

肿 瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001889

超声靶向介导载 CD-TK 双自杀基因的微泡
对肺癌的治疗作用胡 聪¹, 杜晓燚¹, 江德鹏¹, 杨 旭², 张荣贵²

(重庆医科大学附属第二医院 1. 呼吸内科; 2. 泌尿外科, 重庆 400010)

【摘要】目的:制备载胞苷脱氨酶-胸腺嘧啶激酶 (colicytosedeaminase-thymidinekinase, CD-TK) 双自杀基因的超声微泡, 检测其对肺癌的杀伤效应。**方法:**制备载 CD-TK 双自杀基因的微泡, 观察形态和大小, 用碘化丙啶染质粒, 观察荧光和计算微泡与基因的结合率。培养肺癌 H1299 细胞系和建立肺癌裸鼠模型, 随机分为对照、超声 (ultrasound, U)+微泡 (microbubble, M)+CD-TK、U+M+CD-TK+5-FC (5- fluorcytosine, 5-氟胞嘧啶)、U+M+CD-TK +GCV (ganciclovir, 丙氧鸟苷)、U+M+CD-TK +5-FC+GCV 5 组, 每组 1×10^7 个细胞。微泡转染 H1299 肺癌细胞, 24 h 后观察细胞绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 荧光表达情况, 测定细胞 GFP 转染效果和每组 24 h 细胞凋亡和周期。体内动物实验, 每组 6 只裸鼠, 对照组注射 200 μ L PBS, 其余各组尾静脉注射等量的载 CD-TK 双自杀基因的微泡。观察微泡的显影, 同时在肿瘤部位超声辐照转染基因, 每组按实验分组连续腹腔注射 5-FC、GCV 一周, 每周记录每只裸鼠肿瘤的最长径和最短径, 计算并记录肿瘤的体积变化。第 5 周取裸鼠肿瘤标本。免疫荧光测 TdT (TUNEL 法) 和 PCNA 的表达, 评估肿瘤组织细胞凋亡和增殖情况。**结果:**成功制备出载 CD-TK 双自杀基因的微泡, 无毒前药 5-FC 和 GCV 联合载 CD-TK 双自杀基因的超声微泡治疗效果明显, 有促进凋亡 [凋亡率 $(28.45 \pm 1.75)\%$]、抑制增殖作用 [S 期 $(61.40 \pm 4.31)\%$], 疗效明显优于对照组及单药组 (5-FC 组 $P=0.002$ 和 GCV 组 $P=0.012$, 对照组 $P=0.000$)。双药联合超声辐照载基因微泡组的肿瘤体积最小、质量最小、凋亡细胞最多、增殖受抑制最明显。**结论:**无毒前药 5-FC+GCV 联合微泡载 CD-TK 双自杀基因能促进肺癌细胞凋亡, 抑制其增殖, 对肺癌有明显杀伤作用。

【关键词】肺癌; 自杀基因; 微泡; 超声**【中图分类号】**R246.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-03-14

Clinical effect of ultrasound-targeted microbubbles loaded with cytidine deaminase-thymidine kinase double suicide gene in treatment of lung cancer

Hu Cong¹, Du Xiaoyi¹, Jiang Depeng¹, Yang Xu², Zhang Ronggui²

(1. Department of Respiratory Medicine; 2. Department of Urinary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To prepare the ultrasound microbubbles loaded with the cytidine deaminase-thymidine kinase (CD-TK) double suicide gene, and to investigate its killing effect on lung cancer. **Methods:** The microbubbles loaded with the CD-TK double suicide gene were prepared, and their morphology and size were observed. Propidium iodide was used for the staining of plasmids to observe fluorescence and calculate the binding rate of microbubbles and genes. Lung cancer H1299 cells were cultured and a nude mouse model of lung cancer was established. The cells were randomly divided into control group, ultrasound (U)+microbubble (M)+CD-TK group, U+M+CD-TK+5-fluorcytosine (5-FC) group, U+M+CD-TK+ganciclovir (GCV) group, and U+M+CD-TK+5-FC+GCV group, with 1×10^7 cells in each group. The lung cancer H1299 cells were transfected with the microbubbles, and after 24 hours, the expression of green fluorescent protein (GFP) was observed and the effect of GFP transfection and 24-hour apoptosis and cell cycle were measured. In the animal experiment *in vivo*, there were 6 nude mice in each group; the mice in the control group were treated with the injection of 200 μ L phosphate-buffered saline, and those in all the other groups were given the tail vein injection of an equal volume of the

microbubbles loaded with the CD-TK double suicide gene. The development of microbubbles was observed, and gene transfection was performed at the tumor site by ultrasound irradiation. Intraperitoneal injection of 5-FC and GCV was performed for one week. The longest and shortest diameters of the tumors of each nude mouse were recorded every week, and the change in tumor volume was calculated and recorded. Tumor samples

作者介绍: 胡 聪, Email: 1137520554@qq.com,

研究方向: 肺癌的治疗。

通信作者: 张荣贵, Email: 896846903@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81650003); 重庆市科委资助项目 (编号: cstc2015jcyjA10030)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190116.1744.002.html>
(2019-01-17)

were collected for the nude mice at week 5; immunofluorescence assay was used to measure the expression of TdT (the TUNEL method) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and cell apoptosis and proliferation in tumor tissue were assessed. **Results:** The microbubbles loaded with the CD-TK double suicide gene were successfully prepared. 5-FC and GCV combined with ultrasound microbubbles loaded with CD-TK double suicide gene had a marked therapeutic effect and significantly promoted apoptosis [an apoptosis rate of $(28.45 \pm 1.75)\%$] and inhibited proliferation [$(61.40 \pm 4.31)\%$ cells in S phase], with a significantly better effect than the control group ($P=0.000$), the 5-FC group ($P=0.002$), and the GCV group ($P=0.012$). The U+M+CD-TK+5-FC+GCV group had the lowest tumor volume and weight, the highest number of apoptotic cells, and the most significant inhibition of proliferation. **Conclusion:** 5-FC and GCV combined with ultrasound microbubbles loaded with the CD-TK double suicide gene can promote the apoptosis and inhibit the proliferation of lung cancer cells and thus have a marked killing effect on lung cancer.

[Key words] lung cancer; suicide gene; microbubble; ultrasound

肺癌发病率高,病死率高,严重威胁我国人民的生命健康^[1]。肺癌的发生与多种基因相关,其过程复杂。近年来,肿瘤分子生物学和免疫学等基础学科快速发展,以及靶向治疗、免疫治疗的应用明显提高了肺癌患者的生存率和生活质量,但是总体治疗效果仍不满意,需探索新的治疗手段和方法以提高疗效。肿瘤基因治疗可以通过改变基因表达的强度,破坏细胞生长,导致肿瘤衰退及坏死;通过修改基因提高后续的抗癌反应性和免疫系统识别能力等方式清除肿瘤细胞^[2-4]。自杀基因治疗肿瘤的机制是将外源基因导入肿瘤细胞,胞内表达产生的活性酶可以将肿瘤细胞周围无毒性的药物催化成仅杀伤肿瘤细胞的药物^[5-6]。胞苷脱氨酶/5-氟胞嘧啶系统(CD/5-FC)和胸腺嘧啶激酶基因/丙氧鸟苷系统(TK/GCV)是目前应用较成熟的自杀基因/前药体系。微泡的应用已经从传统的血管内单模态成像到多模态和诊断治疗相结合的多功能成像。载基因或药物微泡经静脉注入血液后,在超声的动态监测下,可直接观察到微泡经血液循环迅速聚集于肿瘤组织。同时,利用适宜强度的超声在肿瘤靶区的体表定位辐照,超声介导的微泡破裂将所携带的基因迅速释放到肿瘤区,实现靶向目的,微泡破裂产生的空化效应以及声孔效应不但可直接损伤肿瘤细胞,更能增加药物的吸收,提高药物的疗效^[7-8]。本实验通过超声辐照联合微泡载胞苷脱氨酶-胸腺嘧啶激酶(colicytocyne deaminase-thymidine kinase, CD-TK)双自杀基因对肺癌 H1299 细胞的体外杀伤和肺癌裸鼠的体内治疗,观察其对肺癌的杀伤效应,此方法有望成为治疗肺癌的新方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

肺癌细胞系 H1299 由重庆医科大学检验医学院惠赠,

RPMI1640 培养液、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,0.25%胰蛋白酶购自碧云天公司,CMV-GFPa1-IRES-CDglyTK 双自杀基因质粒由上海诺百公司构建,5-氟胞嘧啶(5-FC)、丙氧鸟苷(GCV)购自重庆赛米克公司,二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG(2000))购自瑞士 Corden 公司,阳离子胆固醇购自美国 Avanti 公司,全氟丙烷、原位末端转移酶标记法(TUNEL)试剂盒购自 Roche 公司,PCNA 试剂盒购自 Roche 公司,PI(碘化丙啶)购自碧云天公司、超声辐照仪由重庆医科大学超研所研制,超声诊断仪购自意大利百胜公司。

1.2 载双自杀基因 CD-TK 的微泡制备

DPPC、DSPE-PEG(2000)、阳离子胆固醇为原料,按一定比例混匀,通过水浴-震荡-结合构建载双自杀基因 CD-TK 微泡,用 PBS 溶液稀释样品,电位-粒度分析仪样品池分析,荧光显微镜下观察。微泡载基因结合率=(基因总量-未结合基因总量)/基因总量 $\times 100\%$

1.3 细胞培养

肺癌细胞系 H1299 细胞培养于 RPMI1640 培养液(含 10%胎牛血清和 100 U/mL 青霉素和链霉素)中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。2 d 换液,细胞长到 90%传代。

1.4 检测细胞凋亡和细胞周期

肺癌细胞系 H1299,6 孔板每孔适宜的密度接种,1 d 后,对照、超声(ultrasound,U)+微泡(microbubble,M)+CD-TK、U+M+CD-TK+5-FC(5-fluorocytosine,5-氟胞嘧啶)、U+M+CD-TK+GCV(ganciclovir,丙氧鸟苷)、U+M+CD-TK+5-FC+GCV 5 组细胞超声(频率 1 MHz、连续波、辐照时间 15 s、声强 1.5 W/cm²)转染质粒 48 h 后,实验分组与浓度为 2 mg/mL 和 500 μg/mL GCV 的 RPMI1640 培养液共孵育 24 h,凋亡测量按试剂盒说明书,悬浮细胞、结合 Annexin V-FITC 和 PI。0.25%胰酶消化细胞,悬浮于 0.4 mL PBS 中,细胞用 75%预冷乙醇固定 24 h 后,流式细胞仪上分析细胞周期,实验独立重复 3 次,计算平均值。

1.5 动物实验

4~6 周裸鼠 30 只,购自重庆医科大学动物实验中心,每只裸鼠皮下接种约 107 个肺癌 H1299 细胞,由实验动物中心

代养。随机分为对照、U+M+CD-TK、U+M+CD-TK+5-FC、U+M+CD-TK+GCV、U+M+CD-TK+5-FC+GCV 5 组,每组各 6 只。对照组不作任何处理,其余各组尾静脉注射 200 μ L 等量微泡,每天注射 1 次,连续注射 1 周,同时用超声辐照(频率 1 MHz、连续波、辐照时间 15 s、声强 1.5 W/cm²)。连续 1 周每天腹腔注射 400 mg/kg 5-FC 和 40 mg/kg GCV 药物。每周测量肿瘤的长径和短径,第 5 周处死裸鼠,取肿瘤,测量,称重,做切片。肿瘤体积=长径(a) $\times$ 短径²(b^2)/2。

1.6 免疫荧光测定肿瘤石蜡切片 TUNEL 和 PCNA

参照试剂盒说明书操作,主要包括石蜡切片脱蜡抗原修复,滴加 PBS 按一定比例配好的一抗(TdT 和 PCNA),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。滴加与一抗相应种属的用 FITC 荧光素标记的二抗覆盖组织,避光室温孵育 50 min。后用抗荧光淬灭封片剂封片。切片于荧光显微镜下观察并采集图像。

1.7 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件对计量资料进行分析,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,裸鼠肿瘤体积大小为重复测量资料,采用重复测量方差分析。微泡和基因的结合率、细胞转染率采用 t 检验方法,其他多组计量资料进行单因素方差结果分析,两两比较采用 LSD- t 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 载双自杀基因微泡的基本特性

经马尔文粒径仪检测,载 CD-TK 双自杀基因的微泡平均粒径为 $(1.37 \pm 0.32) \mu\text{m}$,微泡原浓度为 $[(2.18 \pm 0.46) \times 10^{12}]$ 个/L。载双自杀基因微泡的扫描电镜图如图 1A 所示。光镜下观察到均匀分布的微泡如图 1B 所示。载自杀基因的微泡经过 PI 染色,PI 与质粒结合,微泡发出红色荧光(图 1C),表明微泡成功载 CD-TK 双自杀基因,计算出微泡和基因的结合率为 $(78.21 \pm 0.82)\%$ ($t=110.600, P=0.000$)。用超声辐照仪转染肺癌 H1299 细胞,荧光显微镜 24 h 可以观察到 GFP 荧光,转染 48 h 后,荧光显微镜观察载基因微泡超声辐照组绿色荧光最强(图 1D),胞质中有清晰的绿色荧光表达,裸质粒组未见绿色荧光,用流式细胞术测量微泡超声辐照组肺癌 H1299 细胞 GFP 转染率为 $(45.88 \pm 2.36)\%$ ($t=15.84, P=0.000$) (图 2),超声辐照肺癌 H1299 细胞,与对照组未作任何处理的肺癌 H1299 相比(图 1E),辐照组产生瞬时开孔效应,观察到细胞产生许多小孔(图 1F),验证了超声可以导致声孔效应。

2.2 载双自杀基因微泡在体内超声下的显影

将制备的载双自杀基因微泡原液稀释 100 倍后,放在 1 mL 琼脂糖凝胶模型中,微泡在超声和超声造影下观察(图 3B),与对照 PBS 组(图 3A)相比明显增强。尾静脉注射 200 μ L 稀释 100 倍的微泡在肺癌裸鼠后,同时在超声和超声造影下观察到裸鼠肿瘤部位的微泡显影(图 3D),而注射等量 PBS 无显影(图 3C)。

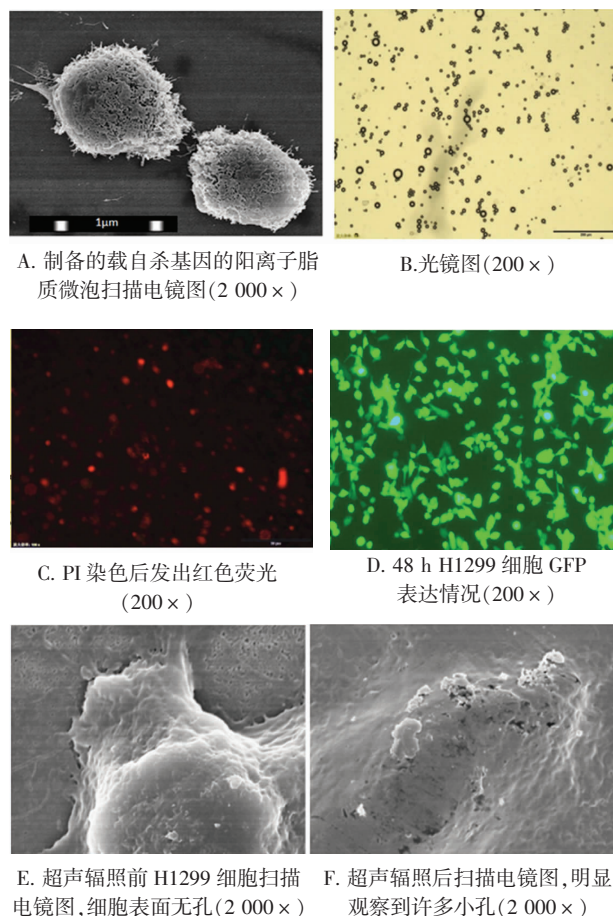
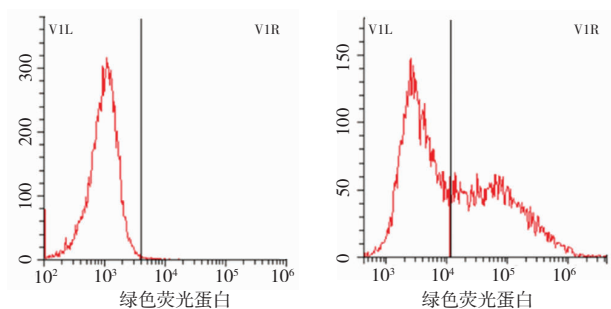


图 1 微泡基本特性



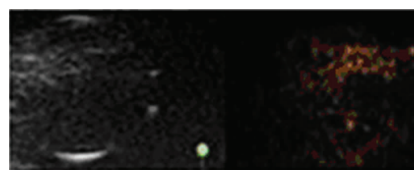
U+M+CD-TK 转染 H1299 细胞,流式细胞仪测量 GFP 表达转染效果与对照组相比, $P=0.000$

图 2 细胞转染率 ($n=3$)

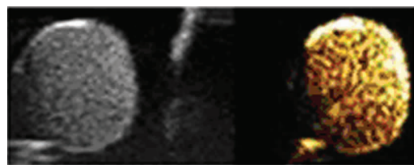
2.3 前药联合载双自杀基因微泡对肺癌细胞 H1299 的杀伤作用

载 CD-TK 双自杀基因微泡转染 H1299 细胞后,5 组实验分组中 5-FC 浓度 2 mg/mL 和 GCV 浓度 0.5 mg/mL 共孵育 24 h 后,前药 5-FC 和 GCV 微泡载 CD-TK 双自杀基因明显导致细胞凋亡,与对照组未做任何处理相比,差异有统计学意义 ($F=137.820, P=0.000$);且好于单药 ($F=137.820, 5\text{-FC}$ 组 $P=0.000$ 和 GCV 组 $P=0.000$),差异有统计学意义。流式周期图 24 h 结果表明与未处理对照组相比,TK/GCV 将 H1299 阻滞在 S 期,超声辐照+微泡+质粒 S 期细胞比未处理组 ($F=$

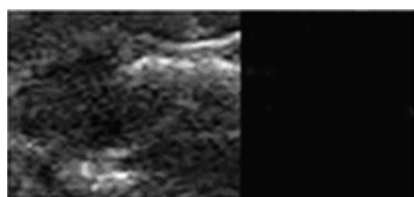
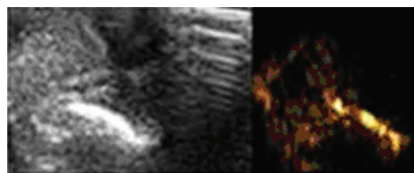
69.00, $P=0.000$) 和 GCV 组 ($F=69.00, P=0.000$) 相比, 差异均有统计学意义 (图 4, 表 1)。



A. 对照组



B. 微泡超声造影下

C. 注射 200 μ L PBS

D. 注射微泡

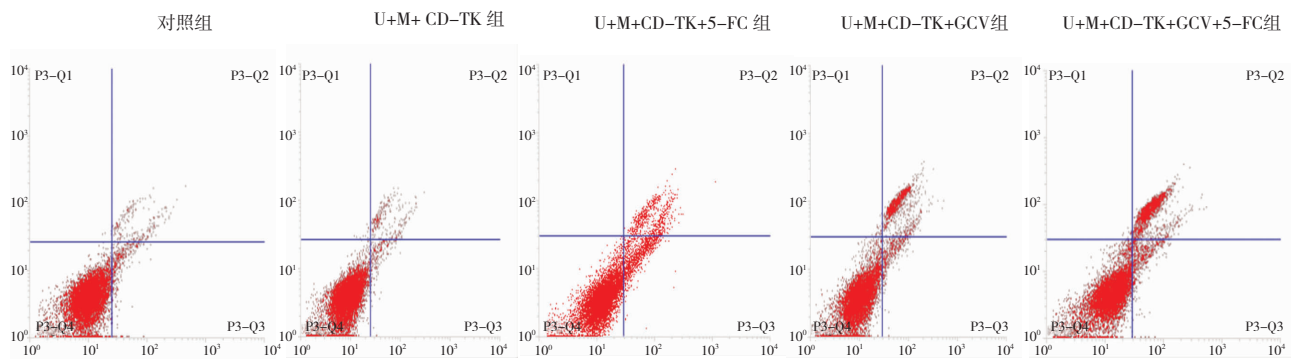
图 3 微泡体内外的显影

表 1 各组细胞 24 h 凋亡率和分裂期对比 ($\bar{x} \pm s$)

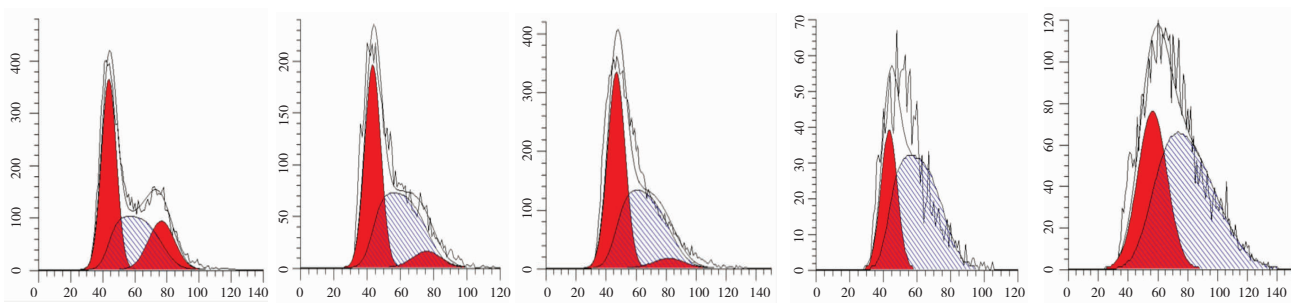
组别	凋亡率 (%)	分裂期
对照组	2.75 ± 0.67	23.01 ± 1.83
U+M+CD-TK 组	4.63 ± 0.87	24.35 ± 4.91
U+M+CD-TK+5-FC 组	16.16 ± 1.94	28.24 ± 2.16
U+M+CD-TK+GCV 组	17.90 ± 1.59	42.51 ± 2.14
U+M+CD-TK+GCV+5-FC 组	28.45 ± 1.75	61.40 ± 4.31
F 值	137.820	69.000
P 值	0.000	0.000

2.4 肺癌裸鼠模型中前药联合微泡载自杀基因对肿瘤的杀伤作用

小鼠皮下肺癌移植瘤生长变化 (图 5A), 前药微泡载 CD-TK 双自杀基因组中, 裸鼠肿瘤生长明显缓慢, 5-FC 和 GCV 前药联合微泡载 CD-TK 双自杀基因组表现出更为明显的抑制肿瘤生长的作用, 5 周肿瘤体积明显低于对照组 (图 5A), 5-FC 和 GCV 前药联合微泡载 CD-TK 双自杀基因组, 肿瘤生长各组组间的方差分析 ($F=1\ 076.286, P=0.000$) 和肿瘤生长的不同时间的方差分析 ($F=1\ 085.260, P=0.000$) 存在交互作用 ($F=228.340, P=0.000$)。5-FC 和 GCV 前药联合微泡载 CD-TK 双自杀基因组与对照组肿瘤体积相比明显减小 ($F=548.730, P=0.000$), 与单药组间肿瘤体积也明显减小 (5-FC 组 $F=490.270, P=0.000$; GCV 组 $F=330.730, P=0.000$), 见表 2。不同组间的两两比较结果提示: 各组之间两两比较的差异均存在统计学意义。TUNEL 荧光染色检测肿瘤组织内的细胞凋亡: 荧光显微镜观察 5-FC 和 GCV 前药联合微泡载 CD-TK 双自杀基因组凋亡细胞 (绿色荧光) 与对照组相比明显增多, 与单药组相比明显增多。PCNA 染色检测肿瘤组织内的细胞增殖: 荧光显微镜下可见 5-FC 和 GCV 前药联合微泡组的增殖细胞与对照组相比明显减少, 与单药组相比增殖细胞数减少。



A. 流式细胞术测量 24 h 各组的凋亡



B. 流式细胞术测量 24 h 各组的周期

图 4 流式细胞技术测细胞周期和凋亡

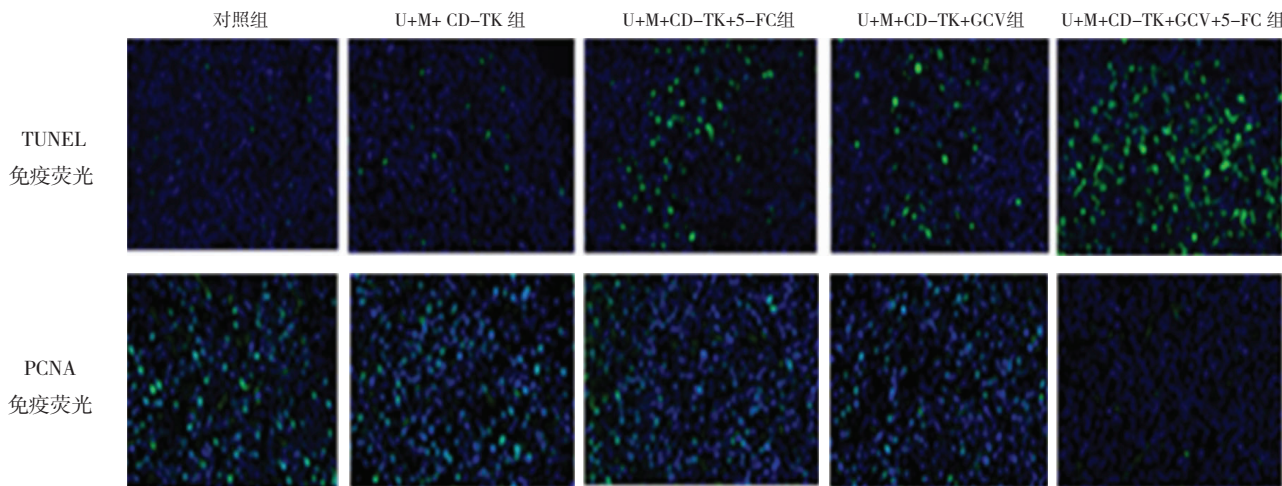


图 5 裸鼠肿块大小和肿块切片分析

表 2 各组肿瘤体积 5 周大小

组别	1 周	2周	3周	4周	5周
对照组	93.25 ± 6.06	165.39 ± 4.90	214.80 ± 5.32	388.83 ± 4.86	573.19 ± 7.66
U+M+CD-TK组	95.55 ± 17.83	135.21 ± 13.32	173.25 ± 4.70	358.63 ± 7.73	554.30 ± 5.30
U+M+CD-TK+5-FC组	88.88 ± 9.03	141.32 ± 7.83	205.30 ± 5.27	202.98 ± 2.66	388.24 ± 12.02
U+M+CD-TK+GCV组	84.55 ± 4.17	126.96 ± 5.93	160.26 ± 7.08	185.27 ± 4.99	318.74 ± 2.55
U+M+CD-TK+GCV+5-FC组	80.92 ± 5.54	119.80 ± 4.90	130.89 ± 4.46	140.64 ± 4.65	228.61 ± 10.61

3 讨 论

肿瘤是在多因素诱导下,多基因参与的细胞增殖、分化、凋亡失调而形成新生物的复杂病理生理过程。针对肿瘤,手术治疗、放化疗有诸多局限性,需不断探索新的治疗手段以弥补传统治疗方法的局限。肿瘤是一种基因病,纠正发生缺陷的基因或载入外源基因等方法可为抗肿瘤提供新的途径。基因治疗需要载体帮助,常规的有病毒载体和非病毒载体^[9-10]。病毒载体因其免疫原性,易致机体突变等生物安全隐患而使用受限,利用超声微泡作为抗肿瘤自杀基因的载体,具有载基因量高、稳定性好、靶向性好、无免疫原性、可修饰、相对无创等优点,同时还可增加疗效及减轻毒副作用,在肿瘤的诊断和治疗方面具有很大的发展潜力^[11-16]。

本实验成功制备载 pGFP-CD-TK 双自杀基因的微泡,在光镜下看到微泡较均一,并用 PI 染色荧光条件下观察了微泡载 pGFP-CD-TK 双自杀基因发出红色荧光,计算出微泡和基因的结合率为 (78.21 ± 0.82)%,表明其成功搭载双自杀基因且结合效率高。与对照组未处理的正常 H1299 细胞相比,本研究观察到超声辐照下载 pGFP-CD-TK 双自杀基因的微泡将质粒成功转染进 H1299 细胞,观察到 48 h GFP 绿色荧光最强,转染率约 50%。在体外

扫描电镜实验中,观察到超声辐照肺癌 H1299 细胞,产生瞬时开孔效应,验证了超声可以导致声孔效应。本研究在琼脂糖凝胶模型中,与对照组 PBS 缓冲液相比,超声微泡的体外的造影模式下明显显影。同时本研究构建了肺癌 H1299 细胞的裸鼠模型,裸鼠尾静脉注射载 pEGFP-CD-TK 双自杀基因的微泡,在造影模式下观察到微泡集中在裸鼠肿块部位,而注射等量 PBS 缓冲液则没有观察到增强信号。本实验通过尾静脉注射微泡,经血液循环到达肿瘤组织,超声辐照载双自杀基因 CD-TK 的超声微泡,产生空化效应以及声孔效应,达到对自杀基因在肿瘤部位的靶向释放。这些实验证明本研究成功构建了一个双自杀基因 CD-TK 的超声微泡系统,这个系统能够靶向聚集于肿瘤部位。

本实验用微泡载体将 CD-TK 双自杀基因转染人肺癌细胞 H1299,在 5-FC 存在条件下,对肿瘤细胞的杀伤率达 25.8%,在 GCV 存在条件下,杀伤率达 35.4%,在联合两者的条件下杀伤率达 58.6%。在细胞周期流式实验组中,与对照组和单独用药组相比,联合用药组细胞 S 期细胞百分比明显增多。体内实验将载 GFP-CD-TK 双自杀基因的微泡注射至荷瘤裸鼠模型,同时腹腔注射 5-FC 或 GCV 均可抑制肿瘤生长,联用效果更加明显,表明 CD-TK 双自杀基因的协同作用。同时,比较 5 组肿瘤的 TUNEL 和 PCNA 免疫荧光染色,观察其肿瘤的凋亡和增殖

情况,再次验证了以上结果。总之,5-FC 和 GCV 双前药联合载 CD-TK 双自杀基因的微泡对肺癌H1299 肿瘤细胞和肺癌裸鼠模型均有杀伤作用和较强的增殖抑制效应,且双药联合双自杀基因疗效好于单药。

细胞周期中 G1 到 S 和 G2 到 M 这两个阶段的分子水平变化活跃,易受环境影响。自杀基因 TK 编码的胸苷激酶能将 GCV 磷酸化为核苷酸类似物三磷酸 GCV,三磷酸 GCV 与细胞 S 期的 DNA 结合,取代相应的正常核苷酸,从而干扰 DNA 的正常生物合成,使得进入 S 期的细胞被杀灭,可见 TK 基因能从分子水平影响肿瘤细胞的生长周期,发挥抗癌作用。CD 基因编码的胸腺嘧啶激酶能将无毒的前药 5-FC 脱氨转变为有毒药物,同时提高细胞对 GCV 前药的敏感性,加强 GCV 的杀伤效果。CD-TK 双自杀基因编码的 2 种酶互补提高杀伤力,加上 5-FC 转变的有毒药物可以通透细胞,三磷酸 GCV 无法通透细胞,两者的合用可同时在细胞内外起到杀伤肿瘤细胞作用^[17-18]。

超声支气管镜近年来在肺部广泛应用,成为呼吸疾病诊断和治疗的重要技术^[19-21]。支气管镜可获得气管和邻近支气管外的周围组织结构的超声断层图像,便于支气管内超声引导下经支气管针吸活检术^[22-23]。因此,通过支气管入路,借助纤维支气管镜,可以将超声应用于中央型肺癌,从而使载自杀基因微泡的应用可以实现。同时,胸腔积液、胸膜肿物、邻近胸膜的肺实质病变(如肺良恶性肿瘤)和肺不张等病变也可以成为超声检查的声窗,从而可以显示肺实质病变,同样也可以为载自杀基因微泡治疗提供适应证。

总之,本研究制备的微泡可以作为 CD-TK 双自杀基因的载体,可以实现对肺癌靶向基因转染和治疗,该系统对肺癌的分子显像和治疗的后续研究均有重要价值。

参 考 文 献

- [1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2013[J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1):11-30.
- [2] Amer MH. Gene therapy for cancer:present status and future perspective[J]. Mol Cell Ther,2014,2:27.
- [3] 邓洪新,魏于全. 肿瘤基因治疗的研究现状和展望[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2015,22(2):170-176.
- [4] Wirth T,Parker N,Ylä-Herttuala S. History of gene therapy[J]. Gene,2013,525(2):162-169.
- [5] Zarogoulidis P,Darwiche K,Sakkas A,et al. Suicide gene therapy for cancer—current strategies[J]. J Genet Syndr Gene Ther,2013,4:16849.
- [6] 谢鑫,姜庆,梁培禾,等. 携 HSV_1-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[J]. 第三军医大学学报,2012,34(13):1285-1288.
- [7] Wood AK,Sehgal CM. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy[J]. Ultrasound Med Biol,2015,41(4):905-928.
- [8] Li J,Zhou P,Li L,Zhang Y,et al. Effects of cationic microbubble carrying CD/TK double suicide gene and $\alpha\beta 3$ integrin antibody in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. PLoS One,2016,11(7):e0158592.
- [9] Pahle J,Walther W. Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy[J]. Expert Opin Biol Ther,2016,16(4):443-461.
- [10] Chira S,Jackson CS,Oprea I,et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors[J]. Oncotarget,2015,6(31):30675-30703.
- [11] Hayashi S,Mizuno M,Yoshida J,et al. Effect of sonoporation on cationic liposome mediated IFN beta gene therapy for metastatic hepatic tumors of murine colon cancer[J]. Cancer Gene Ther,2009,16(8):638-643.
- [12] Zhou S,Li S,Liu Z,et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene treats hepatoma in mice[J]. J Exp Clin Cancer Res,2010,29:170.
- [13] Zhou SJ,Li SW,Wang JJ,et al. High-intensity focused ultrasound combined with herpes simplex virus thymidine kinase gene-loaded ultrasound-targeted microbubbles improved the survival of rabbits with VX2 liver tumor[J]. J Gene Med,2012,14(9-10):570-579.
- [14] Chen ZY,Sun XF,Liu JQ,et al. Augmentation of transgenic expression by ultrasound mediated liposome microbubble destruction[J]. Mol Med Rep,2012,5(4):964-970.
- [15] Xu Y,Xie Z,Zhou Y,et al. Experimental endostatin-GFP gene transfection into human retinal vascular endothelial cells using ultrasound-targeted cationic microbubble destruction[J]. Mol Vis,2015,21:930-938.
- [16] Tang Q,He X,Liao H,et al. Ultrasound microbubble contrast agent-mediated suicide gene transfection in the treatment of hepatic cancer[J]. Oncol Lett,2012,4(5):970-972.
- [17] Fischer U,Steffens S,Frank S,et al. Mechanisms of thymidine kinase/ganciclovir and cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy-induced cell death in glioma cells[J]. Oncogene,2005,24(7):1231-1243.
- [18] Cao HQ,Meng XM,Liu DQ,et al. Killing effect of coexpressing cytosine deaminase and thymidine kinase on rat vascular smooth muscle cells[J]. Chin Med J (Engl),2004,117(10):1464-1470.
- [19] 毕珂,夏德萌,王霄人,等. 超声新技术在肺活检术中的应用进展[J]. 中国医学影像技术,2017,33(10):1566-1569.
- [20] 房延凤,李王平,顾兴,等. 超细支气管镜联合 EBUS-GS 对周围型肺癌诊断效能及影响因素分析[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版),2017,10(4):406-409.
- [21] 夏琼,梅芳,倪雪松,等. 超声引导下经皮肺穿刺活检在肺外周性病变诊断中的应用[J]. 临床肺科杂志,2014,19(5):955-957.
- [22] Sperandio M,dimitri L,Pirri C,et al. Advantages of thoracic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy in lung cancer and mesothelioma[J]. Chest,2014,146(5):e178-179.
- [23] Li XH,Zhou P,Wang LH,et al. The targeted gene(KDRP-CD/TK) therapy of breast cancer mediated by SonoVue and ultrasound irradiation in vitro[J]. Ultrasonics,2012,52(1):186-189.

(责任编辑:冉明会)