

进行试验,结果3种配伍比例的大黄均有较好的抑制率,且随大黄配伍比例的增加,抑制心率失常作用增强,说明大黄对附子具有很好的减毒作用;比较急性毒性和心脏毒性的附子配伍大黄的实验结果,2种试验方法所获得的大黄减毒作用具有较好的一致性。这提示大黄对附子的减毒作用可能与其心脏的保护作用有关。

附子具有抗炎和镇痛药效学作用,因此在减毒存效研究中,选择抗炎和镇痛作为药效学指标观察附子配伍大黄后的存效作用,结果表明大黄对附子的抗炎和镇痛效价无明显影响;中医角学认为,附子主要作用是回阳救逆,因此除了抗炎、镇痛之外,本研究针对回阳救逆进行了附子强心作用的研究,结果表明附子配伍大黄之后,后者对附子的强心作用无明显影响。综上所述,提示大黄对附子的毒性有明显拮抗作用,但对附子的药效却无显著的负面影响,因此附子配伍大黄减毒不减效。

附子中生物碱类成分是附子主要的毒性成分,本研究观察了附子单煎和附子与大黄合用对附子毒性成分的影响。通过对单用附子及配伍大黄水煎液中生物碱类成分的比较研究发现,配伍后水煎液中多数生物碱的含量下降,并随着大黄比例的增高而

含量递减,但新乌头碱和乌头碱的含量在配伍后却增加,而总乌头碱含量配伍后是下降的,而且随着配伍大黄的比率的增加而减少。这可能是大黄减附子毒性的部分原因之一,其机制有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 王岚,彭成. 附子与大黄配伍源流的研究[J]. 山东中医药大学学报, 2006, 30(2): 100-103.
- [2] 王均宁,张成博,鲍捷,等. 基于方剂组成统计分析的附子减毒配伍规律探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(5): 23-26.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 177-178.
- [4] 张广平,解素花,朱晓光,等. 附子甘草配伍减毒增效/存效实验研究. 中国中医药信息杂志[J]. 2012, 19(6): 31-34.
- [5] 金凯,陈中军,罗华荣. 盐酸阿霉素对大鼠心肌损伤的分子机制研究[J]. 同济大学学报(医学版), 2002, 23(3): 191-194.
- [6] 赵志国,李军云,蒋晔,等. 蜈蚣酸性蛋白对急性心力衰竭大鼠心功能的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(2): 106-109.
- [7] 刘国平,黄丽,葛敏. 绞股蓝总皂苷对阿霉素致急性心衰大鼠心功能的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(2): 106-108.
- [8] 胡玉录,张贺龙,吴明华,等. 强心益气汤对多柔比星所致急性心衰大鼠心功能的保护作用[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(6): 930-932.

(编辑:修春)

## 重组 HSV1-tkGFP/GCV 荧光蛋白示踪系统的构建及对小鼠黑色素瘤的抑制作用

曾玲<sup>1</sup>, 吴映雅<sup>1</sup>, 谭宇蕙<sup>1</sup>, 丘鹏翔<sup>3</sup>, 张广献<sup>1</sup>, 刘娟<sup>2</sup>, 陈志从<sup>1</sup>, 杜标炎<sup>2</sup> (1. 广州中医药大学生化教研室, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学病理教研室, 广东 广州 510006; 3. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

**摘要:** **目的** 建立具有绿色荧光蛋白(GFP)示踪功能的单纯疱疹病毒1型胸苷激酶基因/更昔洛韦自杀基因系统(HSV1-tkGFP/GCV),并检测该系统对小鼠黑色素瘤的抑制作用。**方法** 将阳性重组质粒 pLXSN-tkGFP 和 pLXSN-DsRed2 分别转染 B16 细胞,加 G418 进行筛选。用 GCV(5, 50, 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )杀伤实验验证 tk 基因的表达。四甲基偶氮唑盐(MTT)法和荧光示踪法验证该系统存在旁杀伤效应。将 B16-tkGFP 和 B16-RFP 细胞按 1:1 混合,接种于 C57BL/6J 小鼠进行肿瘤模型复制,随机分为模型组和 GCV(50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )组,腹腔注射给药,每 3 d 检测 1 次肿瘤大小( $n=14$ )。**结果** 成功获得能发出绿色荧光的 B16-tkGFP 细胞和能发出红色荧光的 B16-RFP 细胞,且 tk 基因在 B16-tkGFP 细胞中表达正常。该系统存在一定的旁杀伤效应。与模型组比较,GCV 组小鼠肿瘤生长受到明显抑制( $P<0.01$ )。**结论** 重组 HSV1-tkGFP/GCV 系统对小鼠黑色素瘤有明显抑制

收稿日期:2014-03-10

作者简介:曾玲,女,硕士研究生,研究方向:中西医结合肿瘤防治及分子药理学研究。Email: zeng07@yeah.net。通讯作者:杜标炎,教授,研究方向:中医药防治肿瘤研究。Email: dubiaoyan@gzucm.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072906, 30973811);广东省科技厅承担政府特定任务项目(2012B061700108)。

作用, 并可实现直观检测其旁杀伤效应, 为后续中药联合自杀基因疗法的研究奠定基础。

**关键词:** 单纯疱疹病毒胸苷激酶基因; 自杀基因系统; 旁杀伤效应; 黑色素瘤

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0546-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.007

## Construction of Recombinant HSV1-tkGFP/GCV Fluorescent Protein Monitoring System and its Inhibitory Effect on Murine Melanoma

ZENG Ling<sup>1</sup>, WU Yingya<sup>1</sup>, TAN Yuhui<sup>1</sup>, QIU Pengxiang<sup>3</sup>, ZHANG Guangxian<sup>1</sup>, LIU Juan<sup>2</sup>, CHEN Zhicong<sup>1</sup>, DU Biaoan<sup>2</sup>(1. Department of Biochemistry, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Department of Pathology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 3. School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To construct recombinant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase/ganciclovir (HSV1-tkGFP/GCV) tumor suicide gene system with green fluorescent protein (GFP) monitoring function, and to verify the inhibitory effect of this system on murine melanoma. **Methods** The positive recombinant plasmid (pLXSN-tkGFP or pLXSN-DsRed2) was transfected into B16 cells and then anti-G418 monoclonal cells were obtained after screening with G418. The presence and expression of tk gene in B16-tkGFP cells was confirmed by the killing effects of GCV (5, 50, 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The bystander effect of HSV1-tkGFP/GCV system was measured by MTT assay, fluorescence image method. A mixture of B16-tkGFP and B16-RFP cells at the ratio of 1 : 1 was inoculated subcutaneously into C57BL/6J mice for the modeling. The tumor-bearing mice were randomly divided into tumor model group and GCV (50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) treated group. GCV was administrated intraperitoneally. The tumor size was measured every three days ( $n=14$ ). **Results** B16-tkGFP monoclonal and B16-RFP monoclonal were obtained successfully. The recombinant HSV1-tkGFP/GCV system had some bystander effect. The tumor growth in the GCV treated group was significantly inhibited as compared with that in the tumor model group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The HSV1-tkGFP/GCV system shows obvious inhibition of murine melanoma, and the bystander effect could be observed directly, which would lay the foundation for further study of HSV1-tkGFP/GCV system combining with Chinese medicine.

**Keywords:** Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene (HSV1-tk); Suicide gene system; Bystander effect; Melanoma

常规化疗是治疗恶性肿瘤的标准疗法之一。就大多数化疗药物的敏感性而言, 肿瘤细胞具有高度异质性, 使化疗往往达不到预期疗效。此外, 常规化疗方法因药物没有肿瘤靶向性而只能通过加大剂量来保证到达肿瘤细胞的药物浓度, 这就会不可避免地产生外周毒性, 不少化疗药物的有效治疗浓度都在人体最大耐受限度点之上。自杀基因疗法为解决这一难题提供了一个很有前景的新途径<sup>[1-2]</sup>。单纯疱疹病毒胸苷激酶/更昔洛韦 (HSV1-tk/GCV) 自杀基因系统是最早进入临床试验的自杀基因系统, 其优点除了具有一定肿瘤靶向性、毒副作用较低之外, 还具有旁观者效应 (bystander effect, 也称旁杀伤效应) 特点, 即转染有自杀基因如 HSV1-tk 的肿瘤细胞可引起邻近无自杀基因的肿瘤细胞死亡<sup>[3-8]</sup>。这一特点在一定程度上弥补了当前肿瘤基因疗法普遍存在

的体内转染率低和杀伤效应有限等缺点, 并为寻找自杀基因疗法的增效方法提供了入手点——用药物提高旁杀伤效应<sup>[3,7]</sup>。课题组前期研究也显示了自杀基因联合中医药治疗肿瘤的协同增效作用<sup>[9-10]</sup>, 但自杀基因旁杀伤效应仍缺乏较好的、直观和量化的分析检测手段, 中药是否通过旁杀伤效应机制发挥增效作用仍不够明确。本研究尝试将带有 tk-GFP 融合蛋白基因的逆转录病毒表达载体和带有红色荧光蛋白 (RFP) 基因的逆转录病毒表达载体分别转染到小鼠黑色素瘤 B16 细胞中, 建立重组 HSV1-tkGFP/GCV 荧光蛋白示踪系统, 利用带有 TK 活性同时能发出绿色荧光的 tk<sup>+</sup> 细胞和只能发出红色荧光的 tk<sup>-</sup> 细胞构建自杀基因旁杀伤效应的直观检测模型, 为更明确和量化地进行中药联合肿瘤自杀基因疗法的研究奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 载体、细胞株和动物** pLXSN 逆转录病毒表达载体, pEGFP-N1、pDsRed2-N1、pIC19R/MC1-tk(含有 HSV1-tk 片段)载体, 美国 Clontech 公司; E.coli DH5 $\alpha$  菌株由本校生化教研室保存; 小鼠黑色素瘤 B16 细胞株, 中山大学动物中心细胞库; C57BL/6J 小鼠, 雄性, SPF 级, 体质量(20 $\pm$ 2) g, 广东省医学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(粤)2013-0002, 动物质量合格证号: 44007200006703。

**1.2 药物及试剂** G418、更昔洛韦(GCV)、四甲基偶氮唑盐(MTT), 美国 Sigma 公司; RPMI-1640、0.25% 含 EDTA 胰酶, 美国 Gibco 公司; 新生牛血清, 奥地利 PAA 公司; 高保真酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase, 日本 Takara 公司; 高纯度质粒提取试剂盒, 德国 QIAGEN 公司; Lipofectamine 2000 Reagent, 美国 Invitrogen 公司。

**1.3 仪器** V117645 型梯度 PCR 仪, 日本 Takara 公司; BNA-3210 型 CO<sub>2</sub> 培养箱, 日本 Espec 公司; IX71-F22FL/PH 型荧光倒置显微镜及图像采集系统, 日本 Olympus 公司; 680 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; HZ211-220 型电子天平, 日本岛津公司; 细胞培养板等耗材, 美国 Corning 公司。

### 1.4 方法

**1.4.1 重组质粒构建** 以 pEGFP-N1 为模板用高保真酶将 GFP 片段扩增后进行胶回收, 扩增引物: 上游 cccCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGA(含 Xho I 酶切位点), 下游 ggGGATCCCTTTACTTGTACAGCTCGT(含 BamH I 酶切位点); 以 pDsRed2-N1 为模板用高保真酶将 DsRed2 片段扩增后进行胶回收, 扩增引物: 上游 ggGAATTCATGGCCTCCTCCGAGAA(含 EcoR I 酶切位点), 下游 ggGGATCC CTACAGGAACAGG TGGTG(含 BamH I 酶切位点); 以 pIC19R/MC1-tk 为模板用高保真酶将 HSV1-tk 表达框片段扩增后进行胶回收, 扩增引物: 上游 ggGAATTCATGGCTTCGT ACCCCTG(含 EcoR I 酶切位点), 下游 gcCTCGAGGT TAGCCTCCCCATCT(含 Xho I 酶切位点); 以上 3 个 DNA 片段扩增条件均为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 保温 5 min。用 Xho I 和 BamH I 分别酶切消化逆转录病毒表达载体 pLXSN 和扩增 GFP 片段, 胶回收后用 T4 连接酶把 GFP 片段连入 pLXSN 中, 挑选阳性克隆命名为 pLXSN-GFP, 用 EcoR I 和 Xho I 分别酶切 pLXSN-GFP 和扩增 tk 片段, 胶回收后用

T4 连接酶把 tk 片段连入 pLXSN-GFP 中, 构建融合表达 tk-GFP 质粒 pLXSN-tkGFP; 用 EcoR I 和 BamH I 酶切 pLXSN 和扩增的 DsRed 2 片段, 胶回收后用 T4 连接酶把 DsRed2 片段连接到 pLXSN 中, 构建红色荧光蛋白表达质粒 pLXSN-DsRed2。构建的质粒均由 invitrogen 公司测序验证。

**1.4.2 细胞的转染和基因的表达观察** 将小鼠黑色素瘤 B16 细胞贴壁培养于含 10% 新生牛血清 RPMI-1640 培养液中, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养。将 B16 细胞用完全培养基以每孔  $1 \times 10^3$  个接种于 96 孔板中, 分 6 组, 每组 6 个复孔, 12 h 后待细胞贴壁后换含不同浓度 G418(0, 400, 500, 600, 700, 800  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 培养基, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 每天观察细胞, 选用第 7 天细胞几乎全死的最小 G418 浓度为筛选浓度(800  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。质粒 pLXSN-tkGFP 和 pLXSN-DsRed2 分别用 QIAGEN 公司 Ultra Pure QIAGEN Plasmid Midi Kit 抽提, NanoDrop2000 定量。参照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书, 将已知浓度的质粒 pLXSN-tkGFP 和 pLXSN-DsRed2 分别转染入 B16 细胞, 24 h 后换含 800  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  G418 培养基进行筛选, 观察荧光蛋白的表达情况, 连续筛选 2 周后, 放大培养能发出荧光的克隆, 流式细胞仪进一步分选纯化表达荧光蛋白的细胞, 用有限稀释法挑取表达荧光蛋白的单克隆细胞, 获取相应荧光表达的单克隆细胞株, 在含 300  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  G418 的完全培养基中进行扩增, 最终获得稳定表达荧光蛋白的单克隆重组细胞株, 分别命名为 B16-tkGFP 细胞和 B16-RFP 细胞。

**1.4.3 重组细胞株的 TK 活性检测** 将 B16-tkGFP 细胞和 B16-RFP 细胞按每孔  $5 \times 10^3$  个细胞分别接种于 96 孔板中, 培养过夜, 换含终浓度分别为 0, 5, 50, 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 GCV 培养液, 每个浓度设 4 个复孔, GCV 作用 72 h 后镜下观察细胞的变化, 用 MTT 法检测各组细胞的吸光度, 按公式存活率(%)=(T/D)  $\times$  100%(T: 测定孔细胞的吸光度; D: 对照孔细胞的吸光度) 计算各组细胞存活率, 比较 B16-tkGFP 细胞和 B16-RFP 细胞对 GCV 的敏感性。随后用 MTT 法进行 GCV 对 B16-tkGFP 的浓度效应检测: 将 B16-tkGFP 细胞按每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板, 每组设 3 个复孔, 每孔分别加入终浓度为 0, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 GCV 培养液 200  $\mu\text{L}$ 。GCV 作用 72 h 后镜下观察细胞的变化, 用 MTT 法检测各组细胞的吸光度, 按公式抑制率(%)=(1-T/D)

$\times 100\%$  (T: 测定孔细胞的吸光度; D: 对照孔细胞的吸光度) 计算各组细胞的抑制率。用 Calcsyn2.0 软件计算半数抑制量 (IC<sub>50</sub>)。

**1.4.4 tk/GCV 系统对不同比例 tk<sup>+</sup>/tk<sup>-</sup> 混合细胞的杀伤效应检测** 按 B16-tkGFP 细胞 (tk<sup>+</sup> 细胞) 占总细胞的 0%、20%、40%、60% 和 100% 混合 B16-tkGFP 和 B16-RFP 细胞 (tk<sup>-</sup> 细胞), 按每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种 96 孔板, 每组设 6 个复孔, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养过夜, 加药组均加  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (终浓度) 的 GCV; 另设不加 GCV 的各比例混合细胞的空白对照组。GCV 作用 72 h 后 MTT 法检测各组细胞的抑制率。

**1.4.5 对 tk/GCV 系统旁杀伤效应的荧光示踪观察** 按 tk<sup>+</sup> 细胞占总细胞的 0%、40%、60% 和 100% 混合 B16-tkGFP 和 B16-RFP 细胞, 按每孔  $2 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养过夜, 加药孔均换含  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (终浓度) GCV 的培养液; 另设不加 GCV 的各比例 tk<sup>+</sup> 混合细胞的对照孔。作用 72 h 后于荧光显微镜下观察细胞状态并分别在白光和相应激发光下拍同一视野的照片。应用图片分析软件 Image-Pro Plus 处理分析合成图片。

**1.4.6 动物移植瘤实验检测 GCV 治疗效应** 实验前 15 d 将 B16-tkGFP 和 B16-RFP 细胞分别接种于 C57BL/6J 小鼠使之活化。当肿瘤长至直径约 1.5 cm 时分别取出肿瘤, 剪碎后用 400 目滤网过滤, 加无血清培养基  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1} \times 5 \text{ min}$  离心洗 3 次, 加胰酶 37 °C 消化 3 min, 加完全培养基终止消化并吹打至单细胞悬液, 计数后将活化后的 B16-tkGFP 和 B16-RFP 细胞按 1:1 比例混合后制备成  $5 \times 10^6/\text{mL}$  的细胞悬液, 再按每只 0.1 mL 的量接种于 C57BL/6J 小鼠右腋皮下。待出瘤后将其随机分为模型组和 GCV ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 组, 每组 14 只, 次日测量肿瘤大小和称质量, GCV 组小鼠每天每只腹腔注射更昔洛韦钠 0.2 mL ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 连续给药 13 d; 模型组小鼠每天每只相应腹腔注射生理盐水 0.2 mL。在 GCV 处理期间, 每 3 d 称 1 次体质量, 在出瘤后每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤的长径 A (mm) 和短径 B (mm), 肿瘤体积大小按公式<sup>[11]</sup>: 体积 (V) =  $A \times B^2/2$  计算, 单位是 mm<sup>3</sup>。根据测量的肿瘤体积大小绘制肿瘤生长体积曲线图。在治疗实验结束后, 颈椎脱臼法处死小鼠, 取出肿瘤称其质量。按公式<sup>[12]</sup>抑瘤率 (%) = (模型组肿瘤质量 - GCV 组肿瘤质量) / 模型组肿瘤质量  $\times 100\%$  计算抑瘤率。

**1.5 统计学处理方法** 用 SPSS17.0 统计软件分析,

计量资料以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用两独立样本均数的 *t* 检验。

**2 结果**

**2.1 重组质粒的构建** 重组质粒 pLXSN-tkGFP 与 pLXSN-DsRed2 测序分析结果与原始载体 (pEGFP-N1, pDsRed2-N1, pIC19R/MC1-tk) 序列比对, 相应序列完全一致。

**2.2 细胞转染和基因表达观察** 将重组质粒 pLXSN-tkGFP 转染到 B16 细胞中, 24 h 后于荧光倒置显微镜下观察, 发现约 30% 的细胞能被激发出绿色荧光, 细胞荧光分布于细胞核。pLXSN-DsRed2 转染到 B16 细胞中, 48 h 后于荧光倒置显微镜下观察, 发现约 40% 的细胞能被激发出红色荧光, 荧光分布于细胞浆, 见图 1。

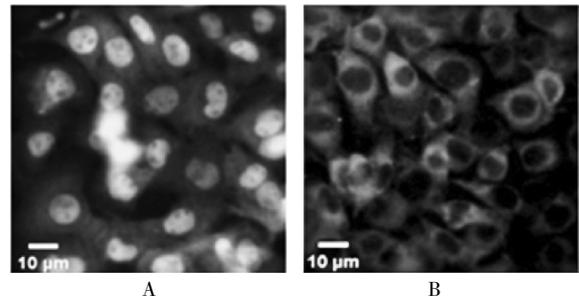


图 1 绿色荧光的 B16-tkGFP 细胞 (A. 荧光分布于细胞核) 和红色荧光的 B16-RFP (B. 荧光分布于细胞浆)

Figure 1 B16-tkGFP cells with green fluorescence in the cell nucleus and B16-RFP cells with red fluorescence in the cytoplasm

**2.3 GCV 细胞毒性试验验证重组细胞株的 TK 活性** 对 B16-tkGFP 细胞和 B16-RFP 细胞进行不同浓度 GCV ( $5, 50, 500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 细胞毒试验结果显示, B16-tkGFP 细胞组对 GCV 敏感性高于 B16-RFP 细胞组, 见图 2。

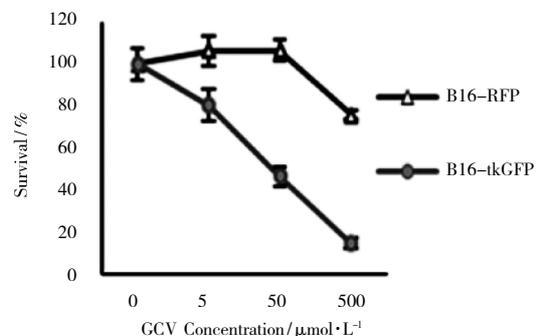


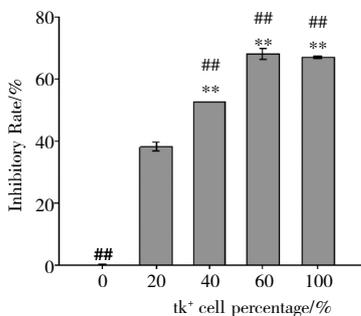
图 2 重组细胞对 GCV 的敏感性比较 (72 h)

Figure 2 Comparison of recombinant cells' sensitivity to GCV (72 h)

B16-tkGFP 细胞密度随 GCV 浓度增大和作用时

间延长而逐步减小, GCV40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 48 h 和 GCV20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  以上作用 72 h 的各复孔均见细胞生长受到抑制, 细胞膨大变圆, 胞膜皱缩, 部分细胞脱落悬浮, 并有大量细胞碎片产生。72 h 测算得 GCV5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  各组的细胞抑制率 (%) 分别为  $(19.9 \pm 3.5)$ ,  $(26.3 \pm 1.1)$ ,  $(46.7 \pm 2.0)$ ,  $(64.2 \pm 2.0)$ , 与对照组  $(0 \pm 4.9)$  比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。GCV 对 B16-tkGFP 细胞作用 72 h 的  $\text{IC}_{50}$  为  $(24.3 \pm 3.9)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而 GCV 作用于 B16-RFP 细胞时各浓度组细胞生长良好, 与对照组比较细胞密度和存活率无显著差异。

**2.4 不同比例 B16-tkGFP 混合对 HSV1-tkGFP/GCV 系统杀伤效应的影响** 含 0, 20%, 40%, 60% 和 100% B16-tkGFP (tk<sup>+</sup>细胞) 的混合细胞在 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GCV 作用下抑制率分别为  $(0.06 \pm 0.41)\%$ 、 $(38.08 \pm 1.33)\%$ 、 $(52.61 \pm 0.08)\%$ 、 $(67.85 \pm 1.76)\%$  和  $(66.94 \pm 0.38)\%$ , 见图 3。GCV 只有在有 tk 基因存在的细胞里才起到毒性作用, 若不存在旁杀伤效应, 则含 20%, 40%, 60% B16-tkGFP(tk<sup>+</sup>细胞)混合细胞组中的理论抑制率应该依次低于 20%, 40%, 60%, 但 MTT 测得其抑制率均显著高于相应的理论抑制率, 由此推测可能存在旁杀伤效应。

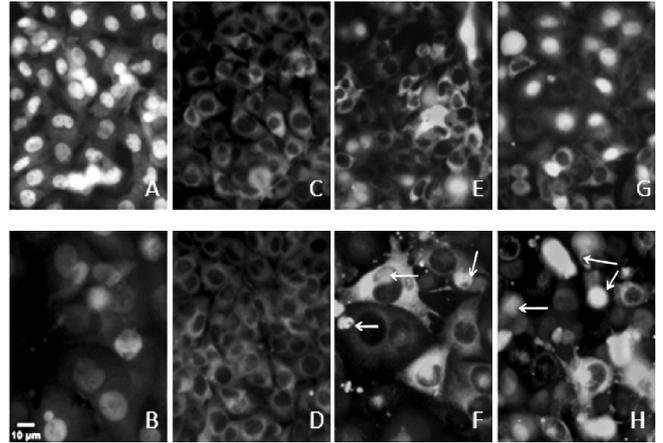


注: 与 0 tk<sup>+</sup>加 GCV 组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与空白对照组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 3 GCV 对不同比例 tk<sup>+</sup>细胞的作用(72 h)

Figure 3 Effect of GCV on co-cultured tk<sup>+</sup> cells at different ratios(72 h)

**2.5 荧光显微镜下对 tk/GCV 系统旁杀伤效应的荧光示踪观察** 荧光显微镜下 ( $\times 400$ ) 观察, 可见在 GCV 作用下, 对 100% B16-RFP 细胞基本没有杀伤效应, 而在含 40% B16-tkGFP 细胞和含 60% B16-tkGFP 细胞的 GCV 组中, 除了能发出绿色荧光的 B16-tkGFP (tk<sup>+</sup>) 细胞被杀伤以外, 一些能发出红色荧光的 B16-RFP (tk<sup>-</sup>) 细胞也同样出现细胞膨大、变圆和死亡的现象, 还可见一些凋亡小体, 说明可能是由于存在旁杀伤效应, 使得一些 tk<sup>-</sup> 细胞也被杀死, 见图 4。



注: A. 100% B16-tkGFP Control; B. 100% B16-tkGFP GCV40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; C. 100% B16-RFP Control; D. 100% B16-RFP GCV40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; E. 40% B16-tkGFP Control; F. 40% B16-tkGFP GCV40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; G. 60% B16-tkGFP Control; H. 60% B16-tkGFP GCV40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。图中箭头所指为凋亡的 tk 阴性细胞 B16-RFP。

图 4 GCV 对含不同比例的 B16-tkGFP 和 B16-RFP 混合细胞的杀伤作用(72 h)

Figure 4 Killing effect of GCV on different ratios of co-cultured B16-tkGFP and B16-RFP cells(72 h)

**2.6 动物移植瘤实验检测 GCV 治疗效应** 模型组和 GCV 组在接种后第 8 天均能触及皮下肿瘤, 随着肿瘤的增大, 小鼠逐渐表现为形体消瘦, 被毛无光泽且易脱落; GCV 治疗组小鼠体型状态则明显好些, 在治疗后 4 d 左右肿瘤体积相对模型组开始有所减小, 且随着治疗进行, 两组间差异逐渐增大, 治疗组肿瘤呈现生长抑制状态, 到接种后第 15, 18, 21 天, 模型组的肿瘤体积分别为  $(132.49 \pm 73.06)$ ,  $(304.82 \pm 134.11)$ ,  $(1032.89 \pm 350.70)\text{mm}^3$ , 而 GCV 组对应肿瘤体积分别为  $(96.81 \pm 63.82)\text{mm}^3$ ,  $(134.54 \pm 95.68)\text{mm}^3$ ,  $(224.26 \pm 144.88)\text{mm}^3$ , 与模型组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 5。到接种后第 22 天解剖取出肿瘤称重结果为: 模型组肿瘤质量为  $(2.32 \pm 0.71)\text{g}$ , GCV 治疗组为  $(0.59 \pm 0.29)\text{g}$ , 与模型组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 抑瘤率为 74.40%。

3 讨论

黑色素瘤, 作为恶性程度最高的皮肤肿瘤, 目前主要以手术、化疗和放疗等常规方法进行治疗, 均未获得满意的疗效。自杀基因疗法是一种具有临床应用前景的新策略, 为解决这一难题带来了曙光<sup>[1-5]</sup>。目前研究的多数自杀基因是通过编码病毒或细菌的酶来介导药物的敏感性, 这些酶能把无毒性的药物

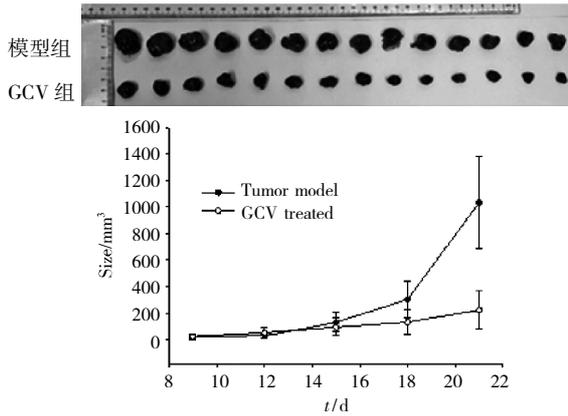


图 5 肿瘤生长曲线  
Figure 5 Growth curves of tumor

转化为其毒性代谢产物，从而将细胞杀死。自杀基因疗法因其具有局部靶向性，避免了常规化疗对机体的全身性毒副作用，因此具有良好的应用前景。目前最常用的自杀基因是单纯性疱疹病毒 1 型胸苷激酶(HSV1-tk)基因。根据《基因药物杂志》(Journal of Gene Medicine) 数据，截至 2014 年 1 月，世界上已获批准的基因治疗临床试验研究项目中有 152 个有关癌症的自杀基因疗法，其中 9 个进入 III 期临床试验的自杀基因疗法中有 8 个均采用了 HSV1-tk 基因。HSV1-tk 基因在肿瘤细胞内表达胸苷激酶，可催化低毒的核苷类似物，如更昔洛韦、丙氧鸟苷、GCV 等形成单磷酸化产物，并在细胞内磷酸激酶作用下形成三磷酸产物，干扰细胞分裂时 DNA 合成，从而导致细胞死亡，该法因存在旁杀伤效应而备受关注。

绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)最早是从水母中发现的荧光分子，后经人工突变后，只在 488 nm 和 509 nm 处有单一的激发峰和发射峰，被称为增强型 GFP，能在各种细胞中表达荧光蛋白并能发出荧光，荧光性质稳定，对细胞无毒害作用，不影响细胞的正常生长和功能。GFP 还能与多种不同蛋白质的 N 端或 C 端融合表达而不影响各自的特征，融合蛋白同时具有 GFP 的荧光特性和被结合蛋白的功能，融合蛋白在细胞内仍能行使正常功能，而且融合蛋白保持了与 GFP 相似的荧光特性，故还适合做生物活体成像研究<sup>[13]</sup>。DsRed2 是红色荧光蛋白(red fluorescence protein, RFP)分子的一个突变体，最早是从珊瑚虫中克隆出来，后经改造成具有低毒、低寡聚化和成熟快的特点，其生物学特征与 GFP 类似。RFP 激发波长在 563 nm，发射的波长较长，在 582 nm 处，灵敏度与信噪比均比 GFP 高，为基于

GFP 的体内外研究提供了很好的互补工具<sup>[11, 13-14]</sup>。

本研究将 HSV1-tk 基因与 GFP 基因相连所获得的 tk-GFP 融合基因片段，经逆转录病毒表达载体(pLXSN)介导转染到小鼠黑色素瘤 B16 细胞中，获得能发出绿色荧光的 B16-tkGFP 细胞，用于建立重组具有荧光示踪功能的 HSV1-tkGFP/GCV 自杀基因系统，可在观测自杀基因系统的自杀伤和旁杀伤效应时用于显示 tk 阳性(tk<sup>+</sup>)细胞；将 RFP 基因通过逆转录病毒表达载体 pLXSN-DsRed2 转染到 B16 细胞中，获得了能发出红色荧光的 B16-RFP 细胞，可在观测自杀基因系统的旁杀伤效应时用于显示 tk 阴性(tk<sup>-</sup>)细胞。由此，能发出绿色荧光细胞的死亡率反映 TK 的自杀伤效应大小，能发出红色荧光细胞的死亡率反映 TK 的旁杀伤效应大小。应用 GFP 和 RFP 检测细胞的生长变化情况并使之可视化，便于监测转染效率和后续观测该自杀基因系统的旁杀伤效应。

本研究初步探讨了 HSV1-tkGFP/GCV 自杀基因系统对小鼠黑色素瘤治疗的可行性。GCV 对 B16-tkGFP 细胞和 B16-RFP 细胞的杀伤效应结果显示，B16-tkGFP 细胞对 GCV 的敏感性远高于 B16-RFP 细胞，且差异具有显著性，说明 tk-GFP 融合基因表达产物具有 TK 活性。

从 tk/GCV 系统对不同比例 tk<sup>+</sup>/tk<sup>-</sup> 混合细胞的杀伤效应的 MTT 检测结果显示，含 20 % 和 40 % B16-tkGFP 的混合细胞经低浓度 GCV 处理 72 h 后，细胞生长抑制率分别能达到 38 % 和 53 %，这种现象可能是由于旁杀伤效应增强了 HSV1-tkGFP/GCV 自杀基因系统对肿瘤的杀伤效应。进一步实验，从对 HSV1-tkGFP/GCV 系统旁杀伤效应的荧光示踪观察结果来看，在药物作用浓度下 GCV 对 100 % B16-RFP 细胞(tk<sup>-</sup>)无明显杀伤效应，而在含 40 % B16-tkGFP 的 GCV 组中，除了能发出绿色荧光的 B16-tkGFP 细胞(tk<sup>+</sup>)以外，一些邻近的能发出红色荧光的 B16-RFP(tk<sup>-</sup>)细胞也同样出现胞膜皱缩、核固缩等凋亡现象，结果直观地证实了 HSV1-tkGFP/GCV 自杀基因系统在治疗小鼠黑色素瘤中存在旁杀伤效应特点。

为检测重组 HSV1-tkGFP/GCV 系统的治疗效应所进行的动物移植瘤实验结果均显示：接种 50 % 比例 B16-tkGFP 细胞的致瘤小鼠经低浓度 GCV 治疗 13 d 后，肿瘤体积数据与肿瘤质量数据均显著低于模型组，其抑瘤率大于 70 %。可见该系统在动物体内同样具有显著的抑瘤效果。

HSV1-tk/GCV 自杀基因系统是 (下转第 631 页)

## 芍苓汤对豚鼠心得安模型及 HaCaT 细胞炎症因子 IL-6、IL-17A 和 IL-22 mRNA 表达的影响

余靖宏<sup>1</sup>, 赵瑞芝<sup>2</sup>, 卢传坚<sup>2</sup>(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120)

**摘要:** 目的 研究芍苓汤对心得安豚鼠模型的影响及对脂多糖(LPS)诱导人永久分化表皮角质细胞(HaCaT 细胞)产生炎症因子 IL-6、IL-17A 和 IL-22 mRNA 表达的调控作用。方法 以 Baker 评分法观测芍苓汤对豚鼠心得安模型的作用, 实时荧光定量 PCR (RT-Q-PCR) 检测芍苓汤对 LPS 诱导 HaCaT 细胞 IL-6、IL-17 和 IL-22 mRNA 表达水平。结果 芍苓汤能够显著改善心得安诱发豚鼠的银屑病样病变, 并显著下调 LPS 诱导的 IL-6 mRNA 表达。结论 芍苓汤具有治疗银屑病的药效, 其作用机制与下调 IL-6 mRNA 表达水平有关。

**关键词:** 银屑病; 芍苓汤; 心得安豚鼠模型; HaCaT 细胞; 炎症因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)05-0552-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.008

### Effect of *Shaoling* Decoction on Propranolol-induced Psoriasis-like Model of Guinea Pigs and mRNA Expression of IL-6, IL-17A and IL-22 in HaCaT Keratinocyte Cell Line Stimulated by Lipopolysaccharide

YU Jinghong<sup>1</sup>, ZHAO Ruizhi<sup>2</sup>, LU Chuanjian<sup>2</sup>(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of *Shaoling* Decoction (SLD) on guinea pigs propranolol-induced psoriasis-like model and to investigate its regulatory effect on mRNA expression of IL-6, IL-17A and IL-22 in HaCaT keratinocyte cell line stimulated by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Baker scoring method was used for the evaluation of *Shaoling* Decoction on the guinea pigs propranolol-induced psoriasis-like model, and real time fluorescence quantitative PCR (RT-Q-PCR) was applied for the detection of mRNA expression of IL-6, IL-17A and IL-22 in HaCaT line stimulated by LPS. **Results** *Shaoling* Decoction had an obvious effect on ameliorating the psoriasis-like pathological changes in guinea pigs, and on down-regulating IL-6 mRNA expression in LPS-activated HaCaT cell line. **Conclusion** *Shaoling* Decoction has certain therapeutic effect for psoriasis, and its mechanism may be related with down-regulation of IL-6 mRNA expression.

**Keywords:** Psoriasis; *Shaoling* Decoction; Propranolol-induced model of guinea pigs; HaCaT cell line; Inflammatory factors

银屑病是一种慢性免疫性疾病, 以表皮过度增殖, 炎症浸润和真皮血管增生为主要病理特征。研究<sup>[1]</sup>发现银屑病患者的血清和皮损中细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、

IL-6、IL-8、IL-17、IL-22 等表达显著增高, 并且与皮损面积和严重性指娄(PASI)指标呈正相关, 很可能是银屑病发病、持续以及复发的重要诱因。

收稿日期: 2013-12-19

作者简介: 余靖宏, 女, 博士研究生, 研究方向: 中药复方物质基础。Email: yiyihannan19@163.com。通讯作者: 赵瑞芝, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药制剂。Email: 13610241754@163.com; 卢传坚, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医外科。Email: luchuanjian888@vip.sina.com。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(10251040701000001); 广东省科技厅项目(2010A03010008, 2011B032200009, 2011A08030004); 广州市科技局项目(2010J-E031)。