

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00294

腺病毒介导胸苷激酶基因联合 α -IFN 治疗肾癌的实验研究

赵国志, 郑少斌*, 谭万龙, 刘 阳

南方医科大学南方医院泌尿外科, 广州 510515

[摘要] **目的:**探讨腺病毒介导的单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶(TK)基因联合 α -IFN 对肾癌生长的抑制作用。**方法:**含 TK 基因的重组腺病毒感染人肾癌细胞株 786-0, 加用无环鸟苷(GCV) 或联用 α -IFN, 用噻唑蓝(MTT)方法观察杀伤效应。建立 786-0 裸鼠皮下移植瘤模型, 瘤内注射腺病毒及腹腔注射 GCV (50 mg/kg), 联合 α -IFN 时行瘤内注射, 用药后观察肿瘤生长情况。**结果:**在对感染腺病毒的 786-0 细胞的体外杀伤实验中, TK+GCV 组的细胞存活率为 (68.57±1.41)%, α -IFN 组的细胞存活率为 (68.65±1.45)%, TK+GCV+ α -IFN 组细胞存活率为 (35.07±1.43)% ($P=0.000$), 两者之间有协同效应。在 786-0 裸鼠移植瘤模型中, TK+GCV 联合 α -IFN 能够显著抑制肿瘤的生长。**结论:**腺病毒为载体的自杀基因 TK 加前体药 GCV 联合 α -IFN 应用对人肾癌细胞的体内、外治疗效果明显。

[关键词] 腺病毒载体; 基因疗法; 胸苷激酶基因; 干扰素 α ; 肾肿瘤

[中图分类号] R 69 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)03-0294-04

Adenovirus-mediated TK gene combined with α -IFN in treatment of nude mice transplanted with human renal clear-cell carcinoma

ZHAO Guo-zhi, ZHENG Shao-bin*, TAN Wan-long, LIU Yang

Department of Urology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of adenovirus-mediated herpes simplex virus-thymidine kinase (TK) gene combined with α -IFN on renal clear-cell carcinoma. **Methods:** Adenovirus containing suicide gene TK, in combination with GCV or α -IFN, was used to treat human renal clear-cell carcinoma cell line 786-0, and the *in vitro* cytotoxic effects against 786-0 were evaluated using MTT method. The subcutaneous transplantation model of 786-0 cells was established with nude mice. Adenovirus containing TK gene was injected intratumorally and the GCV (50 mg/kg) was injected intraperitoneally; α -IFN (10^4 U/L) was injected intratumorally in combined therapy. The growth of tumors was observed after treatments. **Results:** The survival rate of 786-0 cells was (35.07±1.43)% in the TK+GCV+ α -IFN group, (68.57±1.41)% in the TK+GCV group and (68.65±1.45)% in the α -IFN group ($P=0.000$). There was an obvious synergic effect between Ad-TK and α -IFN in inhibiting 786-0 cells. Ad-TK combined with GCV and α -IFN significantly suppressed the growth of 786-0 cells growth in nude mice model. **Conclusion:** Adenovirus-mediated TK plus prodrug GCV combined with α -IFN has obvious therapeutic effect in treatment of human renal clear-cell carcinoma.

[KEY WORDS] adenovirus vector; gene therapy; thymidine kinase gene; interferon- α ; kidney neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(3):294-297]

肾癌是常见的泌尿系统肿瘤,其发病率仅次于膀胱肿瘤。国外肾癌的发病率呈上升趋势,每年死于肾癌者近 1 万例^[1],在我国也有逐年增加趋势。对于早期无转移性肾癌,根治性手术是首选方案,但术后仍有复发和转移的可能,大约 40%~70%的患者术后会出现肿瘤远处转移^[2]。晚期肾癌对放疗及化疗均不敏感,自杀基因及细胞因子治疗作为晚期

肾癌的一种治疗方法,在肾癌的综合治疗中发挥了重要作用。单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus-thymidine kinase, HSV-TK)基因/无环鸟苷(GCV)治疗系统是应用最为广泛、进展最快的自杀基因,同时细胞因子在实体肿瘤治疗中的应用也有广泛的研究。本研究旨在探讨 TK/GCV 系统及细胞因子在肾癌治疗中的价值。

[收稿日期] 2007-11-23 **[接受日期]** 2007-12-21

[基金项目] 广东省医学科研基金(A20004395). Supported by Medical Science Research Foundation of Guangdong Province (A20004395).

[作者简介] 赵国志, 博士生, 主治医师. Tel:020-61365826, E-mail:zxdoc@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:020-61641761, E-mail:xxx704@163.com

1 材料和方法

1.1 实验动物、肿瘤细胞及试剂 人肾透明细胞癌株 786-0 来源于中山大学生物学教研室; HEK293 细胞(南方医科大学泌尿外科保存); 含有 TK 基因和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 基因的复制缺陷腺病毒(AdCMV-TK, Adv, 美国洛杉矶儿童医院惠赠)。5 周龄、雌性 BALB/c 裸鼠购自广州中医药大学实验动物中心(许可证 SCxK<粤>2003-0001)。噻唑蓝(MTT)、GCV、 α -IFN 购于 Sigma 公司; 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) kit 购于大连宝生物公司; DMEM、胎牛血清为 Gibco 公司产品; 绵羊抗 TK 多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司, HRP-兔抗绵羊二抗及 ECL 发光试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。TK 基因和腺病毒 E1 基因的引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成。TUNEL 凋亡试剂盒 Apoptag Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection KitS7100 购自 Chemicon International(加拿大)。

1.2 重组腺病毒扩增及滴度的测定 用 293 细胞扩增腺病毒。将 786-0 按 2×10^4 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ l, 第 2 天加入待检病毒悬液 60 μ l, 预稀释 10 倍, 按 2 倍倍比稀释, 继续培养, 48 h 后观察细胞病变情况, 并按下列公式计算病毒滴度: 病毒滴度(pfu/ml) = (细胞接种数 \times 预稀释倍数 \times 病变稀释倍数 \times MOI) / 病毒接种体积(ml)。

1.3 腺病毒 TK 基因 PCR 鉴定 取病毒上清 50 μ l, 煮沸 10 min 后立即置冰水中 15 min 备用。PCR 反应采用 25 μ l 体系: 腺病毒 DNA 1 μ l, 10 倍缓冲液 2.5 μ l, 上、下引物(10 μ mol/L) 1 μ l, Taq 酶(5 U/ μ l) 1 μ l, dNTP (10 mmol/L) 1 μ l, 最后加去离子水到 25 μ l。TK 基因上游引物: 5'-CCA ATA CGG TGC GGT ATC TG-3'; 下游引物: 5'-CAG GAT AAA GAC GTG CAT GGA-3'。腺病毒 E1 基因上游引物: 5'-TCG ATC TTA CCT TGC CAC GC-3'; 下游引物: 5'-GAG TCA CAG CTA TCC GTA GAC-3'。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 40 s, 61 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定。

1.4 RT-PCR 检测腺病毒感染的 786-0 细胞 TK 基因 mRNA 表达 经腺病毒感染的 786-0 细胞培养 2 d 后, TRIzol 提取总 RNA, 逆转录反应按试剂盒说明书操作, 42 $^{\circ}$ C 反应 60 min。PCR 反应采用 100 μ l 体系: 模板 cDNA 20 μ l, 10 倍缓冲液 8 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 10 μ l, 上、下引物(10 pmol/L) 2 μ l, LATaq 酶

1 μ l, 10 mmol/L dNTP 2 μ l。TK 基因上游引物: 5'-CCA ATA CGG TGC GGT ATC TG-3'; 下游引物: 5'-CAG GAT AAA GAC GTG CAT GGA-3'。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 MTT 法测定细胞存活率 以每孔 2×10^4 786-0 细胞接种 96 孔板, 实验分组: (1) 空白对照; (2) α -IFN 组; (3) Adv+GCV 组; (4) Adv+GCV+ α -IFN 组。每组设 3 个复孔, 于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 条件下培养。以未行任何处理的 786-0 为(1)组。12 h 后换液, (2)、(4)组加入 α -IFN(10⁴ U/L); (3)、(4)组加入 20 μ l Adv 感染 1 h, 然后加入完全培养液 180 μ l, 24 h 后各加入前体药物 GCV(10 mg/L); 继续培养 4 d 后, 每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μ l, 孵箱中继续培养 4 h, 弃去培养液, 每孔加入 DMSO 150 μ l, 室温避光振荡 10 min, 酶联免疫检测仪在 570 nm 处测各孔光密度(D)值。计算公式为: 细胞存活率(%) = (实验组 D 值/空白对照组 D 值) \times 100%。

1.6 TK 基因联合 GCV 及 α -IFN 对 786-0 移植瘤模型的治疗作用 将 786-0 细胞以 2×10^7 接种于裸鼠皮下, 待肿瘤体积生长至 100 mm³, 选取肿瘤大小均一成瘤鼠, 随机分为 4 组, 同体外分组。(1) 组仅用 PBS; (2)、(4) 组瘤内多点注射 α -IFN(100 μ l), 隔日 1 次, 共 10 d; (3)、(4) 组将腺病毒 100 μ l 多点注射入瘤内, 每只 1 次/d, 连续 3 d, 第 4~14 天给予腹腔注射 GCV (50 mg/kg), 其余注射 PBS。注射完毕后继续观察 2 d, 测量瘤体大小, 肿瘤体积(mm³) = A \times B² / 2 (A: 长径; B: 短径), 结束实验, 取各组鼠肿瘤进行病理学检查。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用完全随机设计方差分析(one-way ANOVA), 组间比较采用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒扩增及滴度测定 293 细胞加入腺病毒 24 h 后, 在荧光显微镜下可见 GFP 表达的 293 细胞, 72 h 时几乎都表达 GFP(图 1)。收集细胞, 经过反复冻融、离心、过滤后收集腺病毒悬液, 测得腺病毒滴度为 2×10^8 pfu/ml。

2.2 腺病毒 TK 基因的 PCR 鉴定 重组腺病毒 DNA PCR 扩增产物电泳后可见大小为 234 bp 的 TK 特异性片段, 未见 E1 扩增片段。说明腺病毒含有所需 TK, 而不存在病毒复制所需 E1 基因, 该病毒是含 TK 基因复制缺陷性病毒。

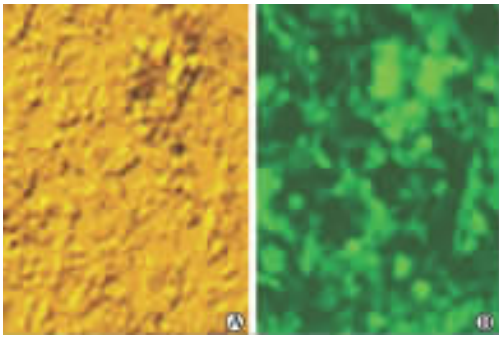


图 1 扩增腺病毒 293 细胞 GFP 表达

Fig 1 GFP expression in HEK293 cells

A: Under natural light; B: Under fluorescent light. Original magnification: ×200

2.3 感染腺病毒的 786-0 细胞 TK 基因 mRNA 表达 从腺病毒感染的 786-0 细胞中扩增出大小为 234 bp 的 TK 基因片段,与腺病毒一致,而未转染腺病毒的 786-0 细胞未扩增出相应片段(图 2),说明感染腺病毒 786-0 细胞中有 TK 基因 mRNA 表达,证实了自杀基因 TK 转入肿瘤细胞,并成功表达。

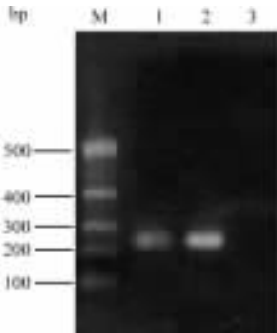


图 2 RT-PCR 产物电泳图

Fig 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

M: DNA marker; 1: Infected 786-0 cells; 2: Adenovirus; 3: Uninfected 786-0 cells

2.4 GCV 对转染 TK 基因的细胞及联合 α-IFN 对肾癌细胞 786-0 杀伤作用 Adv 易于感染 786-0 细胞株,当以 100 MOI 感染时,感染效率可达 92%。结果显示,感染 Adv 的 786-0 细胞用前体药物 GCV 和联用 α-IFN 72 h 后,细胞存活率分别为(68.57 ± 1.41)%、(35.07 ± 1.43)%,单用 α-IFN 为(68.65 ± 1.44)%,都低于对照组(98.25 ± 0.53)%, $P = 0.000$ 。各组间比较,Adv+GCV 和 α-IFN 组无统计学差异($P = 0.899$),其余各组均有显著统计学差异($P = 0.000$)。以上说明 TK 基因在细胞内成功地将 GCV 转化成细胞毒性物质,导致细胞死亡,联合使用 α-IFN 后效果增强。

2.5 TK 基因与前药 GCV 及联合 α-IFN 抑制 786-0 裸鼠移植瘤生长 结果显示,治疗组裸鼠移植瘤体积与对照组[(972.35 ± 91.12) mm³]之间的差异有统计学意义($F = 289.563, P = 0.000$),联合治疗组实验结束时的肿瘤体积为(33.54 ± 6.23) mm³,较单用 α-IFN 组的(366.85 ± 45.43) mm³、Adv+GCV 组的(324.46 ± 22.77) mm³明显减小,除 α-IFN 组、Adv+GCV 组间差异无统计学意义外($P = 0.218$),其余各组差异均有统计学意义($P = 0.000$)。结果与体外杀伤实验相符。

2.6 裸鼠肾癌的组织病理学改变 各组裸鼠未出现致死等不良反应,光镜下对照组见细胞排列紧密,异型性明显,可见核分裂相,治疗组可见肿瘤呈现不同程度的坏死,用 TUNEL 法检测细胞凋亡程度,自杀基因组凋亡细胞增多,联合 α-IFN 后肿瘤凋亡现象更加明显;电镜下观察可见凋亡小体的形成(图 3)。

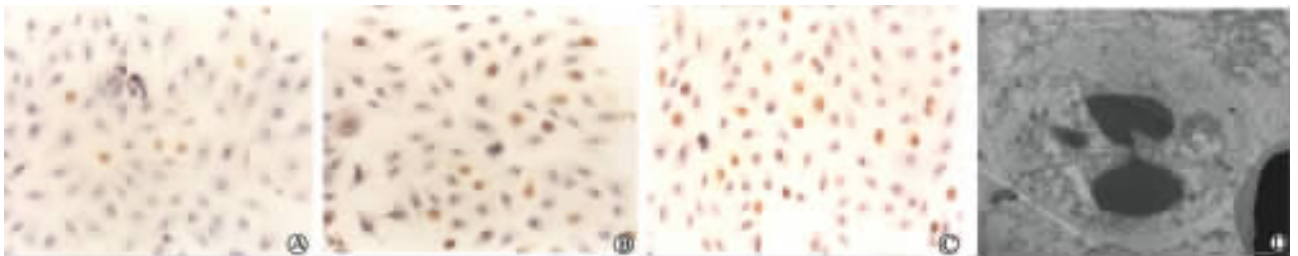


图 3 基因治疗 786-0 前后病理变化比较

Fig 3 Pathological comparison of 786-0 cells before and after gene therapy

A: TUNEL staining of 786-0 cells(H-E); B: TUNEL staining of infected 786-0 cells treated by GCV(H-E); C: TUNEL staining of infected 786-0 cells treated by GCV and α-IFN(H-E); The cells with Buffy cell nuclei, in the shape of patch or with irregular shape, are apoptotic cells; D: The apoptotic body of infected 786-0 cells after treated by GCV and α-IFN(TEM). Original magnification: ×200(A-C), ×20 000(D)

3 讨论

基因治疗是当今医学研究热点,自杀基因治疗作为肿瘤基因治疗的主要策略之一,已在肝癌^[3]、乳腺癌^[4]、膀胱癌^[5]、恶性胸膜间皮瘤^[6]等恶性肿瘤治疗研究中取得了令人满意的结果,显示出良好的临床应用前景。目前研究比较多的是 TK 基因,随着研究的不断深入,人们发现单用自杀基因的治疗效果和临床适用范围受到了限制,而应用自杀基因治疗联合细胞因子或细胞因子基因治疗,则克服了单基因治疗的缺陷,表现出协同作用^[7]。我们采用自杀基因 TK 联合 α -IFN 对肾癌进行了体内外杀伤性研究。

实现自杀基因治疗肿瘤必须将自杀基因导入肿瘤细胞中并表达,本研究采用复制缺陷性腺病毒作为载体,用 E1 基因引物对所用的病毒 DNA 进行 PCR 反应,结果并没有出现大小相当的 DNA 片段,说明该腺病毒不含 E1 基因,是复制缺陷性腺病毒。即使感染了正常组织细胞,病毒也不会复制,因此该病毒载体是安全的。此外,我们所用的腺病毒还携带有 GFP 基因,感染 786-0 细胞 24 h 后通过荧光显微镜就可见发绿色荧光的细胞,表明目的基因已在 786-0 细胞中表达,具有简便、快速、灵敏等优点^[8]。同时提取转染腺病毒 786-0 细胞的 RNA,经 RT-PCR 检测,结果证明转染病毒的细胞中含有 TK 基因的相应片段,未转染的没有,与荧光显微镜观察结果一致。TK/GCV 通过表达胸苷激酶将无毒前药 GCV 磷酸化,掺入细胞 DNA 链并抑制 DNA 聚合酶,使细胞 DNA 合成终止,导致细胞死亡。国内外研究表明,在恶性肿瘤的治疗中,免疫因素的作用越来越明显。IL-2、LAK 等生物治疗技术发展很快,但临床有效率与 α -IFN 相比并无明显提高^[10]。国内石明等^[11]对 45 例术后患者应用 IFN 治疗,早期肾癌患者 5 年生存率无显著性差异,而对晚期肾癌患者可延长生存期,提高长期生存率,5 年生存率治疗组明显高于对照组。

本实验将 TK/GCV 自杀基因系统联合 α -IFN 应用到肾癌的治疗中,发现在体外杀伤试验中,TK/GCV 或 α -IFN 单独应用时,即能产生明显的杀伤作用,而联合 α -IFN 后杀伤效果更为显著。在体内杀伤试验中, α -IFN 和 TK/GCV 自杀基因系统的联合应用的肿瘤体积比各自单独使用的肿瘤体积缩小 8 倍,提示联合治疗有明显协同作用。

本实验将自杀基因及细胞因子应用于肾癌的治疗中,显示自杀基因 TK 联合 α -IFN 治疗优于单自

杀基因系统治疗,但是实验结果也显示进一步提高自杀基因的杀伤效率是必要的,因为本实验肿瘤的生长未完全受到抑制。进一步的研究方向是,设计高效靶向的基因转运载体,实现安全可控的基因表达以及多基因联合应用等^[12]。可以相信,随着分子生物学及相关技术的不断发展完善,自杀基因及细胞因子、细胞因子基因的治疗终将成为攻克肾癌的有力武器。

[参考文献]

- [1] Kirkali Z, Tuzel E, Mungan M U. Recent advances in kidney cancer and metastatic disease[J]. *BJU Int*, 2001, 88: 818-824.
- [2] Papac R J, Keohane M F. Hormonal therapy for metastatic renal cell carcinoma combined androgen and provera followed by high dose tamoxifen [J]. *Eur J Cancer*, 1993, 29A: 997-999.
- [3] Jiao L R, Havlik R, Nicholls J, Jensen S L, Habib N A. Suicide gene therapy in liver tumors[J]. *Methods Mol Med*, 2004, 90: 433-450.
- [4] Brown N L, Lemoine N R. Clinical trials with GDEPT: cytosine deaminase and 5-fluorocytosine [J]. *Methods Mol Med*, 2004, 90: 451-457.
- [5] 谭万龙, 谢毅, 吴元东, 朱文辉, 郑少斌. 腺病毒介导融合双自杀基因治疗膀胱癌[J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26: 594-597.
- [6] Serman D H, Recio A, Vachani A, Sun J, Cheung J, DeLong P, et al. Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 7444-7453.
- [7] Rogulski K R, Wing M S, Paielli D L, Gilbert J D, Kim J H, Freytag S O. Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization[J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11: 67-76.
- [8] Hoffman R. Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models[J]. *Lancet Oncol*, 2002, 3: 546-556.
- [9] Horoszewicz J S, Murphy G P. An assessment of the current use of human interferons in therapy of urological cancers[J]. *J Urol*, 1989, 142: 1173-1181.
- [10] Atzpodien J, Kirchner H, Illiger H J, Metzner B, Ukena D, Schott H, et al. IL-2 in combination with IFN-alpha and 5-FU versus tamoxifen in metastatic renal cell carcinoma: long-term results of a controlled randomized clinical trial[J]. *Br J Cancer*, 2001, 85: 1130-1136.
- [11] 石明, 韩平, 曹贵华, 魏强, 杨宇如. 肾癌术后应用 α -干扰素的疗效分析[J]. *华西医学*, 2006, 21: 288-289.
- [12] Gonçalves M A, van der Velde I, Knaän-Shanzer S, Valerio D, de Vries A A. Stable transduction of large DNA by high-capacity adeno-associated virus/adenovirus hybrid vectors[J]. *Virology*, 2004, 321: 287-296.