

文章编号:1000-5404(2012)13-1285-04

论著

携 HSV₁-TK 自杀基因超声微泡造影剂联合前药更昔洛韦对前列腺癌细胞的抑制

谢鑫¹, 姜庆¹, 梁培禾¹, 王志刚², 郑元义², 谭小军¹, 乔娟³ (400010 重庆, 重庆医科大学附属第二医院: 泌尿外科¹, 超声研究所²; 400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所超声科³)

[摘要] 目的 观察超声微泡造影剂携单纯疱疹病毒 I 型胸昔激酶(HSV₁-TK)基因体外转染及联合前药更昔洛韦(GCV)对前列腺癌细胞株 PC-3 的抑制效应。方法 超声辐照 PC-3 细胞, MTT 筛选出最适辐照时间; 将含有 HSV₁-TK 基因的质粒通过静电吸附在脂质微泡表面, 采用最适超声辐照转染, 并用荧光显微镜及 Western blot 观察 TK 基因的转入及表达; MTT 法观察使用不同浓度的前药更昔洛韦(GCV)后细胞增殖抑制率; 流式细胞仪检测最适浓度的前药 GCV 对转染后的前列腺癌细胞 PC-3 的周期的影响; MTT 法观察 HSV₁-TK/GCV 自杀基因系统对前列腺癌 PC-3 细胞杀伤效应。结果

MTT 检测显示超声强度为 1.0 W/cm², 频率为 1 MHz, 辐照时间 30 s 时超声辐照对细胞无明显的抑制作用; 通过超声辐照后 HSV₁-TK 基因可以顺利转入 PC-3 细胞中并有稳定的表达。与对照组相比, 当前药 GCV 浓度在 100 μg/ml 时, 超声 + 微泡 + TK 组细胞杀伤率明显高于其他各组, 细胞存活率约 32%, 低于其他各组 ($P < 0.05$); 流式细胞术检测显示大多数细胞被阻断在 S 期, 细胞生长受到明显抑制。结论 以超声辐照微泡造影剂为载体转染自杀基因联合前药 GCV, 对人前列腺癌细胞有明显杀伤作用。

[关键词] 前列腺癌; 超声微泡; 基因治疗

[中图分类号] R737.25; R979.1; R981

[文献标志码] A

Inhibitory effect of ultrasound microbubbles carrying HSV₁-TK gene combined with ganciclovir on prostate cancer cells

Xie Xin¹, Jiang Qing¹, Liang Peihe¹, Wang Zhigang², Zheng Yuanyi², Tan Xiaojun¹, Qiao Juan³ (¹Department of Urology, ²Department of Ultrasonography, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, ³Department of Ultrasonography, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of transfection of ultrasonic microbubble with herpes simplex virus thymidine kinase (HSV₁-TK) gene on prostate cancer cell line PC-3 combined with ganciclovir (GCV). **Methods** MTT assay was used to test the optimal irradiation time of PC-3 cells by ultrasonic irradiation. Ultrasound microbubble surface was adsorbed with HSV₁-TK gene, and then transfected into PC-3 cells under optimal ultrasound irradiation. Fluorescence microscopy and Western blot analysis were used to detect the transfection and expression of TK. The cell proliferation was measured by MTT assay after the treatment of different concentrations of GCV. Flow cytometry (FCM) was used to measure the cell cycle of the transfected PC-3 cells after the treatment of the optimal concentration of GCV. The killing effect of HSV₁-TK/GCV suicide gene system on prostate cancer cell PC-3 was observed by MTT assay. **Results** MTT assay showed that ultrasonic radiation had no significant inhibition on cell viability under the conditions of the magnitude of 1.0 W/cm², frequency of 1 MHz, and every 30 s ultrasound exposure time. HSV₁-TK was transfected into PC-3 cells by ultrasound wave irradiation and expressed stably. Compared with the control, the killing activity of ultrasound radiation + microbubble + TK treatment with the GCV concentration of 100 μg/ml was obviously higher, with cell survival rate of about 32%, significantly lower than the other group ($P < 0.05$). FCM showed that most cells were blocked in S phase, and cell growth was obviously inhibited. **Conclusion** Transfection of suicide gene by ultrasound microbubble and the application of GCV has an obvious effect on the apoptosis of human prostate cancer cells.

[Key words] prostate cancer; ultrasound microbubble; gene therapy

Supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (30900371). Corresponding author: Jiang Qing, E-mail: jq001002@sina.com

[基金项目] 国家杰出青年科学基金(30900371)

[通信作者] 姜庆, E-mail:jq001002@sina.com

在西方国家,前列腺癌(Prostate cancer, PCa)是男性发病率最高的恶性肿瘤^[1]。随着PCa发病率迅速升高,PCa的治疗成为肿瘤研究关注的焦点之一,基因疗法是肿瘤治疗研究的热点和希望所在,其中近年出现的单纯疱疹病毒I型胸苷激酶/更昔洛韦(herpes simplex virus type I—thymidine kinase/ganciclovir, HSV₁-TK/GCV)系统显示出了良好的应用前景,但其在前列腺癌中的应用无明确报道。病毒载体的安全性及非病毒载体的低效性等问题限制了肿瘤基因疗法的进一步发展。最近出现的一种新的基因靶向转染技术^[2]——利用超声微泡造影剂定向释放靶基因,有望解决上述问题。本实验利用超声微泡包裹 HSV₁-TK自杀基因对前列腺癌细胞 PC-3 进行高效率的转染,进一步探讨联合前药 GCV 对细胞的杀伤效应,旨在为前列腺癌的基因治疗提供良好的实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

前列腺癌 PC-3 细胞株由本科室保存,超声微泡造影剂为重庆医科大学附属第二医院超声研究所惠赠。增强型绿色荧光蛋白与单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶真核共表达质粒载体 pIRES2-EGFP-TK 为重庆医科大学周世骥博士构建并惠赠^[3]。无内毒素质粒抽取纯化试剂盒购自 Omega 公司,多聚赖氨酸购自美国 Sigma 公司,前药更昔洛韦(GCV)购自湖北科益药业有限公司。RPMI1640 购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司;TKI 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的第 2 抗体购自美国 GenScript 公司,内参照肌动蛋白购自美国 GenScript 公司。

1.2 方 法

1.2.1 PC-3 细胞的培养 应用 RPMI1640 培养液(含 10% 灭活胎牛血清、青霉素 100 × 10³/L、链霉素 100 × 10³/L)常规在 37 °C, 5% 的 CO₂ 孵箱中培养,48 h 更换培养液,待细胞长至 70% ~ 80% 时传代。

1.2.2 MTT 筛选培养细胞超声辐照最适时间 培养 PC-3 细胞生长至 70% ~ 80% 时,倾去培养液,用 PBS 液漂洗,0.125% 胰蛋白酶在 37 °C 消化至细胞皱缩变圆,倾去胰酶,加入无血清培养基重悬。调整细胞数为 5 × 10⁴/ml,采用超声辐照(施加声强 1.0 W/cm²,频率为 1 MHz,辐照时间分别为 0、30、60、90、180 s)细胞后,以 200 μl/孔接种于 96 孔板中,每组 6 复孔,置于 37 °C, 5% 的 CO₂ 孵箱中培养过夜,加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl,继续培养 4 h 后吸弃培养基加入 DMSO 200 μl,振荡 10 min,于自动酶标仪 570 nm 波长处测定各孔的吸光值 [D(570)],并按公式计算细胞存活率。

细胞存活率 = [实验组 D(570)/对照组 D(570)] × 100%

1.2.3 重组质粒 DNA 提取及微泡造影剂的制备 载有 pIRES2-EGFP-TK 质粒的大肠杆菌在 LB 培养基过夜培养后,按照试剂盒的说明书提取质粒;经紫外分光光度计检测合格[纯度 D(260)/D(280)为 1.85,调整浓度为 1 μg/μl];微泡造影剂

冻干粉前期制备由重庆医科大学附属第二医院超声研究所合成,加入 3 ml PBS 缓冲液,用力振摇即可产生微泡,DFY 超声定量分析诊断仪检测微泡平均粒径:(1.68 ± 0.32) μm,微泡浓度为 1.5 × 10⁷ 个/ml。

1.2.4 超声介导微泡转染 制备转染液,所提取的质粒以 0.2 μg/μl 按 1:4 的体积比与微泡造影剂混合,置于 4 °C 冰箱中静置 30 min,使其互相黏附后加入到无胎牛血清、无抗生素的 1640 培养基中。实验分组:对照组、单纯质粒 TK 组、超声辐照 + 质粒 TK 组、超声辐照 + 微泡 + 质粒 TK 组(n = 3)。包裹有目的基因的微泡通过超声波击碎,使目的基因能够定向释放进入细胞,超声辐照采用前面实验筛选后获得的最适参数,转染后孵育 4 ~ 6 h 更换完全培养基继续培养,48 h 后在荧光显微镜下观察其绿色荧光蛋白(GFP)表达情况。MTT 检测超声联合微泡转染后对细胞活性的影响。

1.2.5 Western blot 检测胸苷激酶(thymidine kinase, TK)蛋白的表达情况 转染 72 h 后收集细胞的总蛋白 - 20 °C 保存。常规进行 Western blot 检测,经电泳(60 V, 30 min, 100 V, 90 min)、转膜、封闭等步骤后,加入抗 TKI 单抗(1:500),室温孵育 2 h,4 °C 过夜。Tris 缓冲盐溶液洗膜 3 次,15 min/次,加入 HRP 标记的二抗(1:5 000),室温下轻摇孵育 2 h;再经洗膜、显影、曝光等步骤后,采用 UVP 凝胶图像处理系统 Labworks4.6 软件分析目的条带与内参照 β-肌动蛋白的灰度值比值。

1.2.6 GCV 处理后细胞周期变化及对肿瘤细胞增殖的影响

1.2.6.1 GCV 对 PC-3 细胞毒性作用 将细胞按每孔 1 × 10⁴ 接种于 96 孔板,培养 24 h 后分别加入终浓度为 10 000、1 000、100、10、1 μg/ml 和 0 的 GCV,每组设 6 复孔。分别于 24、48 h 时各取出 1 块板,每孔加入 MTT 20 μl(5 mg/ml),4 h 后弃上清加入 DMSO 200 μl,振荡 10 min,于自动酶标仪 570 nm 波长处测定各孔的吸光值 [D(570)],计算各组抑制率。

抑制率 = (1 - 存活率) × 100%

1.2.6.2 HSV₁-TK/GCV 自杀基因系统对前列腺癌 PC-3 细胞的细胞周期影响 PC-3 细胞转染前 1 d 传代,调整细胞数为 5 × 10⁵/ml,转染方法同前,转染后 4 组细胞均加入浓度为 100 μg/ml GCV 的 1640 培养液共孵育 48 h, PBS 冲洗细胞 2 次,0.25% 的胰酶消化细胞,每组细胞数为 5 × 10⁵, PBS 洗 2 次,离心去除上清液,细胞用 70% 预冷乙醇固定后,流式细胞仪分析细胞周期变化。

1.2.6.3 HSV₁-TK/GCV 自杀基因系统对前列腺癌 PC-3 细胞杀伤效应的观察 按照 1.2.6.2 方法,调整细胞数为 1 × 10⁴/ml,加入 96 孔板中,每组 6 复孔,转染后加入终浓度为 100 μg/ml GCV 的 1640 培养液共孵育,48 h 后 MTT 法测其吸光值,每孔杀伤率 = [对照组 D(570) - 实验组 D(570)]/对照组 D(570) × 100%,求均值。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件行 t 检验。

2 结 果

2.1 最佳辐照时间确定

超声基因转染仪在声强 1.0 W/cm²,频率为 1 MHz,辐射时

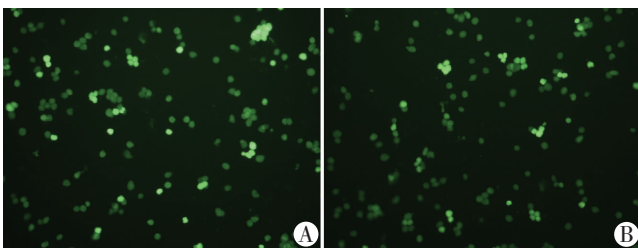
间为30 s时细胞的存活率最高(93.83%),因此该参数为超声转染的最适参数。不同辐照时间细胞存活率见表1。

表1 不同的辐照时间对前列腺癌细胞PC-3的存活率影响(n=6)

辐照时间(s)	D(570)($\bar{x} \pm s$)	存活率(%)
0	0.583 ± 0.058	100
30	0.547 ± 0.047	93.83
60	0.502 ± 0.045	86.10
90	0.288 ± 0.060	49.40
180	0.273 ± 0.055	46.83

2.2 增强型绿色荧光蛋白的表达情况

细胞通过超声介导微泡转染后置于荧光显微镜下观察,可见对照组无荧光表达而实验组有明显的荧光表达(图1)。



A:对照组;B:超声辐照+微泡+质粒TK组

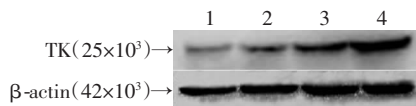
图1 通过超声微泡转染质粒TK后前列腺癌细胞PC-3的荧光表达情况(荧光显微镜×100)

2.3 超声联合微泡转染后对细胞活性的影响

超声在声强为1.0 W/cm²,频率为1 MHz,辐射时间为30 s条件下转染细胞48 h后用MTT法测出各组细胞的存活率为:对照组100%、单纯质粒TK组(99.23 ± 0.16)%、超声辐照+质粒TK组(93.01 ± 0.08)%、超声辐照+微泡+质粒TK组(91.78 ± 0.15)%。与对照组相比差异无统计学意义。说明在合适的超声条件下联合微泡造影剂对细胞的生长无明显的抑制。

2.4 Western blot检测TK蛋白的表达

转染72 h后,各组TK蛋白的相对比值分别为:对照组(0.081 ± 0.002)、单纯质粒TK组(0.183 ± 0.005)、超声辐照+质粒TK组(0.435 ± 0.011)、超声辐照+微泡+质粒TK组(0.882 ± 0.009)。其中超声辐照+微泡+质粒TK组中TK蛋白表达明显高于其他各组,差异具有统计学意义(P < 0.05,图2)。



1:对照组;2:单纯质粒TK组;3:超声辐照+质粒TK组;4:超声辐照+微泡+质粒TK组

图2 Western blot检测各组的TK蛋白表达水平

2.5 GCV对细胞的毒性作用

加入不同浓度的前药GCV与细胞共同培养48 h后,当浓度为10 000、1 000 μg/ml时对细胞有明显的毒性,细胞存活率为(19.22 ± 2.85)%、(78.03 ± 0.23)%,当浓度≤100 μg/ml时,对前列腺癌细胞的生长则无明显的影响,其存活率依次为1 μg/ml(96.90 ± 0.41)%、10 μg/ml(93.91 ± 0.55)%、

100 μg/ml(91.15 ± 1.12)%。经统计学处理,GCV浓度分别为10 000、1 000 μg/ml时细胞存活率明显低于其他3组(P < 0.05);其他3组间的差别无统计学意义(P > 0.05)。因此以下实验选用100 μg/ml浓度。

2.6 流式细胞术检测HSV₁-TK/GCV自杀基因系统对细胞周期影响

前列腺癌PC-3细胞转染质粒后,与GCV 100 μg/ml共孵育48 h后,流式细胞仪检测细胞周期变化。HSV₁-TK/GCV将PC-3阻滞在S期,超声辐照+微泡+质粒TK组S期细胞比例较其余3组高,各组间相比差异均具有统计学意义(P < 0.05,表2)。

表2 HSV₁-TK/GCV自杀基因系统对PC-3细胞周期影响[n=3,($\bar{x} \pm s$)%]

组别	G ₁	S	G ₂
对照组	49.57 ± 0.48	43.26 ± 0.15	7.17 ± 0.14
单纯质粒TK组	35.38 ± 0.29	58.61 ± 0.37 ^a	6.02 ± 0.29
超声辐照+质粒TK组	27.18 ± 0.36	63.34 ± 0.45 ^{ab}	9.48 ± 0.31
超声辐照+微泡+质粒TK组	13.74 ± 0.38	84.92 ± 0.12 ^{abc}	1.34 ± 0.19

a: P < 0.05,与对照组比较;b: P < 0.05,与单纯质粒TK组比较;c: P < 0.05,与超声辐照+质粒TK组比较

2.7 HSV₁-TK/GCV自杀基因系统对前列腺癌PC-3细胞的杀伤效应

使用MTT法测出各组细胞的存活率发现超声辐照+微泡+质粒TK组中癌细胞的存活率仅为(32.35 ± 0.14)%,低于其余各组,对照组(92.03 ± 0.08)%、单纯质粒TK组(74.83 ± 0.09)%、超声辐照+质粒TK组(53.64 ± 0.02)%。各组相比较具有统计学意义(P < 0.05)。

3 讨论

前列腺癌是欧美国家男性发病率最高的恶性肿瘤^[1],死亡率仅次于肺癌。据美国统计2005年新增病例232 090例,死亡30 350例。我国发病率较低,但最近几年,随着饮食结构的调整、人口老龄化及医疗检测水平的提高,前列腺癌的发病率呈上升趋势^[4]。目前前列腺癌晚期的治疗尚不理想,雄激素剥夺疗法也仅为姑息性治疗,平均会在18~24个月转变为非雄激素依赖型,病情恶化。因此在治疗前列腺癌上仍然没有一个完善的方案,随着分子生物学的进展,肿瘤基因治疗日益受到重视,前列腺癌也不例外。目前应用于前列腺癌基因治疗主要包括自杀基因、细胞因子基因、血管生成抑制基因以及凋亡相关基因等,其中自杀基因是热点方案,单纯疱疹病毒I型胸苷激酶基因/丙氧鸟苷显示出良好的应用前景。其原理是向肿瘤细胞导入基因,通过表达其编码的胸苷激酶,将低毒的抗病毒药物GCV磷酸化,阻碍细胞DNA的合成,从而杀灭被转染的肿瘤细胞。Nasu等^[5]用携带HSV-TK基因的重组腺病毒治疗局部复发但未转移的患者,能使血清前列腺特异性抗原水平下降,CD8⁺T淋巴细胞占人

类白细胞抗原-DR⁺细胞比例增加,且无明显毒性作用。然而包括前列腺癌在内的肿瘤基因治疗仍然有一定的局限性,主要表现在基因转染率低、靶向性差。其中目的基因表达量少,不足以杀伤肿瘤细胞。在人体内,如果只能杀灭部分肿瘤细胞,残留的部分也会很快生长,导致肿瘤复发^[6]。因此载体系统的选择影响着肿瘤的疗效。利用超声波破坏携带基因的微泡造影剂,使基因定位释放是一种新型的靶向基因治疗技术^[7-9]。其原理主要为:声场内的超声波破坏微泡造影剂后,其产生的空化和机械效应可使细胞膜的通透性增加,基因可以通过破裂的微血管到达组织细胞内,从而达到提高基因转染靶向性和效率的目的。

国外研究表明,超声联合微泡造影剂后可以使DNA的转染率比单纯超声提高300倍,并且对细胞、组织无损害,细胞存活率达90%以上^[10-12],因此,微泡是一种相对安全,并且不会引起免疫反应的载体。陈云超等^[13]研究发现筛选出合适的超声参数,利用微泡作为载体能够增强EGFP质粒对细胞的转染效率;既往研究^[14]发现超声微泡造影剂能够明显增加自杀基因质粒在癌瘤组织中的导入及表达,发挥杀伤肿瘤的作用。本研究利用超声及微泡的特性,在转染细胞72h后,超声辐照+微泡+质粒TK组中TK蛋白的表达量明显高于其他组,并在荧光显微镜下观察到大量的荧光表达。说明该项技术确实能够提高目的基因的转染率,支持以上的文献报道。同时实验也发现,利用超声辐照和微泡造影剂转染HSV₁-TK基因并未对细胞的生长产生明显的抑制,这和国外学者的研究结论类似。本实验还观察了不同浓度的前药GCV对前列腺癌细胞的增殖影响,当浓度达到1 000、10 000 μg/ml时,可见悬浮细胞增多、细胞损伤严重;出现不同程度的死亡。浓度为1、10、100 μg/ml时,细胞形态无明显变化,存活率大于91%,因此我们选用了100 μg/ml作为实验浓度。进一步的实验结果则证实:当联合应用超声辐照微泡造影剂转染和前药GCV两项干预措施后,肿瘤细胞被大幅度地杀伤,并明显抑制于S期,使细胞无法进入增殖周期,干扰细胞的存活,存活率约为32%,与对照组相比有明显差异。其可能的机制是:当TK表达胸苷激酶后可将无毒前药GCV磷酸化,掺入细胞的DNA合成链中并抑制DNA聚合酶,使细胞DNA合成终止,导致细胞死亡。

综上所述,利用超声微泡造影剂为载体能够高效安全地转染目的基因,且转染具有良好的靶向性;加入前药GCV后则能够同时发挥它本身的杀伤效应及旁

观者效应,显著地抑制肿瘤细胞的生长增殖。为后续的携HSV₁-TK自杀基因超声微泡造影剂联合前药GCV治疗前列腺癌的体内实验奠定了基础。

参考文献:

- [1] Freytag S O, Stricker H, Peabody J, *et al.* Five-year follow-up of trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy for treatment of prostate cancer[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(3): 636-642.
- [2] 景香香, 王志刚. 超声微泡造影剂——一种新型的基因载体[J]. *中国医学影像技术*, 2004, 20(3): 359-361.
- [3] 唐勇, 刘作金, 周世骥, 等. 增强型绿色荧光蛋白与单纯疱疹病毒I型胸苷激酶共表达质粒载体构建及在肝癌细胞株HepG2表达的研究[J]. *中国实用外科杂志*, 2009, 29(11): 937-940.
- [4] 赵雪俭, 孔祥波, 王伟华. 前列腺特异性抗原集团普查是前列腺癌早期诊治的最佳途径[J]. *中华男科学*, 2003, 9(8): 563-565, 568.
- [5] Nasu Y, Saika T, Ebara S, *et al.* Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-tK gene for patients with local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(4): 834-840.
- [6] Tang Z, Qin L, Wang X, *et al.* Alterations of oncogenes, tumor suppressor genes and growth factors in hepatocellular carcinoma: with relation to tumor size and invasiveness [J]. *Chin Med J (Engl)*, 1998, 111(4): 313-318.
- [7] Juffermans L J, Meijering D B, van-Wamel A, *et al.* Ultrasound and microbubble-targeted delivery of therapeutic compounds; ICIN Report Project 49: Drug and gene delivery through ultrasound and microbubbles[J]. *Neth Heart J*, 2009, 17(2): 82-86.
- [8] 骆书美, 张云燕, 钟晓波, 等. 超声微泡造影剂介导pEGFP-N1质粒转染HGFs的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(24): 2459-2462.
- [9] 王佚, 郭振华, 金先庆, 等. 超声微泡促腺病毒载体转染MDR1基因效率的体外实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(1): 67-70.
- [10] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, *et al.* Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound [J]. *Circulation*, 2002, 105(10): 1233-1239.
- [11] Pitt W G, Hussein G A, Staples B J. Ultrasonic drug delivery—a general review[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2004, 1(1): 37-56.
- [12] Lawrie A, Briskin A F, Francis S E, *et al.* Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(23): 2023-2027.
- [13] 陈云超, 张青萍, Liang H D, 等. 超声和微泡造影剂介导细胞基因转染的实验研究[J]. *中华超声影像学杂志*, 2006, 15(11): 864-868.
- [14] 蔡宇, 廖伟, 周世骥, 等. 全反式维甲酸增强超声微泡包裹的单纯疱疹病毒胸苷激酶自杀基因治疗荷肝癌裸鼠的效果[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(20): 2112-2115.

(收稿:2011-11-14;修回:2012-02-09)

(编辑 龙亮)