

# HSV-tk 联合 GCV 自杀系统对肝癌细胞株 Huh-7 杀伤作用的研究

郭国英, 谢国良, 何国清, 孔彦平, 王毅刚

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

**摘 要:** 单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus-thymidine kinase, HSV-tk)基因,是目前研究比较多的自杀基因,其与前体药物丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)构成 HSV-tk/GCV 自杀基因系统。本实验将携带 HSV-tk 基因的慢病毒转染 Huh-7 细胞,通过报告基因反映慢病毒的转染效率;基因组 PCR 及 RT-PCR 检测转染 Huh-7 细胞中的 HSV-tk 基因的整合及表达;MTT 检测不同浓度药物处理后的细胞存活率;最后 HSV-tk<sup>+</sup> 与 HSV-tk<sup>-</sup> 的 Huh-7 细胞以不同比例混合,MTT 测定 GCV 作用后细胞的存活率。结果表明,HSV-tk/GCV 系统作用于 Huh-7 细胞后,细胞出现明显的凋亡现象,旁观者效应比较明显。

**关键词:** HSV-tk; GCV; 肝癌细胞 Huh-7; 旁观者效应

**中图分类号:** Q789

**文献标识码:** A

## 0 引 言

自杀基因又称前药敏感基因,利用自杀基因治疗肿瘤是基因治疗的主流方案。其中单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)基因是目前研究最为深入的自杀基因。将 HSV-tk 基因导入肿瘤细胞,利用该基因编码的一种酶,可将无毒性药物前体 GCV (ganciclovir)进行磷酸化,然后在肿瘤细胞的内激酶作用下最终磷酸化为三磷酸 GCV (GCV-TP)的毒性物质,掺入 DNA 合成链中,导致 DNA 合成链中止、染色体变性和姐妹染色单体交换,最终导致细胞死亡,据此认为,该自杀基因系统是通过凋亡机制来杀伤肿瘤细胞<sup>[1-5]</sup>,可使肿瘤得以消退或消除。

HSV-tk/GCV 自杀系统存在旁观者效应,转染了 HSV-tk 的细胞在 GCV 的作用下亦能将周围 HSV-TK<sup>-</sup> 细胞杀伤,这样弥补了低转染效率的缺点,并大大提高了对肿瘤细胞的杀伤效率。

慢病毒载体是近 10 年发展起来的基因转移载体,其对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力,并可将外源基因有效地整合到宿主染色体上,其最大的特点在于体内或体外高效转染细胞效率<sup>[6]</sup>。

本研究通过慢病毒载体携带由 IRES 连接的报告基因 GFP 和目的基因 HSV-tk 的融合基因转染肝癌 Huh-7 细胞后,联合 GCV 药物构成自杀基因系统抑制肝癌细胞 Huh-7 的生长,为肝癌的基因治疗提供有效的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

慢病毒质粒载体 Lenti-CMV-GFP-IRES-HSVtk 由中科院生化细胞所郭礼和研究员惠赠,GCV 购自湖北科

益药业股份有限公司,人肝癌 Huh-7 细胞株由本实验室保存。Huh-7 细胞在 37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养条件下培养,培养液为含 10%FBS 的 DMEM(Dulhecco's modified eagle's medium),四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒包装

主体质粒 pLOXgfp-IRES-HSVtk 与辅助质粒 psPAX2 和 pMD2. G 及 CaCl<sub>2</sub> 混匀,加至 2×HeBS (0.28 M NaCl, 0.05M HEPES, 1.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>),30 min 后加入到 293T 的培养基中,1 d 后收集上清,离心过滤,超速离心后收集病毒。将病毒加入到 Huh-7 细胞中,荧光显微镜观察病毒转染效率。

1.2.2 基因组 PCR 及 RT-PCR 检测 HSV-TK 的表达

分别取 Huh-7 HSV-tk<sup>+</sup> 与 Huh-7 HSV-tk<sup>-</sup> 各约 1×10<sup>5</sup> 个,提取其基因组 DNA,PCR 检测的目的基因的整合情况。再取同样数目的待测细胞,提取其总 RNA,检测内参基因 GAPDH 和目的基因 TK 是否成功表达。引物序列分别为:HSV-tk 基因上游引物 CCGGAATTCATGGCTTCGTACC,下游引物 CGGCTCGAGTTATACAGGTCGC; GAPDHe 上游引物 AGAAGGCTGGGGCTCATTTG,下游引物 AGGGGCCATCCACAGTCTTC。20 μL PCR 的反应体系中含模板 1 μL,上下游引物(浓度为 5 μmol/L)各 1 μL,dNTP 2 μL,10×Buffer 2 μL,rTaq 酶 0.5 μL,灭菌双蒸水补至 20 μL。反应参数:94℃预变性 5 min 后,94℃变性 30 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,30 个循环后,72℃最终延伸 10 min。取 1 μL 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 荧光显微镜观察 GCV 对转染 CMV-GFP-ires-HSVtk 的 Huh-7 的杀伤

取两组相同数量(1×10<sup>5</sup>)HSV-tk<sup>+</sup> Huh-7,在其中一组细胞中加 25 μg/mL GCV,另外一组作为对照,含 10%胎牛血清的 DMEM 37℃,5%CO<sub>2</sub> 温箱中培养 48 h,荧光显微镜下观察 GFP 阳性细胞的形态变化。

1.2.4 MTT 检测 GCV 对 HSV-TK<sup>+</sup> Huh-7 细胞的增殖抑制效率

对数生长期的 HSV-tk<sup>+</sup> Huh-7 和 HSV-tk<sup>-</sup> Huh-7 细胞以每孔约 1×10<sup>4</sup> 个细胞接种到 96 孔板,含 10%胎牛血清的 DMEM 100μL 37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 8~16 h,加入 GCV,使终浓度分别为 5、10、15、25、35、45、50 μg/mL。每个处理均设 6 个复孔,实验中设不加药物组,同时设置不加细胞的空白孔,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养分别培养 24、48、72 h,吸去培养液,加 MTT(1mg/mL) 20 μL/孔,置于 37℃继续培养 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加 150 μL DMSO,水平摇床震荡使细胞内蓝紫色结晶充分溶解,溶液呈均匀状态。在酶联免疫监测仪上测定 595 nm 处光吸收值,记录结果。

$$\text{细胞生存率} = (\text{OD}_{\text{病毒感染孔}} - \text{OD}_{\text{调零孔}}) / (\text{OD}_{\text{对照孔}} - \text{OD}_{\text{调零孔}}) \times 100\%$$

(1)

1.2.5 旁观者效应的检测

将 HSV-tk<sup>+</sup> Huh-7 与 HSV-tk<sup>-</sup> Huh-7 按不同比例混合,使 HSV-tk<sup>+</sup>/ HSV-tk<sup>-</sup> 的细胞数比分别为:1:4,2:3,3:2,4:1,5:0,每个比例设 6 个复孔,24 h 后加入含 GCV(50 μg/mL)的新鲜培养液,作用 72 h后,MTT 法测定细胞生长抑制率。

1.2.6 统计学方法

采用 STATA8.0 软件统计,不同浓度的 GCV 在 24、48、72 h 测定的吸收值(对照组不加 GCV 组为 100%活性)以均值表示,并进行方差齐性检验。P<0.05 表示统计学差异有显著性。

2 结 果

2.1 荧光显微镜下观察包装的慢病毒对 Huh-7 的转染效率

HSV-tk 基因通过 IRES 与绿色荧光蛋白 GFP 基因连接,可通过荧光显微镜观察荧光蛋白的表达水平来反映慢病毒的转染效率。结果表明,包装的慢病毒转染效率较高,绝大多数 Huh-7 细胞检测到荧光蛋白表达(图 1(a),图1(b))。

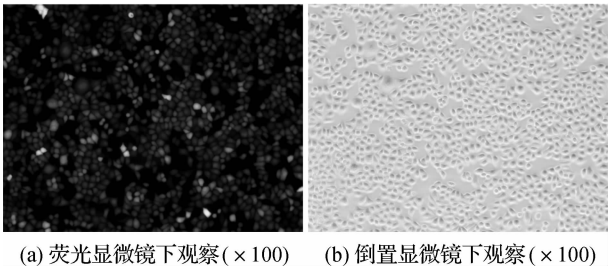


图 1 荧光显微镜下观察 Lenti-CMV-GFP- IRES -HSVtk 转染 Huh-7 细胞后 GFP 的表达

2.2 基因组 PCR 及 RT-PCR 检测 HSV-tk 基因的整合与表达

HSV-tk<sup>+</sup> 的 Huh-7 细胞,其基因组 PCR 及 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳图均可见 Marker 的 1 000 bp 条带附件有一条明显的目的条带(图 2),而未转染的 Huh-7 细胞样品未见此条带。说明 HSV-tk 基因高效整合入 Huh-7 染色体中,并在 mRNA 水平上有高效的表达。

2.3 GCV 作用后 HSV-tk<sup>+</sup> Huh-7 形态变化

荧光显微镜观察 25  $\mu\text{g/mL}$  GCV 作用下的 Lenti-CMV-GFP-IRES -HSVtk 转染细胞,发现 GCV 作用 72 h 后 GFP 阳性细胞的形态发生明显变化,细胞皱缩变圆。而未 GCV 组细胞形态无明显变化(图 3)。

2.4 HSV-tk/GCV 系统对 Huh-7 细胞的杀伤作用

HSV-tk<sup>+</sup> 的 Huh-7 细胞,随着 GCV 浓度和作用时间的增加,细胞的存活率逐渐减少,表明肝癌 Huh-7 细胞对 HSV-tk/GCV 系统存在剂量和时间的依赖性。当 5  $\mu\text{g/mL}$  的 GCV 作用 24 h 后,细胞的杀伤效率不到 10%,而作用 72 h 后细胞的杀伤效率高于 20%,并且当 GCV 浓度达到 50  $\mu\text{g/mL}$  时,杀伤效率接近 100%(图 4(a)),而在对照组(图 4(b))HSV-tk<sup>-</sup> 细胞无明显杀伤,说明 HSV-tk/GCV 系统对 Huh-7 细胞杀伤作用的有效性和安全性。

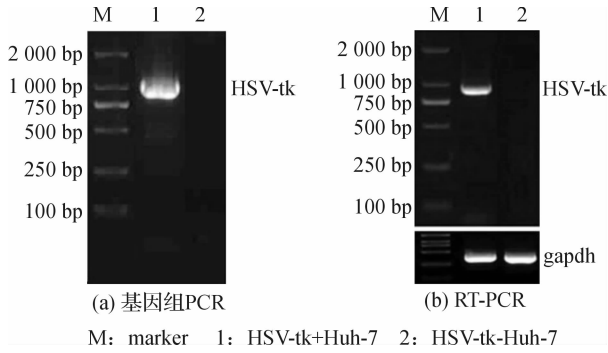


图 2 PCR 扩增 HSV-tk 基因片段

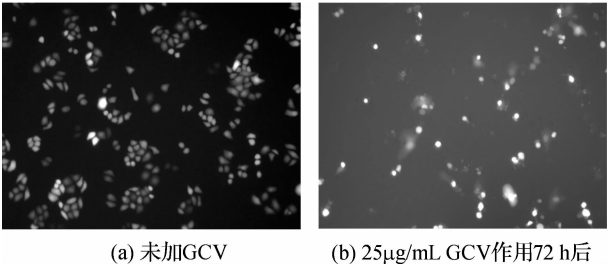


图 3 GCV 分别作用于 HSV-tk<sup>+</sup> 与 HSV-tk<sup>-</sup> 的 Huh-7 细胞后形态变化

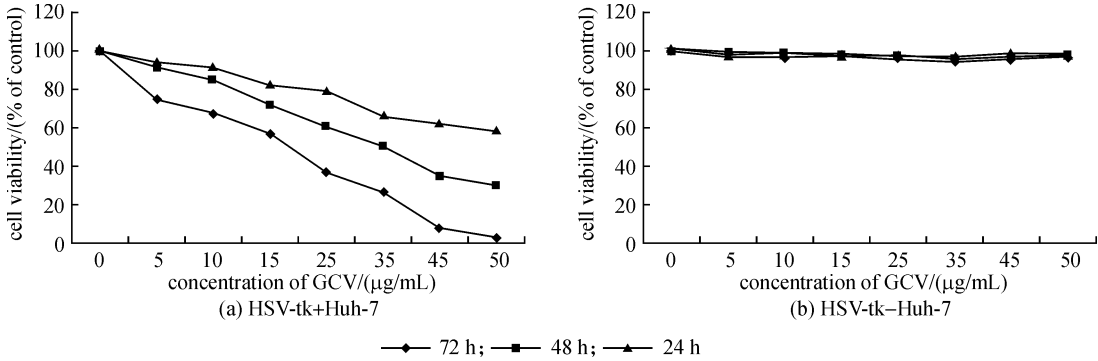


图 4 HSV-tk/GCV 系统对 Huh-7 的抑制作用

2.5 旁观者效应

HSV-tk<sup>+</sup> 与 HSV-tk<sup>-</sup> 的 Huh-7 分别以 1 : 4, 2 : 3, 3 : 2, 4 : 1, 5 : 0 的比例混合后,加入 50  $\mu\text{g/mL}$  GCV, MTT 检测细胞的杀伤效率分别为: (43. 03 $\pm$ 2. 95)%, (67. 52 $\pm$ 3. 02)%, (82. 37 $\pm$ 2. 47)%, (96. 08 $\pm$ 2. 28)%, (99. 25 $\pm$ 2. 49)%(图 5)。结果表明,随着 HSV-tk<sup>+</sup> 细胞数目的不断增加,细胞的生长抑制率随之增加,当 HSV-tk<sup>+</sup> 细胞达到总细胞数的 80%时,混合细胞的生长抑制率达到了近 100%。从此实验可以看出,HSV-tk/GCV 自杀系统对 Huh-7 细胞存在明显的“旁观者效应”。

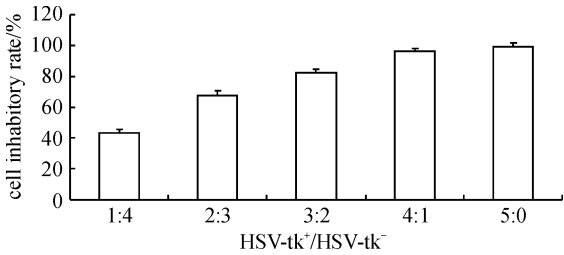


图 5 HSV-tk/GCV 系统对 Huh-7 的旁观者效应

3 讨论

胸苷激酶(TK)能够催化脱氧胸苷变成脱氧胸苷酸。HSV 的 TK 与哺乳动物的 TK 有很大区别,因

HSV-tk 对 GCV 的催化作用达到哺乳动物的 1 000 倍<sup>[7]</sup>,所以常将 HSV-tk 用于肿瘤的基因治疗。目前用于 HSV-tk/GCV 自杀基因系统的药物底物有两类,一类是嘌呤核苷类似物(如 ACV、GCV 等),另一类是嘧啶核苷类似物(如 BVDU),这两种核苷类似物被 HSV-tk 磷酸化后,抑制肿瘤细胞生长的机制不同,GCV 的磷酸化产物主要是抑制细胞 DNA 聚合酶的活性,或作为 dGTP 的竞争性抑制物,掺入到合成的 DNA 中去,阻断 DNA 链的延长。BVDU 的磷酸化产物则主要是通过强烈地抑制细胞的胸苷酸合成酶,从而抑制 DNA 的合成<sup>[8]</sup>。有报道其 GCV 对转基因瘤细胞的抑制作用比 ACV 强 10 倍,故本实验采用 GCV 作为 HSV-tk 作用的底物。

本实验利用慢病毒载体介导 HSV-tk 基因转入肝癌 Huh-7 细胞中,探讨该自杀系统对肝癌细胞进行基因治疗的可能性。显微镜下观察,转染了 HSV-tk 基因与未转染该基因的 Huh-7 细胞形态上无明显变化,增殖速度也没有明显变化,说明 HSV-tk 对 Huh-7 的生长没有影响,当经 GCV 处理后,HSV-tk<sup>+</sup>细胞发生明显凋亡现象,且具有 GCV 浓度和时间依赖性,经 MTT 实验测试,当 GCV 浓度达到 50 μg/mL 时,细胞杀伤率达到 97.4%,而对未转染 HSV-tk 的 Huh-7 细胞无明显毒害作用。这也证明了 Huh-7 细胞内的 TK 激酶对 GCV 极其不敏感。

旁观者效应实验中,当 HSV-tk<sup>+</sup>与 HSV-tk<sup>-</sup>细胞以 4:1 混合后,细胞杀伤率接近 100%,说明 HSV-tk 对 Huh-7 存在明显的“旁观者效应”。目前有许多学者对“旁观者效应”的机制进行研究,研究较多的是细胞的间隙连接对其形成的影响。有报道<sup>[9-10]</sup>GCV 在 TK<sup>+</sup>细胞中作用后形成磷酸化的细胞毒素物质通过细胞的间隙连接传递给临近的 TK<sup>-</sup>细胞中,而不是直接将 GCV 通过细胞间隙连接导致旁观者效应的。也有研究者在对人腺样囊状癌细胞(ACC)进行 HSV-tk/GCV 机理的研究过程中,在 HSV-tk<sup>+</sup>的 ACC 细胞中,caspase-3 被激活,而周围未转染 HSV-tk 基因的细胞中,caspase-3 并未激活,推测由于旁观者效应引起的周围细胞的凋亡不是通过 caspase-3 的信号通路进行的<sup>[11]</sup>,但在 Huh-7 细胞中,是否与细胞间隙连接或 caspase-3 活性有关,有待于进一步研究。

也有许多研究将 HSV-tk/GCV 自杀系统用于其它肿瘤细胞中,如前列腺癌、恶性胶质瘤、黑色素瘤等<sup>[12]</sup>,并且与其他的基因共转染如 IL-2,或是通过其他载体上的改进如细胞载体使肿瘤细胞表达胸苷激酶<sup>[13-14]</sup>,都得到很好的进展,这也为今后利用 HSV-tk/GCV 自杀系统对治疗肝癌提供了很好的方向。

总之,本实验表明自杀基因 HSV-tk/GCV 系统对肝癌 Huh-7 细胞有较明显的杀伤作用,低浓度 GCV 作用时,可产生较强的细胞杀伤作用,而且能够降低体内 GCV 毒性作用,这提示该系统在肝癌的基因治疗中具有潜在的临床应用价值。

参考文献:

[1] Vile R G, Catleden S, Marshall J, et al. Generation of an antitumor in immune response in a non-immunogenic tumor: HSV-tk killing in vivo stimulates a mononuclear cell infiltrate and a TH1-like Profile of intratumoral cytokine expression [J]. Cancer, 1997, 71(11): 267-274.

[2] 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): 3212-3127.

[3] 苏国强, 黄宗海, 刘志峰, 等. 重组腺病毒驱动 KDR-CDglyTK 融合基因系统对 MCF-7 细胞及血管内皮细胞的靶向杀伤作用[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(12): 1346-1349.

[4] Kurozumi K, Tamiya T, Ono Y, et al. Apoptosis induction with 5-fluorocytosine/cytosinede-Aminase gene therapy for human malignant glioma cells mediated by adenovirus[J]. J Neurooncol, 2004, 66(1-2): 117-127.

[5] Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(15): 8699-8704.

[6] Srinivasakumar N. HIV-1 vector systems[J]. Somatic Cell and Molecular Genetics, 2001, 26(1-6): 51-81.

[7] Elion G B, Furman P A, Fyfe J A, et al. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 10(74): 5716-5720.

[8] Field H J, Neden J. Isolation of bromovinyldeoxyuridine-resistant strains of herpes simplex virus and successful chemo-

- therapy of mice infected with one such strain by using acyclovir[J]. *Antiviral Research*, 1982, 2(5): 243-254.
- [9] Nicholas T W, Read S B, Burrows F J, et al. Suicide gene therapy with Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects[J]. *Histol Histopathol*, 2003, 18(2): 495-507.
- [10] Denning C, Pitts J D. Bystander effects of different enzyme prodrug systems for cancer gene therapy depend on different pathways for intercellular transfer of toxic metabolites, a factor that will govern clinical choice of appropriate re6mes[J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(15): 1825-1835.
- [11] Zhang Z H, Lin J Q, Chu J, et al. Activation of caspase-3 noninvolved in the bystander effect of the herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir HSV-tk/GCV system[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(3): 031209.
- [12] Minemura K, Takeda T, Minemura K, et al. Cell specific induction of sensitivity to ganciclovir in medullary thyroid carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(5): 1814-1822.
- [13] Barzon L, Pacenti M, Franchin E, et al. HSV-tk/IL-2 gene therapy for glioblastoma multiforme[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 542: 529-549.
- [14] Matuskova M S, Hlubinova K S, Pastorakova A D, et al. HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells[J]. *Cancerletter*, 2010, 290(1): 58-67.

## The Killing Effects of HSV-tk/GCV Suicide System on Hepatocellular Cell Line Huh-7

GUO Guo-ying, XIE Guo-liang, HE Guo-qing, KONG Yan-ping, WANG Yi-gang  
(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences,  
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) gene/ganciclovir (GCV) has been widely used as a traditional gene therapy modality. This study explores the killing effects of lentiviral vector carried HSV-tk/GCV suicide system to Huh-7 cell line. First of all, Fluorescence imaging assay detects the transfection efficiency of lenti virus, HSV-tk expression is examined by Genome PCR and RT-PCR; Then, MTT assay tested the growth inhibition effects of different concentrations of GCV on HSV-TK<sup>+</sup> Huh-7 cell line and various mix ration between HSV-tk<sup>+</sup> and HSV-tk<sup>-</sup> cells. The results show that HSV-tk/GCV system has great killing effects on Huh-7 cells, and the obvious bystander effects are observed in experiments.

**Key words:** HSV-tk; GCV; Huh-7; bystander effect

(责任编辑: 许惠儿)