

# 全反式维甲酸增强 HSV-tk/GCV 系统对晶状体上皮细胞的旁观者效应

丁芝祥, 彭燕一, 张文彬, 邱梅园, 张玉明

基金项目: 中国广西科学基金项目 (No. 桂科自 0899004); 中国广西卫生厅计划基金项目 (No. Z2008261)

作者单位: (541001) 中国广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院附属医院眼科

作者简介: 丁芝祥, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 白内障的基础与临床。

通讯作者: 张玉明, 硕士, 主治医师, 研究方向: 白内障、角膜病。  
ymzhang76@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-07-23 修回日期: 2012-08-29

## All-trans retinoic acid enhances bystander effect of HSV-tk/GCV system in rabbit lens epithelial cells *in vitro*

Zhi-Xiang Ding, Yan-Yi Peng, Wen-Bin Zhang, Mei-Yuan Qiu, Yu-Ming Zhang

**Foundation items:** Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China (No. 0899004); Project of Guangxi Health Department, China (No. Z2008261)

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

**Correspondence to:** Yu-Ming Zhang. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. ymzhang76@yahoo.com.cn

Received: 2012-07-23 Accepted: 2012-08-29

### Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk)/ganciclovir (GCV) suicide gene system mediated by recombinant adeno-associated virus 2 (rAAV2) in lens epithelial cells (N/N1003A) *in vitro*.

• **METHODS:** The expression of TK gene in lens epithelial cells mediated by rAAV2/HSV-tk was detected by RT-PCR. MTT assay was used to observe the changed bystander effects of HSV-tk/GCV system in N/N1003A cells after ATRA therapy. The effects of ATRA therapy on the apoptotic rates of HSV-tk/GCV system in N/N1003A cells were investigated by flow cytometry.

• **RESULTS:** HSV-tk gene mediated by rAAV2 was transfected successfully into N/N1003A cells and expressed stably. The bystander effect of HSV-tk/GCV system on N/N1003A cells in ATRA treatment group was significantly improved when compared with control group ( $P < 0.01$ ), and the apoptotic rates of the study group

were notably increased ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** ATRA can significantly enhance the bystander effect of HSV-tk/GCV suicide gene system mediated by rAAV2 in rabbit lens epithelial cells *in vitro*.

• **KEYWORDS:** all-trans retinoic acid; lens epithelial cells; bystander effect; herpes simplex virus thymidine kinase

**Citation:** Ding ZX, Peng YY, Zhang WB, *et al.* All-trans retinoic acid enhances bystander effect of HSV-tk/GCV system in rabbit lens epithelial cells *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012; 12 (10): 1844-1846

### 摘要

**目的:** 体外观察兔晶状体上皮细胞 N/N1003A 经全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 诱导后, 2 型重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus 2, rAAV2) 介导的单纯疱疹病毒胸苷激酶 (herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-tk)/丙氧鸟苷 (ganciclovir, GCV) 自杀基因系统对细胞旁观者效应的影响。

**方法:** 应用 RT-PCR 法检测 rAAV2 介导 HSV-tk 基因转染 N/N1003A 细胞后 TK 基因的表达, MTT 法观察经 ATRA 诱导后 HSV-tk/GCV 系统对 N/N1003A 细胞旁观者效应的变化, 流式细胞术检测经 ATRA 诱导后 HSV-tk/GCV 系统对 N/N1003A 细胞凋亡的影响。

**结果:** rAAV2 介导 HSV-tk 基因成功转染 N/N1003A 细胞并稳定表达。与对照组比较, ATRA 诱导组可显著提高 HSV-tk/GCV 系统对兔晶状体上皮细胞 N/N1003A 的旁观者效应 ( $P < 0.01$ ), 且 ATRA 诱导组细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.01$ )。

**结论:** ATRA 可显著增强 rAAV2 介导的 HSV-tk/GCV 系统对体外培养兔晶状体上皮细胞的旁观者效应。

**关键词:** 全反式维甲酸; 晶状体上皮细胞; 旁观者效应; 单纯疱疹病毒胸苷激酶

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.10.07

**引用:** 丁芝祥, 彭燕一, 张文彬, 等. 全反式维甲酸增强 HSV-tk/GCV 系统对晶状体上皮细胞的旁观者效应. 国际眼科杂志 2012; 12 (10): 1844-1846

### 0 引言

随着白内障超声乳化手术和人工晶状体的发展, 后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO) 的发生率有所下降, 但仍然是白内障摘除术后影响视力恢复的主要并发症<sup>[1]</sup>。最近研究表明<sup>[2,3]</sup>, 通过自杀基因疗法抑制手术中残留在晶状体生发区囊膜的晶状体上皮细胞的增殖可能是一种防治 PCO 的有效方法。在目前基因转染效率尚不能明显提高的情况下, 通过增强自杀基因系统的旁观者

效应以提高对晶状体上皮细胞的抑制作用,对减少 PCO 的发生有重要意义。全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 可以通过诱导多种肿瘤细胞分化而提高自杀基因系统杀伤肿瘤细胞的旁观者效应。本实验探讨经 ATRA 诱导后, 2 型重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus 2, rAAV2) 介导的单纯疱疹病毒胸苷激酶 (herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-tk)/丙氧鸟苷 (ganciclovir, GCV) 自杀基因系统对兔晶状体上皮细胞旁观者效应的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

兔晶状体上皮细胞系 N/N1003A 由本院眼科实验室保存。rAAV2/HSV-tk 重组病毒颗粒 (滴度为  $10^{12}$  vg/mL), 由本课题组制备保存。DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司。二乙胺四乙酸 (EDTA)、噻唑蓝 (MTT)、二甲亚砜 (DMSO)、全反式维甲酸 (ATRA) 均购自美国 Sigma 公司。相差显微镜 (日本 Olympus 公司), 480 型 DNA 热循环仪 (美国 Perkin Elmer 公司), DYY 稳压稳流微型凝胶电泳仪 (北京六一仪器厂), 酶联免疫分析仪 (美国 AWARENESS 公司), 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 rAAV2/HSV-tk 转染 N/N1003A 细胞

取对数生长期的 N/N1003A 细胞分种于 50mL 培养瓶,  $4 \times 10^5$  个/瓶, 常规细胞培养 24h, 取两瓶计数细胞。根据本课题组的前期研究<sup>[4]</sup>, 按感染复数为  $10^6$  计算重组病毒 rAAV2/HSV-tk 体积, 加入无血清、无抗生素 DMEM 培养基稀释, 总体积为 500 $\mu$ L。将上述病毒与培养基混合液分别加入每瓶细胞中, 转染, 置 37 $^{\circ}$ C, 50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱, 每 20min 轻轻摇动培养瓶 1 次, 使病毒颗粒与细胞充分接触; 1h 后, 吸去每瓶内液体, 加入含 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 7d 后进行下述实验, 转染后的细胞命名为 N/N1003A-tk 细胞。

#### 1.2.2 RT-PCR 检测 N/N1003A-tk 细胞 TK 基因的表达

rAAV2/HSV-tk 病毒转染 N/N1003A 细胞后第 7d, 将细胞消化后离心沉淀, 按 RNeasy 超纯总 RNA 快速提取试剂盒 (湖南远泰生物技术有限公司) 说明提取总 RNA。TK 基因引物序列 (由上海宝生物工程有限公司合成): 上游: 5'-GCCAGAATTCATGGCTTCGTACCCCGGC-3', 下游: 5'-CTGCGTCGACTCAGTTAGCCTCCCCAT-3', 片段大小为 1151bp。内参  $\beta$ -actin 引物序列: 上游: 5'-AGTGCGACCTGGACATCCG-3', 下游: 5'-TGGCTCTAACAGTCCGCCTAG-3', 片段大小为 295bp。然后 RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen 公司) 逆转录 TK 基因的 cDNA, 加入 TK 引物行 PCR 扩增: 首先预变性 95 $^{\circ}$ C 5min, 然后变性 94 $^{\circ}$ C 30s, 退火 50 $^{\circ}$ C 30s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 总延伸 5min。取 10 $\mu$ L PCR 产物于 10g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 用紫外透射仪观察。

#### 1.2.3 ATRA 对细胞增殖的影响

以每孔  $5 \times 10^3$  细胞接种于 96 孔板, 培养 24h 后弃去培养液, 实验组避光分别加入含 ATRA 的 DMEM (含 100mL/L 胎牛血清), 使终浓度分别为  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  mol/L, 每个浓度 6 个复孔, 对照组加入含 100mL/L 胎牛血清 DMEM 液, 继续培养。4d 取出 96 孔板, 移除上清液, 每孔加入 20 $\mu$ L MTT 液 (5g/L), 继续孵育 4h 后每孔加入 150 $\mu$ L DMSO, 震荡 10min, 用酶联免疫分析仪在波长 570nm 检测每孔光密度 (OD) 值。按下面公式计算细胞的抑制率: 细胞生长抑制率 (%) = (对照孔 OD 值 - 实验孔 OD 值) / 对照孔 OD 值  $\times$  100%。

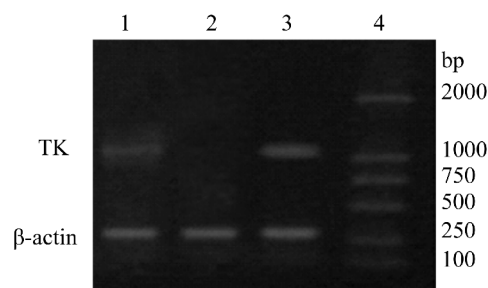


图 1 TK 基因 mRNA 在 N/N1003A-tk 细胞中的表达 1: 阳性对照组; 2: 阴性对照组; 3: N/N1003A-tk 组; 4: Marker DL-2000。

#### 1.2.4 MTT 法检测 ATRA 对 HSV-tk/GCV 系统旁观者效应的影响

分别将转染了 TK 基因的 N/N1003A-tk 细胞和未经转染的 N/N1003A 细胞离心后悬浮, 然后按不同比例 (N/N1003A-tk 细胞/N1003A 细胞分别为 0, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%) 混合后接种于 96 孔板, 每组 6 个平行孔, 24h 实验组换含终浓度  $10^{-8}$  mol/L 的 ATRA 的培养基, 对照组培养基不加 ATRA。约 80% 融合后 5 孔换含 GCV 20 $\mu$ g/mL 的培养基, 另一孔为组内对照, 继续培养 4d 后用酶联免疫分析仪在波长 570nm 测定每孔光密度值, 计算细胞抑制率。

#### 1.2.5 碘化丙啶 (PI) 荧光染色检测细胞凋亡率

分别将转染了 TK 基因的 N/N1003A-tk 细胞和未经转染的 N/N1003A 细胞按不同比例 (N/N1003A-tk 细胞/N1003A 细胞分别为 0, 10%, 20%, 40%) 混合后接种于 50mL 培养瓶, 24h 后实验组换含终浓度  $10^{-8}$  mol/L ATRA 的培养基, 对照组培养基不加 ATRA。约 80% 融合后换含 GCV 20 $\mu$ g/mL 的培养基, 继续培养, 相差显微镜观察细胞形态学变化。培养 4d 后消化离心细胞, PBS 冲洗 2 次, 用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 700mL/L 冷乙醇固定, 4 $^{\circ}$ C 保存, PI 染色后用流式细胞仪检测细胞凋亡。

统计学分析: 应用 SPSS 11.5 软件对数据进行统计分析, 多个样本均数间比较采用单因素方差分析和 SNK-q 检验, 两个样本均数比较用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TK 基因在 N/N1003A-tk 细胞中的表达

RT-PCR 方法从转染了重组病毒 rAAV2/HSV-tk 的 N/N1003A-tk 细胞中扩增出 1151bp 的特异性 TK 基因片段, 对照组不能扩增出该片段 (图 1)。

### 2.2 MTT 法检测 ATRA 对细胞增殖的影响

在  $10^{-7}$  ~  $10^{-5}$  mol/L 组, ATRA 对晶状体上皮细胞的抑制率分别为 (12.71 $\pm$ 0.39)%, (17.13 $\pm$ 0.32)%, (25.40 $\pm$ 0.39)%, 其作用随浓度增加而增强 ( $F = 6469.35$ ,  $P < 0.01$ ); 而  $10^{-8}$  mol/L 组 ATRA 对细胞的抑制率为 (2.53 $\pm$ 0.16)%, 与对照组 (2.29 $\pm$ 0.15)% 比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。因此在后续实验中使用浓度为  $10^{-8}$  mol/L 的 ATRA 来检测其对 HSV-tk/GCV 自杀基因系统旁观者效应的影响。

### 2.3 ATRA 增强 HSV-tk/GCV 系统旁观者效应的观察

在对照组 N/N1003A-tk 所占比例低于或等于 60%、实验组 N/N1003A-tk 所占比例低于或等于 80% 时, 杀伤细胞比例大于 N/N1003A-tk 细胞的比例, 即 GCV 可引起未转染 TK 基因的 N/N1003A 细胞杀死, 证明两组都存在旁观者效应。随 N/N1003A-tk 细胞比例的逐渐增加, 存活细胞百分比逐渐降低, 各比例中实验组与对照组比较差异有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ , 表 1)。

表1 ATRA联合与否对N/N1003A细胞旁观者效应的影响

( $\bar{x} \pm s, \%$ )

分组	细胞存活率						
	0	10%	20%	40%	60%	80%	100%
对照组	99.42±0.14	51.28±0.25	45.48±0.38	39.32±0.54	34.61±0.37	28.36±0.27	25.12±0.11
实验组	99.46±0.18	32.33±0.27	26.25±0.19	21.42±0.32	15.56±0.33	12.32±0.27	10.21±0.15
t	0.42	114.43	100.00	63.23	86.03	97.82	178.46
P	0.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

表2 ATRA联合HSV-tk/GCV对细胞凋亡率的影响

( $\bar{x} \pm s, \%$ )

分组	细胞凋亡率			
	0	10%	20%	40%
对照组	1.36±0.14	5.20±0.16	8.47±0.15	13.53±0.19
实验组	1.46±0.16	9.34±0.08	13.50±0.18	18.68±0.25
t	0.96	52.95	48.19	36.35
P	0.37	0.00	0.00	0.00

### 2.4 ATRA联合HSV-tk/GCV系统对细胞凋亡率的影响

20μg/mL的GCV作用于晶状体上皮细胞后相差显微镜观察,当N/N1003A-tk细胞占混合细胞百分比为0时,细胞呈多角形贴壁生长,分布均匀,可见较多核分裂相;随N/N1003A-tk细胞比例增加,实验组和对照组细胞不同程度出现变小、变圆、脱壁、漂浮,部分细胞崩解为碎片。流式细胞仪检测,随N/N1003A-tk细胞比例的逐渐增加,细胞凋亡率逐渐增加,各比例中实验组与对照组比较差异均有显著统计学意义( $P < 0.01$ ,表2)。

### 3 讨论

旁观者效应就是通过基因转移载体介导自杀基因转染靶细胞后再给予一定浓度前体药物(正常情况下对细胞无毒性)治疗,转染了自杀基因的细胞和周围未转染自杀基因的细胞(即旁观细胞)都被杀伤的一种现象,它是应用自杀基因疗法治疗某些肿瘤的关键要素之一。在目前缺乏有效的PCO预防方法的情况下,通过增强旁观者效应来提高HSV-tk/GCV系统防治PCO的有效性值得深入探讨。但旁观者效应的作用机制尚不完全明确,可能与连接蛋白(connexin, Cx)介导的缝隙连接胞间通讯、细胞凋亡、机体免疫、介质扩散等机制有关<sup>[5,6]</sup>。

ATRA是维生素A的重要活性衍生物,与某些细胞的增生、分化、凋亡等重要生命活动有着密切关系。药理剂量的ATRA可以通过抑制晶状体上皮细胞增殖而降低PCO的发生<sup>[7]</sup>,但尚未见其在PCO自杀基因治疗研究中的报道。本研究以2型重组腺相关病毒为载体,将HSV-tk基因转染至兔晶状体上皮细胞,RT-PCR证实细胞中TK基因表达。将转染有自杀基因的N/N1003A-tk细胞和正常N/N1003A细胞按不同比例混合培养,发现混合细胞经ATRA诱导再给予GCV治疗后,当N/N1003A-tk细胞占10%时即可杀伤68%的混合细胞,当比例增加至40%时杀伤了近80%的混合细胞;而对照组N/N1003A-tk细胞占80%时仍达不到实验组的杀伤效应,可见ATRA明显提高了HSV-tk/GCV自杀基因系统对旁观者细胞的杀伤作用。廖伟等<sup>[8]</sup>发现ATRA可提高肝癌细胞中连接蛋白Cx32的有效表达及在细胞膜上的正确定位,可能与其增强自杀基因系统对治疗肝癌的旁观者效应有关。已有研究证实,ATRA可以促进肿瘤细胞Cx43的表达,并以胞

膜上表达为主,从而可以建立功能性缝隙连接,恢复细胞间通讯功能<sup>[9]</sup>,因此广泛用于增强自杀基因治疗多种恶性肿瘤的旁观者效应。

Freeman等<sup>[10]</sup>研究报道,当自杀基因HSV-tk导入肿瘤细胞,再给予前体药物GCV后,观察到肿瘤细胞出现胞膜皱缩、脱壁、漂浮、染色质浓聚、胞膜出泡等典型细胞凋亡特征,因此他认为自杀基因系统的杀伤效应是因GCV的三磷酸代谢产物引起的细胞凋亡。我们在实验中通过相差显微镜也观察到N/N1003A-tk细胞与N/N1003A细胞混合后在GCV作用下发生变小、变圆、脱壁、漂浮等细胞死亡的形态学改变,与文献<sup>[11]</sup>报道的一致。通过流式细胞仪检测细胞凋亡,各比例混合细胞实验组与对照组比较有显著性差异,说明细胞经ATRA诱导后,显著提高了HSV-tk/GCV系统导致的晶状体上皮细胞凋亡。

本研究结果显示,ATRA可以增强腺相关病毒介导的HSV-tk/GCV系统杀伤晶状体上皮细胞的旁观者效应,进一步深入研究其机制对提高自杀基因系统防治PCO的疗效有重要意义。

### 参考文献

- Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated. *Arch Ophthalmol* 2009;127(4):555-562
- 丁芝祥,谭浅,刘双珍,等. 重组腺相关病毒介导的HSV-tk/GCV体系对兔晶状体上皮细胞的抑制作用. *中华眼科杂志* 2009;45(6):537-543
- Jiang YX, Lu Y, Liu TJ, et al. Using HSV-TK/GCV suicide gene therapy to inhibit lens epithelial cell proliferation for treatment of posterior capsular opacification. *Mol Vis* 2011;17:291-299
- 丁芝祥,谭浅,刘双珍,等. 重组增强型绿色荧光蛋白腺相关病毒转染兔晶状体上皮细胞的研究. *眼科新进展* 2006;26(12):889-892
- Huang Q, Liu XZ, Kang CS, et al. The anti-glioma effect of suicide gene therapy using BMSC expressing HSV/TK combined with overexpression of Cx43 in glioma cells. *Cancer Gene Ther* 2010;17(3):192-202
- Martin OA, Redon CE, Nakamura AJ, et al. Systemic DNA damage related to cancer. *Cancer Res* 2011;71(10):3437-3441
- Inan UU, Ozturk F, Kaynak S, et al. Prevention of posterior capsule opacification by retinoic acid and mitomycin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239(9):93-97
- 廖伟,李生伟,刘长安,等. 全反式维甲酸增强携单纯疱疹病毒胸苷酸激酶基因的超声微泡对SMMC-7721细胞的旁观者效应. *第三军医大学学报* 2011;33(15):1582-1585
- 陈必良,马向东,王德堂,等. 维甲酸对HeLa细胞间隙连接蛋白基因Cx43表达的调节作用. *癌症* 1999;18(6):646-648
- Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, et al. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993;53(21):5274-5283
- Bai S, Du L, Liu W, et al. Tentative novel mechanism of bystander effect in glioma gene therapy with HSV-tk/GCV system. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256(2):455-459