

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002323

低强度超声介导的载双自杀基因纳泡对膀胱癌小鼠模型的治疗研究

胡 聪¹, 江德鹏², 卢茂青³, 杨 旭³, 张荣贵³

(1. 暨南大学附属珠海医院重症医学科, 珠海 519000; 重庆医科大学附属第二医院 2. 呼吸内科; 3. 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(colicytocinedeaminase-thymidinekinase, CD-TK)双自杀基因纳泡, 用于治疗膀胱癌小鼠。**方法:**采用薄层法制备载 CD-TK 双自杀基因纳泡, 合成 CD-TK 双自杀基因阳离子纳泡, 光镜观察纳泡的形态, 马尔文粒径仪测其粒径; 建立裸鼠后膀胱癌模型, 超声辐照肿瘤部位, 转染双自杀基因, 按实验分组每组连续腹腔注射无毒前药 1 周, 开始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, 免疫荧光评估肿瘤组织切片细胞凋亡和增殖情况。**结果:**本研究成功制备了载 CD-TK 双自杀基因纳泡。通过超声介导载 CD-TK 纳泡成功转染自杀基因, 抑制肿瘤增殖和促进肿瘤凋亡。**结论:**载 CD-TK 纳泡可能成为治疗膀胱癌的一种新方式。

【关键词】超声; 纳泡; CD-TK; 膀胱癌**【中国分类号】**R737.14**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-06-05

Therapeutic effect of low intensity ultrasound-mediated nanobubbles loaded with double suicide gene on bladder cancer in mice

Hu Cong¹, Jiang Depeng², Lu Maoqing³, Yang Xu³, Zhang Ronggui³

(1. Department of Critical Care Medicine, Zhuhai Hospital Affiliated with Jinan University;

2. Department of Respiratory Medicine; 3. Department of Urinary Surgery,

The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To prepare nanobubbles loaded with colicytocinedeaminase-thymidinekinase(CD-TK) for treating bladder cancer in mice. **Methods:** Nanobubbles loaded with CD-TK double suicide gene were prepared by thin layer method and cationic nanobubbles loading CD-TK double suicide gene were synthesized. Nanobubbles' shape was observed through light microscope and the particle diameter was measured via Malvin laser particle size analyzer. The mice model with bladder cancer was established, ultrasound was used to irradiate the tumor site and the double suicide gene was transfected. Intraperitoneal injection of atoxic prodrug was continuously given to each group for one week. The longest and shortest diameters of each nude mouse's tumor were recorded, and the tumor's volume changes were calculated and recorded. Tumor specimens were taken at the fifth week. Apoptosis and proliferation of tumor cells were evaluated by immunofluorescence. **Results:** The nanobubbles loading CD-TK double suicide gene were successfully prepared in this study. Ultrasound-mediated nanobubbles loaded with CD-TK can successfully transfect suicide gene, inhibiting the proliferation and apoptosis of tumors. **Conclusion:** Nanobubbles loaded with CD-TK may be a new therapy for bladder cancer.

【Key words】ultrasound; nanobubbles; colicytocinedeaminase-thymidinekinase(CD-TK); bladder cancer

作者介绍: 胡 聪, Email: 1137520554@qq.com,

研究方向: 肿瘤的治疗。

通信作者: 张荣贵, Email: 1005983970@qq.com。

基金项目: 重庆市委资助项目(编号: cstc2015jcyjA10030); 重庆市

卫生局医学科研重点资助项目(编号: 2012-1-037); 重庆

市渝中区科技计划资助项目(编号: 20130117)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20191010.1324.008.html>

(2019-10-11)

膀胱癌是全世界泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一, 发病率居男性恶性肿瘤的第四位, 死亡率居男性恶性肿瘤的第八位^[1]。膀胱癌约 90% 为移行上皮癌(transitional cell carcinoma, TCC), 临床特点是多中心性, 术后易复发。目前 TCC 的高复发性是临床治疗膀胱癌面临的一大难题, 这一特点和膀胱癌患者的基因缺陷相关。因此, 基因疗法可能为膀

膀胱癌的治疗提供新的思路和方法。

基因治疗可以改变基因的表达,如让细胞过表达“自杀基因”,将无害的前药转化为高杀伤力的药物,从而促进细胞死亡^[2-4]。胞苷脱氨酶/5-氟胞嘧啶(CD/5-FC)和胸腺嘧啶激酶基因/丙氧鸟苷(TK/GCV)是目前应用较为成熟的自杀基因/前药系统,但由于缺乏较好的载体,因此并未广泛使用。腺病毒和慢病毒递送的病毒载体具有高转导效率,但其感染和免疫原性风险仍未得到解决。随着生物医学工程领域的不断发展,纳泡有望弥补病毒的缺陷,表现出良好的前景。纳泡碎片的空化效应和声孔效应不仅直接损伤肿瘤细胞,而且提高了化疗药物的功效^[5-6]。本研究通过制备载 CD-TK 双自杀基因纳泡,研究其对膀胱癌裸鼠模型的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

膀胱癌细胞系 T24 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 CD-TK 纳泡的合成

将一定比例的 DPPC、DSPE-PEG(2000)和胆固醇溶解在圆底烧瓶中的 100 mL 氯仿中,并置于 50 °C 的旋转真空蒸发器中以除去有机溶剂并形成均匀的脂质膜。将体积为 0.5 mL 的由甘油磷酸盐缓冲盐水(V/V 为 1:9)组成的水合溶液加入 1.5 mL 微量离心管中,然后加入脂质悬浮液并用橡胶盖密封。随后,用全氟丙烷替换管中的空气,并将管在 42 °C 的水浴中温育 30 min。然后使用机械振荡器振动 90 s 获得纳泡,并将这些纳泡与 CD-TK 自杀基因一起在 37 °C 下获得载 CD-TK 双自杀基因纳泡。随后,将纳泡稀释并通过光镜观察。在扫描电子显微镜上观察纳泡。上悬浮液包含与 CD-TK 基因组合的纳泡,下层包含游离基因。使用核酸蛋白质检测器测量下部悬浮液中游离基因的浓度。纳泡的基因结合率=(总基因-总未结合基因)/总基因×100%。该实验重复至少 3 次。

1.3 细胞培养

膀胱癌细胞系 T24 细胞培养于 RPMI1640 培养液中培

养,培养液含 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素和链霉素,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。2 d 换液至 90% 汇合。

1.4 细胞凋亡分析

将浓度为 1×10^5 膀胱癌细胞/孔接种于 6 孔板中培养 24 h。对照组、US+CD-TK 基因纳泡组、US+CD-TK 基因+5-FC+GCV 组加用 2 mg/mL 5-FC 和 0.5 mg/mL GCV 孵育 24 h。孵育期结束后,以 560 g RCF 的速度离心去除上清液,并重新悬浮细胞。每管加入 5 mL V-FITC 和 5 mL PI,将样品混合并在黑暗中培养 15 min。用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,再悬浮于 0.4 mL PBS 中,用流式细胞术分析细胞凋亡,每组 5 个样本。

1.5 动物实验

从重庆医科大学实验动物中心购买 30 只 4~6 周龄的裸鼠。使用 0.25% 胰蛋白酶在 37 °C 下从培养瓶中取出培养的膀胱癌 T24 细胞 5 min,以每 1 mL 重悬 1×10^7 个细胞,并皮下注射到小鼠的后背部^[8-10]。接种肿瘤细胞 1 周后,小鼠肿瘤块约达 100 mm³ 开始实验。将小鼠随机分成 3 组,即对照组、US+CD-TK 基因纳泡组、US+CD-TK 基因+5-FC+GCV 组,每组 10 只小鼠。对照组未接受任何治疗。治疗组每天 1 次用 200 μ L 纳泡静脉注射 1 周,并用超声照射。在这些组中,每天 1 次腹腔注射 400 mg/kg 5-FC 和(或)40 mg/kg GCV 的浓度,持续 1 周。每周测量肿瘤的长度和直径,并且在 5 周后处死小鼠并取出肿瘤,测量其长短并切片。肿瘤的体积=长径(a)×短径²(b^2)/2。

1.6 免疫荧光法测定肿瘤的石蜡切片 TUNEL 和 PCNA

参照试剂盒说明书提供方法操作,包括石蜡切片脱蜡抗原修复,以及在 4 °C 温度下与单一抗体(TdT 或 PCNA)孵育过夜。将标记有 FITC 荧光素的 2 种抗覆盖组织添加至同源属,并在 23 °C 下避光孵育 50 min。使用抗荧光淬灭封片剂封片。通过荧光显微镜观察切片。

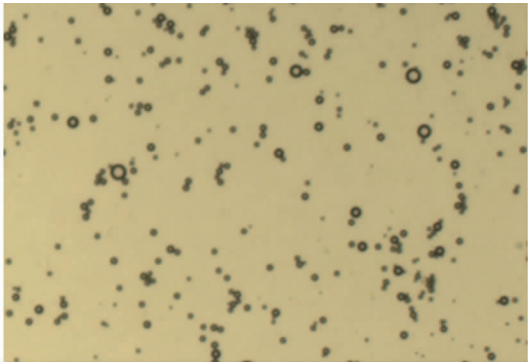
1.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。正态分布的计量资料以均数±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;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 $\alpha=0.05$ 。

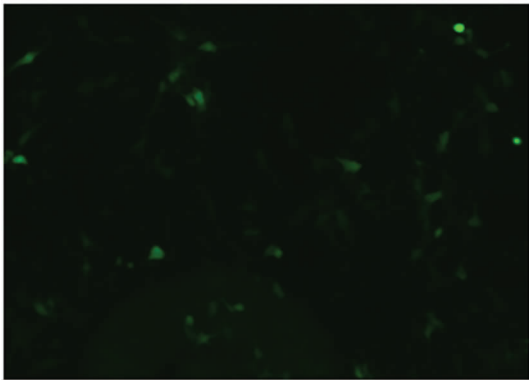
2 结果

2.1 双自杀基因纳泡的基本特征和转染效率

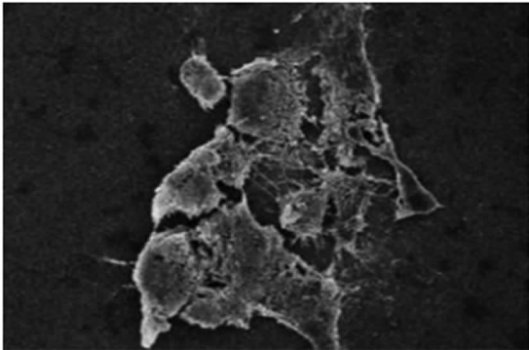
CD-TK 双自杀基因纳泡的平均直径为 600 nm。通过光学显微镜观察纳泡(图 1A)。本实验计算出的 DNA 与纳泡的结合率约为 60%。在用双自杀基因负载的纳泡转染膀胱癌 T24 细胞后 24 h 和 48 h,可以通过显微镜观察到绿色荧光。48 h 组显示出最强的绿色荧光(图 1B)。通过电子显微镜观察到的纳泡破裂瞬间(图 1C)。



A. 纳泡光学显微镜形态



B. GFP 表达 T24 细胞



C. 纳泡碎裂

图 1 纳泡基本特性

2.2 通过体内和体外超声评估双自杀基因负载的纳泡

将制备的双自杀基因纳泡 200 μ L 注射到裸鼠后, 在超声和对比增强超声下观察肿瘤部位有纳泡到达(图 2)。

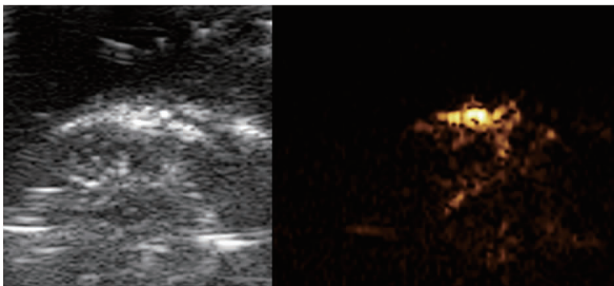


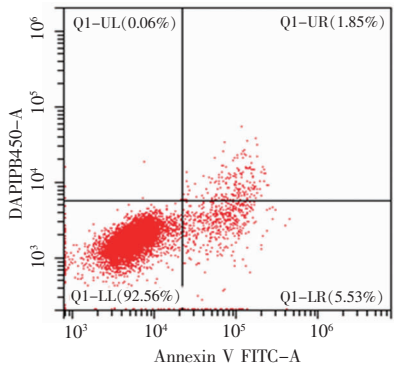
图 2 超声下纳泡在裸鼠肿块聚集

2.3 细胞功能研究

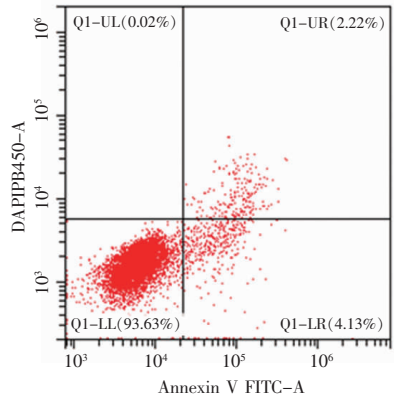
将浓度为 2 mg/mL 的 5-FC 和 0.5 mg/mL 的 GCV 与实验组一起孵育 24 h, 流式细胞术结果显示(表 1), 与未治疗对照组相比, 含有 CD-TK 基因的前药 5-FC 和 GCV 纳泡诱导膀胱癌细胞凋亡($P=0.00$)(图 3)。这说明载自杀基因纳泡在体外有效杀伤膀胱癌细胞。

表 1 各组细胞 24 h 凋亡率对比

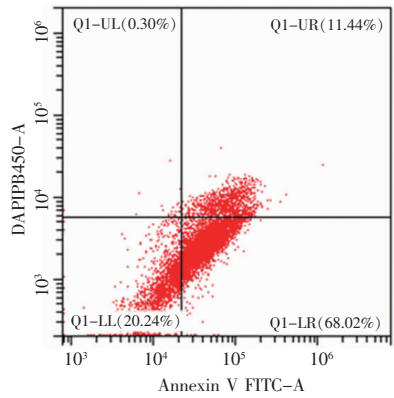
组别	凋亡率/%
对照组	2.25 ± 0.75
U+CD-TK 组	3.55 ± 1.23
U+CD-TK+GCV+5-FC 组	41.12 ± 4.51



A. 对照组



B. U+CD-TK 基因纳泡组



C. U+CD-TK 基因 +5-FC+GCV 组

图 3 细胞凋亡流式图

2.4 前体药物与携带自杀基因的纳泡相结合对裸鼠膀胱肿瘤的细胞毒性

从小鼠肿瘤大小可以看出(表 2),对照组中肿瘤生长最快,然后是装载 CD-TK 双自杀基因的纳泡组。在 5-FC 和 GCV 存在下肿瘤生长明显较慢(图 4A)。在将前药与装载 CD-TK 基因的纳泡组合之前,显示出明显的抗肿瘤效果,并且肿瘤体积和体质量明显低于对照组中的肿瘤体积(表 2)。荧光显微镜显示,与对照组相比,5-FC 和 GCV 前药与 CD-TK 双自杀基因的纳泡组合明显增加细胞凋亡(图 4A)。如荧光显微镜所示,与对照组相比,含有 5-FC 和 GCV 实验组中的增殖细胞明显减少(图 4B)。

3 讨 论

膀胱癌的发生是一个复杂的病理生理过程,涉及细胞增殖、分化和凋亡相关基因^[7-8]。因此,基因治疗的出现为膀胱癌的治疗提供了新的思路,有望成为手术、放疗和化疗后的新选择。基因治疗传统的转运载体一般分为病毒载体介导系统和非病毒载体介导系统。病毒载体的转染效率高,但有毒性、免疫原性、致癌性等安全隐患,其应用受到很大限制。在非病毒载体中,微泡等相关载体已成为重要的选

择和研究方向。由于微泡具有无创性、无病毒性和靶向性的优点,引起人们广泛关注^[9-15]。与微泡相比,纳泡的尺寸更小,更容易穿透内皮层,到达肿瘤细胞,以便随后定向释放。纳泡在 4 ℃ 温度下可稳定悬浮 1 周,其稳定性表明良好的载基因能力。利用纳泡作为自杀基因的载体,具有基因载量高、稳定性好、靶向性好、无免疫原性、易修饰、无损伤等优点。这种方法已在肿瘤诊断和治疗中起重要作用^[16-19]。

本研究成功制备了载有 pGFP-CD-TK 双自杀基因的纳泡,纳泡和 DNA 的结合率为 60%,表明双自杀基因被纳泡成功携带,且结合效率高。本实验也通过超声辐射用载有 pGFP-CD-TK 的纳泡成功转染 T24 细胞。绿色荧光强度在 48 h 最强。体外扫描电子显微镜实验观察到,超声辐射纳泡破裂。超声观察到载有 pEGFP-CD-TK 双自杀基因的纳泡到达肿瘤组织,在注射后观察到增强的信号。通过超声照射载 CD-TK 双自杀基因的纳泡,同时会产生空化效应和声孔效应以实现肿瘤部位杀伤。因此,本研究可为基因传递领域的研究人员提供有用的治疗工具。

本研究结果表明,与未治疗对照组相比,含有

表 2 各组肿瘤体积 5 周大小 (mm³, $\bar{x} \pm s$)

组别	1周	2周	3周	4周	5周
对照组	94.25 ± 4.03	164.39 ± 4.30	207.80 ± 5.92	378.83 ± 4.66	574.19 ± 7.56
U+CD-TK 组	96.55 ± 14.83	137.71 ± 12.33	199.30 ± 5.57	368.61 ± 6.74	551.30 ± 5.81
U+CD-TK+GCV+5-FC 组	81.12 ± 6.51	120.80 ± 4.80	135.89 ± 4.49	145.64 ± 5.75	238.61 ± 13.25

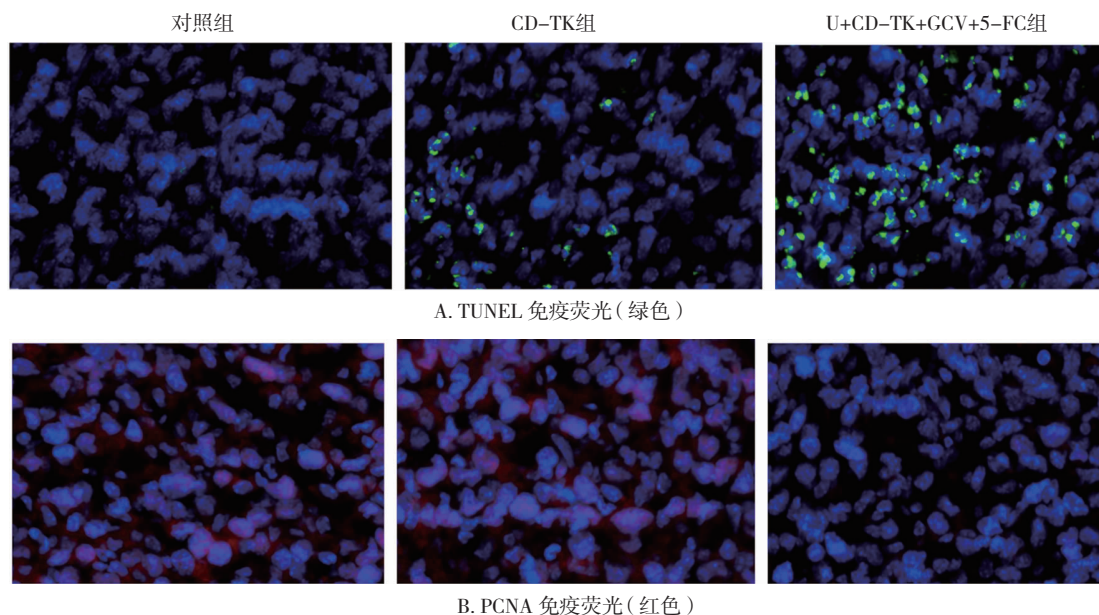


图 4 裸鼠肿瘤切片分析

CD-TK 基因的前药 5-FC 和 GCV 纳泡可明显诱导膀胱癌细胞凋亡。CD-TK 双自杀基因编码的胸苷激酶可以使 GCV 磷酸化以产生核苷酸类似物三磷酸 GCV, 这一底物可以代替正常应答核苷酸, 导致进入 S 期的细胞发生突变, 从而干扰 DNA 的生物合成。同时, 由 CD-TK 基因编码的胸腺嘧啶激酶将无毒前药 5-FC 转化为 5-FU, 再转化为毒性 5-FUTP 或 5-FdUMP, 从而改善细胞对 GCV 前体药物的反应, 并加强 GCV 的细胞毒作用。CD-TK 双自杀基因编码的这 2 种酶协同作用、相互补充, 从而增强其肿瘤杀伤效应。此外, 5-FdUMP 可以渗透细胞, 而三磷酸 GCV 不能渗透细胞, 因此两者的组合可以在体内和体外同时破坏肿瘤细胞^[20-21]。

总之, 本研究成功制备了载有 CD-TK 双自杀基因的纳泡, CD-TK 双自杀基因在肿瘤中过表达, 从而促进肿瘤细胞凋亡, 并且抑制肿瘤细胞增殖。该系统可能成为膀胱癌的新型治疗方法。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective[J]. Mol Cell Ther, 2014, 2: 27.
- [3] Raza A, Ghosh SS. Connexin-43 enhances the redesigned cytosine deaminase activity for suicide gene therapy in human breast cancer cells[J]. Biochem Insights, 2019, 12: 1178626418818182.
- [4] Sun CH, Berg K. Photochemical internalization enhanced nonviral suicide gene therapy[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1895: 165-176.
- [5] Wood AK, Sehgal CM. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy[J]. Ultrasound Med Biol, 2015, 41(4): 905-928.
- [6] Li J, Zhou P, Li L, et al. Effects of cationic microbubble carrying CD/TK double suicide gene and $\alpha\text{V}\beta 3$ integrin antibody in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0158592.
- [7] Wu M, Wang Y, Wang Y, et al. Paclitaxel-loaded and A10-3.2 aptamer-targeted poly(lactide-co glycolic acid) nanobubbles for ultrasound imaging and therapy of prostate cancer[J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12: 5313-5330.
- [8] Wu M, Zhao H, Guo L, et al. Ultrasound mediated nanobubble destruction (UMND) facilitates the delivery of A10-3.2 aptamertargeted and siRNA-loaded cationic nanobubbles for therapy of prostate cancer[J]. Drug Deliv, 2018, 25(1): 226-240.
- [9] Liu S, Song W, Liu F, et al. Antitumor efficacy of VP22-CD/5-FC suicide gene system mediated by lentivirus in a murine uveal melanoma model[J]. Exp Eye Res, 2018, 172: 144-151.
- [10] 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.
- [11] Durinikova E, Plava J, Tyciakova S, et al. Cytotoxic response of 5-fluorouracil-resistant cells to gene- and cell-directed enzyme/pro-drug treatment[J]. Cancer Gene Ther, 2018, 25: 285-299.
- [12] Liu Y, Zhu P, Huang Z, et al. Simultaneous detection of 5-fluorocytosine and 5-fluorouracil in human cells carrying CD/5-FC suicide gene system by using capillary zone electrophoresis[J]. J Chromatogr B, 2018, 1076: 1-7.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Düzgünes N, Cheung J, Konopka K. Suicide gene therapy of oral squamous cell carcinoma and cervical carcinoma *in vitro*[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1895: 177-184.
- [16] Fang SY, Hu CQ, Liu MN, et al. Reversibly immortalized hepatic progenitor cell line containing double suicide genes[J]. Int J Mol Med, 2018, 42: 1977-1986.
- [17] Liu S, Song W, Liu F, et al. Antitumor efficacy of VP22-CD/5-FC suicide gene system mediated by lentivirus in a murine uveal melanoma model[J]. Exp Eye Res, 2018, 172: 144-151.
- [18] Yang J, Shi LK, Sun HM. Antiproliferative effect of double suicide gene delivery mediated by polyamidoamine dendrimers in human Tenon's capsule fibroblasts[J]. Exp Ther Med, 2017, 14: 5473-5479.
- [19] Gwak SJ, Macks C, Jeong DU, et al. RhoA knockdown by cationic amphiphilic copolymer/siRhoA polyplexes enhances axonal regeneration in rat spinal cord injury model[J]. Biomaterials, 2017, 121: 155-166.
- [20] Al HJ, Ystaas L, Talasila KM, et al. Long-term treatment with valganciclovir improves lentiviral suicide gene therapy for glioblastoma[J]. Neuro Oncol, 2017, 19(S3): iii63.
- [21] 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): 186-191.

(责任编辑: 唐秋姗)