

• 基础研究 •

TK/GCV 系统对骨肉瘤 MG-63 细胞杀伤的体外实验研究

张桦栋, 吕智, 冯毅, 刘小丽, 侯慧铭
(山西医科大学第二医院骨科, 山西 太原 030001)

【摘要】 目的:探讨脂质体介导的 TK/GCV 系统对骨肉瘤 MG-63 细胞的杀伤作用以及所产生的旁观者效应。**方法:**脂质体介导 TK 基因体外转染骨肉瘤 MG-63 细胞,倒置荧光显微镜观察细胞转染是否成功,流式细胞仪检测转染细胞与未转染细胞的转染效率。将未转染的骨肉瘤 MG-63 细胞分为 3 组,实验 1 组用转染 TK/GCV 的细胞上清液与原培养液按 1/10、1/7、1/5、1/2 比例混和液培养;实验 2 组用 0.22 μm 滤器过滤的转染后的细胞上清液与原培养液按 1/10、1/7、1/5、1/2 比例混和液培养;对照组用培养液培养,四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法分别测定各组细胞的生长抑制率及骨肉瘤细胞对 TK/GCV 系统的敏感性。**结果:**经 TK 基因转染的 MG-63 细胞,倒置荧光显微镜下有大量绿色荧光蛋白表达,流式细胞仪检测转染 TK 基因的细胞转染效率可达 75.5%。6 d 后 MTT 检测结果显示实验 1 组中各比例浓度的混合培养液对细胞的抑制率与对照组相比有统计学意义($P<0.05$);实验 2 组中 1/10、1/7 比例浓度的混合培养液对细胞的抑制率与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。经 TK 基因转染的 MG-63 细胞随 GCV 浓度增加,细胞凋亡率增加。**结论:**脂质体介导的 TK/GCV 系统能够通过旁观者效应抑制骨肉瘤 MG-63 细胞的生长。

【关键词】 骨肉瘤; 基因治疗; 胸腺嘧啶脱氧核苷激酶(TK)/丙氧鸟苷(GCV); 旁观者效应

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2014.03.017

Experimental research in vitro of TK/GCV system for osteosarcoma MG-63 cell damage ZHANG Hua-dong, LÜ Zhi, FENG Yi, LIU Xiao-li, and HOU Hui-ming. Department of Orthopaedics, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

ABSTRACT Objective: To study the killing effects of the liposome-mediated thymidine kinase (TK)/ganciclovir (GCV) system on MG-63 osteosarcoma (OS) cells and its bystander effects. **Methods:** Liposome-mediated TK gene transfected into MG-63 OS cells, the efficiency of transfection was analyzed by flow cytometry and observed under inverted fluorescence microscope. Non-transfected osteosarcoma MG-63 cells were divided into three groups, in the experimental group 1 transfected TK/GCV cells cultured in solutiona liquid mixture by supernatant by 1/10, 1/7, 1/5, 1/2 ratio to original broth; in the experimental group 2 transfected cells cultured in solutiona liquid mixture of supernatant filtered through 0.22 μm filter by 1/10, 1/7, 1/5, 1/2 ratio to original broth, in control group the transfection cells cultured in original culture solution. Cell growth inhibition rate and osteosarcoma cell sensitivity to TK / GCV system were measured by MTT assay in each group. **Results:** The TK gene was transfected into MG-63 OS cells successfully by liposome-mediated, flow cytometry instrument detection TK gene transfection cell transfection efficiency can reach 75.5%. Six days later the MTT assay showed that in the experimental group 1 inhibition rate of all concentration ratio of the mixed culture fluid were statistically significant as compared with the control group ($P<0.05$), and in the experimental group 2 that of the 1/10 and 1/7 of concentration ratio of mixed culture medium was not statistically significant as compared with the control group ($P>0.05$). TK gene transfected MG-63 cells increased with the the GCV concentration, the cell apoptosis rate increased. **Conclusion:** The experiment demonstrated that the MG-63 OS cells are sensitive to the liposome-mediated TK/GCV system and bystander effects are significant.

KEYWORDS Osteosarcoma; Gene therapy; Thymidine kinase/Ganciclovir (TK/GCV); Bystander effect

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(3):240-243 www.zggszz.com

骨肉瘤是骨骼系统最常见的原发恶性肿瘤,目

前针对骨肉瘤的治疗方法仍以手术治疗同时辅助化疗为主,寻找更为有效的治疗方案已很必要。目前应用于临床治疗肿瘤的改良方法有很多,如:抑癌基因治疗、反义基因治疗、自杀基因治疗等,但对骨肉瘤的基因治疗仅限于动物与体外实验。运用自杀基因治疗系统^[1]治疗骨肉瘤有许多优点,如选择性杀伤

基金项目:山西省自然科学基金资助项目(编号:2007011112)
Fund program: The Natural Science Foundation of Shanxi Province (No. 2007011112)
通讯作者:吕智 E-mail: zhiLV_2002@163.com
Corresponding author: LÜ Zhi E-mail: zhiLV_2002@163.com

基因转染的骨肉瘤细胞,对正常骨组织的损伤较小,同时避免了全身化疗的毒副作用。旁观者效应^[2]能在一定程度上弥补载体系统在骨肉瘤细胞中转染率低以及靶向性差所带来的问题,并协同自杀基因治疗系统消除肿瘤细胞。本实验以脂质体介导的 pIRES-EGFP-TK/GCV 系统,对 MG-63 OS 骨肉瘤细胞的杀伤作用及旁观者效应进行体外实验研究。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与质粒 高糖 DMEM 培养液购于赛默飞世尔生物化学制品有限公司;胎牛血清购于浙江天杭生物科技有限公司;pIRES-EGFP-TK 基因购于武汉三鹰生物技术有限公司;Lipofectamine 2000 转染试剂盒购于 Invitrogen 公司;MTT 试剂盒购于 Neuronbc Laboratories Co.2td.

1.2 细胞株及分组 MG-63 OS 人骨肉瘤细胞株购于中国科学院上海生命科学研究院;提取稳定转染 pIRES-EGFP-TK 基因的人骨肉瘤 MG-63 OS 细胞上清液,将未转染 pIRES-EGFP-TK 基因的人骨肉瘤 MG-63 OS 细胞悬液接种于 96 孔板,待稳定传代后随机分为 3 组:实验 1 组内加入不同比例转染成功的 MG-63 OS 细胞上清液;实验 2 组内加入不同比例经 0.22 μm 滤器过滤后转染成功的 MG-63 OS 细胞上清液;对照组加入正常培养液。每组设置 3 个副孔。

1.3 细胞培养 人骨肉瘤 MG-63 OS 细胞在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 培养箱内培养。2~3 d 倒置显微镜下观察细胞长至 80%~90%,0.25%胰蛋白酶消化后传代。

1.4 干预措施 将购得的 MG-63 OS 人骨肉瘤细胞悬液接种于 T25 培养瓶中,在 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 ,饱和湿度培养箱内培养,细胞稳定传至 3 代后,取对数期生长细胞接种于 6 孔板内,用于基因转染。

1.5 观察项目与方法

1.5.1 细胞转染 转染前将用胰蛋白酶消化的贴壁细胞接种于 6 孔板,待细胞密度达到 80%~90% 时,将 pIRES-EGFP-TK 基因导入人骨肉瘤 MG-63 OS 细胞中。按 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书进行转染,24 h 后倒置荧光显微镜下观察结果。

1.5.2 流式细胞仪检测 将转染 pIRES-EGFP-TK 基因的 MG-63 细胞与未转染的细胞进行检测,分别将两组细胞用胰蛋白酶消化后收集于离心管内,于离心机内 1 000 r/min,5 min,弃上清,PBS 洗涤 2 次,弃去上清液,各管中分别加入 500 μl PBS,流式细胞仪分别检测转染与未转染细胞的转染效率。

1.5.3 MTT 法检测

1.5.3.1 对旁观者效应的观察 将 MG-63 OS 在

6 孔板中转染后 24 h,加入 GCV(浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 培养 6 d 后,吸取上清液保存。将上清液加入已接种于 96 孔板的未转染 MG-63 OS 中,上清液加入量与原培养液体积比例分别为 1/10、1/7、1/5、1/2,作为实验 1 组,以未加入上清液的作为对照组(空白对照组)。上清液经 0.22 μm 的滤器过滤后加入已接种于 96 孔板的未转染 MG-63 OS 中,加入量与原培养液体积比例为 1/10、1/7、1/5、1/2,作为实验 2 组。培养 6 d 后加入 MTT 检测细胞生存率。

1.5.3.2 对 GCV 敏感性的观察 将稳定转染 pIRES-EGFP-TK 基因的 MG-63 OS 用胰蛋白酶消化后离心,以 1×10^4 接种于 96 孔板;将未转染的 MG-63 OS 以相同方法接种于 96 孔板;分别加入不同浓度 GCV(1、5、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$),每种浓度分别设置 3 个复孔,培养 6 d 后加入 MTT 检测 490 nm 处 OD 值,计算细胞抑制率(%).细胞抑制率=[1-(实验组活细胞 OD 值/对照组活细胞 OD 值)] $\times 100\%$ 。

1.6 统计学处理 以上实验均独立重复 3 次,采用 SPSS 13.0 统计学软件对文中数据进行 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置荧光显微镜转染结果 成功将重组质粒 pIRES-EGFP-TK 基因导入 MG-63 OS 骨肉瘤细胞株中(图 1)。

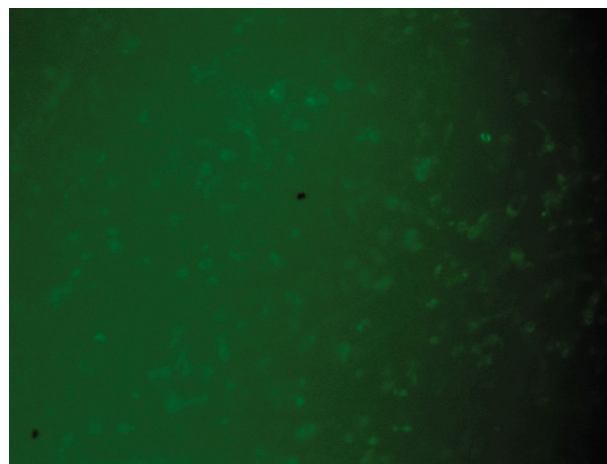


图 1 TK 基因转染 MG-63 OS 24 h 后倒置荧光显微镜结果($\times 20$)

Fig.1 Fluorescence microscope results after TK gene transfection MG-63 OS for 24 h ($\times 20$)

2.2 流式细胞仪测定转染效率 流式细胞仪测定转染质粒细胞的转染率为 75.5%,未转染质粒细胞的转染率为 1.1%(图 2-3)。

2.3 MTT 法检测结果

2.3.1 旁观者效应测定结果 将转染 TK 基因的上清液加入未转染的 MG-63 OS 骨肉瘤细胞中,发

(F1)[B] MG-63-0930-2 554.LMD : FL1 Log - ADC

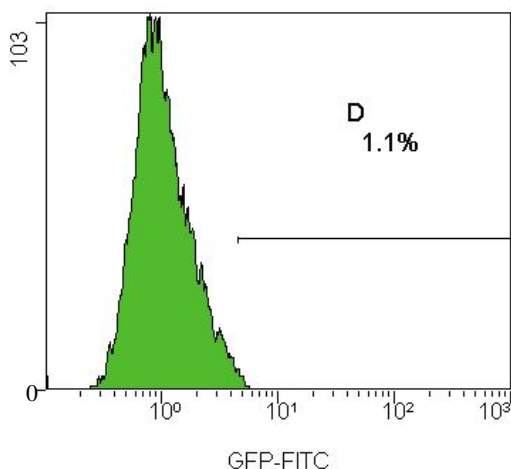


图 2 流式细胞仪测定转染细胞转染率

Fig.2 Transfection rate of transfection cell was measured by flow cytometry instrument

(F1)[B] MG-63-1-0928 484.LMD : FL1 Log - ADC

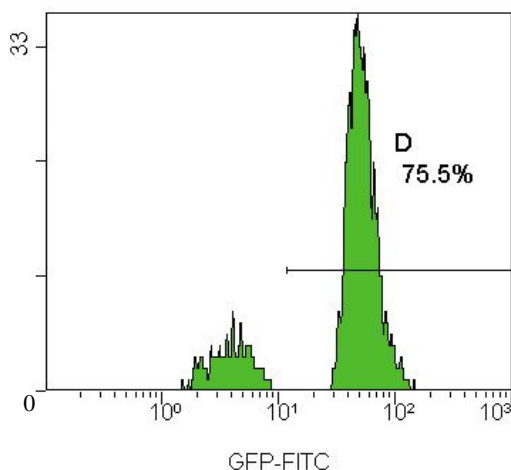


图 3 流式细胞仪测定未转染细胞转染率

Fig.3 Transfection rate of non-transfection cell was measured by flow cytometry instrument

现有明显的细胞凋亡现象, 该组细胞抑制率与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 随着上清液加入体积与原培养液的体积比例的增高, 细胞抑制率也同步增高, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。而经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤后的上清液加入未转染的 MG-63 OS 骨肉瘤细胞后, 其细胞抑制率与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 随着经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤后上清液加入体积与原培养液体积比例增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

2.3.2 TK/GCV 系统敏感性测定结果 随着 GCV 浓度的增加, 发生凋亡的细胞也逐渐增加, 经 MTT 检测: 浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 的 GCV 可杀伤 40% 的 TK(+)

表 1 实验 1 组中不同比例转染 TK 基因上清液对 MG-63 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Inhibition rate in different proportion TK gene transfection supernatant fluid to MG-63 cells in experimental group 1 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	转染 TK 基因上清液与培养液混合的比例			
	1/10	1/7	1/5	1/2
实验 1 组	13.34±1.86	15.86±3.75	16.44±2.17	23.51±3.74
对照组	2.57±0.55	2.59±0.33	2.50±0.11	2.61±0.28
t 值	11.573	7.045	12.854	11.154
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 实验 2 组中不同比例经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤的转染 TK 基因上清液对 MG-63 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.2 Inhibition rate in different proportion of $0.22 \mu\text{m}$ filter filtration transfection TK gene supernatant fluid to MG-63 cells in experimental group 2 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤的转染 TK 基因上清液与培养液混合的比例			
	1/10	1/7	1/5	1/2
实验 2 组	2.73±0.09	2.74±1.09	2.97±0.69	3.45±1.29
对照组	2.57±0.55	2.59±0.33	2.50±0.11	2.61±0.28
t 值	2.632	0.844	4.998	5.359
P 值	0.056	0.431	0.002	0.002

MG-63 OS 骨肉瘤细胞; 浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 的 GCV 可杀伤 80% 的 TK(+)MG-63 OS 骨肉瘤细胞; 浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 GCV 可杀伤全部 TK (+)MG-63 OS 骨肉瘤细胞, 但相同浓度的 GCV 对未转染的细胞无明显杀伤作用。

3 讨论

3.1 自杀基因治疗机制 运用自杀基因辅助前药的方法已在许多体外实验及动物实验中得到证实, 并且该法的疗效在部分临床试验中也得到证实。其治疗机制是将胸腺嘧啶脱氧核苷激酶 TK (thymidine kinase) 导入骨肉瘤细胞后, 加入前药丙氧鸟苷 GCV (ganciclovir), 使转入细胞的 TK 经磷酸化转化为一磷酸 GCV (GCV-MP), 一磷酸 GCV 通过细胞内激酶 (如丙酮酸激酶、磷酸烯醇式丙酮酸激酶和磷酸甘油激酶) 作用继续磷酸化为三磷酸 GCV (GCV-TP), 后者通过整合到肿瘤细胞的 DNA 链上, 阻止 DNA 聚合酶的活性而将肿瘤细胞杀死^[3]。通过基因转移载体将目的基因 (自杀基因) 转入肿瘤细胞, 经过一系列酶促反应, 使肿瘤细胞对无毒或低毒性药物的敏感性增加, 进而在细胞内转化为有高度毒性代谢产物, 最终使肿瘤细胞发生凋亡。目前国内外研究者对该系统进行了大量体外实验研究, 充分证实该系统

在肿瘤治疗中的有效性,借助载体导入目的基因是目前肿瘤基因治疗的主要方法。但现有载体在操作过程中对设备及技术条件要求较高,且存在一些不安全因素,因此,有必要探索一种安全、高效的基因转移方法。研究表明^[4]磷酸钙、壳聚糖和脂质体 3 种转染试剂均可将外源性 DNA 整合于宿主细胞,但脂质体介导的转染方法具有毒性低、操作简便、转染效率高优点。

3.2 旁观者效应的机制及对骨肉瘤细胞生物学特性的影响 “旁观者效应”指导入自杀基因的肿瘤细胞,在前药存在的前提下,可使附近未导入自杀基因的肿瘤细胞发生死亡^[5]。Leinonen 等^[6]体内实验证明单纯转染 TK 基因不能抑制肿瘤生长,只有 GCV 加入 1 周或更长时间才能通过旁观者效应产生明显杀伤肿瘤细胞的效应。旁观者效应是通过细胞间缝隙连接而实现的,旁观者效应可弥补基因转染效率低下的缺陷,接种细胞密度越高,旁观者效应越明显。但在体外实验中,占总量 10%~20% 转染自杀基因的肿瘤细胞即可在使用前药后使肿瘤完全消失^[7]。Sharrow 等^[8]研究表明缺乏细胞缝隙连接的肿瘤细胞经 HSV-TK 基因转染给予 GCV 后,只对转染阳性的肿瘤细胞有杀伤作用,相邻未转染肿瘤细胞未被杀伤,说明没有旁观者效应作用;当将 Cx43 (Connexin 43) 连接蛋白转染肿瘤细胞,使细胞间缝隙连接重建后,转染 HSV-TK 基因的肿瘤细胞在 15% 左右时加入前药 GCV,即可杀灭所有未转染细胞。说明 Cx43 连接蛋白是细胞连接中的重要蛋白,而细胞缝隙连接又是实现旁观者效应的重要通路。本实验将实验组转染 6 d 的细胞上清液加入未转染组,发现未转染组中细胞抑制率也显著增高。因此,推断加入 Cx43 连接蛋白转染后的骨肉瘤细胞,其分泌的蛋白仍然具有旁观者效应。

3.3 TK/GCV 系统对骨肉瘤细胞的杀伤作用 本实验采用 Lipofectamine 2000 脂质体介导,将重组质粒 pIRES-EGFP-TK 导入骨肉瘤细胞株 MG-63 OS 后,加入抗病毒药物丙氧鸟苷(GCV),通过阻止细胞周期于 G0、G1 期,进而使细胞发生凋亡和坏死^[9]。通过观察转染 TK 基因、未转染 TK 基因以及转染空质粒的 MG-63 OS 细胞在 GCV 作用后细胞的凋亡情况,发现转染 TK 基因的 MG-63 OS 骨肉瘤细胞存活率最低。经 TK 基因转染后加入 GCV 死亡的肿瘤细胞表现出凋亡的特征^[10],即细胞皱缩、染色质集聚、囊泡形成,周围未转染的肿瘤细胞可将其吞噬。本实验中将转染 6 d 后的骨肉瘤细胞上清液抽出,经 0.22 μm 滤器过滤后,这种吞噬现象消失,实验组与对照组细胞抑制效率无差异。随着上清液体积与原

培养液体积比例的增高,实验 2 组与对照组细胞抑制率差异有统计学意义,这是由于上清液浓度比例升高所致。因此,认为细胞凋亡以及周围未转染细胞吞噬现象与旁观者效应有关。

总之,运用自杀基因系统治疗骨肉瘤有广阔的前景,旁观者效应虽可提高自杀基因治疗系统杀灭骨肉瘤细胞,但旁观者效应的部分机制尚未完全了解,因此需要对其进行更深入的研究。

参考文献

- [1] 孙廓,张键,陈统一.骨肉瘤基因治疗研究进展[J].国际骨科学杂志,2009,30(6):385-387.
Sun K,Zhang J,Chen TY. Osteosarcoma gene therapy research progress[J]. Guo Ji Gu Ke Xue Za Zhi,2009,30(6):385-387. Chinese.
- [2] Pandey BN,Kumar A,Ali M,et al. Bystander effect of conditioned medium from low and high doses of γ -irradiated human leukemic cell on normal lymphocytes and cancer cells[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol,2011,30(4):333-340.
- [3] 李晋惠,吕智,马卓,等. TK 基因转染骨肉瘤 U-2 细胞体外实验研究[J]. 中国骨与关节杂志,2012,1(3):272-276.
Li JH,Lü Z,Ma Z,et al. The experimental research on the osteosarcoma U-2 cells transfected by thymidine kinase gene in vitro [J]. Zhongguo Gu Yu Guan Jie Za Zhi,2012,1(3):272-276. Chinese.
- [4] 刘新宇,梁东春,张镜宇. 三种非病毒载体转染方法的比较[J]. 天津医科大学学报,2003,4(9):456-458.
Liu XY,Liang DC,Zhang JY. Comparison of three Non-viral vector for gene transfection[J]. Tian Jin Yi Ke Da Xue Xue Bao,2003,4(9),2003,4(9):456-458. Chinese.
- [5] Maron A,Havaux N,Le Roux A,et al. Differential toxicity of ganciclovir for rat neurons and astrocytes in primary culture following adenovirus-mediated transfer of the HSVtk gene[J]. Gene Ther,1997,4(1):25-31.
- [6] Leinonen HM,Ruotsalainen AK,Määttä AM,et al. Oxidative stress-regulated lentiviral TK/GCV gene therapy for lung cancer treatment [J]. Cancer Res,2012,72(23):6227-6235.
- [7] Sun P,Liu Y,Ying H,et al. Action of db-CAMP on the bystander effect and chemosensitivity through connexin 43 and Bcl-2-mediated pathways in medulloblastoma cells[J]. Oncol Rep,2012,28(3):969-976.
- [8] Sharrow AC,Li Y,Wcsenyi A,et al. Modulation of osteoblast gap junction connectivity by serum,TNF alpha and TRAL[J]. Exp Cell Res,2008,314(2):297-308.
- [9] 王燕,丘钜世,乔慧,等. 缺氧对 HRE-TK/GCV 系统杀伤骨肉瘤细胞的增强作用[J]. 中国肿瘤临床,2005,32(2):69-72.
Wang Y,Qiu JS,Qiao H,et al. Enhancement of hypoxia in the killing effect of HER-TK/GCV on human osteosarcoma cells [J]. Zhongguo Zhong Liu Lin Chuang,2005,32(2):69-72. Chinese.
- [10] Pan JG,Zhou X,Luo R,et al. The adeno-associated virus-mediated HSV-TK/GCV suicide system:a potential strategy for the treatment of bladder carcinoma[J]. Med Oncol,2012,29(3):1938-1947.

(收稿日期:2013-03-07 本文编辑:李宜)