

泌尿系统疾病诊断与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000163

婴儿双歧杆菌介导HSV-TK/GCV自杀基因治疗系统对裸鼠肾细胞癌肿瘤细胞凋亡及NF- κ B活性的影响

肖 啸,任 劲,杨 柒,唐 伟

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘要】目的:证实婴儿双歧杆菌(*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)自杀基因系统对裸鼠肾癌的治疗作用,检测其诱导裸鼠肾癌组织细胞凋亡的作用及对核因子- κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)信号通路的影响。**方法:**引瘤后原代细胞培养注射细胞悬液法建立裸鼠皮下荷瘤肾癌模型,并随机分为BI-pGEX-TK/GCV组(重组质粒组)、BI-pGEX-5X-1/GCV组(空质粒组)、BI/GCV组(空BI组)和生理盐水/GCV对照组(生理盐水组)。分别经尾静脉注射BI-pGEX-TK、BI-pGEX-5X-1、BI和生理盐水,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,qRT-PCR、Western blot检测各组肿瘤组织Rel A、Caspase-3 mRNA及蛋白表达水平。**结果:**(1)重组质粒组荷瘤裸鼠体质量明显高于其余3组($P=0.006$),肿瘤组织质量明显降低($P=0.003$)。(2)TUNEL法检测发现各组均有不同程度的肿瘤细胞凋亡,以重组质粒组最为明显($P=0.000$)。(3)与空质粒组、空BI组及生理盐水组比较,重组质粒组Rel A蛋白表达明显下调($P=0.000$),Caspase-3蛋白表达明显上调($P=0.000$)。**结论:**BI介导HSV-TK/GCV自杀基因系统对荷瘤裸鼠肾癌有明显的抑制作用,可能通过影响NF- κ B信号通路的活性,诱导荷瘤裸鼠肾癌肿瘤细胞的凋亡,发挥抑癌作用。

【关键词】婴儿双歧杆菌;肾细胞癌;基因治疗;核因子- κ B

【中图分类号】R737.11;R73-36

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-06

作者介绍:肖 啸,Email:xiaorder@aliyun.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计划资助项目(编号:2011-1-012)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000163.html

- [10] Sun H, Meng X, Han J, et al. Anti-cancer activity of DHA on gastric cancer—an in vitro and in vivo study[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(6): 3791-3800.
- [11] Wu GS, Lu JJ, Guo JJ, et al. Synergistic anti-cancer activity of the combination of dihydroartemisinin and doxorubicin in breast cancer cells[J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(2): 453-459.
- [12] Wu B, Hu K, Li S, et al. Dihydroartemisinin inhibits the growth and metastasis of epithelial ovarian cancer[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(1): 101-108.
- [13] He Q, Shi J, Shen XL, et al. Dihydroartemisinin upregulates death receptor 5 expression and cooperates with TRAIL to induce apoptosis in human prostate cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(10): 819-824.
- [14] 高小玲, 罗子国, 王丕龙, 等. 双氢青蒿素诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡及其机制研究[J]. *中草药*, 2010, 41(1): 81-84.
- [15] Perry AS, Foley R, Woodson K, et al. The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(2): 357-377.
- [16] Thibault A, Figg WD, Bergan RC, et al. A phase II study of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in hormone independent metastatic (D2) prostate cancer[J]. *Tumori*, 1998, 84(1): 87-89.
- [17] Xiang T, Li L, Yin X, et al. The ubiquitin peptidase UCHL1 induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis through stabilizing p53 and is frequently silenced in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29783.
- [18] Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T et al. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(4): 527-532.
- [19] Liao X, Siu MK, Chan KY et al. Hypermethylation of RAS effector related genes and DNA methyltransferase 1 expression in endometrial carcinogenesis[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(2): 296-302.
- [20] Morey Kinney SR, Smiraglia DJ, James SR, et al. Stagespecific alterations of DNA methyltransferase expression, DNA hypermethylation, and DNA hypomethylation during prostate cancer progression in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(8): 1365-1374.

(责任编辑:唐宗顺)

Effects of HSV-TK/GCV suicide gene therapy system mediated by bifidobacterium infantis on apoptosis of renal cell carcinoma and activity of nuclear factor kappa B in nude mice

Xiao Xiao, Ren Jin, Yang Qi, Tang Wei

(Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To confirm effects of bifidobacterium infantis mediated herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK)/ganciclovir (GCV) suicide gene system on the treatment of renal cell carcinoma in nude mice and to detect the induction of apoptosis and activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway in renal cell carcinoma. **Methods:** Tumor cells which obtained through digestion of subcutaneous tumor were cultured and then subcutaneously injected into the right flank of the test mice. Animals were randomly divided into four groups: BI-pGEX-TK/GCV treatment group (recombinant plasmid group), BI-pGEX-5X-1/GCV group (empty plasmid group), BI/GCV group (empty BI group) and normal saline/GCV control group (normal saline group). Either saline or drug was injected through tail vein, followed by intraperitoneal injection of GCV. The quality of life was recorded after 4 weeks of treatment and tumor weight was also evaluated. Apoptosis of tumor was detected by TUNEL assay. Expression of Rel A and Caspase-3 was assessed through qRT-PCR and Western blot. **Results:** (1) Quality of life of recombinant group was better and tumor weight of recombinant group was significantly lower compared with those of empty plasmid group, empty BI group and normal saline group ($P=0.006$, $P=0.003$). (2) Different degrees of apoptosis of tumor cells in each group were detected by TUNEL assay, most obvious in recombinant plasmid group ($P=0.000$). (3) More importantly, qRT-PCR and Western blot further demonstrated that the recombinant plasmid group had higher level of Caspase-3 protein expression than empty plasmid group, empty BI group and normal saline group ($P=0.000$), in contrast, the level of Rel A protein expression was the lowest ($P=0.000$). **Conclusion:** Bifidobacterium infantis-mediated HSV-TK/GCV suicide gene therapy system induce apoptosis of tumor cells in renal cell carcinoma possibly by affecting the NF- κ B signaling pathway, which play a tumor promoter role.

[Key words] bifidobacterium infantis; renal cell carcinoma; gene therapy; nuclear factor kappa B

肾癌是严重威胁人类健康的疾病,为泌尿系统常见的恶性肿瘤之一。手术治疗为主,术后放疗及化疗都不敏感,患者复发率及死亡率较高。基因治疗是当前国内外肿瘤治疗的前沿课题,其中自杀基因疗法是近年来基因治疗的研究热点。单纯疱疹病毒胸苷激酶 (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。同时,寻找高效、特异、安全的载体系统是肿瘤基因治疗成功的关键,也是肿瘤基因治疗的难点。有研究表明^[1-3],双歧杆菌 (bifidobacterium infantis, BI) 对肿瘤组织厌氧坏死区有特异的靶向性,同时该菌是人体中的重要益生菌,作为肿瘤基因治疗的载体系统具有高效性、特异性和安全性。本课题组曾经使用 BI 介导 pGEX-TK/GCV 治疗大鼠膀胱癌,疗效显著,膀胱癌细胞凋亡明显增加^[4],但是仍不清楚其作用机制。近年的研究表明,核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 与细胞凋亡的关系密切,其参与多种凋亡相关基因的转录调控,具有抑制细胞凋亡及促细胞凋亡的双向作用^[5]。本实验在研究 BI 介导 HSV-TK/GCV 治疗荷瘤裸鼠肾癌疗效的同时,探讨诱导肾癌细胞凋亡的过程是否通过 NF- κ B 信号通路,旨在进一步明确其治疗作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 BI-pGEX-TK 菌种、BI-pGEX-5X-1 菌种由本实验室保存, TUNEL 试剂盒购于瑞士 Roche 公司, DNA marker DL2000 购于 TaKaRa 公司, SYBRGreen PCR 试剂盒 (F-415XL)、逆转录试剂盒 (#K1622) 购于 Thermo 公司, 兔抗鼠 Rel A、Caspase-3、Actin 多克隆抗体购自 Immunoway 公司 (重庆博培生物技术有限公司分装), 多聚甲醛、PVDF 膜购自北京鼎国生物试剂公司, GCV 购自宜昌长江药业有限公司, 山羊抗兔二抗、PMSF、BCA 法蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒及 ECL 显影剂均购自碧云天生物技术有限公司。

1.1.2 动物 选用健康雌性裸鼠 60 只, 4~5 周龄, 体质量 14~16 g, 饲养环境为重庆医科大学动物实验中心无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 动物房。动物房温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 湿度为 $(60 \pm 5)\%$, 12 h 昼夜节律。裸鼠可以自由饮水和进食。

1.1.3 仪器 光学显微镜、荧光显微镜 BX51 (日本 Olympus), 低温高速离心机 (长沙湘仪公司), PCR 仪、凝胶成像系统 (BIO-RAD 公司), 紫外分光仪 (GE 公司)、real-time 检测仪 ABI-7300 (ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 裸鼠肾癌模型的建立及分组 采用引瘤后原代细胞培养注射细胞悬液法^[6]建立裸鼠皮下荷瘤肾癌模型, 选取荷瘤裸鼠 48 只, 随机分为 4 组, 每组 12 只, 分别为: 重组质粒

组(BI-pGEX-TK)、空质粒组(BI-pGEX-5X-1)、空双歧杆菌组(BI)、生理盐水组(生理盐水)。分别经尾静脉注射 BI-pGEX-TK 菌液、BI-pGEX-5X-1 菌液、BI 菌液(含 BI 约 1×10^7 个)和生理盐水 0.2 ml, 间隔 7 d 重复注射 1 次, 共 4 次。从注射第 1 天开始, 各组裸鼠每天腹腔注射 GCV (50 mg/kg), 连续 28 d。治疗结束后第 1 天, 采用断颈法处死裸鼠, 取瘤体组织 4% 多聚甲醛保存, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色。

1.2.2 各组荷瘤裸鼠肿瘤大小测量 治疗结束, 称量裸鼠体质量后采用断颈法处死, 沿肿瘤边缘剪开皮肤, 分离肿瘤, 紧贴肿瘤基底部分离瘤体组织, 用滤纸吸干水分, 测量肿瘤大小, 称取肿瘤质量。

1.2.3 TUNEL 法检测各组裸鼠肿瘤细胞凋亡及分布情况 实验步骤按照 TUNEL 试剂盒说明书操作。荧光显微镜下观察拍照。加 HRP 标记的抗荧光素抗体, DAB 显色, 普通光学显微镜下观察。细胞核固缩, 核膜裂解, 染色质浓缩、边缘化, 分割成凋亡小体, 呈棕褐色者为凋亡细胞。观察 5 个视野, 每个视野计数 100 个细胞, 计算凋亡指数 (apoptotic index, AI) = 凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 Real-time PCR 检测 Rel A、Caspase-3 mRNA 水平 分别取各组肿瘤组织 100 mg, 剪碎后放入无 RNA 酶的匀浆器中, 加入 1 ml Trizol, 依次匀浆, 提取总 RNA。取 4 μ l RNA 为模板进行逆转录得到 cDNA, 取 2 μ l cDNA 为模板进行 real-time PCR, 根据人类 Rel A、Caspase-3 cDNA 序列由重庆博培设计合成引物(表 1)。反应体系体积为 50 μ l, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。数据采用仪器自带软件分析: ABI Prism7300 SDS Software(表 2)。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物序列	温度 ($^{\circ}$ C)	引物 大小 (bp)
Rel A	前端: 5'-GAATGGCTCGTCTGTACTG-3'	60	232
	后端: 5'-TGGTATCTGTGCTCCTCTC-3'		
Caspase-3	前端: 5'-GTTTGAGCCTGAGCAGAGAC-3'	60	120
	后端: 5'-TGGCAGCATCATCCACAC-3'		
GAPDH	前端: 5'-CACCCACTCCTCCACCTTTG-3'	60	110
	后端: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'		

表 2 qRT-PCR 各组 Ct 值

Tab.2 Ct value of qRT-PCR of each group

基因	重组质粒组	空质粒组	空 BI 组	生理盐水组
Rel A	21.03 $\pm$ 0.01	20.65 $\pm$ 0.03	20.68 $\pm$ 0.02	20.61 $\pm$ 0.08
Caspase-3	23.72 $\pm$ 0.03	24.09 $\pm$ 0.02	24.12 $\pm$ 0.01	24.08 $\pm$ 0.05

1.2.5 Western blot 检测裸鼠肿瘤组织中 Rel A、Caspase-3 蛋白表达水平 取 100 mg 肿瘤组织, 剪碎后放入匀浆器, 加入 990 μ l RIPA 及 10 μ l 10 mg/ml PMSF 溶液, 匀浆至完全裂解, 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 15 min, 取上清于 1.5 ml EP 管中, BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μ g 总蛋白加入适量上样缓冲液, 沸水浴 10 min 后取上清上样。8% SDS-PAGE 电泳, 切胶, 半干电转膜仪转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭

1 h。分别加入 ACTIN、Rel A、Caspase-3 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 随后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗, 与膜 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。ECL 化学发光检测, 凝胶成像系统摄像并记录各目的条带与 β -actin 条带灰度值, 目的条带/ β -actin 条带灰度比值为各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

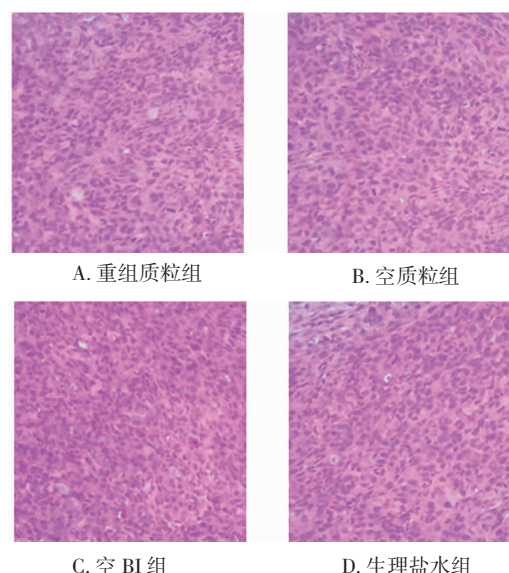
所有实验数据均采用 SPSS 19.0 软件进行处理, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组样本均数的组间比较采用单因素方差分析, 各组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 裸鼠皮下荷瘤肾癌模型建立及病理结果

裸鼠皮下荷瘤肾癌建模过程中死亡 7 只, 其中 1 只在注射细胞悬液后第 10 天死亡, 解剖后病理证实肿瘤组织为肾透明细胞癌, 其他脏器未见异常。选取的 48 只荷瘤裸鼠, 治疗过程中无死亡, 无恶病质发生。

随机选取重组质粒组、空质粒组、空 BI 组以及生理盐水组荷瘤裸鼠肿瘤组织, 肉眼及切片 HE 染色观察可见肿瘤组织为圆形实体瘤, 可见分叶, 表面可有出血坏死点; 癌细胞胞浆透明, 包膜清楚, 组织间可见小的薄壁血管构成的网状间隔, 细胞异形性明显, 大小不一, 排列紊乱, 极性消失(图 1)。

图 1 各组荷瘤裸鼠肾癌组织病理切片 (HE 染色, 200 $\times$)Fig.1 Histopathological appearance of the renal cell carcinoma in nude mice (HE, 200 $\times$)

2.2 荷瘤裸鼠治疗效果比较

与其余 3 组相比, 重组质粒组荷瘤裸鼠肿瘤组织质量明显减轻 ($F=5.266, P=0.003$); 空质粒组、空 BI 组及生理盐水对照组两两比较, 肿瘤组织质量无明显统计学差异。治疗结束后, 重组质粒组裸鼠体质量明显高于其余 3 组 ($F=4.708, P=0.006$); 空质粒组、空 BI 组及生理盐水组两两比较, 裸鼠体

质量无明显统计学差异。表明 BI 介导 HSV-TK/GCV 能明显抑制荷瘤裸鼠肾癌生长,结果见表 3。

表 3 荷瘤裸鼠体重、肿瘤组织质量及 AI 值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Body mass tumor weight and apoptotic index in nude mice RCC model ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量 (n)	体质量 (g)	肿瘤质量 (g)	凋亡指数 (%)
生理盐水组	12	25.67 ± 0.30	1.71 ± 0.06	9.20 ± 1.92
空 BI 组	12	25.73 ± 0.27 ^d	1.68 ± 0.07 ^d	11.40 ± 2.07 ^d
空质粒组	12	25.73 ± 0.36 ^{e,f}	1.68 ± 0.06 ^{d,f}	11.80 ± 2.59 ^{e,f}
重组质粒组	12	26.11 ± 0.35 ^a	1.62 ± 0.05 ^b	23.40 ± 3.05 ^c

注:a,重组质粒组与其余 3 组比较, $F=4.708, P=0.006$;b,重组质粒组与其余 3 组比较, $F=5.266, P=0.003$;c,重组质粒组与其余 3 组比较, $F=34.164, P=0.000$;d,生理盐水组与空 BI 组比较, $P>0.05$;e,生理盐水组与空质粒组比较, $P>0.05$;f,空 BI 组与空质粒组比较, $P>0.05$

2.3 荷瘤裸鼠肾癌组织中凋亡细胞分布及变化

TUNEL 法检测发现各组荷瘤裸鼠肾癌组织中出现不同程度的凋亡细胞(图 2),重组质粒组明显多于其余 3 组($F=34.164, P=0.000$)。空质粒组、空 BI 组及生理盐水组之间没有明显统计学差异,结果见表 3。

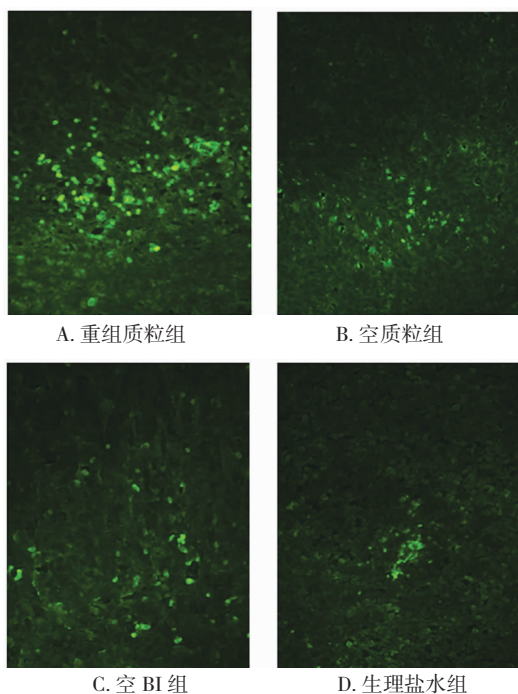
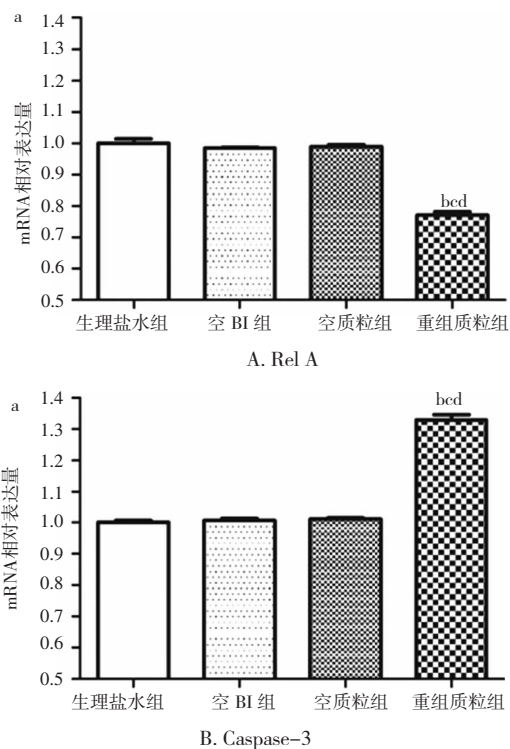


图 2 各组荷瘤裸鼠肿瘤组织凋亡 (TUNEL 染色, 200 ×)
Fig.2 TUNEL assay in nude mice RCC model of each group
(TUNEL, 200 ×)

2.4 荷瘤裸鼠肾癌组织中 Rel A、Caspase-3 mRNA 表达

重组质粒组 Rel A mRNA 表达量明显低于其余 3 组($F=379.596, P=0.000$),空质粒组、空 BI 组、生理盐水组之间比较,Rel mRNA 表达量无统计学差异;重组质粒组 Caspase-3

mRNA 表达量明显高于其余 3 组($F=853.905, P=0.000$),空质粒组、空 BI 组、生理盐水组之间比较,Caspase-3 mRNA 表达量无统计学差异(图 3)。



a. 根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各组 Ct 值得到相对于对照组的相对表达倍数;b. 重组质粒组与生理盐水组比较, $P<0.01$;c. 重组质粒组与空 BI 组比较, $P<0.01$;d. 重组质粒组与空质粒组比较, $P<0.01$

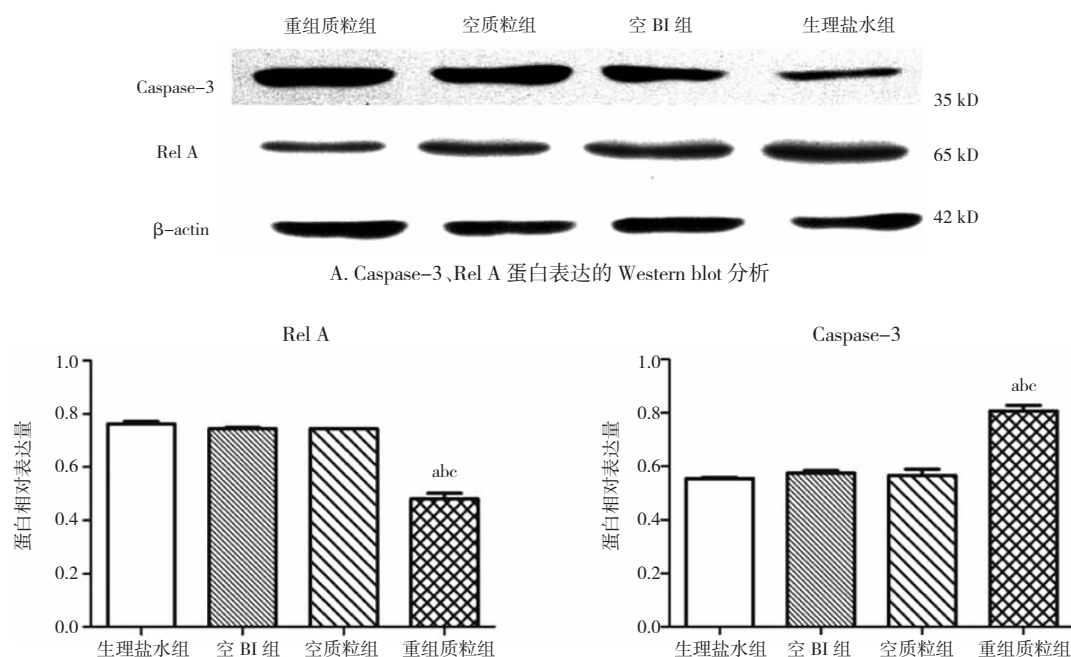
图 3 各组荷瘤裸鼠肾癌中 Rel A、Caspase-3 mRNA 相对表达量
Fig.3 Relative expression folds of Rel A and Caspase-3 mRNA
in nude mice RCC model

2.5 荷瘤裸鼠肾癌组织中 Rel A、Caspase-3 蛋白表达

Western blot 结果显示,重组质粒组 Rel A 蛋白表达明显低于其余 3 组($F=382.290, P=0.000$),空质粒组、空 BI 组、生理盐水组之间比较,Rel A 表达无统计学差异;重组质粒组 Caspase-3 蛋白表达明显高于其余 3 组($F=173.886, P=0.000$),空质粒组、空 BI 组、生理盐水组之间比较,Caspase-3 表达无统计学差异(图 4)。

3 讨论

基因治疗是目前国内外肿瘤研究的前沿课题,而安全、特异和高效的载体系统是肿瘤基因治疗成功与否的关键,也是肿瘤基因治疗的难点。研究证实,BI 介导 sKDR 原核表达系统能够抑制 Lewis 肺癌小鼠的肿瘤生长及血管形成^[7],Yi 等^[8]证实 BI 介导胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶自杀基因系统能引起黑色素瘤小鼠的肿瘤体积减小,江虹锐等^[9]证实 BI



B. HSV-TK/GCV 治疗系统对 Caspase-3 和 Rel A 蛋白表达的影响

a. 重组质粒组与生理盐水组比较, $P < 0.01$; b. 重组质粒组与空 BI 组比较, $P < 0.01$; c. 重组质粒组与空质粒组比较, $P < 0.01$

图 4 各组荷瘤裸鼠肾癌 Caspase-3、Rel A 蛋白表达

Fig.4 Caspase-3 and Rel A protein expression in nude mice RCC model

经尾静脉注射后能定植于胃癌荷瘤裸鼠的瘤体中,而对心、脾、肺、肾及肝等其他组织无定植能力。这些研究表明 BI 作为肿瘤基因治疗载体的可行性。本课题组曾经采用 BI 介导 pGEX-TK/GCV 治疗系统处理膀胱癌荷瘤大鼠,大鼠膀胱癌质量明显降低,心、肝、肾和肺组织未发现肿瘤形成。上述结果表明,BI 作为肿瘤基因治疗的载体系统具有安全性、特异性和有效性。

HSV-TK/GCV 自杀基因系统是目前研究最彻底的自杀基因系统之一,广泛应用于肿瘤基因治疗研究,其产生自杀作用的确切效果已被证实^[10],并进一步开展临床试验^[11]。目前,对于 HSV-TK/GCV 的作用机制也有了广泛和深入的研究,结果表明,其自杀作用主要通过两方面实现:一是自杀效应,二是旁观者效应,两者可能单独或者协同诱导肿瘤细胞凋亡产生自杀作用^[12-14]。喻备等^[15]证实 BI 介导 HSV-TK/GCV 处理人工诱导膀胱癌荷瘤大鼠可通过 Fas/FasL 死亡受体通路诱导荷瘤大鼠膀胱癌凋亡增加。Saati 等^[16]、Pacciarini 等^[17]研究发现药物小剂量多次注射与大剂量单次注射效果相似,在某些情况下由于更低的药物毒性甚至优于大剂量单次注射的效果。本实验中,采用 BI 介导 pGEX-TK/GCV 小剂量多次注射的方法处理肾癌荷瘤裸鼠,治疗过

程中裸鼠无死亡,重组质粒组荷瘤裸鼠体质量明显高于其余 3 组,肿瘤质量明显降低,肿瘤细胞凋亡明显增加,而其余 3 组之间比较无统计学差异,表明 BI 介导 pGEX-TK/GCV 治疗荷瘤裸鼠肾癌是安全、有效的,其主要机制可能是诱导肿瘤细胞凋亡。Beltinger 等^[18]研究证实三磷酸化更昔洛韦能通过缝隙连接从胸苷激酶表达阳性细胞转移到胸苷激酶表达阴性的旁观者细胞,肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 能促进旁观者细胞的杀伤作用。Kim 等^[19]研究表明,对于转移性肾癌,TRAIL 和 HSV-TK/GCV 联合治疗能同时作用于侧群和非侧群细胞,从而达到长期缓解,是安全、有力的治疗策略。上述研究表明,HSV-TK/GCV 自杀基因系统与抑癌基因联合治疗可能是中晚期肾癌达到完全缓解的一种新的治疗策略,其作用机制有待进一步研究。

细胞死亡分为凋亡与坏死 2 种。凋亡又称程序性细胞死亡,是由体内外因素触发细胞内预存的死亡程序而导致细胞死亡的过程。目前研究认为,诱导凋亡主要通过 2 条途径:细胞外的死亡受体途径和细胞内的线粒体途径^[20]。NF- κ B 作为死亡受体途径的一个重要信号通路,由肿瘤坏死因子家族介导,激活 Caspase-8,最后导致 Caspase-3 激活,从而激

活核酸内切酶,使 DNA 链断裂,引起细胞死亡。研究认为,NF- κ B 信号通路的激活主要通过 2 个途径:经典途径和替代途径^[21-22]。Rel A 是最早发现的,分布与作用最广泛的 NF- κ B 效应蛋白,常与 P50 构成异源二聚体,即通常所说的 NF- κ B。正常情况下,NF- κ B 与其抑制因子(NF- κ B inhibitor, I κ B)蛋白家族成员相结合,其中 I κ B α 是最重要的活性调控成员。当细胞受到外界刺激时,I κ B α 与 NF- κ B 解离,NF- κ B 二聚体发生核易位,参与调控相应基因的表达。研究证实,肾细胞癌的分级、侵袭和转移与 NF- κ B 的活性密切相关^[23]。本实验中,重组质粒组裸鼠肿瘤质量明显降低,肿瘤细胞凋亡明显增加,Rel A mRNA 及蛋白表达减少,说明 NF- κ B 经典途径的抑制可能参与了 BI 介导 HSV-TK/GCV 治疗荷瘤裸鼠肾癌的肿瘤细胞凋亡诱导,结合 Caspase-3 蛋白表达上调,提示抑制 NF- κ B 经典途径的激活,引起下游效应蛋白 Caspase-3 表达增加可能是 BI 介导 pGEX-TK/GCV 治疗荷瘤裸鼠肾癌发挥抑癌作用的机制之一。此外,其他诱导凋亡途径(例如细胞内的线粒体途径及 NF- κ B 替代激活途径)是否在 BI 介导 pGEX-TK/GCV 治疗荷瘤裸鼠肾癌诱导肿瘤细胞凋亡过程中发挥作用有待更深入地研究。

参 考 文 献

- [1] Fujimori M, Amano J, Taniguchi S. The genus bifidobacterium for cancer gene therapy[J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2002, 5(2): 200-203.
- [2] Li X, Fu GF, Fan YR, et al. Bifidobacterium adolescentis as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth[J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(2): 105-111.
- [3] Lee do K, Jang S, Kim MJ, et al. Anti-proliferative effects of bifidobacterium adolescentis SPM0212 extract on human colon cancer cell lines[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 310-317.
- [4] Tang W, He Y, Zhou S, et al. A novel bifidobacterium infantis mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer[J]. *Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28: 155.
- [5] Dutta J, Fan Y, Gupta N, et al. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B[J]. *Oncogene*, 2006, 25(51): 6800-6816.
- [6] 郑宏祥, 毛立军, 郝林, 等. 3 种建立人肾癌皮下荷瘤裸鼠模型方法比较[J]. *徐州医学院学报*, 2007, 27(4): 216-218.
- [7] Li ZJ, Zhu H, Ma BY, et al. Inhibitory effect of Bifidobacterium infantis-mediated sKDR prokaryotic expression system on angiogenesis and growth of Lewis lung cancer in mice[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 155.
- [8] Yi C, Huang Y, Guo ZY, et al. Antitumor effect of cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system mediated by Bifidobacterium infantis on melanoma[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(5): 629-634.
- [9] 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.
- [10] 曾曙光, 刘启才, 王素文, 等. mtHSP70/HSV-tk 重组沙门菌抗小鼠黑色素瘤的作用[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(1): 101-105.
- [11] Herman JR, Adler HL, Aguilar-Cordova E, et al. In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial[J]. *Hum Gen Ther*, 1999, 10(7): 1239-1249.
- [12] Hamel W, Magnelli L, Chiarugi VP, et al. Herpes simplex virus kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(12): 2697-2702.
- [13] Jiang W, Liu XX, Kang Y, et al. Therapeutic effect of ovarian intra-arterial infusion of GE7-delivery system-mediated HSV1-tk/ganciclovir gene therapy in a rat model of malignant ovarian tumor[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2012, 34(4): 245-248.
- [14] Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, et al. Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(12): 3212-3217.
- [15] 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.
- [16] Saati S, Agrawal RN, Louie S, et al. Effect of multiple injections of small divided doses vs single injection of intravitreal bevacizumab on retinal neovascular model in rabbits[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2010, 248(4): 457-466.
- [17] Pacciarini MA, Barbieri B, Colombo T, et al. Distribution and antitumor activity of adriamycin given in a high dose and a repeated low-dose schedule to mice[J]. *Cancer Treat Rep*, 1978, 62(5): 791-800.
- [18] Beltinger C, Fulda S, Walczak H, et al. TRAIL enhances thymidine kinase/ganciclovir gene therapy of neuroblastoma cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(4): 372-381.
- [19] Kim SW, Kim SJ, Park SH, et al. Complete regression of metastatic renal cell carcinoma by multiple injections of engineered mesenchymal stem cells expressing dodecameric TRAIL and HSV-TK[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(2): 415-427.
- [20] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205-219.
- [21] Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity[J]. *Trends Immunol*, 2004, 25(6): 280-288.
- [22] Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death—a new approach to cancer therapy[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2625-2632.
- [23] Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, et al. Increased nuclear factor- κ B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(3): 377-384.

(责任编辑: 冉明会)