

间隙连接细胞间通讯与胸苷激酶系统 “旁观者效应”的关系及其调控

邢毅飞^{1*}, 鲁功成¹, 肖亚军¹, 赵军¹, 曾甫清¹, 熊平², 冯玮²

(¹ 华中科技大学同济医学院附属协和医院泌尿外科; ² 同济医学院免疫学研究所, 武汉 430030)

摘要: 增强“旁观者效应”是提高单纯疱疹胸苷激酶/更昔洛韦(HSV-TK/GCV)基因系统治疗效果的关键手段。旨在探讨间隙连接细胞间通讯(GJIC)在 HSV-TK/GCV 系统“旁观者效应”中的作用及其化学调控。通过采用划痕标记染料示踪技术(SLDT)比较 ACHN、HeLa、NIH-3T3、Cos-7 及 L-02 等五种不同细胞系 GJIC 功能状况, 四甲基偶氮唑盐酶反应比色法(MTT 法)检测 HSV-TK/GCV 对其杀伤效应和“旁观者效应”, 并比较 GJIC 上调剂 apigenin 和抑制剂 18- α -glycyrrhetic acid (AGA)对 GJIC 和“旁观者效应”的影响。结果表明, GJIC 功能强大的 NIH-3T3、Cos-7 及 L-02 细胞对 HSV-TK/GCV 敏感性及其“旁观者效应”程度远较 GJIC 功能低下的 ACHN 和 HeLa 细胞高 ($P < 0.001$)。Apigenin 可显著提高 ACHN 细胞 GJIC 功能, 对 HeLa 细胞则无影响; 相反, AGA 可显著抑制 NIH-3T3、Cos-7 和 L-02 等三种靶细胞的 GJIC 功能。相应地, apigenin 可明显提高 ACHN 细胞的“旁观者效应”而对 HeLa 细胞的“旁观者效应”则无影响, AGA 则可明显降低上述三种细胞的“旁观者效应”。因此认为, 细胞内在的 GJIC 功能与靶细胞对 HSV-TK/GCV 的敏感性和“旁观者效应”程度有正向关系, 人为调控细胞 GJIC 后, “旁观者效应”程度亦发生相应改变。

关键词: 间隙连接细胞间通讯; 旁观者效应; 单纯疱疹胸苷激酶/更昔洛韦

中图分类号: R31; R730 文献标识码: A 文章编号: 0253-9977(2004)02-162-05

“旁观者效应”的存在是胸苷激酶 (TK) 基因疗法引人注目的重要原因之一, 但对不同靶细胞其程度不相同。研究表明, 连接蛋白 (connexin, Cx) 介导的间隙连接细胞间通讯(GJIC)与该现象关系密切^[1,2]。我们通过比较不同细胞系 GJIC 功能状况、HSV-TK/GCV 对其杀伤效应和“旁观者效应”, 并比较 GJIC 调节剂对其影响, 探讨 GJIC 在“旁观者效应”中的作用, 为联合应用 GJIC 上调剂增强“旁观者效应”, 从而提高 TK 基因系统疗效提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 ACHN 为人肾癌细胞系, HeLa 为人宫颈癌细胞系, Cos-7 为猴肾细胞系, NIH-3T3 为鼠成纤维细胞系, 本校免疫学研究所保存或购自武汉中国典型物保存中心; L-02 为人肝细胞系, 本院高勇博士馈赠。

1.1.2 目的基因 携带 HSV-TK 基因的 EB 病毒真核表达载体 pDR2-TK 在中国预防医学科学院病毒所国家重点实验室构建, 本校免疫学系保存。

1.1.3 试剂 脂质体 Dosper Reagent 为德国 Boehringer Mannheim 公司产品, GCV 为湖北科益药业有限公司产品、四甲基偶氮唑盐(MTT)、芹黄素 apigenin、18- α 甘草酸(18- α -glycyrrhetic acid, AGA)和二甲基亚砷 DMSO 为美国 Sigma 公司产品, 罗氏黄(Lucifer Yellow, LY)为美国 Molecular Probes 公司产品, DMEM 培养基和新生牛血清为美国 GIBCO 公司产品。

1.1.4 主要仪器 荧光显微镜(Nikon, 日本), 倒置显微镜(Olympus, 日本), 酶标仪 EXL800(Bio-Tek, 美国), CO₂ 培养箱(Heraeus, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 上述细胞以 DMEM 培养基培

收稿日期: 2003-05-26; 修回日期: 2003-07-14

* 通讯作者, E-mail: xingyifei@163.net

养, 内含 10% 新生牛血清、青霉素 100U/ml, 链霉素 100μg/ml。置 37℃、5%CO₂ 环境下培养。

1.2.2 基因转染 采用阳离子脂质体转染法, 参见 *Dosper Reagent* 转染试剂盒说明书并略作改进。简言之, 转染前 24h 消化并重悬浮细胞, 转入六孔板, 每孔细胞数约为 3×10^5 个。临近转染前用无血清培养基替换原培养液, 每孔加入预先处理的 DNA-脂质体复合物 100μl。6h 后去除无血清培养液, 替用完全培养基。

1.2.3 细胞内在 GJIC 功能测定及其化学调控 划痕标记染料示踪技术 (SLDT)^[3] 检测几种不同细胞 GJIC 功能以及 GJIC 调节剂对其影响 (GJIC 上调剂 apigenin 终浓度为 10μmol/L, GJIC 下调剂 AGA 终浓度为 70μmol/L, 后者临用时新配)。SLDT 的原理在于通过划痕法使单层培养的细胞膜上出现短暂的裂痕 (这种裂痕既不影响细胞的存活亦不影响其分化能力), 荧光染料罗氏黄 (Lucifer Yellow, LY, 分子量 450) 可通过裂痕进入细胞, 在荧光显微镜下观察 LY 染液所发出的黄色荧光向邻近细胞间的传递而用于表示间连接细胞间通讯功能。将上述细胞置于 35mm 培养皿常规培养, 待其单层铺满皿底, 去除培养基后用 0.1mol/L PBS 冲洗 3 遍并吸净。往培养皿中加入 1ml 0.05% 罗氏黄 LY 染液, 用手术刀片在皿底划痕数道, 计时 3 分钟后吸净染液再次用 PBS 冲洗 3 遍并吸净, 于荧光显微镜下观察黄色荧光。通过观察 LY 自伤沿列细胞向邻近细胞传递的距离进行半定量检测。表示方法为 (-): 荧光仅限于伤沿列单列细胞; (+): 荧光自伤沿列细胞传递至邻近的一列细胞内; (++) : 荧光自伤沿列细胞传递至邻近的二列细胞内; (+++) : 荧光自伤沿列细胞传递至邻近的三列细胞内; (++++): 荧光自伤沿列细胞传递至邻近的四列细胞或更远距离。

1.2.4 HSV-TK/GCV 系统对不同细胞系的杀伤作用 四甲基偶氮唑盐酶反应比色法 (MTT 法) 检测杀伤效应。调整转染 TK 基因 (TK⁺) 细胞浓度约为 1×10^4 个/毫升, 按每孔 100μl 将细胞分转至 96 孔板并设立对

照及复孔。培养使细胞贴壁后加入不同浓度 GCV, 24h、48h、72h 后弃除培养上清, 先后加入 MTT 和 DMSO, 将样本置酶标仪上测定 A₄₉₀, 依照公式 杀伤效应 = $(1 - \text{实验孔 } A_{490} / \text{对照孔 } A_{490}) \times 100\%$ 计算。

1.2.5 “旁观者效应”的检测及 GJIC 调节剂对其影响 将 TK⁺ 细胞与亲本 (TK⁻) 细胞分别按 10%:90% 和 5%:95% 两种比例混合, 细胞培养过夜使其贴壁后予以或不予 apigenin 和 AGA 处理, 并设立阴性对照组。6h 后去除 apigenin, AGA 则不予去除, 分别加入 GCV 继续培养 72h 后 MTT 检测杀伤效应, 按照下列公式 杀伤效应 = $(1 - \text{实验组 } A_{490} / \text{对照组 } A_{490}) \times 100\%$ 计算杀伤效应。

1.2.6 统计学分析 *t* 检验和 *F* 检验分析数据。

2 结果

2.1 GJIC 功能测定结果

SLDT 检测发现, ACHN 和 HeLa 细胞 GJIC 功能低下, NIH-3T3、Cos-7 及 L-02 细胞 GJIC 功能较为强大。Apigenin 可增强 ACHN 细胞 GJIC 功能, 对 HeLa 细胞无影响; AGA 则可以明显降低靶细胞 GJIC 功能 (表 1)。我们还发现 apigenin 对细胞 GJIC 功能的促进作用是迅速而持久的, 用药后 6h 即可起效且在去除 apigenin 后可较长时间仍保持这一作用。

2.2 HSV-TK/GCV 系统对不同细胞系的杀伤作用

MTT 法检测发现, 转染 TK 基因的 Cos-7、L-02 和 NIH-3T3 细胞对 GCV 的敏感性远较 ACHN 和 HeLa 细胞高 ($P < 0.001$), 10μmol/L GCV 作用 72h 后前三者杀伤效应分别为 $(76.12 \pm 2.79)\%$ 、 $(79.33 \pm 3.64)\%$ 和 $(81.66 \pm 3.07)\%$, 后两者杀伤效应分别为 $(28.34 \pm 1.86)\%$ 和 $(23.90 \pm 2.48)\%$ (图 1)。

2.3 不同细胞系“旁观者效应”程度评价

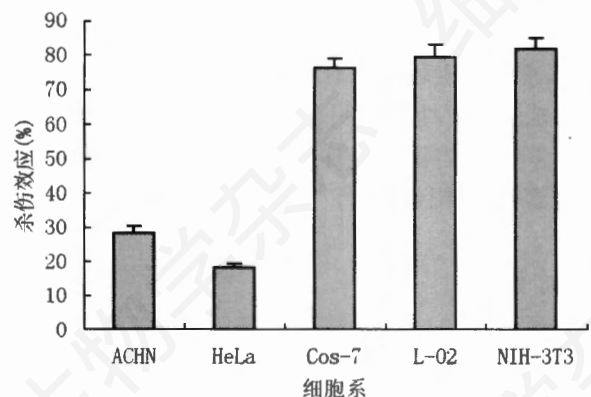


图 1 HSV-TK/GCV 对不同细胞系的杀伤效应

表 1 Apigenin 和 AGA 细胞对 GJIC 功能的影响^①

细胞系	对照	Apigenin(10μmol/L)	AGA(70μmol/L)
ACHN	+/-	+++	ND
HeLa	-	-	ND
Cos-7	++++	ND ^②	+/-
L-02	++++	ND	+/-
NIH-3T3	++++	ND	+/-

注: ^①用药后 24h 测定值; ^②ND: 未测

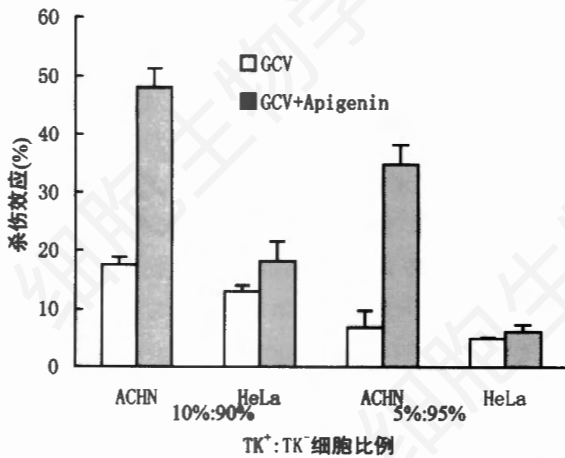


图2 Apigenin对TK系统“旁观者效应”的影响

TK⁺和TK⁻细胞按照一定比例混合后测定杀伤效应,发现GCV对GJIC功能较强的细胞Cos-7、L-02和NIH-3T3杀伤效应远较GJIC功能低下的ACHN和HeLa细胞者大,TK⁺细胞比例为10%条件下,GCV对前三者杀伤效应分别为(56.47 ± 2.96)%、(62.70 ± 4.26)%和(64.97 ± 2.70)%、后两者为(13.58 ± 1.25)%和(12.92 ± 3.01)%;TK⁺细胞比例为5%条件下则分别为(39.42 ± 1.20)%、(37.12 ± 4.75)%、(40.53 ± 2.68)%、(6.78 ± 1.03)%和(4.88 ± 0.23)%、前三者“旁观者效应”程度远较后两者强($P < 0.001$),未加GCV的混合细胞组和加入GCV的亲本细胞(TK⁻)组未出现明显的细胞杀伤效应。

2.4 GJIC调节剂对“旁观者效应”的影响

相对未处理组,10 μmol/L apigenin预先处理6h后,GCV对ACHN混合细胞的杀伤效应显著增强($P < 0.001$),但apigenin不能提高TK基因系统对HeLa细胞的杀伤效应($P > 0.05$)(图2)。相反,AGA与HSV-TK/GCV联合处理72h后,对Cos-7、L-02和NIH-3T3混合细胞杀伤效应显著降低($P < 0.001$)(图3)。Apigenin和AGA在相同条件下处理未转染TK基因的上述细胞时细胞增殖活性与对照组相比无明显差异。结果表明apigenin可提高ACHN细胞的“旁观者效应”对HeLa细胞者无影响,AGA则可显著降低靶细胞的“旁观者效应”。

3 讨论

单纯疱疹病毒胸苷激酶基因/更昔洛韦(HSV-TK/GCV)系统是肿瘤自杀基因疗法研究中应用最多的方案。HSV-TK蛋白除能催化脱氧胸苷磷酸化外,还可催化一些核苷类似物如GCV磷酸化。GCV

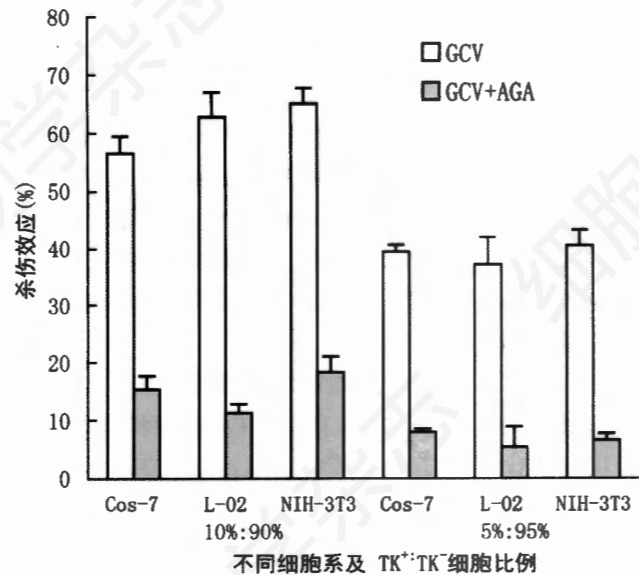


图3 AGA对TK系统“旁观者效应”的影响

与细胞TK的亲和力极低,不能在细胞TK作用下磷酸化。但在转染并有效表达了HSV-TK基因的细胞中,GCV可以在HSV-TK的催化下成为单磷酸产物GCV-MP,然后在细胞激酶作用下逐步生成三磷酸化核苷类似物GCV-TP。GCV-TP作为DNA复制的底物掺入细胞DNA的合成链中,并竞争性抑制细胞的DNA聚合酶,从而阻断DNA合成,使细胞死亡。

“旁观者效应”是指在HSV-TK/GCV治疗时即使仅有部分肿瘤细胞转染目的基因,在运用GCV后却可引起强大的杀瘤效应,包括TK⁺细胞及其周围TK⁻细胞均被杀灭。“旁观者效应”对于TK基因系统有重要的作用:①“旁观者效应”的存在使得在目前体内基因转染效率较低条件下较彻底杀灭肿瘤细胞,尽可能避免肿瘤复发。②强大的“旁观者效应”可能会避免HSV-TK/GCV治疗时出现耐药细胞克隆^[4]。③加强“旁观者效应”后,可降低病毒载体及GCV的用量,减少载体相关毒性和其他毒副作用的发生机会。“旁观者效应”发生机理尚未完全阐明,GJIC介导的毒性代谢物传递学说正受到越来越多学者的认同^[1,2],即三磷酸化的GCV经过缝隙连接(gap junction, GJ)通道由TK⁺细胞进入TK⁻细胞,导致后者的死亡。GJIC是通过由连接蛋白(Connexin, Cx)构成的GJ实现的,GJ的直径取决于连接蛋白的类型,约1.5~2nm,可通透小于2kD的小分子,如离子、水、糖类、核酸多肽、氨基酸、药物及致癌物等,蛋白质、RNA、多糖和脂质复合体等大分子物质则不能透过GJ通道。物质

通过 GJ 通道在不同细胞间流动的现象称为 GJIC, 是不耗能的被动扩散过程。Cx 基因的正常表达, Cx 蛋白的正确定位及配对是 GJIC 发生的前提条件, 除此之外, Cx 的磷酸化及适宜的细胞-细胞黏附、Cx 的合成与降解速度及细胞表面 GJ 的装配与去除速度、胞内 pH 值及钙离子浓度、GJ 的门控特性等均参与细胞间 GJIC 的产生与维持^[1]。

有报道 NIH-3T3 细胞 GJIC 功能较强, 并在 HSV-TK/GCV 作用后显示强大的“旁观者效应”^[5]。Cos-7 具有强大的 GJIC 功能^[6], 而 L-02 为正常肝细胞, 理论上具备良好的 GJIC 能力。ACHN 和 HeLa 均被报道 GJIC 功能低下, 后者甚至完全丧失 GJIC 能力^[7-8]。本研究选择上述具有代表性的细胞为研究对象, 首先观察其 GJIC 功能, 发现 Cos-7、L-02 和 NIH-3T3 细胞可有效将 LY 传递至伤沿列细胞两侧的 6~10 列细胞, 半定量(++++), 表明其 GJIC 功能较强大。ACHN 细胞传递染料能力低下, 大多位于伤沿列细胞内, 个别视野见 LY 被传递至邻近 1 列细胞, 提示其 GJIC 功能低下, 半定量(+/-); HeLa 细胞则完全未显示染料传递功能。实验结果与先前相关报道结果一致。检测 HSV-TK/GCV 系统对上述几种靶细胞的杀伤效应及“旁观者效应”后, 发现 Cos-7、L-02 和 NIH-3T3 细胞对 TK/GCV 系统的敏感性远高于 ACHN 和 HeLa 细胞。而且, 前三者的“旁观者效应”程度亦高于后二者, TK⁺:TK⁻为 10%:90% 的混合细胞经 10 μ mol/L GCV 作用后, 细胞杀伤率分别为(56.47 \pm 2.96)%、(62.7 \pm 4.26)%、(64.97 \pm 2.70)%、(13.58 \pm 1.25)% 和(12.92 \pm 3.01)%。

AGA 和 apigenin 作为两种常用的 GJIC 调节剂已经在数项研究中被证实可有效抑制或促进靶细胞的 GJIC 功能, 其起效时间短而持续时间长。本研究亦证实 apigenin 对靶细胞 GJIC 功能的促进作用在加药后 6h 即可出现, 且可保持直至去除 apigenin 后 48h。我们观察了 AGA 和 apigenin 对上述细胞 GJIC 功能及“旁观者效应”程度的影响。发现 AGA 可明显抑制 Cos-7、L-02 和 NIH-3T3 细胞的 GJIC 功能, 处理后传递 LY 功能由处理前(++++)降至(+/-); apigenin 则可明显促进 ACHN 细胞 GJIC 功能, 处理后传递 LY 功能达(+++)。但是, apigenin 并不能提高 HeLa 细胞的 GJIC 能力, 可能与 HeLa 细胞不表达 Cx 基因有关。相应地, AGA 可显著降低 Cos-7、NIH-3T3 和 L-02 细胞的“旁观者效

应”; apigenin 则可促进 ACHN 细胞的“旁观者效应”, 对 HeLa 细胞则无影响。说明 GJIC 调节剂对“旁观者效应”的影响依赖于其对细胞 GJIC 功能的调节作用。

本研究提示: 1. 细胞内在的 GJIC 功能与其对 HSV-TK/GCV 系统的敏感性和“旁观者效应”程度有正向关系, 2. 人为调节细胞 GJIC 后, 其对 HSV-TK/GCV 系统的“旁观者效应”程度同时发生改变。结果进一步支持 GJIC 在 TK 自杀基因系统旁观杀瘤效应中具有重要作用的观点。由于绝大部分肿瘤细胞 Cx 表达低下, GJIC 减弱或缺陷, 提示应在应用 TK 自杀基因治疗肿瘤前评价靶细胞 GJIC 功能, 一方面为预示治疗效果提供线索, 另一方面为上调 GJIC、提高“旁观者效应”程度, 进而提高疗效确立依据。

参 考 文 献

- [1] 邢毅飞, 肖亚军, 鲁功成. 连接蛋白介导的 GJIC 与肿瘤自杀基因治疗时旁观者效应的关系[J]. *国外医学·生理、病理科学与临床分册*, 2001, 21:246-248.
- [2] MESNIL M, YAMASAKI H. Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 3989-3999.
- [3] EI-FOULY M H, TROSKO J E, CHANG C C. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication [J]. *Exp Cell Res*, 1987, 168: 422-430.
- [4] YANG L, HWANG R, CHIANG Y W, et al. Mechanisms of ganciclovir resistance in gastrointestinal tumor cells transduced with a retroviral vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4: 731-741.
- [5] DRAKE R R, PITLYK K, MCMASTERS R A, et al. Connexin-independent ganciclovir-mediated killing conferred on bystander effect-resistant cell lines by a herpes simplex virus-thymidine kinase-expressing colon cell line[J]. *Mol Ther*, 2000, 2: 515-523.
- [6] GEORGE C H, KENDALL J M, CAMPBELL A K, et al. Connexin-aequorin chimerae report cytoplasmic calcium environments along trafficking pathways leading to gap junction biogenesis in living COS-7 cells[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 29822-29829.
- [7] NOGUCHI M, NOMATA K, WATANABE J I, et al. Disruption of gap junction intercellular communication in human renal cancer cell lines[J]. *Urology*, 1999, 53: 218-222.
- [8] TANAKA T, YAMASAKI H, MESNIL M. Stimulation of intercellular communication of poor-communicating cells by gap-junction-competent cells enhances the HSV-TK/GCV bystander effect *in vitro* [J]. *Int J Cancer*, 2001, 91: 538-542.

Role of GJIC on the Bystander Effect Mediated by HSV-TK/GCV Approach and Its Regulation

XING Yi Fei^{1*}, LU Gong Cheng¹, XIAO Ya Jun¹, ZHAO Jun¹,
ZENG Fu Qing¹, XIONG Ping², FENG Wei²

(¹Department of Urology, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; ²Institute of Immunology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: Reinforcement of the so-called “bystander effect” is a key way to improve the efficacy of HSV-TK/GCV approach. For exploring the effect of gap junctional intercellular communication (GJIC) on the bystander effect mediated by HSV-TK/GCV system and investigating the chemical modulation of GJIC and bystander effect, the GJIC of five cell lines named ACHN, HeLa, NIH-3T3, Cos-7 and L-02 were detected by the Scrape-loading dye transfer assay (SLDT), and their susceptiveness to HSV-TK/GCV approach and the bystander tumoricidal effect were determined. In addition, the influence of apigenin and 18- α -glycyrrhetic acid (AGA), which were reported as GJIC up- and down-regulator, on the GJIC of certain cell lines and on the bystander effect induced by HSV-TK/GCV were observed. It was manifested that the susceptiveness to HSV-TK/GCV approach and the magnitude of bystander effect were higher in NIH-3T3, Cos-7, and L-02 cells which manifested excellent GJIC than in ACHN and HeLa cells which showed poor GJIC ($P < 0.001$). It also demonstrated that apigenin could significantly improve the GJIC of ACHN cells while could not exercise any influence on that of HeLa cells, on the other hand, AGA could effectively inhibit the GJIC of the three target cell lines. Accordingly, apigenin markedly enhanced the bystander effect of ACHN but had little effect on the bystander effect of HeLa, and AGA inhibited the bystander effect of the above three cell lines. In conclusion, the cellular inherent GJIC positively correlates to the sensitivities of GCV in the cells modified with HSV-TK gene and to the bystander effect mediated by this approach, and the magnitude of bystander effect were altered corresponding to the chemical modulation of target cells.

Key words: gap junctional intercellular communication; bystander effect; herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir

*Corresponding author, E-mail: xingyifei@163.net