

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000767

婴儿双歧杆菌介导 HSV-TK/GCV 对前列腺癌 PC-3 细胞裸鼠移植瘤细胞凋亡的影响

郑斌¹, 唐永永², 蒋立², 熊涛¹, 唐伟²

(1. 重庆市荣昌县人民医院泌尿外科, 重庆 402460; 2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究婴儿双歧杆菌(*bifidobacterium infantis*, BI)介导单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK)/丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)自杀基因系统对 PC-3 细胞裸鼠移植瘤细胞凋亡的影响。**方法:**采用前列腺癌 PC-3 细胞悬液皮下注射法建立裸鼠前列腺癌模型,并随机分为 4 组,每组各 12 例,分别经尾静脉注射 BI-pGEX-TK(重组质粒组)、BI-pGEX-5X-1(空质粒组)、BI(空婴儿双歧杆菌组)和生理盐水(生理盐水组),联合腹腔注射 GCV,4 周后,称取裸鼠质量及肿瘤质量。TUNEL 法检测各组肿瘤细胞凋亡情况,real-time PCR、Western blot 分别检测各组肿瘤组织中 Fas、FAP-1、casepase3 和 casepase8 的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果:**重组质粒组荷瘤裸鼠体质量明显高于其余 3 组($F=12.952, P=0.000$),肿瘤组织质量明显降低($F=7.795, P=0.000$);重组质粒组凋亡指数明显高于其他 3 组($F=45.895, P=0.000$);重组质粒组 Fas mRNA($F=70.077, P=0.000$)、casepase3 mRNA($F=70.611, P=0.000$)和 casepase8 mRNA($F=73.781, P=0.000$)的表达明显上调,FAP-1 mRNA($F=46.880, P=0.000$)的表达明显下调。重组质粒组 Fas 蛋白($F=664.116, P=0.000$)、casepase3 蛋白($F=203.090, P=0.000$)和 casepase8 蛋白($F=654.354, P=0.000$)的表达明显上调,FAP-1 蛋白($F=318.989, P=0.000$)的表达明显下调。**结论:**婴儿双歧杆菌介导 HSV-TK/GCV 自杀基因系统可能通过影响 Fas 介导凋亡信号通路,诱导荷瘤裸鼠前列腺癌细胞的凋亡,发挥抑癌作用。

【关键词】婴儿双歧杆菌;前列腺癌;单纯疱疹病毒胸苷激酶/丙氧鸟苷;Fas

【中图分类号】R737.25;R73-36

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-12-09

Effects of HSV-TK/GCV suicide gene therapy system mediated by bifidobacterium infantis on cell apoptosis of prostate cancer PC-3 cell xenografts in nude mice

Zheng Bin¹, Tang Yongyong², Jiang Li¹, Xiong Tao², Tang Wei¹

(1. Department of Urology, People's Hospital in Rongchang County of Chongqing;

2. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of bifidobacterium infantis(BI)-mediated herpes simplex virus thymidine kinase(HSV-TK)/ganciclovir(GCV) suicide gene therapy system on cell apoptosis of prostate cancer PC-3 cell xenografts in nude mice. **Methods:** The prostate cancer model was established by subcutaneous injection of human prostate cancer cell line PC-3 into nude mice. The model mice were randomly divided into 4 groups, which were treated by intraperitoneal injection of GCV in combination with tail vein injection of BI carrying recombinant plasmid BI-pGEX-TK(recombinant plasmid group), BI carrying empty plasmid BI-pGEX-5x-1(empty plasmid group), BI(BI group) and normal saline(normal saline group). After 4 weeks of treatment, tumor weights and nude mice weights were recorded. The apoptosis of tumor was detected by TUNEL assay. The expression of Fas, FAP-1, casepase3 and casepase8 were determined by real-time qPCR and Western blot, respectively. **Results:** After treatment, comparing with those of empty plasmid group, BI group and normal saline group, the nude mice weights in recombinant plasmid group increased($F=12.952, P=0.000$), the tumor weights decreased($F=7.795, P=0.000$). The apoptosis index of recombinant plasmid group was obviously higher than that of the other three groups($F=45.895, P=0.000$). Comparing with the other three groups, the mRNA expression of Fas($F=70.077, P=0.000$), casepase3($F=70.611, P=0.000$) and casepase8($F=73.781, P=0.000$) in recombinant plasmid group increased, but the mRNA expression of FAP-1($F=46.880, P=0.000$) decreased. Protein expression of Fas($F=664.116, P=0.000$), casepase3($F=203.090, P=0.000$) and casepase8($F=654.354, P=0.000$) in recombinant plasmid group increased, but the expression of FAP-1 protein($F=318.989, P=0.000$) decreased. **Conclusion:** The BI-mediated HSV-TK/GCV suicide gene therapy system can inhibit nude mice prostate cancer

作者介绍: 郑斌, Email: zh0515@163.com,

研究方向: 泌尿系肿瘤。

通信作者: 唐伟, Email: tangwei2060@163.com。

基金项目: 重庆市卫生局医学科研资助项目(编号: 2012-2-325)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150910.1828.020.html>

(2015-09-10)

progression effectively, probably through affecting Fas mediated apoptosis signaling pathways, inducing to nude mice prostate cancer cells apoptosis and playing a role in tumor suppression.

【Key words】 bifidobacterium infantis; prostate cancer; herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir; Fas

前列腺癌是全球男性的第二大常见恶性肿瘤,是与癌症相关的第六大死亡原因^[1]。在我国,前列腺癌的发病率虽远低于欧美发达国家,但随着我国人口老龄化、饮食结构和生活方式的改变,其近年来呈现不断上升的趋势,且增长比欧美发达国家更为迅速^[2]。前列腺是一个较为特殊的人体器官,在其外部有一层脂质包膜,该包膜具有单向渗透性,导致药物很难进入前列腺组织,为前列腺癌的化疗增添了难度。多数早期局限性前列腺癌可通过根治性前列腺切除术等治疗达到较好的疗效,晚期转移性前列腺癌的早期综合治疗效果也非常满意,但是对去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC)的治疗非常棘手,效果不佳。并且,大部分雄激素依赖性前列腺癌最终会发展成为难治性 CRPC。因此,为 CRPC 患者寻求一种更理想的治疗方式显得尤为重要。肿瘤的基因治疗是当前研究的热门话题,单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK)/丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)是目前研究最早最彻底的,广泛用于肿瘤基因治疗的自杀基因系统之一。本实验运用婴儿双歧杆菌(bifidobacterium infantis, BI)介导 HSV-TK/GCV 自杀基因系统治疗裸鼠前列腺癌,观察其安全性及疗效,并初步探讨其可能相关机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

含 pGEX-TK 质粒的 BI、含 pGEX-5X-1 质粒的 BI 及未处理的 BI 为本课题组前期实验保存,人前列腺癌 PC-3 细胞株购于重庆医科大学附属第一医院分子肿瘤及表观遗传学实验室。胎牛血清、RPMI1640 培养基及 0.25% 胰酶购于 HyClone 公司,兔抗人 caspase3、caspase8、Fas、FAP-1 多克隆抗体购于 Immunoway 公司, TUNEL 试剂盒购于罗氏(Roche)公司, SYBRGreen 荧光定量 PCR 试剂盒购于 Takara 公司, HRP 标记羊抗兔二抗、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-Page 凝胶电泳试剂盒、ECL 超强化学反应发光底物及 DAB 显色剂均购于上海碧云天生物技术公司,更昔洛韦购于宜昌长江药业有限公司。

1.2 实验动物

选用 4~5 周龄健康雄性 Balb/c 裸鼠 60 只,体质量 15~18 g,饲养条件为重庆医科大学动物实验中心 SPF 级动物房,12 h 昼夜节律。裸鼠可自由饮水、进食。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 PC-3 细胞培养于含 10% 胎牛血清、青霉素(100 U/L)和链霉素(100 mg/L)的 RPMI1640 培养液中,37 °C、5% CO₂ 的培养箱中常规传代培养。

1.3.2 人前列腺癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立及分组治疗 收集对数生长期的 PC-3 细胞,取 1×10⁶ 个细胞/100 μl 接种

于裸鼠右侧背部皮下,接种后每天观察裸鼠肿瘤形成情况及注射点有无异常。选取建模成功且荷瘤大小均一的 48 只裸鼠随机分为 4 组:生理盐水(生理盐水)组、重组质粒(BI-pGEX-TK)组、空质粒(BI-pGEX-5X-1)组、空婴儿双歧杆菌(BI)组,每组各 12 例。分别经尾静脉注射生理盐水、含 pGEX-TK 质粒的双歧杆菌菌液、含 pGEX-5X-1 质粒的双歧杆菌菌液和婴儿双歧杆菌菌液(含菌数约为 1×10⁷)各 0.2 ml。每 7 d 1 次,连续 4 周。各组裸鼠从处理第 1 天开始每天腹腔注射 GCV(50 mg/kg),连续 28 d。治疗结束后,处死各组裸鼠并称量裸鼠及荷瘤体质量。

1.3.3 TUNEL 法检测裸鼠肿瘤组织细胞凋亡 实验步骤按 TUNEL 试剂盒(POD 法)说明书进行。裸鼠肿瘤组织取出后予以甲醛固定,石蜡包埋,切片处理。再予以脱蜡、通透、标记反应液标记、DAB 显色、封片,显微镜下观察、拍照。凋亡细胞皱缩,胞质致密,核呈棕褐色着色,核固缩,核染色质边集,核膜完整,可见凋亡小体。每张切片观察 5 个视野,计算凋亡指数(apoptotic index, AI)=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.3.4 Real-time PCR 检测 分别取各组裸鼠前列腺癌组织 100 mg, Trizol 法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR。引物由重庆博培生物技术有限公司设计和合成。引物序列:Caspase-3:上游引物:5'-AGATGGTTGAG-CCTGAGCA-3',下游引物:5'-CAGTGGTATGGAGAAATGG-3',扩增片段大小:103 bp;Caspase-8:上游引物:5'-GCTTT-GACCACGACCTTTGA-3',下游引物:5'-GATGATGCCCTT-GTCTCCAT-3',扩增片段大小:165 bp;Fas:上游引物:5'-CCGATTCATCTACCCTGCTG-3',下游引物:5'-TGAGCAA-TTCCAGAGGCAGT-3',扩增片段大小:152 bp;PAP-1:上游引物:5'-GGATTGTGGCCTTCTTTGAG-3',下游引物:5'-TA-CCCAGCCTCCGTTATCCT-3',扩增片段大小:111 bp;PCR 循环条件为:94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

1.3.5 Western blot 检测 分别取各组裸鼠前列腺癌组织 100 mg, 剪碎、研磨后,加入 PMSF 及裂解液,离心后取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。总蛋白中加入上样缓冲液,沸水中煮 10 min,取 50 μg 蛋白上样,10% SDS-PAGE 电泳分离,半干电转膜仪转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入兔抗人 caspase-3(1:1 000 稀释)、caspase-8(1:1 000 稀释)、Fas(1:500 稀释)、FAP-1(1:500 稀释)和 β-actin(1:500 稀释)一抗体,室温摇床孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入相应的二抗,室温摇床孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 增强化学发光试剂显色,成像。

1.4 统计学处理

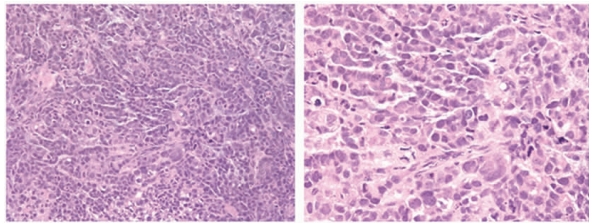
统计分析运用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组样本数据间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 人前列腺癌裸鼠皮下移植瘤模型及病理

人前列腺癌裸鼠皮下移植瘤模型建模过程中共有 2 只

裸鼠死亡,5 只未成瘤,53 只成瘤,在成瘤的裸鼠中随机选取 1 只,处死后取出肿瘤,固定,石蜡包埋,切片,HE 染色。光镜下观察,见肿瘤细胞排列较紊乱,细胞体积较大、形态不一致,细胞核大小及染色深浅不一,呈腺癌特征(图 1)。



A. 放大倍数 200× B. 放大倍数 400×
图 1 荷瘤裸鼠前列腺癌组织病理切片 (HE)

Fig.1 Histopathological appearance of the xenografts in nude mice (HE)

2.2 各组裸鼠及荷瘤体质量

BI-pGEX-TK 组较生理盐水组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组裸鼠质量增加 ($F=12.952, P=0.000$), 荷瘤质量降低 ($F=7.795, P=0.000$)。生理盐水组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组之间比较, 裸鼠质量、荷瘤质量差异均无统计学意义, 见表 1。

2.3 TUNEL 法检测肿瘤组织凋亡

TUNEL 法检测发现各组裸鼠前列腺癌组织中有不同程度的凋亡(图 2), BI-pGEX-TK 组较生理盐水组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组凋亡明显增加 ($F=45.895, P=0.000$)。生理盐水

组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组之间比较, 凋亡程度无统计学意义, 结果见表 1。

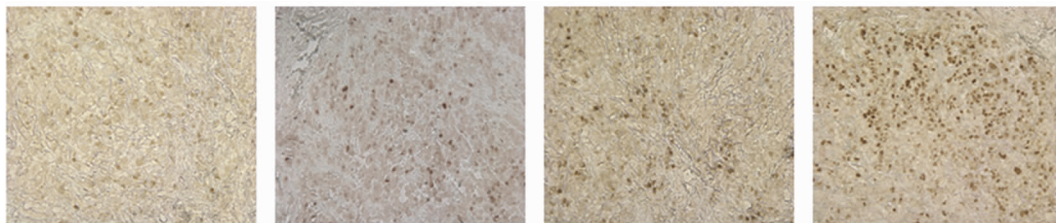
表 1 各组裸鼠、荷瘤体质量及凋亡指数 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 The nude mice and tumor weights and apoptotic index of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量 (n)	裸鼠体质量 (g)	荷瘤体质量 (g)	凋亡指数 (%)
生理盐水组	12	23.12 ± 1.20	1.67 ± 0.09	10.11 ± 2.16
BI 组	12	23.18 ± 0.89	1.65 ± 0.11	11.45 ± 2.87
BI-pGEX-5X-1 组	12	23.52 ± 1.13	1.64 ± 0.08	10.95 ± 3.03
BI-pGEX-TK 组	12	25.26 ± 0.51 ^a	1.50 ± 0.09 ^a	22.07 ± 3.35 ^a
F 值		12.952	7.795	45.895
P 值		0.000	0.000	0.000

注: a, 与其余 3 组相比, $P < 0.05$

2.4 Real-time PCR 检测裸鼠前列腺癌组织 casepase3、casepase8、Fas 及 FAP-1 的 mRNA 表达

Real-time PCR 结果显示 BI-pGEX-TK 组 casepase3 ($F=70.611, P=0.000$)、casepase8 ($F=73.781, P=0.000$) 及 Fas ($F=70.077, P=0.000$) 的 mRNA 表达水平较生理盐水组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组明显增加, 而 FAP-1 的 mRNA 表达水平较生理盐水组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组明显降低 ($F=46.880, P=0.000$)。生理盐水组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组之间相互比较, casepase3、casepase8、Fas 及 FAP-1 的 mRNA 表达差异均无统计学意义, 见表 2。



A. 生理盐水组 B. BI 组 C. BI-pGEX-5X-1 组 D. BI-pGEX-TK 组

图 2 各组肿瘤组织凋亡 TUNEL 染色 (200×)
Fig.2 TUNEL assay in PCa xenografts of nude mice of each group (200×)

表 2 各组 casepase3、casepase8、Fas、FAP-1 及 GAPDH real-time PCR 的 ct 值 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 The ct value of real-time PCR of casepase3, casepase8, Fas, FAP-1 and GAPDH ($\bar{x} \pm s$)

指标	生理盐水组	BI 组	BI-pGEX-5X-1 组	BI-pGEX-TK 组	F 值	P 值
casepase3	22.53 ± 0.25	22.29 ± 0.23	22.36 ± 0.30	21.46 ± 0.17	70.611	0.000
casepase8	23.54 ± 0.12	23.42 ± 0.19	23.44 ± 0.31	22.51 ± 0.17	73.781	0.000
Fas	27.48 ± 0.22	27.63 ± 0.15	27.51 ± 0.31	26.34 ± 0.21	70.077	0.000
FAP-1	24.63 ± 0.13	24.64 ± 0.15	24.59 ± 0.21	25.61 ± 0.20	46.880	0.000
GAPDH	18.83 ± 0.11	18.76 ± 0.14	18.75 ± 0.13	18.75 ± 0.12		

注: F 值及 P 值是根据公式 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 计算各组 ct 值得到相对于生理盐水组的相对表达倍数的统计结果; casepase 结果中: BI-pGEX-TK 组分别与生理盐水组、BI 组及 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值均为: 0.000; 生理盐水组分别与 BI 组及 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值分别为: 0.051, 0.145; BI 组与 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值为 0.602。casepase8 结果中: BI-pGEX-TK 组分别与生理盐水组、BI 组及 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值均为: 0.000; 生理盐水组分别与 BI 组及 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值分别为: 0.136, 0.407; BI 组与 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值为 0.498。Fas 结果中: BI-pGEX-TK 组分别与生理盐水组、BI 组及 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值均为: 0.000; 生理盐水组分别与 BI 组及 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值分别为: 0.291, 1.000; BI 组与 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值为 0.292。FAP-1 结果中: BI-pGEX-TK 组分别与生理盐水组、BI 组及 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值均为: 0.000; 生理盐水组分别与 BI 组及 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值分别为: 0.220, 0.356; BI 组与 BI-pGEX-5X-1 组比较, P 值为 0.758

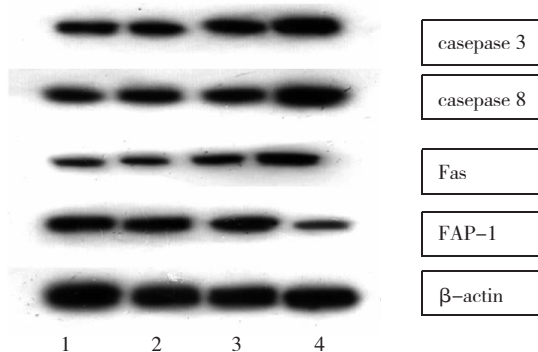
表 3 各组 caspase3、caspase8、Fas、FAP-1 与 GAPDH 的灰度比值 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.3 The gray ratio of caspase3, caspase8, Fas, FAP-1 to GAPDH ($\bar{x} \pm s$)

指标	生理盐水组	BI组	BI-pGEX-5X-1组	BI-pGEX-TK组	F 值	P 值
caspase3	0.641 ± 0.016	0.628 ± 0.018	0.620 ± 0.024	0.864 ± 0.046	203.090	0.000
caspase8	0.499 ± 0.016	0.494 ± 0.013	0.484 ± 0.018	0.858 ± 0.041	654.354	0.000
Fas	0.349 ± 0.027	0.334 ± 0.012	0.343 ± 0.025	0.672 ± 0.022	664.116	0.000
FAP-1	0.714 ± 0.037	0.697 ± 0.024	0.692 ± 0.035	0.377 ± 0.026	318.989	0.000

注: caspase 结果中: BI-pGEX-TK组分别与生理盐水组、BI组及 BI-pGEX-5X-1组比较, P值均为: 0.000; 生理盐水组分别与 BI组及 BI-pGEX-5X-1组比较, P值分别为: 0.264, 0.086; BI组与 BI-pGEX-5X-1组比较, P值为 0.536。caspase8 结果中: BI-pGEX-TK组分别与生理盐水组、BI组及 BI-pGEX-5X-1组比较, P值均为: 0.000; 生理盐水组分别与 BI组及 BI-pGEX-5X-1组比较, P值分别为: 0.615, 0.155; BI组与 BI-pGEX-5X-1组比较, P值为 0.352。Fas 结果中: BI-pGEX-TK组分别与生理盐水组、BI组及 BI-pGEX-5X-1组比较, P值均为: 0.000; 生理盐水组分别与 BI组及 BI-pGEX-5X-1组比较, P值分别为: 0.093, 0.509; BI组与 BI-pGEX-5X-1组比较, P值为 0.299。FAP-1 结果中: BI-pGEX-TK组分别与生理盐水组、BI组及 BI-pGEX-5X-1组比较, P值均为: 0.000; 生理盐水组分别与 BI组及 BI-pGEX-5X-1组比较, P值分别为: 0.206, 0.099; BI组与 BI-pGEX-5X-1组比较, P值为 0.688

2.5 Western blot 检测裸鼠前列腺癌组织 caspase3、caspase8、Fas 及 FAP-1 的蛋白表达

Western blot 结果显示 BI-pGEX-TK 组 caspase3 ($F=203.090, P=0.000$)、caspase8 ($F=654.354, P=0.000$) 及 Fas ($F=664.116, P=0.000$) 的蛋白表达水平较生理盐水组、BI组和 BI-pGEX-5X-1 组明显增加, 而 FAP-1 的蛋白表达水平较生理盐水组、BI组和 BI-pGEX-5X-1 组明显降低 ($F=318.989, P=0.000$)。生理盐水组、BI组和 BI-pGEX-5X-1 组之间相互比较, caspase3、caspase8、Fas 及 FAP-1 的蛋白表达差异均无统计学意义, 见表 3、图 3。



1. 生理盐水组; 2. BI组; 3. BI-pGEX-5X-1组; 4. BI-pGEX-TK组

图 3 Western blot 半定量分析结果

Fig.3 The analysis of Western blot

3 讨论

随着肿瘤的基因治疗研究的深入, 自杀基因也受到了越来越多的关注。自杀基因 (suicide gene), 是指将某些病毒或细菌的基因导入靶细胞中, 其表达的酶可催化无毒的药物前体转变为细胞毒物质,

从而导致携带该基因的受体细胞被杀死, 此类基因称为自杀基因。HSV-TK 作为其中的一员, 是目前研究最多、进展最快的自杀基因之一。其作用机制是细胞感染该基因后, 能表达 TK, 而 TK 能催化 GCV 磷酸化, 磷酸化的 GCV 能取代 DNA 合成过程中的三磷酸鸟苷, 抑制 DNA 聚合酶, 使 DNA 链的延长终止, 从而抑制蛋白质的合成, 杀伤处于分裂期的细胞, 最终导致肿瘤细胞死亡, 而哺乳动物本身所含的 TK 并没有这种功能^[3]。自杀基因靶向治疗疗效在很多肿瘤的基础实验和临床试验中得到了证实。Freyta 等^[4]用转基因法将含 TK 基因的腺病毒治疗前列腺癌患者, 3 周后, 患者的 PSA 明显下降; Li 等^[5]在成神经管细胞瘤的研究中发现, 维甲酸可以增强 HSV-TK 基因疗法的疗效, 而其机制主要是通过借助于增强旁观者效应来杀灭肿瘤细胞。Zeng 等^[6]用 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗系统治疗人类乳腺癌细胞株 MCF-7, 发现细胞周期被阻滞在 G1/S 阶段。

如上所述, 肿瘤的 TK 基因治疗具有较好的疗效, 而人体细胞中的 TK 基因并没有杀灭肿瘤细胞的功能。因此, 要想外源性 TK 基因在人体肿瘤的治疗中发挥作用, 寻求一种安全、有效的载体就显得尤为重要。双歧杆菌是一种厌氧菌, 而恶性实体瘤组织中的氧分压特别是中心区域的氧分压远低于正常组织^[7], 这就为选择双歧杆菌作为自杀基因治疗肿瘤的载体提供了很好的基础。本课题组及一些其他国内外研究均表明^[8-12], 用双歧杆菌作为肿瘤基因治疗的载体具有良好的肿瘤靶向定植性, 且具有较好的安全性、特异性和高效性。本实验中, 采用 BI 介导 pGEX-TK/GCV 治疗前列腺癌裸鼠, 治疗过

程中裸鼠无死亡,无明显并发症。治疗 4 周后,BI-pGEX-TK 组的荷瘤裸鼠体质量明显高于生理盐水组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组,肿瘤质量明显降低,而生理盐水组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组之间比较无统计学差异。TUNEL 结果显示 BI-pGEX-TK 组较生理盐水组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组肿瘤细胞凋亡明显增加。这一结果使得 BI 介导 pGEX-TK/GCV 治疗肿瘤的安全性和有效性得到了进一步证实,也为前列腺癌的基因治疗提供了新的思路,而其机制可能是诱导肿瘤细胞凋亡。

细胞凋亡是由体内外因素触发细胞内预存的死亡程序而导致的细胞主动性死亡方式。目前研究认为,细胞凋亡的途径主要有两条:一条是通过细胞外信号激活细胞内的凋亡酶 caspase;一条是通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活 caspase^[13]。外部途径主要利用细胞间的死亡配基(如 Fas 配基,肿瘤坏死因子 TNF)去活化“死亡受体”,通过死亡受体凋亡信号使启动子 caspase(caspase8)和执行因子(caspase3、7)进入凋亡程序^[14]。在本实验中,qRT-PCR 结果显示 BI-pGEX-TK 组 Fas、caspase8、caspase3 的 mRNA 表达水平均明显高于生理盐水组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组。Western blot 检测结果显示 BI-pGEX-TK 组 Fas、caspase8、caspase3 表达水平也均明显高于其他 3 组。此结果说明本实验中 BI 介导 pGEX-TK/GCV 治疗前列腺癌可能通过 Fas 配基的激活,从而激活 caspase8,进而激活 caspase3,最终导致肿瘤细胞的凋亡。

Fas 相关磷酸酶-1(Fas associated phosphatase-1, FAP-1),作为 Fas 系统的负调因子,在细胞生长、分化、细胞周期甚至肿瘤转化的调控过程中有广泛参与。它一般不表达在正常组织细胞中,但在恶性肿瘤组织中却有高水平的表达。FAP-1 在 Fas 介导的凋亡信号转导通路中起阻碍作用,从而抑制肿瘤细胞的凋亡^[15-16]。而在本实验中,qRT-PCR 及 Western blot 结果均显示 BI-pGEX-TK 组的前列腺癌组织中 FAP-1 表达水平明显低于生理盐水组、BI 组和 BI-pGEX-5X-1 组。因此推测 BI 介导 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗系统降低 FAP-1 表达,活化 Fas 介导凋亡信号通路,从而发挥抑瘤作用。

总之,BI 介导 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗系统治疗裸鼠前列腺癌是安全、有效的。然而,BI 介导 HSV-TK/GCV 自杀基因如何转染前列腺癌细胞,是否存在其他诱导凋亡的信号通路还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015 Jan-Feb; 65(1): 5-29. doi: 10.3322/caac.21254. Epub 2015 Jan 5.
- [2] 那彦群, 叶章群, 孙颖浩, 等. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 61.
- [3] Ketola A, Maatta AM, Pasanen T, et al. Osteosarcoma and chondrosarcoma as targets for virus vectors and herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy [J]. *Int J Mol Med*, 2004, 13(5): 705-710.
- [4] Freytag SO, Movsas B, Aref I, et al. Phase I trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy combined with IMRT for prostate cancer [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(5): 1016-1023.
- [5] Li S, Gao Y, Pu K, et al. All-trans retinoic acid enhances bystander effect of suicide gene therapy against medulloblastomas [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 503(2): 115-119.
- [6] Zeng ZJ, Xiang SG, Xue WW, et al. The cell death and DNA damages caused by the Tet-On regulating HSV-tk/GCV suicide gene system in MCF-7 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(7): 887-892.
- [7] 孙恒, 李雪冰, 方靖. 低氧与肿瘤 [J]. *生命科学*, 2013, 25(2): 206-217.
- [8] Yin X, Yu B, Tang Z, et al. Bifidobacterium infantis-mediated HSV-TK/GCV suicide gene therapy induces both extrinsic and intrinsic apoptosis in a rat model of bladder cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(2): 77-81.
- [9] 王琳, 浦寅飞, 王衣祥, 等. 双歧杆菌在肿瘤靶向性基因治疗中的应用 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2013, 40(2): 268-272.
- [10] Xiao X, Jin R, Li J, et al. The antitumor effect of suicide gene therapy using Bifidobacterium infantis-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir in a nude mice model of renal cell carcinoma [J]. *Urology*, 2014, 84(4): 982.
- [11] 江虹锐, 鲁志刚, 马玉彦, 等. 两歧双歧杆菌在荷瘤鼠模型中的靶向定植及对巨噬细胞的免疫激活 [J]. *肿瘤*, 2009, 29(8): 721-726.
- [12] 喻备, 王亚荣, 殷祥瑞, 等. 婴儿双歧杆菌介导 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗系统对大鼠膀胱癌组织细胞凋亡及 Fas/FasL 表达的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2012, 41(10): 877-881.
- [13] 李敏, 林俊. 细胞凋亡途径及其机制 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41(2): 103-107.
- [14] Jia LT, Chen SY, Yang AG. Cancer gene therapy targeting cellular apoptosis machinery [J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(7): 868-876.
- [15] Gump JM, Staskiewicz L, Morgan MJ, et al. Autophagy variation within a cell population determines cell fate through selective degradation of Fap-1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(1): 47-54.
- [16] Joshi S, Ryan KM. Autophagy chews Fap to promote apoptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(1): 23-25.