

个条目“懒言”、“乏力”、“气短”代表了气虚症状;“面色■白”、“眠差”、“便溏”在公因子 4 中载荷较大,反映了其他一般情况。所以量表包括 4 个维度:肾虚、脾虚、气虚和其他一般情况。这与课题设计时的预想大体一致。

为了更深入探讨量表因子结构,我们计算了量表的内容效度,既是对临床应用的分析,也是因子分析的验证。如表 5 所示,每个条目与所在的维度总分的相关都有统计学意义( $P < 0.05$ ),每个条目得分和其所在维度得分的相关系数均在 0.6 以上,说明因子分析比较成功,没有需要剔出的条目。计算每个维度得分情况,代表气虚的公因子 3 得分最高,其次是肾虚和脾虚因子,最低的是其他一般情况因子。结合临床情况,公因子 3 中“懒言”、“乏力”、“气短”3 个症状广泛存在于各类气虚证中,因此,不论肾气虚还是脾气虚都有可能出现。可以说,公因子 3 是公因子 1 和公因子 2 的共同表现,这大概是公因子 3 得分最高的原因。而作为其他一般情况的公因子 4 与生活习惯、遗传因素关系较大,个体差异比较明显,并不是每位病人都会出现,所以得分偏低。从标准差来看,公因子 3 最小,说明气虚表现的集中趋势最大,这也与气

虚症状的广泛存在有关。研究发现,脾肾气虚证并非脾气虚与肾气虚证的单纯叠加,其中既有各自独立的特征性的症状,表现为公因子 1 和 2;也有二者可以同时存在的症状,如公因子 3;另外,尚有些个体差异比较大的症状,表现为公因子 4。因此,在临床辨证中应用此量表可以避免一些经验并不丰富的医师将脾肾气虚证简单地分解为脾气虚和肾气虚,从而达到指导临床的作用。

#### 参考文献

- 1 陈国林,胡随瑜,陈泽奇,等. 中医肝脏辨证标准规范化研究—肝阳上亢证辨证标准. 中国中医基础医学杂志,2001,12(7):13-16
- 2 方积乾. 医学统计学与电脑实验. 上海:上海科学技术出版社,2001:239
- 3 孙伟,邹燕勤. 健脾益肾补气治疗慢性原发性肾小球疾病脾肾气虚证 102 例. 南京中医学院学报,1989,3:18-20
- 4 郭志刚. 社会统计分析方法—SPSS 软件应用. 北京:中国人民大学出版社,1999:87-111
- 5 Daniel W. Russell. In Search of Underlying Dimensions: The Use (and Abuse) of Factor Analysis in Personality and Social Psychology Bulletin. Personality and Social Psychology Bulletin, 2002, 28 (12): 1629-1646
- 6 张文彤,董伟. SPSS 统计分析高级教程. 北京:高等教育出版社,2004:218-229

(收稿:2009-12-24)

## 厌氧菌介导的 CD/5-FC 系统对鼠黑色素瘤的杀伤效应

郭志英 任启伟 巴再华 刘晓岚 易 成 王树人

**摘 要** **目的** 构建婴儿双歧杆菌介导的 CD/5-FC 肿瘤基因治疗系统,探讨该系统对小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 的体外杀伤效应。**方法** 构建重组质粒 pGEX-CD,以电穿孔法转化婴儿双歧杆菌,筛选阳性克隆菌,然后加入 5-FC 厌氧培养,24h 后取其上清,作用于小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞,采用 MTT 法检测细胞存活率,并观察细胞形态学改变。**结果** 成功构建出婴儿双歧杆菌介导的 CD/5-FC 肿瘤基因治疗系统。与对照组和 pGEX 组相比,CD 组的肿瘤细胞发生了明显的形态学改变,细胞存活率明显降低。**结论** 婴儿双歧杆菌介导的 CD/5-FC 系统对小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞具有明显的体外杀伤效应。

**关键词** 婴儿双歧杆菌 胞嘧啶脱氨酶(CD) 肿瘤基因治疗 靶向性

**The Killing Effect of CD/5-FC System Delivered by Anaerobic Bacteria on Melanoma Cell of Mice.** Guo Zhiying, Ren Qiwei, Ba Zaihua, Liu Xiaolan, Yi Cheng, Wang Shuren. Department of Pathology and Pathophysiology, Basic Science College of Jining Medical University, Shangdong 272013, China

**Abstract Objective** To construct CD/5-FC tumor gene therapy system delivered by bifidobacterium infantis, and to investigate

基金项目:山东省济宁市科技局重点计划项目

作者单位:272013 济宁医学院基础学院病理与病理生理学教研室(郭志英、任启伟、巴再华、刘晓岚);四川大学华西医院腹部肿瘤科(易成);四川大学华西基础医学与法医学院病理生理学教研室(王树人)

the killing effect on melanoma B16 - F10 cell of mice. **Methods** Recombined plasmid pGEX - CD was constructed and transferred into bifidobacterium infants by electroporation. Positive recombined bacteria was selected and identified, and then was incubated with 5 - FC in anaerobic condition. The supernatant of bacteria was collected and added to the melanoma B16 - F10 cells. The cell growth status was evaluated by MTT assay, and the morphologic changes of cells were observed. **Results** The CD/5 - FC tumor gene therapy system delivered by bifidobacterium infantis has been constructed successfully. The survival rate of cells was significantly lower in CD group than those in control group and in pGEX group, and tumor cells of CD group were remarkably damaged morphologically. **Conclusion** The CD/5 - FC system delivered by bifidobacterium infantis has the significant killing effect on melanoma B16 - F10 cell of mice in vitro.

**Key words** Bifidobacterium infantis; Cytosine deaminase (CD); Tumor gene therapy; Targeting

胞嘧啶脱氨酶/5 - 氟胞嘧啶 (cytosine deaminase/fluorocytosine, CD/5 - FC) 系统是肿瘤基因治疗的研究热点。以往多采用腺病毒或反转录病毒作载体, 由于基因转染效率低、安全性差, 故不能广泛应用于临床。本文用婴儿双歧杆菌作基因转载体, 根据实体瘤内低氧代谢特点及厌氧菌趋低氧环境的特性, 婴儿双歧杆菌可靶向定植于实体肿瘤局部, 并在局部表达其携带的外源基因 CD, 后者能将抗癌前药 5 - FC 转变为毒性代谢产物 5 - FU (5 - fluorouracil), 进而杀死肿瘤细胞 (图 1)。本研究在构建婴儿双歧杆菌介导的 CD/5 - FC 系统基础上, 进一步检测并探讨其对小鼠黑色素瘤 B16 - F10 细胞的体外杀伤效应。

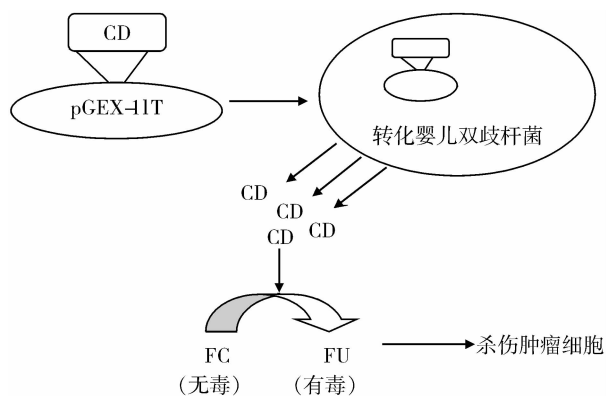


图 1 厌氧菌介导的自杀基因疗法对肿瘤细胞的杀伤示意图

## 材料与方法

1. 材料: B16 - F10 鼠黑色素瘤细胞株 (武汉大学中国典型培养物保藏中心), 婴儿双歧杆菌 2001 (卫生部华西口腔生物医学工程重点实验室微型厌氧培养系统研究基地提供), 反转录 PCR 试剂盒 (Invitrogen 公司), 5 - FC (Sigma 公司, 0.9% 生理盐水溶解), 重组质粒 pGEX - CD、200bpDNA Marker (本实验室保存)。

2. 方法: 重组质粒 pGEX - CD 转染婴儿双歧杆菌及鉴定: ①重组质粒 pGEX - CD 的构建: 前期已完成<sup>[1]</sup>; ②转染: 婴儿双歧杆菌于 37℃ 厌氧培养。电穿孔法将重组质粒 pGEX - CD 瞬时转染至婴儿双歧杆菌, 然后将菌液涂布于 MRS 固体培养

基 (含 5% 氨苄青霉素), 继续厌氧培养, 72h 后, 挑选阳性克隆菌进行鉴定; ③鉴定: 挑选阳性克隆菌, 提取细菌的总 DNA 及总 RNA, 分别进行 CD 基因的 PCR 扩增和 RT - PCR 扩增 (具体操作按试剂盒说明书进行), 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。CD 基因引物序列为: 上游引物: 5' - ATGGATCCGGAG - GCTAACAATG - 3', 下游引物: 5' - GGGGAATCTCTGAAC - CCACTCGT - 3'。

3. 阳性转化菌联合: 5 - FC 对鼠黑色素瘤 B16 - F10 细胞的杀伤效应检测: ①细菌培养及菌液处理: 阳性转化菌中加入 5 - FC (终浓度为 1mmol/L), 37℃ 厌氧培养, 24h 后离心收集菌液上清。然后加入醋酸乙酯, 离心吸取上清, 真空干燥后用生理盐水溶解, 由此获得细菌处理液; ②MTT 法测定细胞存活率: 以  $2 \times 10^4$  /孔将 B16 - F10 细胞接种于 96 孔培养板, 然后往每孔内加入细菌处理液。实验分 3 组: Control 组 (即空白对照组)、pGEX 组 (即 pGEX 空质粒转化菌处理组) 及 CD 组 (即 pGEX - CD 重组质粒转化菌处理组), 每组均设 3 个复孔。48 h 后观察各组细胞形态学改变, 并采用 MTT 比色法检测细胞存活率, 酶标仪于 490nm 波长处测定各孔吸光度 (A) 值。计算方法为: 细胞存活率 (%) =  $A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

4. 统计学处理: 应用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计学处理。所有计量资料均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 结 果

1. CD 基因的 PCR 及 RT - PCR 检测: PCR 及 RT - PCR 扩增产物进行凝胶电泳, 结果在相应泳道上分别出现一大约 1.3kb 的特异性片段, 与 CD 基因片段大小一致。PCR 及 RT - PCR 结果证实外源性 CD 基因片段已整合至婴儿双歧杆菌细菌基因组中, 并能在 mRNA 水平上表达 (图 2)。

2. B16 - F10 肿瘤细胞形态学变化: B16 - F10 细胞加入细菌处理液继续培养 48h 后, 各组细胞形态学变化有明显不同 (第 127 页彩图 7)。CD 组的肿瘤细胞大部分死亡, 仅有少数细胞贴壁生长, 培养液中可见大量细胞碎屑, 残存的细胞形态发生明显变化, 原有的贴壁生长形态消失, 胞核固缩, 折光性下降, 表现出明显的细胞损伤改变, 而对照组和 pGEX 组的肿瘤细胞形态变化均不明显。

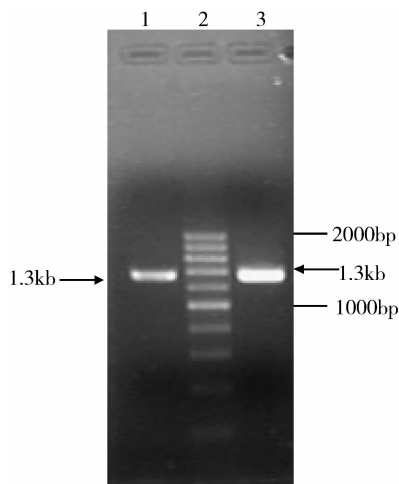


图 2 PCR 及 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

1. PCR 产物; 2. 200bp DNA Ladder Marker; 3. RT-PCR 产物

3. MTT 法检测细胞存活率: 菌液中加入 5-FC 共培养, 阳性转化菌所表达的 CD 即可将 5-FC 转变为 5-FU, 然后杀伤 B16-F10 肿瘤细胞。细胞存活率结果显示, CD 组的细胞存活率为  $(47.60 \pm 1.27)\%$ , 明显低于对照组  $(98.25 \pm 0.53)\%$  和 pGEX 组  $(93.57 \pm 2.38)\%$ , 差异有显著统计学意义 ( $P = 0.000$ )。而对照组与 pGEX 组无统计学差异 ( $P = 0.098$ )。细胞存活率结果进一步表明, CD 基因在婴儿双歧杆菌中成功表达, 并能够将 5-FC 转化为 5-FU, 抑制肿瘤细胞生长。

## 讨 论

肿瘤自杀基因治疗是将“自杀”基因 (suicide gene) 导入肿瘤细胞, 表达的基因产物能把无毒的抗癌前药 (prodrug) 转化成抗癌药物, 进而杀伤肿瘤细胞<sup>[2]</sup>。近年来胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶 (cytosine deaminase/5-fluorocytosine, CD/5-FC) 系统是肿瘤自杀基因治疗的研究热点。人类及其他哺乳动物体内不含有 CD 基因, 研究所用的 CD 基因主要来源于大肠杆菌, 其表达产物约为 48kDa。5-FC 是一种抗真菌药物, 本身并不具有抗癌作用, 但在胞嘧啶脱氨酶的催化作用下可脱去氨基转化成 5-FU。5-FU 是临床上常用的抗代谢类抗肿瘤药物, 在体内可被嘧啶代谢酶系统转化为毒性代谢产物 5-氟脱氧单磷酸尿嘧啶 (5-FdUMP)、5-氟脱氧三磷酸尿嘧啶 (5-FdUTP) 和 5-氟三磷酸尿嘧啶 (5-FUTP), 进而干扰或阻断细胞的核酸代谢, 造成细胞死亡<sup>[3,4]</sup>。传统自杀基因治疗多采用腺病毒或反转录病毒作载体, 进而转化肿瘤细胞。研究表明此疗法存在以下缺点: ①转化效率低, 即使存在“旁观者效应”, 抗癌效果也很局

限; ②腺病毒和反转录病毒作载体, 安全性难以保证; ③全身途径给药不可避免会引起正常组织细胞被转化, 毒性不良反应较大<sup>[5]</sup>。鉴于以上几点, 人们迫切需要探索一种新的更加安全可靠的载体系统用于肿瘤基因治疗。

人类大多数肿瘤属于实体瘤, 且瘤体内部通常存 有低氧代谢区<sup>[6]</sup>。根据这一特点, 当全身静脉注射厌氧菌后, 厌氧菌趋低氧环境的特性可使其靶向定植于实体肿瘤局部, 并由孢子状态迅速活化, 进而大量增生。本研究构建携带 CD 基因的重组婴儿双歧杆菌, 静脉注射后细菌可迅速定植于实体瘤局部, 表达外源基因酶活性, 并将全身途径给予的抗癌前药 5-FC 转化为抗癌药 5-FU, 专性杀伤肿瘤细胞。与传统自杀基因治疗相比, 这种改良后的自杀基因治疗体系有以下优越性: ①对实体瘤靶向性强, 全身途径给药后可减少对正常组织的损伤, 降低毒性不良反应; ②携带自杀基因的转化菌在肿瘤局部活化后直接表达酶活性, 不必再去转化癌细胞, 转化效率明显提高; ③婴儿双歧杆菌属于非致病性厌氧宿主菌, 正常即存在于人类及其他哺乳动物的低位小肠和大肠中, 以此为载体安全性较高。

本研究结果表明, CD 组的细胞形态发生明显改变, 细胞存活率明显降低, 提示婴儿双歧杆菌介导的 CD/5-FC 肿瘤基因治疗体系初步构建成功, 能够表达胞嘧啶脱氨酶活性, 杀伤肿瘤细胞, 降低细胞存活率。随着肿瘤基因治疗体系的不断发展和完善, 这种抗癌微生物介导的基因治疗很有可能成为下一步肿瘤治疗的研究焦点, 进而向临床逐步推广和应用。

## 参考文献

- 郭志英, 易成, 王树人, 等. 婴儿双歧杆菌/胞嘧啶脱氨酶肿瘤靶向性基因治疗系统的构建[J]. 中国肺癌杂志, 2004, 7(2): 95-98
- 郭志英, 王浩毅, 王树人. 基因导向性酶前体药物疗法在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2006, 33(04): 288-291
- YI Cheng, HUANG Ying, GUO Zhiying, et al. Construction of Bifidobacterium Infantis/CD Targeting Gene Therapy System[J]. The Chinese - German Journal of Clinical Oncology, 2005, 4(04): 244-247
- Yazawa K, Fujimori M, Amano J, et al. Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors[J]. Cancer Gene Therapy, 2006, 12(2): 269-274
- 张治进, 赵任. 大肠癌基因治疗的现状 & 展望外科理论与实践[J]. 外科理论与实践, 2008, 13(3): 270-272
- Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, et al. Bifidobacterium longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2007, 72(3): 165-170

(收稿: 2009-12-08)