系统进行人结肠癌基因治疗的可能性。我们观察到 HSV-TK 基因的导入对 LoVo 细胞的形态,体外生长能力均无明显影响。但使 LoVo 细胞对原药 GCV 的敏感性明显提高($IC_{50} = 0.5 \mu\text{mol/L}$),与野生型 LoVo 细胞相比($IC_{50} > 2000 \mu\text{mol/L}$)提高了 4000 倍以上。

在低浓度 GCV 存在时, LoVo/LTKSN 细胞已有明显的自杀效应。相差显微镜观察,已有不少细胞死亡。电镜照片上,可清楚看到细胞核发生了很大的变化(结果未给出),这可能是 GCV 磷酸化后参入 DNA 合成途径,阻断 DNA 合成引起的现象。

逆转录病毒感染细胞的效率不高,这一直是其在基因治疗中应用受到限制的一个重要因素。推而言之,基因治疗技术应用面临的一个主要障碍就是细胞转基因效率太低。这对肿瘤治疗更加突出,因为未被转染的肿瘤细胞就成为肿瘤复发的危险来源,使肿瘤基因治疗的效果不好,妨碍这种技术的应用。利用自杀基因的旁杀伤作用就可能克服这个缺点,促进肿瘤基因治疗的研究与应用。我们的实验证明,将 LoVo/LTKSN 细胞与野生型 LoVo 细胞以 10:90 的比例混合,低浓度 GCV 就能有效地杀死大多数肿瘤细胞,提示即使基因转入肿瘤细胞效率不是很高,亦有可能达到理想的治疗效果。

GCV 与 BVDU 联合使用还未见报道。这两者联合使用,绝不等于两种毒性物质作用的简单叠加。正如 Fig. 4 所示,单独用 BVDU 时,对 LoVo/LTKSN 的 IC_{50} 很低,为 $0.13 \mu\text{mol/L}$,说明此时已有很好的细胞毒作用,但其浓度增到 $3 \mu\text{mol/L}$ 后杀伤作用不再增加,因此不能全部杀死肿瘤细胞。因此我们设想以低浓度 BVDU 为基础,辅以随浓度升高杀伤作用亦增加的 GCV,可能有更好的作用。结果表明,在 BVDU 为 $0.03 \mu\text{mol/L}$ 时(这时它对 LoVo/LTKSN 的杀伤作用不大),若加入 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 的 GCV(低于 IC_{50} 时的用量,)就有相当于 $0.5 \mu\text{mol/L}$ GCV 时的杀伤作用。这说明 GCV 和 BVDU 联合使用的产物对肿瘤细胞的杀伤远大于两个原

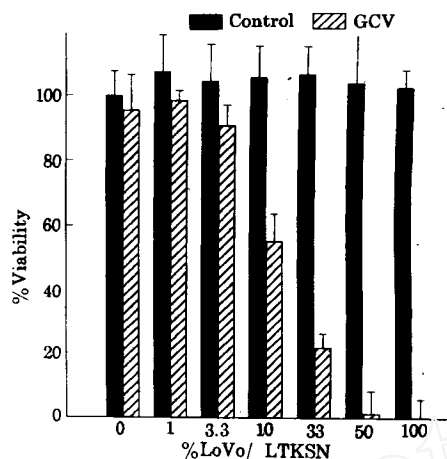


Fig. 6 In vitro neighbor cell killing

LoVo/LTKSN and LoVo cells were mixed at the ratios: 0 : 100 : 1 : 99.3 : 97.10 : 90.33 : 67.50 : 50, 100 : 0

药单独代谢的作用. 这可能与 BVDU 和 GCV 有不同细胞抑制作用机制有关, BVDU 的代谢物产物作用于胸苷酸合成酶, 而 GCV 的产物对 DNA 聚合酶起作用^[6]. 因此几种原药联合使用, 可以使每种药的用量都大大减少, 不仅减少了毒副作用, 而且提高了疗效. 加之, 利用逆转录病毒只感染分裂期的细胞和原药代谢产物对转基因细胞的毒性作用, 合用这些原药可以更有效地选择性杀伤肿瘤细胞.

在临床上, 20 $\mu\text{mol/L}$ GCV 为生理上可接受的血药浓度, 对人体基本无毒性, 而在图 4a 中, LoVo/LTKSN 的 IC_{50} 为 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$ GCV 可使大多数细胞死亡, 提示 HSV-TK/GCV 系统在肠癌治疗中的应用有着潜在临床价值^[7].

参 考 文 献

- 1 Moolten F L, *et al. Cancer Res*, 1986, **46**:5276~5281
- 2 Kotani, H, *et al. Hum Gene Ther*, 1994, **5**:19~28
- 3 李秀森. 免疫学杂志, 1992, **8**:67
- 4 Culver K W, *et al. Science* (Washington DC), 1992, **256**:1550~1552
- 5 汤钊猷, 等. 现代肿瘤学, 第 1 版, 上海: 上海医科大学出版社, 1993
- 6 Balzarini J, *et al. J Bio Chem*, 1993, **268**:6332~6337
- 7 Paul S, Dummer S. *Am J Med Sci*, 1992, **304**:272

Human Colon Carcinoma Cells Transduced with TK Gene were Sensitive to Several Prodrugs

Jiang Qiong Ge Kai Xu De-Hua Zheng Zhong-Cheng Liu Xin-Yuan
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract Recombinant retroviral vector LTKSN containing herpes simplex virus thymidine kinase gene was constructed. After packaging into PA317 cell line, infectious particles were used to infect human colon carcinoma cell line LoVo. Single clone harbouring HSV-TK gene was picked after G418 selection. There was no significant difference in cell growth curve or morphology between the LoVo/LTKSN and the wild type cells. But LoVo/LTKSN became 4 000 times more sensitive to the cytotoxicity of GCV ($IC_{50}=0.5 \mu\text{mol/L}$) than LoVo. The three prodrugs GCV, ACV, BVDU when used separately showed different effect on LoVo/LTKSN and the combination of BVDU with GCV showed better effect. When LoVo/LTKSN cells were mixed with wild type LoVo cells at a ratio of 10 : 90, significant bystander effect was observed *in vitro* after they were treated with nontoxic levels of GCV.

Key words: Human colon carcinoma cell, HSV-TK gene, Gene therapy