

HSV-TK/GCV 系统在体外对胃癌 MNK-45 细胞株的增殖抑制作用研究

李 娅¹, 张 贇¹, 刘红莉¹, 皇 海², 苏明权², 屈 慧²

(1. 西安市人民医院(西安市第四医院)检验科, 西安 710004;

2. 空军军医大学第一附属医院全军临床检验医学研究所, 西安 710032)

摘要:目的 探讨单纯疱疹病毒胸苷激酶基因/丙氧鸟苷(HSV-TK/GCV)自杀基因系统对胃癌 MNK-45 细胞增殖、侵袭和迁移的抑制效应。方法 分别采用 MTS 试验、CCK8 试验、Transwell 试验、Western blot 试验和 RT-PCR 方法检测 HSV-TK/GCV 系统对胃癌 MNK-45 细胞在 24, 48, 72 和 96h 的增殖、侵袭和迁移的改变;对 MNK-45 细胞凋亡相关蛋白 mRNA 水平的变化。结果 HSV-TK/GCV 系统能够有效抑制胃癌 MNK-45 细胞的增殖效应,并能够减弱胃癌 MNK-45 细胞的侵袭和迁移能力,诱导 MNK-45 细胞凋亡相关蛋白 Caspase3、Bax 蛋白水平和 mRNA 的表达增加,抑制 Bcl-2 蛋白表达水平的降低,促进凋亡的发生。结论 HSV-TK/GCV 系统能够有效抑制胃癌 MNK-45 细胞增殖、侵袭和迁移,诱导 MNK-45 细胞凋亡的发生。

关键词: 胃癌;单纯疱疹病毒胸苷激酶基因/丙氧鸟苷系统; MNK-45 细胞;细胞增殖

中图分类号: R735.2; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 02-019-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.02.005

Study on the Inhibition of HSV-TK/GCV System on the Proliferation of Gastric Cancer MNK-45 Cell Line in Vitro

LI Ya¹, ZHANG Yun¹, LIU Hong-li¹, HUANG Hai², SU Ming-quan², QU Hui²

[1. Departments of Clinical Laboratory, Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Xi'an 710004, China; 2. Institute of Clinical Laboratory Medicine of People's Liberation Army, the First Affiliated Hospital of AFMU, Xi'an 710032, China]

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of HSV-TK/GCV suicide gene system on proliferation, invasion and migration of MNK-45 cells in gastric cancer. **Methods** MTS test, CCK8 test, Transwell test, Western blot test and RT-PCR were used to detect the proliferation of MNK-45 cells in gastric cancer at 24, 48, 72 and 96h by HSV-TK/GCV. Transwell test was used to detect the invasion and migration of MNK-45 cells in gastric cancer by HSV-TK/GCV system. Changes of mRNA levels of apoptosis-related proteins in MNK-45 cells. **Results** HSV-TK/GCV system can effectively inhibit the proliferation effect of gastric cancer MNK-45 cells, reduce the invasion and migration ability of gastric cancer MNK-45 cells, induce the expression level and mRNA of apoptosis-related proteins Caspase 3 and Bax, inhibit the expression level of Bcl-2, and promote the occurrence of apoptosis. **Conclusion** HSV-TK/GCV system can effectively inhibit the proliferation, invasion and migration of gastric cancer MNK-45 cells and induce the occurrence of apoptosis of MNK-45 cells.

Keywords: gastric cancer; HSV-TK/GCV system; MNK-45 cells; cell proliferation

胃癌是人类最常见的恶性肿瘤之一。尤其在我和东南亚地区,其发病率与死亡率居于世界癌症前列。胃癌较其它癌症相比起病较为隐匿,发现时一般都错过了最佳治疗时机。研究发现,70%的胃癌患者发现时已经处于进展期或者晚期,失去了手术治疗的机会,导致胃癌的一年生存率都很低。目前胃癌的治疗方法有多种,手术治疗、中医中药治疗以及胃癌的基因治疗等,但效果仍然不佳。

单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV-TK)/丙氧鸟苷(GCV)系统被称为前体药物激活酶,能磷酸化与核苷酸结构相似的 GCV,最后形成有很强毒力的代谢产物三磷酸 GCV^[1]。三磷酸 GCV 能够抑制细胞在分裂期基因的合成,还能够使 DNA 聚合酶表达降低,对细胞产生杀伤作用^[2]。

双歧杆菌属于食品安全级细菌的一种,多用于生物技术的很多方面。双歧杆菌在体内婴儿时期含

基金项目:陕西省科技厅一般项目-社会发展领域(2017SF-265),西安市人民医院(西安市第四医院)孵化基金 CX-20。

作者简介:李娅(1980-)女,副主任检验师,研究方向:肿瘤分子机制研究, E-mail: 38647846@qq.com。

通讯作者:屈慧,主管技师, E-mail: quhui1113@163.com。

量最多,随着年龄的增长而丢失。双歧杆菌具有抗衰老、抑制肿瘤、降低血糖血脂、调节免疫等功能。由于双歧杆菌具有较好的安全性,并对肿瘤组织具有靶向性,因此被广泛地应用于肿瘤临床靶向治疗的载体。

1 材料与方法

1.1 材料 pGEX-TK 和 pGEX-5X-1 由本课题组前期研究所构建,胃癌 MNK-45 细胞株 RPMI1640 培养液、胎牛血清、Transwell 小室、Matrigel 胶、0.25g/dl 胰酶-EDTA 购买于 Gibco 公司; Caspase 3, Bax, Bcl-2, Actin 等购买于 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 MTS 实验: ①将 MNK-45 细胞种以 5×10^3 个细胞/孔的密度种植于 96 孔板。以上细胞种植在 4 个 96 孔板上, 24, 48, 72 以及 96h 分别观察细胞增殖情况; ②在每个时间(24, 48, 72 以及 96h)段加入 MTS 试剂 $20 \mu\text{l}$ /孔; ③放入培养箱中继续孵育 4h。通过酶标仪检测细胞的吸光度值(A)。计算方式依据以下公式: $A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白对照组}} = A_{\text{相对目的}}$ 。

1.2.2 CCK8 实验: 运用 Cell Counting Kit (CCK) 试剂盒进行检测。主要方法依据说明书进行: ①细胞准备: 胃癌 MNK-45 细胞离心后细胞计数, 准备铺板; ②CCK 铺板: 密度为 5×10^3 个细胞/孔, 每组设置 4 个副孔, 分别设置 4 个时间点即: CCK-24h, CCK-48h, CCK-72h 以及 CCK-96h; ③吸光度检测: 细胞贴壁后换液, 加入 $100 \mu\text{l}$ 含有 10% (v/v) CCK-8 试剂的完全培养液, 孵育 2 h 后,

用酶标仪 450nm 测定吸光度值。

1.2.3 Transwell 迁移侵袭/迁移实验: MNK-45 细胞消化后收集细胞沉淀; 以 1×10^5 个细胞的密度用无血清培养液悬浮后接种于小室上层, 下层加入完全培养液 $600 \mu\text{l}$ 的 10g/dl FBS, 放入孵箱中培养; 侵袭实验将稀释过的 Matrigel 胶涂抹在 PET 膜上; 取出小室, 运用 4g/dl 多聚甲醛固定, 时间为 15min; 结晶紫染色 10min, PBS 清洗后自然风干, 显微镜拍照计数。

1.2.4 Western blot 检测: 分别取各分组的胃癌细胞, 弃去培养液后分别用 0.01mol/L PBS 冲洗 3 遍, 在细胞培养皿中加入 PMSF, 蛋白酶抑制剂和蛋白裂解液, 冰上裂解 15min。转移至 EP 管中离心后取上清液, 通过 BCA 法测定蛋白浓度。总蛋白中加入上样缓冲液, 沸水中煮 8 min, 取 $50 \mu\text{g}$ 蛋白上样, 10g/dl SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 湿转电转膜仪转膜, 5g/dl 脱脂奶粉室温 (37℃) 封闭 1h, 加入兔抗人 Caspase-3 (1:500 稀释), Caspase-8 (1:1 000 稀释), Fas (1:500 稀释), FAP-1 (1:500 稀释) 和 β -actin (1:500 稀释) 一抗体, 室温摇床孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入相应的二抗, 室温摇床孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 增强化学发光试剂显色, 成像。

1.2.5 Real-time PCR 试验检测: 根据 Genbank 中的基因序列, 使用 Primer 5.0 软件设计 4 对引物, 由吉凯生物公司合成, 引物扩增信息见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	上游引物	下游引物
Caspase-3	5'-AGATGGTTTGAGCCTGAGCA-3'	5'-CAGTGCCTATGAGAAATGG-3'
Caspase-8	5'-GCTTTGACCACGACCTTTGA-3'	5'-GATGATGCCCTTGTCTCCAT-3'
Bax	5'-CCGATTCATCTACCCTGCTG-3'	5'-TGAGCAATTCAGAGGCAGT-3'
Bcl-2	5'-GGATTGTGGCCTTCTTTGAG-3'	5'-TACCCAGCCTCCGTTATCCT-3'

运用 Trizol 法提取各组细胞中的总 RNA, 进行逆转录合成 cDNA; 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。以 pGEX-TK 质粒为模板, 用上游引物 TKF 与下游引物 TKR 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系如下: 总反应体积 $50 \mu\text{l}$, 包括: $2 \times \text{Pfu PCR Master Mix}$ $25 \mu\text{l}$, DNA 模板 $1 \mu\text{l}$, TKF $1 \mu\text{l}$, TKR $1 \mu\text{l}$, ddH₂O $22 \mu\text{l}$ 。扩增片段大小: 111 bp; 设置 PCR 循环条件为: 94℃预变性 2min, 94℃变性 35s, 63℃退火 30s, 72℃延伸 1.5min, 共进行 34 个循环, 72℃再延伸 10min。

1.3 统计学分析 统计分析运用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组样本数据间比较采用单因素方差分析, 两两比较

采用 LSD-t 法, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HSV-TK/GCV 对人胃癌细胞增殖活性的影响 将胃癌 MNK-45 细胞分为六组: 空白对照组、GCV 组、pGEX-5X-1 组、pGEX-TK 组、pGEX-TK+GCV 组、pGEX-5X-1+GCV 组。通过 CCK8 (表 2) 以及 MTS 试验 (表 3) 进行各组细胞增殖活力的检测, 分别在 24, 48, 72 和 96h 观察各组胃癌 MNK-45 细胞的增殖活性的差异。结果发现, GCV 组、pGEX-5X-1 组、pGEX-TK 组、pGEX-5X-1+GCV 组与空白对照组相比胃癌 MNK-45 细胞的增殖活性并无变化。pGEX-TK+GCV 组与空白对照组相比增殖活性显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表2 CCK8 试验检测 HSV-TK+GCV 对人胃癌细胞增殖活性的影响

组别	A_{450nm}			
	24h	48h	72h	96h
空白对照组	0.165 ± 0.017	0.241 ± 0.019	0.530 ± 0.041	1.025 ± 0.094
GCV 组	0.165 ± 0.016	0.243 ± 0.016	0.482 ± 0.039	1.027 ± 0.103
pGEX-5X-1 组	0.166 ± 0.018	0.241 ± 0.020	0.492 ± 0.041	1.028 ± 0.101
pGEX-TK 组	0.165 ± 0.015	0.244 ± 0.018	0.550 ± 0.038	1.030 ± 0.094
pGEX-TK+GCV 组	0.168 ± 0.014	0.251 ± 0.021	0.531 ± 0.046	1.027 ± 0.092
pGEX-5X-1+GCV 组	0.134 ± 0.012*	0.170 ± 0.011*	0.361 ± 0.021**	0.481 ± 0.029**

注: 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组样本数据间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 法。*: $P < 0.05$ vs Con ($P_1 = 0.036$, $P_2 = 0.031$), **: $P < 0.01$ vs Con ($P_3 = 0.0086$, $P_4 = 0.0075$)。

表3 MTS 试验检测 HSV-TK+GCV 对人胃癌细胞增殖活性的影响

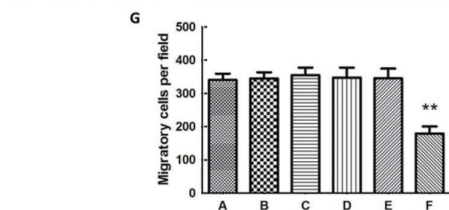
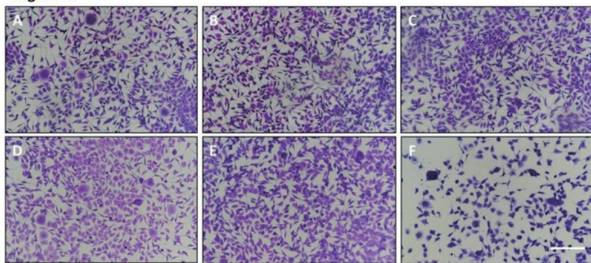
组别	A 值			
	24h	48h	72h	96h
空白对照组	0.46 ± 0.056	0.58 ± 0.026	0.75 ± 0.050	1.06 ± 0.096
GCV 组	0.44 ± 0.065	0.60 ± 0.022	0.73 ± 0.046	1.09 ± 0.107
pGEX-5X-1 组	0.45 ± 0.038	0.61 ± 0.019	0.74 ± 0.061	1.06 ± 0.106
pGEX-TK 组	0.47 ± 0.044	0.60 ± 0.021	0.75 ± 0.049	1.04 ± 0.086
pGEX-TK+GCV 组	0.48 ± 0.037	0.57 ± 0.023	0.77 ± 0.066	1.07 ± 0.102
pGEX-5X-1+GCV 组	0.24 ± 0.026**	0.38 ± 0.023**	0.41 ± 0.036**	0.49 ± 0.037**

注: 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组样本数据间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 法。*: $P < 0.01$ vs Con ($P_1 = 0.0085$, $P_2 = 0.0079$, $P_3 = 0.0077$, $P_4 = 0.0063$)。

2.2 HSV-TK+GCV 系统对胃癌 MNK-45 细胞侵袭 / 迁移能力的影响 为了观察 pGEX-TK+GCV 对胃癌 MNK-45 细胞侵袭 / 迁移能力的影响, 通过 Transwell 实验观察 6 组细胞模型 (空白对照组、GCV 组、pGEX-5X-1 组、pGEX-TK 组、pGEX-TK+GCV 组和 pGEX-5X-1+GCV 组) 在 24h 培养后, 各组胃癌

MNK-45 细胞的迁移活力的改变 (见图 1) 以及侵袭活力的改变 (图 2)。结果发现, 与空白对照组相比, GCV 组, pGEX-5X-1 组, pGEX-TK 组, pGEX-5X-1+GCV 组胃癌 MNK-45 细胞的迁移活力并无显著变化。pGEX-TK+GCV 组与空白对照组相比其侵袭 / 迁移活力显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

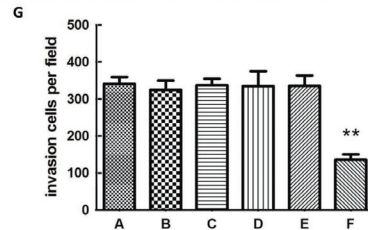
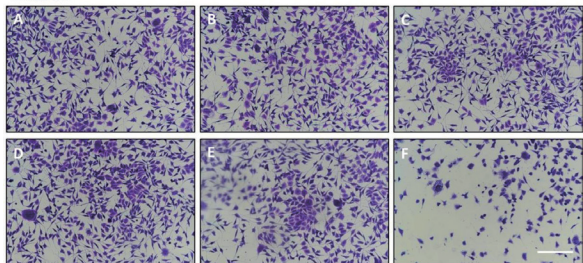
Migration



A: 空白对照组; B: GCV 组; C: pGEX-5X-1 组; D: pGEX-TK 组; E: pGEX-TK+GCV 组; F: pGEX-5X-1+GCV 组, **: $P < 0.01$ vs Con ($P = 0.0066$)。

图1 Transwell 试验检测各组胃癌 MNK-45 细胞迁移能力的影响

Invasion

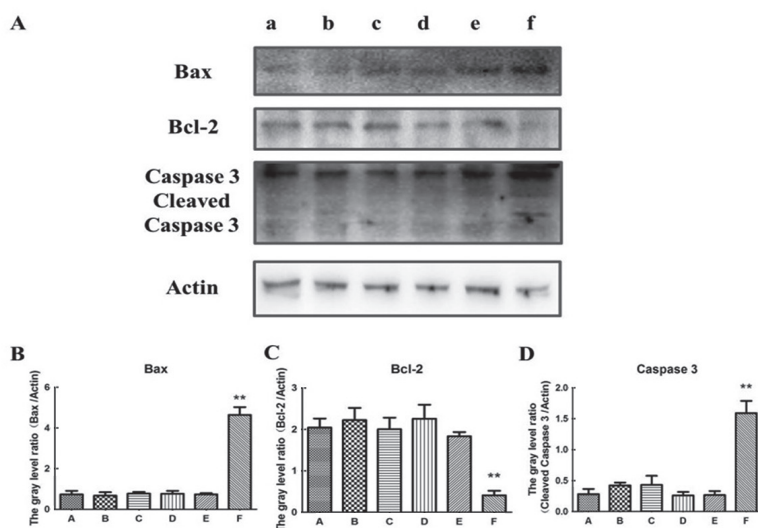


A: 空白对照组; B: GCV 组; C: pGEX-5X-1 组; D: pGEX-TK 组; E: pGEX-TK+GCV 组; F: pGEX-5X-1+GCV 组, **: $P < 0.01$ vs Con ($P = 0.0056$)。

图2 Transwell 试验检测各组胃癌 MNK-45 细胞侵袭能力的影响

2.3 HSV-TK+GCV 系统对胃癌 MNK-45 细胞凋亡的影响 通过 Western blot 检测了各组细胞处理 48h 后凋亡相关蛋白的改变, 凋亡蛋白包括: Cleaved Caspase-3, Bcl-2, Bax 等蛋白, 结果发现, 与空白对照组相比, GCV 组、pGEX-5X-1 组、pGEX-TK 组、pGEX-5X-1+GCV 组胃癌 MNK-45 细胞的凋亡相关

蛋白并无显著变化。pGEX-TK+GCV 组与空白对照组相比其凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3, Bax 显著升高, Bcl-2 抗凋亡相关蛋白显著降低 (见图 3), 提示该组细胞凋亡发生率显著增加, 且 $P < 0.01$, 差异具有统计学意义。

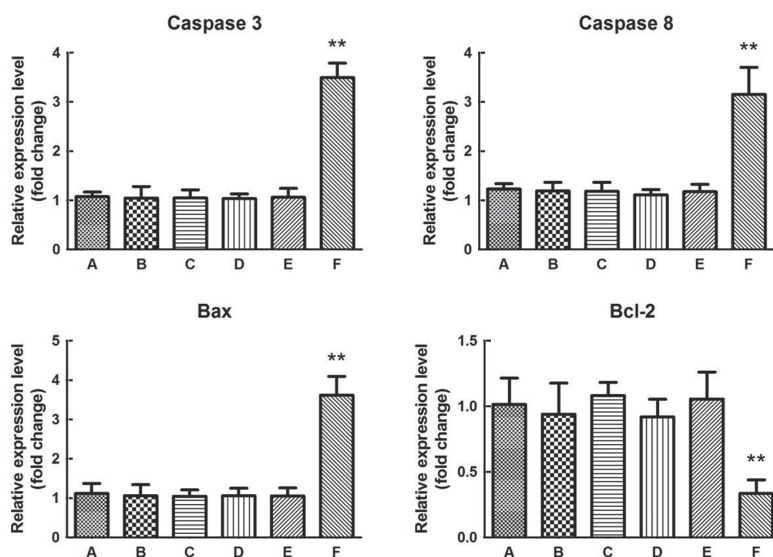


A: Western blot 检测各组蛋白水平的改变 (a: 空白对照组; b: GCV 组; c: pGEX-5X-1 组; d: pGEX-TK 组; e: pGEX-TK+GCV 组; f: pGEX-5X-1+GCV 组); B,C,D: 各组蛋白的灰度分析值。**: $P < 0.01$ vs Con ($P_1=0.0076$, $P_2=0.0055$, $P_3=0.0063$)。

图 3 Western blot 试验检测各组胃癌 MNK-45 细胞凋亡相关蛋白的影响

2.4 Real-time PCR 检测 HSV-TK+GCV 对人胃癌细胞凋亡相关蛋白的影响 通过 Real-time PCR 检测了各组细胞处理 48h 后凋亡相关蛋白 mRNA 水平的改变 (见图 4), 凋亡基因包括: Caspase-3, Caspase-8, Bcl-2, Bax 等蛋白, 结果发现, 与空白对照组相比, GCV 组、pGEX-5X-1 组、pGEX-TK 组、

pGEX-5X-1+GCV 组胃癌 MNK-45 细胞的凋亡相关蛋白 mRNA 水平并无显著变化。pGEX-TK+GCV 组与空白对照组相比其凋亡相关蛋白 Caspase-3, Bax 显著升高, Bcl-2 抗凋亡蛋白显著降低, 提示该组细胞凋亡发生率显著增加, 且 $P < 0.01$, 差异具有统计学意义。



A: 空白对照组; B: GCV 组; C: pGEX-5X-1 组; D: pGEX-TK 组; E: pGEX-TK+GCV 组; F: pGEX-5X-1+GCV 组。**: $P < 0.01$ vs Con ($P_1=0.0076$, $P_2=0.0055$, $P_3=0.0063$, $P_4=0.0032$)。

图 4 RT-PCR 检测 HSV-TK+GCV 对人胃癌细胞凋亡相关蛋白基因的影响

3 讨论

目前肿瘤的基因治疗方法研究愈发成熟,其中自杀基因相关的研究受到了广泛关注。自杀基因(suicide gene)是利用某些病毒或细菌基因的特性,在其导入靶细胞后,再运用其表达的酶催化无毒的药物前体转变为细胞毒物质的原理将靶细胞杀死,这部分基因称为自杀基因^[3]。其中,HSV-TK就是一种自杀基因^[4]。HSV-TK感染细胞后能表达TK基因,TK能够催化GCV磷酸化,进而抑制DNA聚合酶,抑制细胞蛋白质的合成,达到杀伤肿瘤细胞的目的^[5-6]。

利用HSV-TK在很多肿瘤的治疗中得到了验证。前列腺癌、成神经管细胞瘤以及人类乳腺癌细胞株MCF-7运用自杀基因HSV-TK系统均能够有效抑制^[7-10]。然而在胃癌中却没有报道,以胃癌MNK-45细胞为靶细胞,观察了HSV-TK系统对胃癌MNK-45细胞增殖、迁移和侵袭的作用。结果提示与对照组相比,HSV-TK系统能够有效地抑制胃癌MNK-45细胞的增殖,且具有一定的时间依赖效应,随着作用时间的延长,HSV-TK系统抑制胃癌MNK-45细胞的作用就越大。胃癌细胞在临床治疗中具有较强转移性和侵袭性,其侵袭和转移能力较高是引起术后复发的主要诱因。本研究中同样观察了HSV-TK系统对胃癌细胞侵袭和转移能力的影响,发现与对照组相比,HSV-TK系统干预能够有效降低胃癌细胞的侵袭和转移能力。从细胞的增殖、迁移和转移能力均发现HSV-TK具有显著的干预效果。然而,研究发现人体细胞中的TK基因并没有杀灭肿瘤细胞的功能。因此,要想外源性TK基因在人体肿瘤的治疗中发挥作用,需要寻求一种安全、有效的载体就显得尤为重要。本实验的研究结果仅仅是体外的研究,并未进行体内胃癌的治疗,可能在体内的治疗效果上会有一定的局限性。

另外,为了进一步证实HSV-TK系统干预肿瘤细胞生长的分子机制^[11-12],本研究还观察了HSV-TK系统作用后细胞凋亡相关蛋白的改变。结果显示,HSV-TK系统能够促进促凋亡蛋白caspase3的剪切以及Bax蛋白的表达增加^[13-16],同时还能够抑制Bcl-2抗凋亡蛋白水平的表达。提示HSV-TK系统能够促进胃癌细胞的凋亡发生,这可能是HSV-TK系统抑制胃癌细胞增殖的主要机制。

参考文献

- [1] DÜHRSEN L, HARTFUSS S, HIRSCH D, et al. Preclinical analysis of human mesenchymal stem cells: tumor tropism and therapeutic efficiency of local HSV-TK suicide gene therapy in glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(58): 6049-6061.
- [2] BREET E, KIDD M, MCGREGOR N W, et al.

- Suicide ideation and attempts in obsessive-compulsive disorder[J]. *Annals of Clinical Psychiatry*, 2019, 31(3): 192-199.
- [3] HOSSAIN J A, RIECKEN K, MILETIC H, et al. Cancer suicide gene therapy with TK.007[J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2019, 1895: 11-26.
- [4] LOCKWOOD L E, SU Shaoyong, YOUSSEF N A. The role of epigenetics in depression and suicide: A platform for gene-environment interactions [J]. *Psychiatry Research*, 2015, 228(3): 235-242.
- [5] LUO Jingfeng, ZHOU Jiali, XIE Fengnan, et al. Combined treatment of cholangiocarcinoma with interventional radiofrequency hyperthermia and heat shock protein promoter-mediated HSV-TK gene therapy[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2018, 8(8): 1595-1603.
- [6] XIAO Jianyong, WANG Xiaolan, WU Yingya, et al. Synergistic effect of resveratrol and HSV-TK/GCV therapy on murine hepatoma cells[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2019, 20(2): 183-191.
- [7] WEI Dan, HOU Jiali, ZHENG Ke, et al. Suicide gene therapy against malignant gliomas by the local delivery of genetically engineered umbilical cord mesenchymal stem cells as cellular vehicles[J]. *Current Gene Therapy*, 2019, 19(5): 330-341.
- [8] LIN Mei, ZHOU Chenglin, HUANG Junxing, et al. The possible mechanisms of HSV-TK/hyperthermia combined with 131I-antiAFP McAb-GCV nanospheres to treat hepatoma[J]. *Analytical Cellular Pathology* (Amsterdam), 2018, 2018: 8941908.
- [9] JIN Yin, GAO Jun, WENG Qiaoyou, et al. Cholangiocarcinoma: molecular imaging-guided radiofrequency hyperthermia-enhanced intratumoral herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2018, 8(3): 502-513.
- [10] SUN Xiaoyi, WU Zaide, HU Junbo. Suicide gene therapy of hepatocellular carcinoma and delivery procedure and route of therapeutic gene in vivo[J]. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2002, 1(3): 373-377.
- [11] FATHI N, RASHIDI G, KHODADADI A, et al. STAT3 and apoptosis challenges in cancer[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 993-1001.
- [12] ARUMUGAM A, ABDULL R A. Apoptosis as a mechanism of the cancer chemopreventive activity of glucosinolates: a review[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2018, 19(6): 1439-1448.
- [13] TOMPKINS K D, THORBURN A. Regulation of apoptosis by autophagy to enhance cancer therapy[J]. *the Yale Journal of Biology and Medicine*, 2019, 92(4): 707-718.
- [14] LI Yingjie, LEI Yuhe, YAO Nan, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2017, 36(1): 1-40.