

# 双自杀基因 CDTK 载体系统对裸小鼠 Y79 细胞皮下移植瘤的杀伤作用

张永红<sup>1</sup>, 唐罗生<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(545006) 中国广西壮族自治区柳州市人民医院眼科;<sup>2</sup>(410011) 中国湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院眼科  
作者简介: 张永红, 博士, 主治医师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。

通讯作者: 张永红. yonghongdoctor@126.com

收稿日期: 2010-08-10 修回日期: 2010-09-06

## Killing effects of tumor cells specific vector of suicide gene of CDglyTK driven by hTERT promoter on nude mice model of retinoblastoma Y79 *in vivo*

Yong-Hong Zhang<sup>1</sup>, Luo-Sheng Tang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Liuzhou City, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

**Correspondence to:** Yong-Hong Zhang. Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Liuzhou City, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yonghongdoctor@126.com

Received: 2010-08-10 Accepted: 2010-09-06

### Abstract

• **AIM:** To investigate the killing effects of tumor cells specific vector of suicide gene of CDglyTK driven by hTERT promoter on retinoblastoma Y79 *in vivo*.

• **METHODS:** The BALB/C nude mice were divided into two groups, ten mice each. The experimental mice were injected subcutaneously with the CDTK expressional retinoblastoma Y79 cells. The control mice were injected with non-transfected Y79 cells. Intraperitoneal injections with 5-FC and GCV were started 7 days after tumor injection. Tumor was allowed to grow and established. All the mice with tumor received prodrug once per day for 15 days. The volume of tumor were observed. Furthermore, the pathological results of tumor was observed. At the same time, RT-PCR was used to detect CDTK amplification fragments in the tumors.

• **RESULTS:** The volume of the tumor in experimental group, compared to the control group, showed a significant decrease. There was significant difference in the tumor volume between the two groups ( $P < 0.05$ ).

There was generous necrosis in the transfected group. The result of RT-PCR showed 403bp fragment that was equal to the expectation.

• **CONCLUSION:** Tumor cells specific vector of suicide gene of CDglyTK and prodrugs can inhibit the growth of tumor of Y79 subcutaneously.

• **KEYWORDS:** CDglyTK gene; suicide gene therapy; BALB/C nude mice; retinoblastoma; 5-Fc; GCV

Zhang YH, Tang LS. Killing effects of tumor cells specific vector of suicide gene of CDglyTK driven by hTERT promoter on nude mice model of retinoblastoma Y79 *in vivo*. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(10):1871-1873

### 摘要

**目的:** 研究肿瘤特异性双自杀基因载体系统 pc-ChCDTK 对视网膜母细胞瘤的体内杀伤作用。

**方法:** 用 G418 筛选载体阳性转染的 Y79 细胞; 通过皮下注射载体转染和未转染的 Y79 细胞致瘤 BALB/C 小鼠, 每组 10 只。Y79 细胞皮下移植术 7d 后, 向成瘤裸小鼠腹腔注射前体药物 5-Fc + GCV (5-Fc 500mg/kg + GCV 30mg/kg), 连续给药 15d, 每天测量 1 次皮下移植瘤长径和短径, 计算体积。末次给药后 3d 处死裸小鼠, 取皮下移植瘤组织做 HE 染色, 并提取组织 RNA, 用 RT-PCR 检测 CDTK 的表达。

**结果:** 未转染组裸小鼠 8 只成瘤, 转染组裸小鼠 7 只成瘤。两组比较, 转染组皮下移植瘤的体积较未转染组小, 有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 转染组瘤组织 HE 染色中可见散在坏死组织。转染组皮下移植瘤组织中检测到 403bp 片段, 与 CDTK 预期 mRNA 大小一致。

**结论:** 双自杀基因载体 pc-ChCDTK 系统对裸小鼠的视网膜母细胞瘤皮下移植瘤的生长有抑制作用。

**关键词:** CDTK 基因; 自杀基因治疗; BALB/C 裸小鼠; 视网膜母细胞瘤; 5-Fc; GCV

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.10.010

张永红, 唐罗生. 双自杀基因 CDTK 载体系统对裸小鼠 Y79 细胞皮下移植瘤的杀伤作用. 国际眼科杂志 2010;10(10):1871-1873

### 0 引言

自杀基因治疗是近年来肿瘤研究的热点领域之一, 也是目前最有可能有效应用于临床的肿瘤基因治疗策略之一。构建安全高效的载体是基因治疗的关键。我们已经成功的构建了含有 hTERT 启动子的肿瘤特异性杀伤载体

pc-ChCDTK<sup>[1]</sup>,并且研究了该载体系统对人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞在体外的杀伤作用在下面的研究中,我们将探讨该载体对人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞在体内的杀伤作用。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** BALB/C 小鼠 20 只,雌雄不限,4~6 周龄,20g 左右,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。由中南大学湘雅二医院实验动物中心按无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级动物标准饲养。Y79 细胞株 (美国模式菌种收集中心 (ATCC); RPMI-1640 细胞培养基和 G418 (Gibco); 胎牛血清 (Gibco); 5-Fc, GCV (Sigma); 蛋白质 Marker (上海生化试剂公司); 实验所用引物 (上海生物工程技术有限公司): yCDrt: 5'-ACGCTGTGTGTTCGGTGAGAA-3'; TKrt: 5'-CACACCACGCAACTGCTG-3';  $\beta$ -actin F: 5'-CACCTGAAGTACCCCATCG-3';  $\beta$ -actin R: 5'-TTGCCAATGGTGATGACCTG-3'。

**1.2 方法** Y79 细胞电转染后 48h,离心,弃去培养液,加入 10mL 含有浓度为 400mg/L G418 的 200mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,2~3d 换液 1 次,筛选 2wk,获得抗新霉素的阳性转染细胞。小鼠分成 2 组,每组 10 只。一组皮下注射未转染 pc-ChCDTK 载体的 Y79 细胞,另一组注射转染 pc-ChCDTK 载体的 Y79 细胞。7d 后,成瘤裸小鼠 iP 5-Fc + GCV。准备转染和未转染 pc-ChCDTK 载体的 Y79 细胞,换瓶后正常培养;裸小鼠致瘤前 1d,细胞换液;致瘤前用细胞计数板计数后,用 RPMI-1640 培养液稀释到  $2 \times 10^{10}/L$ ;将  $1 \times 10^7$  (0.5mL) 细胞用 1mL 注射器注入裸小鼠右侧腋部皮下;约 7d,可见肿瘤形成,测量其长、短径,准备开始用药;每天注射药量 5-Fc 500mg/kg + GCV 30mg/kg (参考 Xia 等<sup>[2]</sup>实验) ip,连续给药 15d,每 3d 测量 1 次体积,末次给药后 3d 颈椎脱臼处死全部成瘤裸小鼠,取出所形成的瘤组织。每天观察裸小鼠精神、饮食等生活状态,当肉眼可见明显的皮下肿块形成时 (7d),每 3d 用游标卡尺测量 1 次长径和短径,计算肿瘤的体积,肿瘤的体积 = 长径  $\times$  短径<sup>2</sup>/2,绘制肿瘤生长曲线。每组各取一个皮下移植瘤组织作病理切片,行 HE 染色观察 (取肿块,100g/L 甲醛磷酸缓冲液固定 48h 后,常规石蜡包埋,切片,HE 染色,显微镜下观察)。另将裸小鼠皮下移植瘤组织放入液氮中,取出标本碾碎后加入 Trizol 1mL,室温静置 20min;加氯仿 0.2mL,剧烈摇 15s,室温静置 3min;12000r/min,4℃ 离心 15min;取上清到 EP 管 (DEPC 处理),加 0.5mL 预冷的异丙醇,混匀静置 10min。12000r/min,4℃ 离心 10min;去上清,750mL/L 乙醇 1mL 洗涤 (用 DEPC 水配制),12000r/min,4℃ 离心 5min,去上清,重复离心一次,用中 Tip 吸干液体。空气干燥沉淀 5min,用 1g/L DEPC 水 20 $\mu$ L 55℃ 水浴溶解 10min,测总 RNA A 值。取 2 $\mu$ L 行 RT-PCR 检测 CDTK 表达。同时用  $\beta$ -actin 扩增引物作对照,PCR 产物用 8g/L 琼脂糖凝胶跑胶检测。

统计学分析:统计学数据均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,SPSS 11.5 统计软件包进行统计,两组肿瘤体积的比较采用两样本配对 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

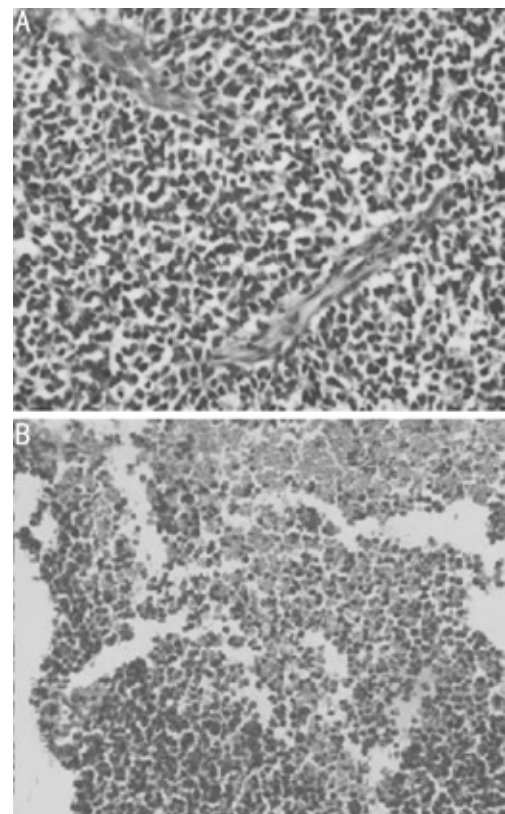


图 1 皮下移植瘤组织学变化 (HE  $\times 200$ ) A: 未转染组; B: 转染组。

### 2 结果

**2.1 一般情况** 20 只裸小鼠中有 3 只于肿瘤细胞移植术后 2wk 出现活动减少、食欲下降、精神萎靡,其余各鼠生活状态与术前相比无明显异常。前 3 只小鼠于观察结束时尚存活,无全身衰竭情况。10 只未转染组小鼠 8 只成瘤,转染组小鼠 7 只成瘤。给药前测量皮下移植瘤长短径,计算体积,未转染组平均体积为  $111.6 \pm 0.4 \text{mm}^3$ ,转染组平均体积为  $109.8 \pm 0.7 \text{mm}^3$ ,两组无统计学差异。结果发现 pc-ChCDTK 载体转染组较未转染组皮下移植瘤体积小,有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 移植瘤病理形态特征** 小鼠皮下致瘤注射后 25d 结束实验,处死小鼠,取皮下移植瘤制成石蜡切片,HE 染色光学显微镜下观察 (图 1) 显示,未转染组肿瘤细胞形小,呈圆形或椭圆形,胞质少,核大深染,可见少数菊形团形成,纤维血管组织较丰富,未见明显坏死;转染组肿瘤细胞与未转染组形态相似,可见散在的坏死区,未见明显菊形团形成。

**2.3 移植瘤双自杀基因 CDTK 的表达** 提取各组皮下移植瘤组织细胞 RNA,RT-PCR 检测发现,在转染组裸小鼠皮下移植瘤组织内检测到 403bp 的 CDTK 基因扩增片段和 561bp 的  $\beta$ -actin (图 2),而未转染组未检测到 CDTK 片段。

### 3 讨论

BALB/C 小鼠是建立 RB 动物模型的理想动物。BALB/C 鼠移植瘤动物模型主要有异位移植模型、常位移植模型以及转基因肿瘤模型。视网膜母细胞瘤在裸小鼠体内的移植部位主要有皮下,前房,玻璃体腔。皮下为异