

· 专栏论著 ·

腺病毒介导 CD/5-FC 系统治疗舌癌的实验研究

王安训 黄洪章

摘要 目的:探讨胞嘧啶脱氨酶基因/5-氟胞嘧啶(CD/5-FC)自杀基因治疗系统对舌癌细胞株的治疗效果。方法:应用透射电镜、RT-PCR检测含CD基因的重组腺病毒(AdCMVCD)对舌癌细胞株 Tca8113的转染及表达情况,MTT法检测 AdCMVCD/5-FC系统对舌癌细胞的杀伤作用及旁观者效应,FCM检测该系统对舌癌细胞周期的影响。结果:AdCMVCD可转染入舌癌细胞的胞核并表达CD基因;AdCMVCD/5-FC系统对舌癌细胞具有强杀伤作用和旁观者效应;FCM检测结果显示舌癌细胞S期比率显著升高($P < 0.001$),G₂+M期比率下降为0($P < 0.001$),G₁/G₀期的改变不明显($P > 0.05$)。结论:AdCMVCD/5-FC自杀基因系统对舌癌细胞株具有强的杀伤作用,杀伤作用具有细胞周期(S期)特异性。

关键词 自杀基因 胞嘧啶脱氨酶基因 基因治疗 舌肿瘤 腺病毒

A Study of Adenovirus-mediated Cytosine Deaminase/5-Fluorocytosine Suicide Gene System in the Treatment of Tongue Carcinoma Cells

Wang Anxun

Department of Oral Maxillofacial Surgery,
the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences

Huang Hongzhang

Department of Oral Maxillofacial Surgery,
the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences

Abstract

Objective: The purpose of this investigation was to study the effects of replication-defective recombinant adenovirus-mediated cytosine deaminase (AdCMVCD)/5-fluorocytosine (5-FC) suicide gene system on tongue carcinoma cells. **Methods:** AdCMVCD was propagated in 293 tongue carcinoma cells, purified by cesium chloride gradient and titrated using tissue culture infectious doses-50 (TCID₅₀). Transmission electron microscope was used to observe the adenovirus transferred into tongue carcinoma cells (Tca8113 cell line), and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect the expression of CD after infection of Tca8113 cells. The killing effects and bystander effects of AdCMVCD/5-FC system on tongue carcinoma cells were evaluated using MTT assay. The changes of cell cycles after treated with AdCMVCD/5-FC system were monitored with the flow cytometry (FCM). **Results:** The titration of adenovirus (AdCMVCD) was 6.3×10^9 /ml plaque forming units (PFUs). Under the transmission electron microscope, the adenoviral particles were found in the nucleus of tongue carcinoma cells. The recombinant adenovirus expressed CD after infection of Tca8113 cells in vitro. AdCMVCD/5-FC had strong killing-effects on Tca8113 cells, and these effects were 5-FC dose-dependent. The maximum killing efficacy was 97%. The bystander effect of this system in Tca8113 cells was good. 58% of cells were killed only when 12.5% of cells were infected with AdCMVCD. Compared with the control groups, the cell treated by the AdCMVCD/5-FC accumulated in the S phase of the cell cycle ($P < 0.001$) and dropped to zero in the G₂+M phase ($P < 0.001$) and didn't change in the G₁/G₀ phase ($P > 0.05$). **Conclusion:** The killing effects and the bystander effects of AdCMVCD/5-FC system on tongue carcinoma cells are satisfying, and the AdCMVCD/5-FC system targeted on tongue carcinoma cells in the S phase.

Key words: suicide gene cytosine deaminase gene therapy tongue tumor adenovirus

本课题为中山医科大学“211工程”基金(编号99074)和中山医科大学基金(编号072014)资助项目

作者单位:510080 中山大学附属第一医院口腔颌面外科(王安训),中山大学附属第二医院口腔颌面外科(黄洪章)

自1992年Austin等¹将大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)基因用作自杀基因进行恶性肿瘤基因治疗以来,胞嘧啶脱氨酶基因/5-氟

胞嘧啶 (cytosine deaminase/5-fluorocytosine, CD/5-FC) 自杀基因治疗系统在多种恶性肿瘤的基因治疗研究中显示强的杀伤作用²。目前该系统在舌癌治疗中的研究作者未查见报道。本研究用含 CMV 启动子和 CD 基因的复制缺陷型腺病毒 (AdCMVCD) 感染舌癌细胞株 Tca8113, 观察 AdCMVCD/5-FC 自杀基因治疗系统对舌癌细胞株的治疗效果, 并初步探讨其治疗机理。

1 材料和方法

1.1 材料

AdCMVCD 病毒上清液 (许德华教授提供), 5-氟胞嘧啶 (5-FC), MTT (Sigma 公司, 美国), DNA 及总 RNA 抽提试剂 (Life Technologies 公司, 美国), 人胚肾细胞株 293 细胞 (曾益新教授惠赠) 及舌癌细胞株 (Tca8113, 何荣根教授惠赠) 均在含 10% 新生牛血清 (Gibco 公司, 美国), 1×10^5 u/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养基 (Gibco 公司, 美国) 中培养。

1.2 方法

1.2.1 AdCMVCD 的扩增、纯化及滴度测定 将 AdCMVCD 病毒在人胚肾细胞株 293 细胞中扩增, 氯化铯 (CsCl) 密度梯度超离心法纯化, 以含 10% 甘油的透析液透析, 并用 TCID₅₀ 法 (tissue culture infectious dose₅₀) 测定纯化病毒的滴度 (T), $T = 10^{1+d(S0.5)-0.7}$ PFU/ml (空斑形成单位 plaque forming unit, PFU), d 为稀释倍数的对数, S 为各稀释度的病变率的总和。

1.2.2 AdCMVCD 对 Tca8113 细胞的转染 用感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 20 的重组腺病毒 AdCMVCD 感染 Tca8113 细胞 (MOI 是指每个细胞感染的病毒数量, 其计算方法为: 病毒滴度/细胞数), 24 h 后消化离心收集细胞, 2.5% 戊二醛固定液 4 固定 2~6 h; 1% 锇酸固定 1~2 h; 常规乙醇脱水; LR White 树脂 (Polysciences inc, 美国) 渗透包埋, 56 聚合 24~36 h; 超薄切片, 铀铅双染; 用透射电镜观察重组腺病毒对 Tca8113 细胞的转染情况。

1.2.3 CD 基因在舌癌细胞中的表达 用 TRzol 抽提经 AdCMVCD (MOI 20) 转染 48 h 的 Tca8113 细胞的总 RNA, 以寡核苷酸 (dT) 为随机引物合成 cDNA, 然后以此为模板, 用 CD 基因的 5 和 3 端引物进行 PCR 检测。PCR 反应条件: 94 1 min, 50 1 min, 72 1 min, 30 个循环。

5 端引物 5' ATAGAATTCAGCCTAACAAATGICGAATAACGCTT3',

3 端引物 5' TATGGATCCTCAACGTTTCTAATCGATGGCTT3'。

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 目的基因片段的长度为 1.4 kb。以 AdCMVCD 感染的 Tca8113 细胞抽提的 DNA 为模板的 PCR 产物作为阴性对照; AdCMVCD 感染的

Tca8113 细胞抽提的 DNA 为模板的 PCR 产物作阳性对照。

1.2.4 AdCMVCD/5-FC 系统对舌癌细胞株的杀伤作用

Tca8113 细胞以 10^3 个细胞/孔接种于 96 孔板, 24 h 后用 MOI 分别为 0、1、10、20、40、50 的 AdCMVCD 病毒转染, 24 h 后分别加入浓度为 0、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} mol/L 的 5-FC, 培养 5 d 后用 MTT 法检测并计算细胞存活率 (细胞存活率 = 实验组 OD 值/对照组 OD 值)。

1.2.5 AdCMVCD/5-FC 系统对舌癌细胞株的旁观者效应

Tca8113 细胞用 MOI 为 60 的 AdCMVCD 病毒感染 24 h 后, 实验组和对照组均将感染和未感染的 Tca8113 细胞以不同比例 (0、1/8 ~ 6/8、8/8) 混合接种于 96 孔板 (2×10^3 个细胞/孔), 24 h 后实验组加入 10^{-3} mol/L 5-FC, 对照组不加 5-FC, 培养 5 d 后用 MTT 法检测并计算两组细胞存活率, 细胞存活率 = 该组 OD 值/空白对照组 OD 值, 空白对照组为转染和未转染比例为 0 且不加 5-FC 培养的组别。

1.2.6 AdCMVCD/5-FC 系统对舌癌细胞周期的影响

该部分实验分 4 组: 空白对照组, AdCMVCD 组, 5-FC 组, AdCMVCD/5-FC 组。将 Tca 8113 细胞接种于 25 ml 培养瓶, 24 h 后在第 1 组加入 MOI 30 的 AdCMVCD; 24 h 后第 2、3 组去培养液, 加入含 10^{-3} mol/L 的 5-FC 的培养液, 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 固定过夜, 离心去乙醇, PBS 洗 2 次; 加入 1 g/L 的 RNase 200 μ l, 37 1 h, 离心去 RNase; 加入碘化丙啶 (PI) 800 μ l 染色 30 min; 流式细胞仪 (FCM) 检测, 从 DNA 含量直方图分析得到细胞周期各时相的百分比。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 8.0 统计软件对各治疗组细胞周期的改变进行统计学分析, 各治疗组间细胞周期的比例比较采用单因素方差分析和最小显著差法 (LSD) 分析。

2 结果

2.1 AdCMVCD 的滴度及对 Tca8113 细胞的转染

纯化后重组腺病毒 AdCMVCD 的滴度约为 6.3×10^9 PFU/ml。舌癌细胞经 AdCMVCD 转染后, 舌癌细胞的胞核中可发现病毒颗粒存在 (图 1)。

2.2 CD 基因在舌癌细胞中的表达

用 RT-PCR 法检测的经 AdCMVCD 转染的 Tca8113 细胞的总 RNA 中, 可检测到约 1.4 kb 的 CD 基因扩增产物 (图 2)。

2.3 AdCMVCD/5-FC 系统对舌癌细胞株的杀伤作用和旁观者效应

经不同 MOI 的 AdCMVCD 和不同浓度的 5-FC 作用 Tca8113 细胞 5 d 后细胞存活率如图 3。当 MOI 10 时 AdCMVCD/5-FC 系统即产生明显的杀伤作用, 细胞存活率随着 5-FC 浓度的升高显著下

降,当 MOI 为 50,5-FC 为 10^{-3} ml/L 时细胞的存活率仅为 3%。

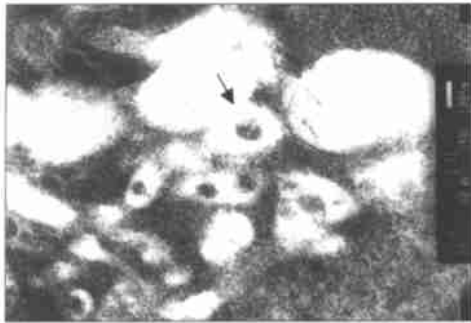


图 1 AdCMVCD 转染 Tca8113 细胞后,舌癌细胞的胞核中可见圆球形病毒颗粒存在 透射电镜 $\times 50000$

Fig 1 There were many round-like viral particles in the nucleus of Tca8113 cells after infected with AdCMVCD transmission electron microscope $\times 50000$

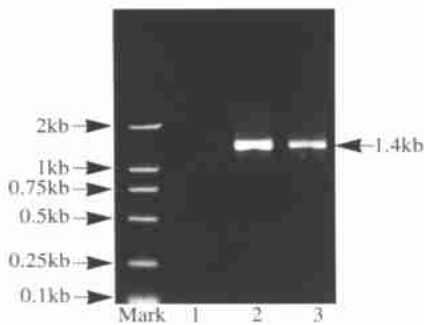


图 2 RT-PCR 法检测 CD 基因在舌癌细胞中的表达
1 阴性对照;2 阳性对照;3 以 Tca8113/AdCMVCD 抽提的 cDNA 为模板的 RT-PCR 产物

Fig 2 Identification of the expression of CD by RT-PCR
1 negative control;2 positive control;3 RT-PCR products using Tca8113/AdCMVCD cDNA as template

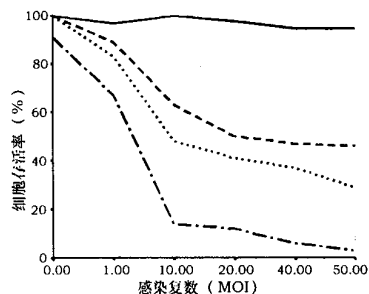


图 3 AdCMVCD/5-FC 系统对舌癌细胞株的杀伤作用(治疗 5 d)

Fig 3 The killing effect of AdCMVCD/5-FC on Tca8113 cells for 5 days

— Control; - - - 5-FC: 10^{-5} ml/L
.....5-FC: 10^{-4} ml/L; - · - 5-FC: 10^{-3} ml/L

AdCMVCD/5-FC 系统对舌癌细胞株的旁观者效应见图 4。从图 4 可见:12.5%的细胞转染即可杀伤 58%的舌癌细胞,25%的细胞转染可杀伤 71%的舌癌细胞。

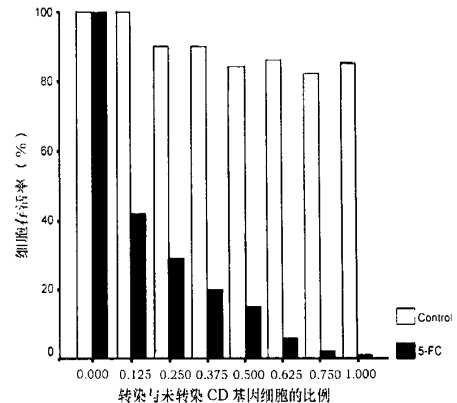


图 4 AdCMVCD/5-FC 系统对舌癌细胞株的旁观者效应

Fig 4 The bystander effect of AdCMVCD/5-FC in Tca8113 cells

2.4 FCM 检测 AdCMVCD/5-FC 系统对舌癌细胞周期的影响

Tca 8113 细胞经 AdCMVCD/5-FC 处理 96 h 后细胞周期变化如表 1。与对照组比较,AdCMVCD 组和 5-FC 组对 Tca 8113 细胞周期的影响不明显 ($P > 0.05$)。与对照组、AdCMVCD 组和 5-FC 组比较,AdCMVCD/5-FC 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 ($P > 0.05$),也即治疗后舌癌细胞被阻滞于 S 期。

表 1 AdCMVCD/5-FC 系统治疗 96 h 对 Tca8113 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab 1 The changes of cell cycle in Tca8113 cells after treated with AdCMVCD/5-FC for 96 h

组别	G_1/G_0	$G_2 + M$	S
对照组	55.30 \pm 1.18	8.93 \pm 0.76	35.76 \pm 1.47
5-FC 组	54.77 \pm 0.74	9.77 \pm 0.50	35.47 \pm 0.93
AdCMVCD 组	54.87 \pm 1.16	9.86 \pm 0.81	35.26 \pm 0.45
AdCMVCD/5-FC 组	56.87 \pm 1.85	0.00 \pm 0.00 *	43.13 \pm 1.85 *

*与对照组比较 $P < 0.01$

3 讨 论

5-氟尿嘧啶 (5-FU) 对舌癌具有较高的杀伤作用,单药有效率约 20%,5-FU 联合顺铂方案治疗头颈部肿瘤有效率达 80%左右³。作者应用 MTT 法

检测也发现 5-FU 对舌癌细胞株具有强的杀伤作用,作用 4 d 时其 IC_{50} 为 2.33×10^{-6} mol/L (另文发表)。AdCMVCD/5-FC 自杀基因治疗系统通过把 CD 基因导入肿瘤细胞,可将无毒的前体药物 5-FC 代谢成具细胞毒的 5-FU,5-FU 再代谢为 5-氟尿苷酸(5-FUTP)和 5-氟脱氧尿苷酸(5-FdUMP),分别抑制 RNA 的功能和抑制胸苷合酶(thymidylate synthase)的活性,最终导致细胞死亡⁴。因此可将 AdCMVCD/5-FC 系统用于治疗舌癌。本研究发现 AdCMVCD/5-FC 系统对舌癌细胞的杀伤作用呈 5-FC 浓度依赖性,当 MOI 10 时 AdCMVCD/5-FC 系统即产生明显的杀伤作用,细胞存活率随着 5-FC 浓度的升高显著下降,在本实验中其最大的杀伤率可达 97%。

由于基因的转染通常达不到 100%,在以腺病毒为载体的同类研究中均以大部分细胞被转染作为转染细胞进行旁观者效应的研究。本研究以 MOI 60 的 AdCMVCD 转染 Tca8113 细胞研究旁观者效应,该重组腺病毒对舌癌细胞的转染率约 70%左右⁵。旁观者效应(bystander effect)是指在自杀基因治疗时除了转染的细胞可被杀伤外,与转染细胞相邻近的未转染细胞也可被杀伤,由于基因治疗时转染率达不到 100%,因此旁观者效应在自杀基因系统的杀伤作用中非常重要。旁观者效应在很大程度上依赖于细胞间的间隙连接⁶,然而舌癌细胞中缺乏间隙连接⁷,这就导致利用胸苷激酶基因/丙氧鸟苷系统治疗舌癌时差的旁观者效应⁵。由于 5-FC 和 5-FU 均为小分子,能通过被动扩散自由进出细胞,当 5-FU 形成时,它易于从一个细胞进入另一细胞,因此利用 AdCMVCD/5-FC 治疗时的旁观者效应不需要间隙连接⁸,这克服了舌癌细胞缺乏间隙连接的缺点,本研究也可观察到 AdCMVCD/5-FC 系统治疗舌癌细胞时强的旁观者效应。

5-FU 为细胞周期(S 期)特异性化疗药物,FCM 检测发现 AdCMVCD/5-FC 系统治疗 Tca8113 细胞后,细胞周期阻断于 S 期, $G_2 + M$ 期则降为 0,也即细胞的有丝分裂基本停止,这从另一方面证明该系统是通过产生 5-FU 而起作用。

载体系统是影响基因治疗效率的关键因素,现阶段基因治疗采用的载体系统主要有腺病毒和逆转录病毒、脂质体等载体。不同的载体系统其转基

因效率差异大,重组腺病毒具有滴度高、转基因效率高、无整合突变的优点。本研究通过透射电镜和 RT-PCR 检测均证实应用含 CMV 启动子的重组腺病毒可很好地转染舌癌细胞并表达目的基因。

综上所述 AdCMVCD/5-FC 系统对 Tca8113 细胞株具有强的杀伤作用和旁观者效应,由于在哺乳动物细胞中不存在 CD 基因,5-FC 的毒性小,因此 AdCMVCD/5-FC 具有较高的临床价值⁹,可望成为舌癌治疗的新途径。

参考文献

- 1 Austin EA, Huber BE. A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing and expression of Escherichia coli cytosine deaminase. *Mol Pharmacol*, 1993,43(3): 380~387
- 2 Topf N, Worgall S, Hackett NR, et al. Regional pro-drug gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene Therapy*, 1998,5(5): 507~513
- 3 Dreyfuss AI, Clark JR, Wright JE, et al. Continuous infusion high-dose leucovorin with 5-fluorouracil and cisplatin for untreated stage carcinoma of the head and neck. *Ann Intern Med*, 1990,112(3): 167~172
- 4 Uckert W, Kammertons T, Haack K, et al. Double suicide gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells in vivo. *Hum Gene Ther*, 1998,9(6): 855~865
- 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. *中华口腔医学杂志*, 2001,36(6): 457~460
- 6 Shirakawa T, Gardner TA, Ko SC, et al. Cytotoxicity of adenoviral-mediated cytosine deaminase plus 5-fluorocytosine gene therapy is superior to thymidine kinase plus acyclovir in a human renal cell carcinoma model. *J Urol*, 1999,162(3 pt 1): 949~954
- 7 卢利,王兆元,王玉新,等. 舌鳞癌侵袭行为的冷冻蚀刻电镜观察. *中华口腔医学杂志*, 1998,33(1): 41~43
- 8 Lambin P, Nuyts S, Landuyt W, et al. The potential therapeutic gain of radiation-associated gene therapy with the suicide gene cytosine deaminase. *Int J Radiat Biol*, 2000,76(3): 285~293
- 9 Pederson LC, Buchsbaum DJ, Vickers SM, et al. Molecular chemotherapy combined with radiation therapy enhances killing of cholangiocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 1997,57(19): 4325~4332

(2001-04-02 收稿,2002-05-26 修回)

(本文编辑 刘怡)