

· 论 著 ·

厌氧菌介导的肿瘤靶向自杀基因系统对鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞的杀伤作用研究*

郭志英¹, 任启伟^{1△}, 易成², 王树人³, 巴再华¹, 刘晓岚¹

(1. 济宁医学院基础学院病理与病理生理学教研室, 山东 272013; 2. 四川大学华西医院腹部肿瘤科, 成都 610041; 3. 四川大学华西基础医学与法医学院病理生理学教研室, 成都 610041)

摘要:目的 构建婴儿双歧杆菌介导的胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶(CD/5-FC)肿瘤基因治疗系统, 探讨该系统对小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 的体外杀伤效应。方法 构建重组质粒 pGEX-CD, 以电穿孔法转化婴儿双歧杆菌, 筛选阳性克隆菌, 然后加入 5-FC 厌氧培养, 24 h 后取其上清液, 作用于小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞, 采用 MTT 法检测细胞存活率, 并观察细胞形态学改变。结果 成功构建出婴儿双歧杆菌介导的 CD/5-FC 肿瘤基因治疗系统。与空白对照组和 pGEX 组相比, CD 组肿瘤细胞发生了明显的形态学改变, 细胞存活率明显降低。结论 婴儿双歧杆菌介导的 CD/5-FC 系统对小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞具有明显的体外杀伤效应。

关键词: 婴儿双歧杆菌; 胞嘧啶脱氨酶; 肿瘤基因治疗; 靶向性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.016

中图分类号: R739.5; R73-362

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)23-3190-02

The study of killing effect of tumor-targeted suicide gene system delivered by anaerobic bacteria on murine melanoma cell B16-F10*

GUO Zhi-ying¹, REN Qi-wei^{1△}, YI Cheng², et al.

(1. Department of Pathology and Pathophysiology, Faculty of Basic Science of Jining Medical University, Shandong 272013, China; 2. Department of Abdominal Oncology, West China Hospital, Sichuan University, Sichuan 610041, China; 3. Department of Pathophysiology, College of Basic and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To construct CD/5-FC tumor gene therapy system delivered by Bifidobacterium Infants, and to investigate the killing effect on melanoma B16-F10 cell of mice. **Methods** Recombined plasmid pGEX-CD was constructed and transferred into bifidobacterium infants by electroporation. Positive recombinant bacteria was selected and identified, and then was incubated with 5-FC in anaerobic condition. The supernatant of bacteria was collected and added to the melanoma B16-F10 cells. The cell growth status was evaluated by MTT assay, and the morphologic changes of cells were observed. **Results** The CD/5-FC tumor gene therapy system delivered by Bifidobacterium Infantis has been constructed successfully. The survival rate of cells was significantly lower in CD group than in control group and in pGEX group, and tumor cells of CD group were remarkably damaged morphologically. **Conclusion** The CD/5-FC system delivered by Bifidobacterium Infantis has the significant killing effect on melanoma B16-F10 cell of mice in vitro.

Key words: bifidobacterium infantis; cytosine deaminase; tumor gene therapy; targeting

胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶(cytosine deaminase/5-fluorocytosine, CD/5-FC)系统是肿瘤基因治疗的研究热点。以往多采用腺病毒或逆转录病毒作载体, 由于基因转染效率低、安全性差, 故不能广泛应用于临床。本文用婴儿双歧杆菌作基因运载体, 根据实体瘤内低氧代谢特点及厌氧菌趋低氧环境的特性, 婴儿双歧杆菌可靶向定植于实体肿瘤局部, 并在局部表达其携带的外源基因 CD, 后者能将抗癌前药 5-FC 转变为毒性代谢产物 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU), 进而杀死肿瘤细胞。本研究在构建婴儿双歧杆菌介导的 CD/5-FC 系统基础上, 进一步检测并探讨其对小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞的体外杀伤效应。

1 材料与与方法

1.1 材料 B16-F10 鼠黑色素瘤细胞株(武汉大学中国典型培养物保藏中心), 婴儿双歧杆菌 2001(卫生部华西口腔生物医学工程重点实验室微型厌氧培养系统研究基地提供), 逆转

录 PCR 试剂盒(Invitrogen 公司), 5-FC(Sigma 公司, 用 0.9% 生理盐水溶解), 重组质粒 pGEX-CD、200 bp DNA Marker(本实验室保存)。

1.2 重组质粒 pGEX-CD 转染婴儿双歧杆菌及鉴定

1.2.1 重组质粒 pGEX-CD 的构建 前期已完成^[1]。

1.2.2 转染 婴儿双歧杆菌于 37℃ 厌氧培养, 用电穿孔法将重组质粒 pGEX-CD 瞬时转染至婴儿双歧杆菌, 然后将菌液涂布于 MRS 固体培养基(含 5% 氨苄青霉素), 继续厌氧培养, 72 h 后, 挑选阳性克隆菌进行鉴定。

1.2.3 鉴定 挑选阳性克隆菌, 提取细菌的总 DNA 及总 RNA, 分别进行 CD 基因的 PCR 扩增和 RT-PCR 扩增(具体操作按试剂盒说明书进行), 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。CD 基因引物序列为: 上游引物: 5'-ATG GAT CCG GAG GCT AAC AAT G-3', 下游引物: 5'-GGG GAA TTC TGT AAC CCA GTC GT-3'。

* 基金项目: 济宁市科技局重点计划基金资助项目。△ 通讯作者, E-mail: qiwiren@yahoo.com.cn。

1.3 阳性转化菌联合 5-FC 对鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞株的杀伤效应检测

1.3.1 细菌培养及菌液处理 在阳性转化菌中加入 5-FC(终浓度为 1 mmol/L),37 °C 厌氧培养,24 h 后离心收集菌液上清液。然后加入醋酸乙酯,离心吸取上清液,真空干燥后用生理盐水溶解,由此获得细菌处理液。

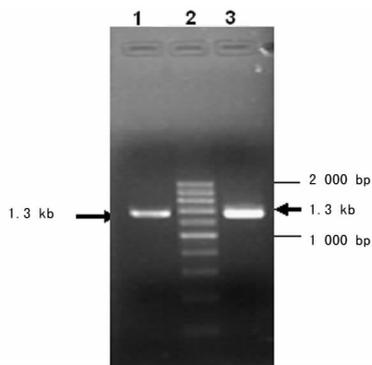
1.3.2 MTT 法测定细胞存活率 以 2×10^4 /孔将 B16-F10 细胞接种于 96 孔培养板,然后每孔内加入细菌处理液。实验分为 3 组:空白对照组、pGEX 组(pGEX 空质粒转化菌处理组)及 CD 组(pGEX-CD 重组质粒转化菌处理组),每组均设 3 个复孔。48 h 后观察各组细胞形态学改变,并采用 MTT 法检测细胞存活率,用酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值。计算方法为:细胞存活率(%)=实验组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

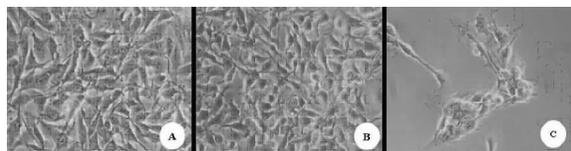
2 结 果

2.1 CD 基因检测结果 PCR 及 RT-PCR 扩增产物进行凝胶电泳,结果在相应泳道上分别出现一大一小约 1.3 kb 的特异性片段,与 CD 基因片段大小一致。证实外源性 CD 基因片段已整合至婴儿双歧杆菌细菌基因组中,并能在 mRNA 水平上表达(图 1)。

2.2 B16-F10 肿瘤细胞形态学变化 B16-F10 细胞加入细菌处理液继续培养 48 h 后,各组细胞形态学变化有明显不同(图 2)。CD 组的肿瘤细胞大部分死亡,仅有少数细胞贴壁生长,培养液中可见大量细胞碎屑,残存的细胞形态发生明显变化,原有的贴壁生长形态消失,胞核固缩,折光性下降,表现出明显的细胞损伤改变,而空白对照组和 pGEX 组的肿瘤细胞形态变化均不明显。



1:PCR 产物;2:200 bp DNA Ladder Marker;3:RT-PCR 产物。
图 1 PCR 及 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果



A:空白对照组;B:pGEX 组;C:CD 组。
图 2 各组细胞形态学变化($\times 200$ 倍)

2.3 各组细胞存活率 菌液中加入 5-FC 共培养,阳性转化菌所表达的 CD 即可将 5-FC 转变为 5-FU,然后杀伤 B16-F10 肿瘤细胞。细胞存活率结果显示,CD 组的细胞存活率为(47.60

± 1.27)%,明显低于空白对照组[(98.25 \pm 0.53)%]和 pGEX 组[(93.57 \pm 2.38)%],差异有统计学意义($P = 0.000$)。而空白对照组与 pGEX 组差异无统计学意义($P = 0.098$)。表明 CD 基因在婴儿双歧杆菌中成功表达,并能够将 5-FC 转化为 5-FU,抑制肿瘤细胞生长。

3 讨 论

肿瘤自杀基因治疗是将“自杀”基因(suicide gene)导入肿瘤细胞,表达的基因产物能把无毒的抗癌前药(prodrug)转化成抗癌药物,进而杀伤肿瘤细胞^[2]。近年来 CD/5-FC 系统是肿瘤自杀基因治疗的研究热点。人类及其他哺乳动物体内不含有 CD 基因,研究所用的 CD 基因主要来源于大肠埃希菌,其表达产物约为 48 000。5-FC 是一种抗真菌药物,本身并不具有抗癌作用,但在 CD 的催化作用下可脱去氨基转化成 5-FU。5-FU 是临床上常用的抗代谢类抗肿瘤药物,在体内可被嘧啶代谢酶系转化为毒性代谢产物 5-氟脱氧单磷酸尿嘧啶(5-FdUMP)、5-氟脱氧三磷酸尿嘧啶(5-FdUTP)和 5-氟三磷酸尿嘧啶(5-FUTP),进而干扰或阻断细胞的核酸代谢,造成细胞死亡^[3-4]。传统自杀基因治疗多采用腺病毒或逆转录病毒为载体,进而转化肿瘤细胞。研究表明此疗法存在以下缺点:(1)转化效率低,即使存在“旁观者效应”,抗癌效果也很局限;(2)腺病毒和逆转录病毒为载体,安全性难以保证;(3)全身途径给药不可避免会引起正常组织细胞被转化,不良反应较大^[5-8]。鉴于以上几点,迫切需要探索一种新的、更加安全可靠的载体系统用于肿瘤基因治疗。

人类大多数肿瘤属于实体瘤,且瘤体内部通常存有低氧代谢区^[9]。根据这一特点,当全身静脉推注厌氧菌后,厌氧菌趋低氧环境的特性可使其靶向定植于实体肿瘤局部,并由孢子状态迅速活化,进而大量增殖。前期实验通过放射性同位素体内示踪、组织匀浆厌氧培养及组织切片等技术已证实婴儿双歧杆菌对小鼠黑色素瘤具有明显的靶向特性^[10]。在此基础上,本研究构建出携带 CD 基因的重组婴儿双歧杆菌,静脉推注后细菌可迅速定植于实体瘤局部,表达外源基因酶活性,并将全身途径给予的抗癌前药 5-FC 转化为抗癌药 5-FU,专性杀伤肿瘤细胞。与传统自杀基因治疗相比,这种改良后的自杀基因治疗体系有以下优越性:(1)对实体瘤靶向性强,全身途径给药后可减少对正常组织的损伤,降低不良反应;(2)携带自杀基因的转化菌在肿瘤局部活化后直接表达酶活性,不必再去转化癌细胞,转化效率明显提高;(3)婴儿双歧杆菌属于非致病性厌氧宿主菌,正常即存在于人类及其他哺乳动物的低位小肠和大肠中,以此为载体安全性较高。

本研究结果表明,CD 组的细胞形态发生明显改变,细胞存活率明显降低,提示婴儿双歧杆菌介导的 CD/5-FC 肿瘤基因治疗体系初步构建成功,能够表达 CD 活性,杀伤肿瘤细胞,降低细胞存活率。随着肿瘤基因治疗体系的不断发展和完善,这种抗癌微生物介导的基因治疗很有可能成为下一步肿瘤治疗的研究焦点,进而向临床逐步推广应用。

参考文献:

[1] 郭志英,易成,王树人,等. 婴儿双歧杆菌/胞嘧啶脱氨酶肿瘤靶向性基因治疗系统的构建[J]. 中国肺癌杂志, 2004,7(2):95.
[2] 杨桦. 直肠癌的外科治疗进展[J]. 重庆医学,2009,38(5):505.
[3] Cheng YI, Huang Y, Guo ZY, et al. Con-(下转第 3194 页)

很多,血液直接接触管道等非生理性物质表面、非生理性灌注、缺血再灌注、手术创伤等机械刺激均可导致白细胞和血管内皮细胞释放大量炎症因子^[13],例如 IL-1、IL-6 及 TNF- α 等在炎症反应中起着重要的作用^[14],而这些促炎细胞因子的水平可直接反映体外循环后 SIRS 的严重程度^[15]。本研究结果显示 SGB 对炎症反应的抑制,具体体现在上述炎症因子血浆浓度的降低。罗哌卡因作为长效局麻药,阻滞时间长于短效局麻药利多卡因,但本研究中抑制炎症反应的效果并未超过初期应用利多卡因抑制炎症反应的效果。可能原因为:(1)体外循环和心脏手术所造成的过度应激反应初期,机体产生了炎症反应,当应激持续较长时间后,机体对应激产生了耐受性,应激并不继续导致炎症反应,所以,SGB 抑制应激的时间对炎症反应的影响并无差别;(2)在体外循环和心脏手术所造成炎症反应初期,SGB 抑制了应激,减轻了炎症反应,但随着手术的进程,其他引起炎症反应因素的出现,并成为主要原因,虽 SGB 抑制了应激反应,但机体的全身炎症反应并未由持续的应激状态所维持,所以 SGB 时间对炎症反应的影响并无差别。

罗哌卡因应用于 SGB 对体外循环和心脏手术引起的应激反应有一定的抑制作用,降低了应激反应对机体的打击,从而减轻了炎症反应;但 SGB 减轻炎症反应的效果可能并不会因局麻药的作用时间长短而有明显的区别。总之,SGB 对因体外循环引起的炎症反应有一定的抑制作用,具体的机制尚待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Asimakopoulos G, Thompson R, Nourshargh S, et al. An anti-inflammatory property of aprotinin detected at the level of leukocyte extravasation[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 120(2): 361.
- [2] Taneyama C, Goto H. Fractal cardiovascular dynamics and baroreflex sensitivity after stellate ganglion block [J]. *Anesth Analg*, 2009, 109(4): 1335.
- [3] 车洪彬, 裴凌, 颜红军. 单侧星状神经节阻滞对冠脉搭桥患者围术期心血管反应的影响[J]. *中国医药导报*, 2007, 4(14): 18.
- [4] 杜晓红, 应俊, 廖平生. 星状神经节阻滞对胃肠手术患者心血管反应和皮质醇浓度的影响[J]. *实用临床医学*, 2008, 9(6): 70.
- [5] 刘向龙, 赵欣, 于明克. 星状神经节阻滞治疗失眠疗效观

察[J]. *中国误诊学杂志*, 2007, 7(5): 957.

- [6] 张晓东, 杨天德, 李洪. 星状神经节阻滞对体外循环术中皮质醇、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(10): 1028.
- [7] Ohmura S, Kawada M, Ohta T, et al. Systemic toxicity and resuscitation in bupivacaine, levobupivacaine, or ropivacaine infused rats[J]. *Anesth Analg*, 2001, 93(3): 743.
- [8] Yang CW, Jung SM, Kwon HU, et al. A clinical comparison of continuous inter scalene brachial plexus block with different basal infusion rates of 0.2% ropivacaine for shoulder surgery[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2010, 59(1): 27.
- [9] Berthon N, Plainard X, Cathelineau X, et al. Effect of wound infiltration of ropivacaine in postoperative pain after extraperitoneal laparoscopic radical prostatectomy [J]. *Prog Urol*, 2010, 20(6): 435.
- [10] Mikuni I, Hirai H, Toyama Y, et al. Efficacy of intrathecal morphine with epidural ropivacaine infusion for postcesarean analgesia[J]. *J Clin Anesth*, 2010, 22(4): 268.
- [11] Hirota K, Browne T, Appadu BL, et al. Do local anaesthetics interact with dihydropyridine binding sites on neuronal Lrtype Ca²⁺ channels? [J]. *Br J Anaesth*, 1997, 78(2): 185.
- [12] Valenzuela C, Delpon E, Franqueza L, et al. Effects of ropivacaine on a potassium channel (hkv1.5) cloned from human ventricle[J]. *Anesthesiology*, 1997, 86(3): 718.
- [13] 罗爱林, 廖志品, 田玉科, 等. 心肺转流心内直视术围术期血清重要炎性细胞因子水平变化与全身炎症反应综合征[J]. *临床麻醉学杂志*, 2005, 21(12): 806.
- [14] Chrysant SG. The pathophysiologic role of the brain Renin-Angiotensin system in stroke protection: clinical implications[J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2007, 9(6): 454.
- [15] Wan S, Marchant A, Desment JM, et al. Human cytokine responses to cardiac transplantation and coronary artery bypass grafting[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1996, 112(2): 560.

(收稿日期:2010-05-18 修回日期:2010-06-09)

(上接第 3191 页)

- struction of Bifidobacterium Infantis/CD Targeting Gene Therapy System [J]. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, Aug, 2005, 4(4): 244.
- [4] Yazawa K, Fujimori M, Amano J, et al. Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors [J]. *Cancer Gene Therapy*, 2006, 12(2): 269.
- [5] 王治伟, 杨强, 赵渝, 等. 肿瘤靶向治疗技术现状[J]. *重庆医学*, 2009, 38(6): 713.
- [6] 吴秀伟, 利炜, 何远春, 等. 多肿瘤标志物蛋白芯片系统在鉴别良恶性胸腹腔积液中的价值[J]. *安徽医药*, 2009, 13(3): 57.
- [7] 窦晓辉, 赵晓明, 王燕群, 等. 重组人 p53 腺病毒注射液联

合化疗治疗喉癌的试验研究[J]. *海南医学*, 2007, 18(07): 127.

- [8] 李常林, 张艳, 何培华, 等. 肿瘤标志物联合检测对恶性肿瘤诊断的意义探讨[J]. *检验医学与临床*, 2009, 6(15): 30.
- [9] Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, et al. Bifidobacterium longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors[J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2007, 72(3): 165.
- [10] 吴瑜, 易成, 王树人, 等. 婴儿双歧杆菌对小鼠黑色素瘤模型肿瘤组织的靶向性[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2005, 36(3): 436.

(收稿日期:2010-06-09 修回日期:2010-07-18)