

- Immunol* 2001;166:162-169
- 10 Ajuebor MN, Hogaboam CM, Kunkel SL, Proudfoot AE, Wallace JL. The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic colitis in the rat. *J Immunol* 2001;166:552-558
- 11 Amerio P, Verdolini R, Proietto G, Feliciani C, Toto P, Shivji G, Loconsole F, Cassano N, Amerio P, Vena G, Sauder DN. Role of Th2 cytokines, RANTES and eotaxin in AIDS-associated eosinophilic folliculitis. *Acta Derm Venereol* 2001;81:92-95
- 12 Fairchild RL, VanBuskirk AM, Kondo T, Wakely ME, Orosz CG. Expression of chemokine genes during rejection and long-term acceptance of cardiac allografts. *Transplantation* 1997; 63:1807-1812
- 13 顾晓, 唐孝达, 杨尚琪, 刘永, 周佩军, 徐达, 王祥慧, 谭建明. 大鼠心脏移植后动态监测血清 RANTES 和单核细胞趋化蛋白-1 的意义. *中华器官移植杂志* 2001;22:36-38
- 14 李元新, 李宁, 黎介寿. 小肠移植排斥反应期移植肠基因表达的研究. *中华医学杂志* 1999;79:773-776

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

双功能融合基因在肝癌细胞中的表达与作用

谢娜, 林菊生, 吴斌文, 黎培员

谢娜, 林菊生, 吴斌文, 黎培员, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所. linjusheng2001@163.net
电话: 027-83662578
收稿日期: 2004-04-04 接受日期: 2004-04-27

摘要

目的: 构建含有融合基因 FCU1 的自杀基因系统观察其对体外培养肝癌细胞的杀伤效应。

方法: 将 FCU1 基因亚克隆于 pEGFP-C₁ 载体转化大肠杆菌 DH5 α 阳性重组子转染肝癌细胞 HepG2 绿色荧光蛋白检测 FCU1 的表达用 G418 筛选出阳性细胞克隆后进行体外药物敏感实验观察旁观者效应。

结果: FCU1 基因正确插入到 pEGFP-C₁ 中 pEGFP-FCU1 转染成功的细胞在荧光显微镜下可见绿色荧光 5-FC 作用下细胞的生长抑制率明显高于未转染细胞且旁观者效应显著。

结论: 本基因治疗体系具有很好的体外杀肿瘤效果为肝癌的基因治疗提供了一个新的选择。

谢娜, 林菊生, 吴斌文, 黎培员. 双功能融合基因在肝癌细胞中的表达与作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1740-1742

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1740.asp>

0 引言

自杀基因/前药系统是一种很有效的肿瘤药物敏感基因疗法这种方法已在多种肿瘤的治疗中得到应用. 新型高效的融合自杀基因 FCU1 是由 FCY1 和 FUR1 两种自杀基因的编码序列经过特定的酶切连接定点缺失突变等过程融合而成^[1]. FCY1 和 FUR1 基因分别编码胞嘧啶脱氨酶(CDase)和尿嘧啶磷酸核糖转移酶(UPRTase)

可将 5-FC 直接代谢为 5-FU 的单磷酸化产物在肿瘤自杀基因治疗中可产生双功能杀伤细胞的功效^[2-4]. 我们将构建好的自杀基因真核细胞表达载体用一定方式导入肿瘤细胞获得稳定表达的细胞株并探讨 FCU1/5-FC 自杀基因系统对体外培养肝癌细胞的杀伤效应。

1 材料和方法

1.1 材料 pCIneoFCU1 由 Transgene S.A. 惠赠 pEGFP-C₁ 由本实验室保存宿主菌 DH5 α 由本室保存肝癌细胞株 HepG2 由本室保存在含 100 mL/L 小牛血清 100 IU/mL 青/链霉素的 DMEM 培养基(Gibco 公司)中于 37 50 mL/LCO₂ 培养箱中培养. 限制性内切酶 *Sma* *Xho* 购自 MBI 公司 DNA 回收试剂盒质粒提取试剂盒购自上海华舜公司 T₄ DNA ligase 购自 MBI 公司 脂质体 LipoGen 购自 InvivoGen 公司 G418 购自 Gibco 公司 5-FC 购自 Sigma 公司。

1.2 方法 用 *Sma* *Xho* 分别双酶切 pEGFP-C₁ 和 pCIneoFCU1 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物并回收目的基因片段将载体片段目的基因片段按摩尔比 1:3 混合用 T₄ DNA 连接酶于 4 连接过夜. 取适量连接产物用低温 CaCl₂ 法转化 DH5 α 同时用空载体质粒转化作为阳性对照. 筛选出阳性克隆后提取质粒琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性产物即得所需重组体质粒 pEGFP-FCU1. HepG2 细胞培养至对数生长期时转入 6 孔板每孔 5 10⁵ 个细胞重组体质粒 pEGFP-FCU1 用 LipoGen 脂质体进行转染对照组转染 pEGFP-C₁ 空质粒 48 h 后于荧光显微镜下观察结果. 用 400 mg/L 的 G418 筛选阳性细胞克隆获得稳定表达的单克隆细胞记为 HepG2/FCU1 再扩大培养. 检测前药 5-FC 作用下的细胞生长抑制率将 HepG2/FCU1 细胞以 2 10⁵ 个/

孔接种于6孔板中24 h后6孔细胞分别加不同体积的5-FC使其终浓度依次为0 0.01 0.1 1 10 100 $\mu\text{mol/L}$ 每组设3个复孔并用未转染细胞HepG2做阴性对照连续观察培养6 d后用台盼兰染色排除法分别计数总细胞数和兰染细胞数计算细胞生长抑制率.在96孔板上将转染的细胞与未转染细胞分别以0 1 1 9 2 8 3 7 4 6 5 5 6 4 7 3 8 2 9 1 1 0的比例混合每组设3个复孔经100 $\mu\text{mol/L}$ 5-FC作用6 d后用MTT法检测体外旁观者效应^[5].

统计学处理 实验数据用方差分析法检验组间比较用LSD检验法以 $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 pEGFP-FCU1质粒构建及转染细胞结果 重组体质粒经 *Sma* *Xho* 双酶切应获得约1 100 bp(目的基因)和4 500 bp(载体)的两条线性片段并与pCIneoFCU1双酶切所得目的基因片段大小一致(图1).pEGFP-FCU1转染HepG2细胞48 h后荧光显微镜下可见绿色荧光(图2) 转染效率约40%. G418筛选至单细胞克隆呈集落生长时再进行荧光观察记为HepG2/FCU1细胞.HepG2 HepG2/FCU1及HepG2/EGFP(转染空质粒组)细胞的倍增时间分别为(40.4 \pm 0.1) h (42.8 \pm 0.1 h) (41.5 \pm 0.1 h) 方差分析显示3组间差异无显著性($P > 0.05$) 表明外源基因的转入与表达不影响细胞的生长速度.

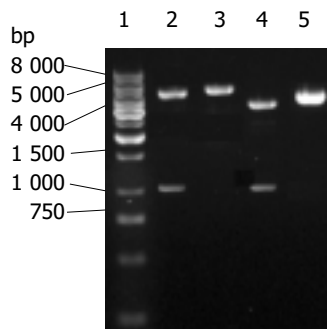


图1 重组体质粒酶切鉴定. 1: DNA marker; 2: pCIneoFCU1 双酶切产物; 3: pCIneoFCU1 质粒; 4: 重组体pEGFP-FCU1 双酶切产物; 5: pEGFP-C1 质粒.

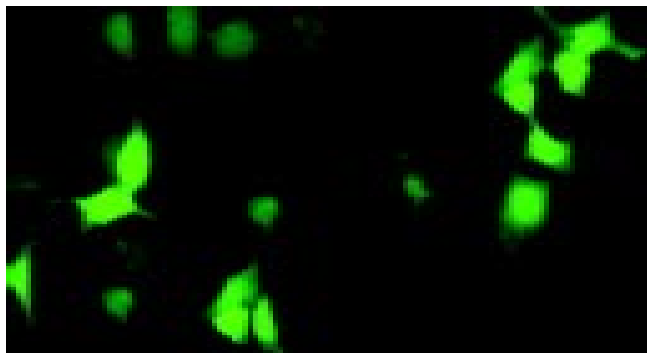


图2 pEGFP-FCU1 转染 HepG2 细胞后荧光照片(400 \times).

2.2 体外药物敏感试验结果 随着前体药物5-FC浓度的增加 HepG2/FCU1 细胞的存活率明显降低且与对照组(未加药)有显著差异抑制率曲线如图3所示.前体药物5-FC对混合细胞作用后FCU1/5-FC系统存在明显的旁观者效应如图4所示 转染细胞 HepG2/FCU1 含量占10%时 混合细胞生长抑制率已达53%.

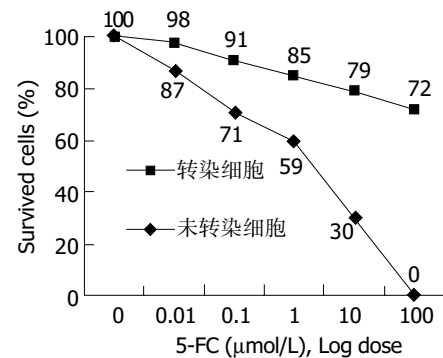


图3 细胞的药物敏感性实验.

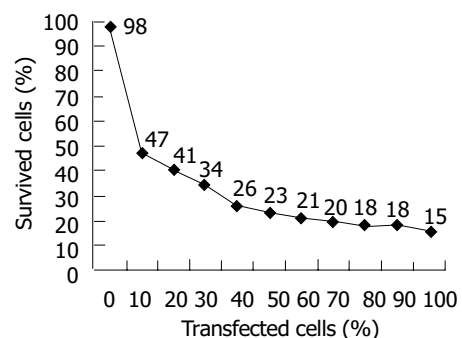


图4 FCU1/5-FC 系统的体外旁观者效应.

3 讨论

肝癌是全球高发肿瘤之一最常见的肝细胞癌一般对化疗高度耐药目前惟一的治愈方法只有部分肝叶切除术和肝移植^[6-7].基因治疗是一种新的有前景的治疗形式 其基本原理就是将遗传物质导入细胞以产生生物学的治疗效应.病毒或细菌中的一些酶可将无毒或低毒的前药转化为致死性的毒性化合物自杀基因治疗即将编码这些酶的基因导入到靶细胞中因此也称为病毒介导的酶/前药治疗(virus-directed enzyme/prodrug therapy VDEPT)^[8].TK/GCV(thymidine kinase/ganciclovir)和CD/5-FC系统是目前肝癌基因治疗中应用最广泛的前药激活系统许多体内和体外实验均证实有较好的抑制肿瘤细胞生长的作用^[9-13].自杀基因的一个显著特点就是所谓的旁观者效应(bystander effect) 即转染细胞中的毒性药物代谢物可弥散至邻近组织中增加受作用的瘤细胞数目.因此即使仅有部分肿瘤细胞被转染时也可取得显著的杀瘤效果.一些双位点模型研究表明 同时在肝的两叶内分别接种野生型的结肠癌细胞和转染有CD基因的结肠癌细胞在用5-FC治疗后两个病灶均消退这意味着旁观者效应甚至可在

较远的部位发生作用^[14]。融合基因FCU1既能编码CD基因 又编码UPRTase 基因 其表达产物是一个具有双功能的高效杀伤系统Philippe Erbs *et al* 的研究表明FCU1/5-FC系统能显著抑制多种肿瘤细胞的生长转染了FCU1基因的肿瘤细胞对前药5-FC的敏感性比单纯转染FCY1基因的肿瘤细胞高出100倍 且其旁观者效应明显强于单独转染FCY1或FUR1基因 亦或是同时转染两个基因的细胞^[11,15-16]。我们在实验中初步探讨了FCU1/5-FC系统的体外抗肿瘤作用为进一步研究该自杀基因在肿瘤基因治疗中的应用奠定了良好的基础。

4 参考文献

- 1 Erbs P, Regulier E, Kintz J, Leroy P, Poitevin Y, Exinger F, Jund R, Mehtali M, Transgene SA. *In vivo* cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res* 2000;60:3813-3822
- 2 Erbs P, Exinger F, Jund R. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* FCY1 gene encoding cytosine deaminase and its homologue FCA1 of *Candida albicans*. *Curr Genet* 1997; 31:1-6
- 3 Kievit E, Bershad E, Ng E, Sethna P, Dev I, Lawrence TS, Rehemtulla A. Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res* 1999;59:1417-1421
- 4 Kanai F, Kawakami T, Hamada H, Sadata A, Yoshida Y, Tanaka T, Ohashi M, Tateishi K, Shiratori Y, Omata M. Adenovirus-mediated transduction of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentrations of 5-fluorouracil. *Cancer Res* 1998;58:1946-1951
- 5 Lv SQ, Yang H, He JQ, Wang B, Yoshimura I, Liu YS. Effects of CD/5-FC suicide gene therapy system on human malignant glioma cells *in vitro*. *Acta Biochim Biophys Sin* 2003;35: 430-434
- 6 Badvie S. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med J* 2000;76: 4-11
- 7 Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl): 225-237
- 8 Moolten FL. Drug sensitivity (suicide) genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther* 1994;1:279-287
- 9 Narita M, Bahar R, Hatano M, Kang MM, Tokuhisa T, Goto S, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. Tissue-specific expression of a suicide gene for selective killing of neuroblastoma cells using a promoter region of the NCX gene. *Cancer Gene Ther* 2001;8:997-1002
- 10 van Dillen JJ, Mulder NH, Vaalburg W, de Vries EF, Hospers GA. Influence of the bystander effect on HSV-tk/GCV gene therapy. *Curr Gene Ther* 2002;2:307-322
- 11 Nowak AK, Lake RA, Kindler HL, Robinson BW. New approaches for mesothelioma: biologics, vaccines, gene therapy, and other novel agents. *Semin Oncol* 2002;29:82-96
- 12 Qiao J, Doubrovin M, Sauter BV, Huang Y, Guo ZS, Balatoni J, Akhurst T, Blasberg RG, Tjuvajev JG, Chen SH, Woo SL. Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy. *Gene Ther* 2002;9:168-175
- 13 Yazawa K, Fisher WE, Brunicardi FC. Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J Surg* 2002;26:783-789
- 14 Pierrefite-Carle V, Baque P, Gavelli A, Benchimol D, Bourgeon A, Milano G, Saint-Paul MC, Rossi B. Regression of experimental liver tumor after distant intra-hepatic injection of cytosine deaminase-expressing tumor cells and 5-fluorocytosine treatment. *Int J Mol Med* 2000;5:275-278
- 15 Desaknai S, Lumnic K, Esik O, Hamada H, Safrany G. Local tumour irradiation enhances the anti-tumour effect of a double-suicide gene therapy system in a murine glioma model. *J Gene Med* 2003;5:377-385
- 16 Tiraby M, Cazaux C, Baron M, Drocourt D, Reynes JP, Tiraby G. Concomitant expression of *E. coli* cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase improves the cytotoxicity of 5-fluorocytosine. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:41-49

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

复方二甲基硅油对功能性肠胀气的疗效观察

徐可树, 丁震, 李云桥, 熊汉华

徐可树, 丁震, 李云桥, 熊汉华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
项目负责人: 徐可树, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. xuzou@medmail.com.cn
电话: 027-85726381
收稿日期: 2004-04-10 接受日期: 2004-04-20

摘要

目的: 评价复方二甲基硅油对功能性肠胀气的临床疗效及安全性 并探讨其治疗机制。

方法: 功能性肠胀气患者54例 采用随机分组平行对照的实验设计方法在应用复方二甲基硅油和安慰剂治疗后观察临床症状积分肠管积气量及肠排气次数的改变。

结果: 与安慰剂比较复方二甲基硅油能够明显降低功能

性肠胀气患者临床症状积分肠内胀气指数并增加肠排气次数(0.65 ± 0.61 vs 1.83 ± 0.49 45 ± 21 vs 117 ± 40 13 ± 4 vs 8 ± 3 $P = 0.01$)。复方二甲基硅油治疗功能性肠胀气的总有效率为88.9% 显著高于安慰剂的29.6% ($P = 0.01$)。

结论: 复方二甲基硅油能够减少肠内气体改善临床症状 且安全性好。

徐可树, 丁震, 李云桥, 熊汉华. 复方二甲基硅油对功能性肠胀气的疗效观察. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1742-1744

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1742.asp>

0 引言

肠胀气系指肠腔内过多的气体积聚导致患者出现腹