

慢病毒介导 CD-TK 融合基因转染神经干细胞后杀伤 C6 胶质瘤的研究

闫超¹, 刘昊¹, 彭海声², 牛健¹, 邢春阳¹, 李殿俊³, 陶海泉¹, 杨海城¹

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨医科大学大庆校区药学院, 黑龙江 大庆 163019; 3. 哈尔滨医科大学免疫学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: [目的] 观察慢病毒介导的 CD-TK 融合基因转染神经干细胞(NSCs)对 C6 胶质瘤生长的抑制作用以及疗效。[方法] 利用慢病毒介导的大肠杆菌噬菌体脱氢酶(CD)和单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)融合基因转染 NSCs, 植入 C6 胶质瘤模型。用流式细胞仪技术检测 C6 胶质瘤生长凋亡情况。[结果] 成功构建 CD-TK 基因转染 NSCs 模型。实验组坏死细胞(17.80%)、早期凋亡细胞及晚期凋亡细胞(33.30%)较对照组增加。CDglyTK-NSC+GCV/5-Fc 治疗组肿瘤体积为 $9.36 \pm 2.35 \text{ mm}^3$, 小于其他处理组及对照组的肿瘤体积($P < 0.05$)。[结论] 转染 NSCs 的 CD-TK 基因对 C6 胶质瘤细胞有抑制作用, 抗肿瘤效果明显, 优于单一的自杀基因系统。

关键词: CD-TK 融合基因; 神经干细胞; 胶质瘤; 基因治疗

中图分类号: R739.41 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2014)01-0063-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.01.A015

Effect of Neural Stem Cells Modified by CD-TK Gene Mediated by Lentivirus on Glioma Cells

YAN Chao¹, LIU Hao¹, PENG Hai-sheng², et al.

(1. The 2nd Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China;

2. College of Pharmacy, Daqing Campus, Harbin Medical University, Daqing 163319, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the inhibition effect and efficacy of neural stem cells modified by CD-TK gene mediated by lentivirus in the treatment of glioma. [Methods] CD-TK gene was introduced into NSCs by lentivirus-mediated transfection and implanted into the model of C6 glioma. FCM was used to observe the apoptosis of glioma in vivo. [Results] NSCs/CD-TK model was successfully constructed. Necrotic cells, apoptotic cells in treatment group were significantly higher than those in other groups ($P < 0.05$). Tumor volume in CDglyTK-NSC+GCV/5-Fc group ($9.36 \pm 2.35 \text{ mm}^3$) was smaller than that in other groups ($P < 0.05$). [Conclusion] NSCs/CD-TK significantly inhibited the growth of C6 cells with a better anti-tumor efficacy than CD-TK suicide gene.

Key words: CD-TK gene; neural stem cells; glioma; gene therapy

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)属于多能干细胞,可生成神经组织,并具有自我更新能力。NSCs 作为基因治疗的载体可以确保表达外源基因的稳定性,从而保证了对肿瘤的杀伤效果;其次,NSCs 可以和正常脑组织整合,修复脑组织由于肿瘤侵袭而受到的损害,修复神经元的缺失以及损伤的神经胶质^[1]。NSCs 本身也具有一定的抗肿瘤能力^[2]。本实验将 NSCs 作为 CD-TK 自杀基因的载体^[3],观察慢病毒介导 CD-TK 融合基因转染 NSCs 后对 C6 胶质瘤的抑制作用和

疗效,为进一步临床研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与动物

携带 CD-TK 基因的慢病毒载体 pLVX-CDglyTK-ZsGreen 由深圳百恩维生物科技有限公司合成。C6 胶质瘤细胞株由天津大学神经外科研究所惠赠。DMEM/F12、B27、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)、EGF(表皮生长因子)均购自 Gibco 公司。BD

收稿日期: 2013-03-22; 修回日期: 2013-08-02

通讯作者: 杨海城, E-mail: yanghaicheng999@sina.com

ApoAlert™ Annexin V-FITC Kit(BD Biosciences 公司), 兼性逆转录病毒包装细胞 PA317 购自美国 ATCC。抗体包括 Nestin 兔抗鼠多克隆抗体 (Santa Cruz 公司), GFAP 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司), NSE 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司), 生物素标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉生物试剂公司), 山羊抗兔 Cy3-IgG(北京中杉生物试剂公司), DAPI (北京中杉生物试剂公司)。仪器有 37℃、CO₂ 培养箱(SMART Cell 公司), 酶标仪(Gene company), 荧光显微镜(Nikon)。

Wister 大鼠 60 只, 雄性, 体质量 200~250g, 购自哈尔滨医科大学大庆校区实验动物中心。

1.2 实验方法

1.2.1 NSCs 分离、培养及分化鉴定

将孕 14~16d 大鼠麻醉后颈椎脱臼法处死, 将胚胎取出。在解剖显微镜下分离胚胎脑组织, 研磨, 离心弃上清, 加入 NSCs 完全培养液, 用吸管吹打使细胞沉淀与培养液混匀。置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养。用免疫荧光法检测培养第 3 代的 NSCs 特异性抗原巢蛋白(neuroepithelial stem cell protein, Nestin)。

1.2.2 CD-TK 融合基因转染 NSCs 及分化鉴定

将慢病毒 pLVX-CDglyTK-ZsGreen 转染培养至第 3 代 NSCs, 48h 后于倒置荧光显微镜 490nm 激光下观察转染效率。用免疫荧光法检测转染 7d 的 NSCs 的 Nestin。

1.2.3 C6 胶质瘤大鼠模型建立及治疗

于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养 C6 胶质瘤细胞, 取生长状况良好的瘤细胞处理后, 显微镜下计数 10⁶/ml 注入 30 只大鼠头部。4d 后, 用相同方法在 30 只大鼠大脑对侧接种含 10⁶ 个/ml CD-TK 融合基因的 NSCs, 另 30 只大鼠不做处理。2 周左右后, 每天在 15 只含 CD-TK 融合基因、NSCs 大鼠以及 15 只不含 CD-TK 基因、NSCs 大鼠腹腔内注射 5-Fu 500mg/kg+ GCV 60mg/kg, 共注射 1 周, 观察大鼠生存状况。

1.2.4 流式细胞仪检测 C6 胶质瘤细胞凋亡率

取处死大鼠的肿瘤组织

0.2~1.0g, 剪成细小碎片, 磨碎。1000g×5min 离心收集分离细胞, PBS 冲洗 2 次。用 PBS 配制成 1×10⁶/ml 浓度的单细胞悬液。取 100μl 细胞悬液于培养管内, 加入 5μl 的 Annexin V-FITC 和 2μl PI (50μg/ml), 混匀后室温、避光放置 15min, 每个加样组做 3 个平行管, 每管加入 400μl 缓冲液, 检测凋亡情况。不加 Annexin V-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。细胞凋亡率=(凋亡细胞数/所测细胞总数)×100%。

1.2.5 肿瘤体积测定

移植入 C6 胶质瘤细胞 20d 后随机处死 5 只大鼠, 估计各处理组的肿瘤体积大小。肿瘤体积估算方法: 肿瘤体积=0.52×宽×高。

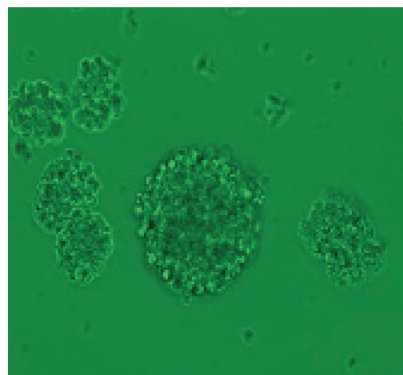
1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件进行数据处理。数据以均数±标准差表示, 采用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

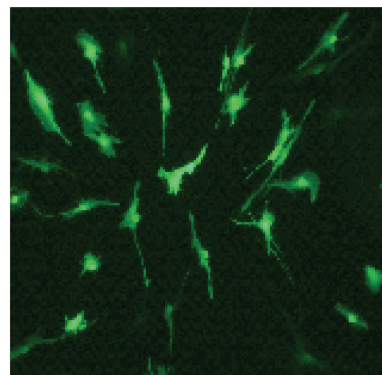
2 结 果

2.1 慢病毒介导的 CD-TK 融合基因转染 NSCs 建立

转染前, 大部分 NSCs 为球状单细胞, 悬浮生长, 透明, 折光性强, 分散存在, 大小均一(Figure 1A)。转染 48h 后, 细胞克隆内有散在微弱表达的绿色荧光细胞, 细胞贴壁生长后迅速伸出突起, 并向周围迁移, 形态上可见分化为神经元样或神经胶质样细胞, 均能表达强烈绿色荧光(Figure 1B)。



A. Neural stem cells before transfection



B. Neural stem cells transfected by CD-TK gene for 7 days

Figure 1 Morphological observation of neural stem cells before and after transfection(×100)

2.2 NSCs转染前后分化鉴定

经传代培养的 NSCs 球 Nestin 免疫荧光呈明显的绿色荧光阳性着色(Figure 2A)。诱导分化 NSCs 2~3d 后可见大量神经样细胞和突起, 呈现神经元、星形胶质细胞以及少突胶质细胞形态(Figure 2B)。转染后, 经 Nestin 标记 Cy3 染色(红色)联合 DAPI(蓝色)标记细胞核, 大部分细胞表达 Nestin(Figure 2C、2D)。

2.3 生存分析

所有大鼠接种肿瘤 3d 后均恢复正常活动。1 周后大鼠体质量增加, 对外界刺激反应灵敏, 无死亡。2 周左右大部分大鼠出现颅内高压症状, 饮食减少, 活动量下降, 对外界刺激反应敏感度下降, 完全或部分偏瘫。2 周后大鼠眶周淤血, 毛发不整洁, 失去光泽, 进食显著减少, 体质量下降, 并出现昏迷、死亡。治疗组治疗 10d 后, 大鼠症状减轻, 体重逐渐上升。CDglyTK-NSC +GCV/5-Fc 处理组, CDglyTK-NSC 处

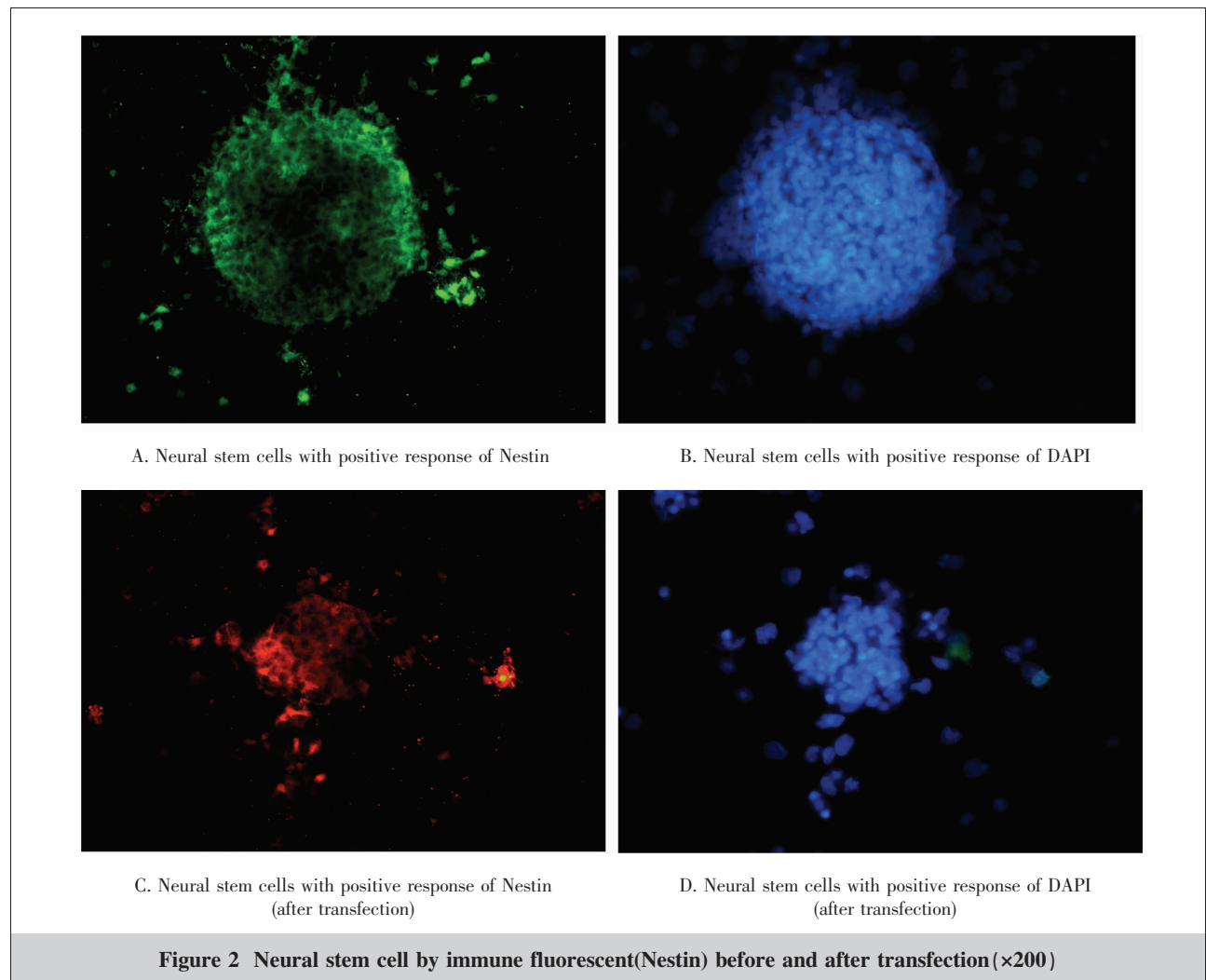
理组, NSC+GCV/5-Fc 处理组及对照组生存时间分别为 $47.20 \pm 2.15d$, $29.67 \pm 3.26d$, $29.80 \pm 1.24d$ 和 $29.00 \pm 1.53d$, CDglyTK-NSC+GCV/5-Fc 处理组与其他各组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

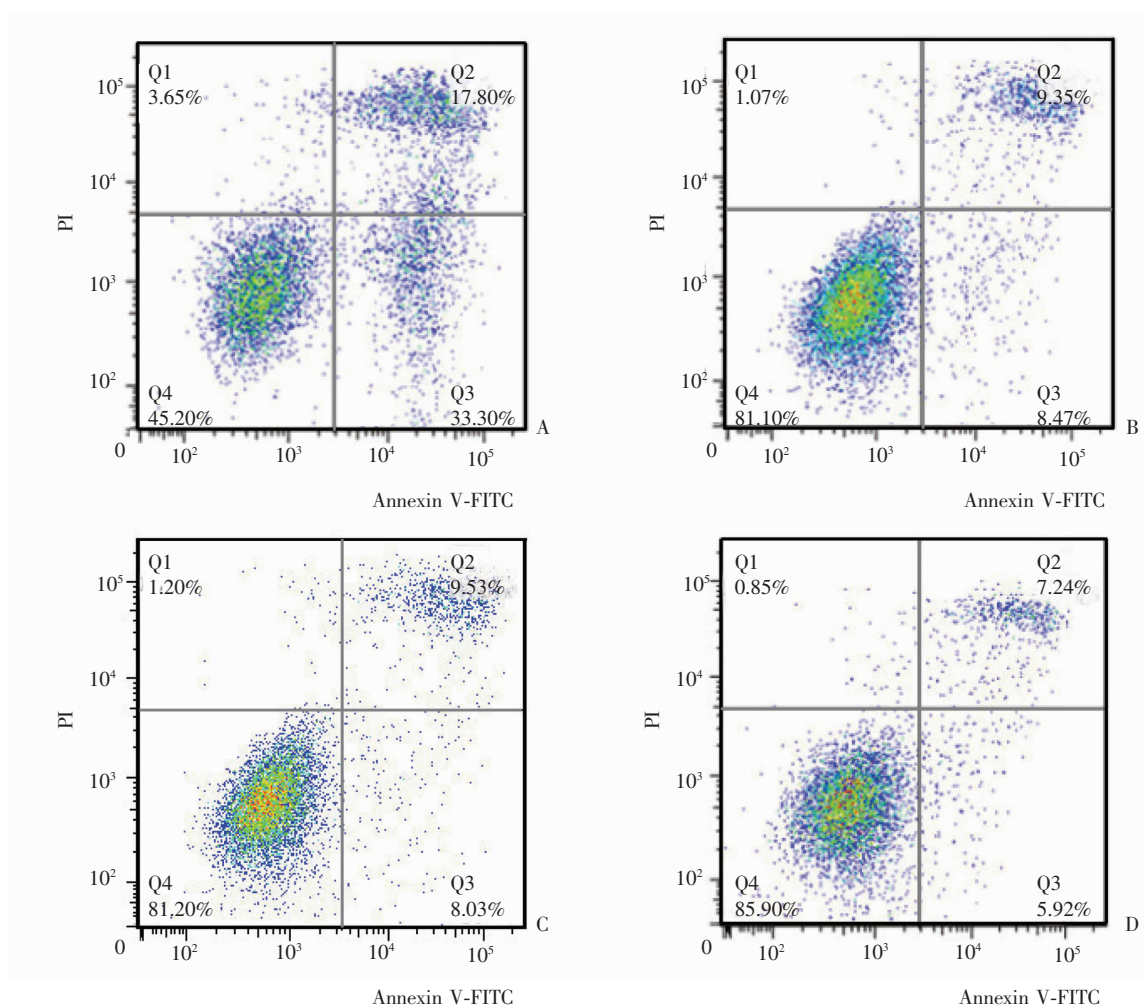
2.4 流式细胞仪检测 C6 胶质瘤细胞凋亡

Annexin-V 与 PI 匹配使用可将凋亡早、晚期细胞以及坏死细胞区分开来。实验组坏死细胞(17.80%)、早期凋亡细胞及晚期凋亡细胞(33.30%)较对照组明显增加(Figure 3)。

2.5 肿瘤体积

CDglyTK-NSC +GCV/5-Fc 治疗组肿瘤体积为 $9.36 \pm 2.35mm^3$, 小于其他处理组及对照组的肿瘤体积($P < 0.05$)。CDglyTK-NSC 组, NSC+GCV/5-Fc 组及对照组肿瘤体积分别为 $30.66 \pm 2.74mm^3$, $28.65 \pm 4.21mm^3$ 和 $29.66 \pm 3.47mm^3$, 各组间肿瘤体积差异无统计学意义($P > 0.05$)。





A. CDglyTK-NSC+GCV/5-Fc(Q1 3.65%,Q2 17.80%,Q3 33.30%,Q4 45.20%) C. NSC+GCV/5-Fc(Q1 1.20%,Q2 9.53%,Q3 8.03%,Q4 81.20%)
B. CDglyTK-NSC(Q1 1.07%,Q2 9.35%,Q3 8.47%,Q4 81.10%) D. control group(Q1 0.95%,Q2 7.24%,Q3 5.92%,Q4 85.90%)

Figure 3 Cell apoptosis in different groups by flow cytometry

3 讨 论

神经胶质瘤是常见的神经系统原发恶性肿瘤,约占全部中枢神经系统肿瘤的45%~55%,传统的联合治疗效果不理想^[4,5],低级别胶质瘤患者平均生存3~5年,而高级别胶质瘤则为1~2年^[6]。自杀基因治疗最早于1986年由Moolten^[7]提出,其基本原理为利用基因转移的方法将药敏基因导入肿瘤细胞,再施以对细胞无毒性作用的前体药物,后者能被药敏基因的表达产物转化为细胞毒性药物,从而引起肿瘤细胞自杀。有学者联合应用CD基因和TK基因构

建融合基因质粒治疗胶质瘤,发现融合基因可获得协同作用,增强了单一基因对靶细胞的杀伤能力,同时并未产生耐药性^[8,9]。

NSCs应用于治疗中枢神经系统(CNS)疾病仍处于实验研究或临床研究阶段,应用范围包括脑脊髓损伤、CNS退行性疾病、脑代谢性疾病和脑肿瘤等^[10]。但是直到目前为止,还没有发现NSCs特异性标志物的存在。Mckay^[11]用Neurospheres方法扩增NSCs,Nestin(neuroepithelial stem cell protein)呈阳性反应,而在分化神经元中Nestin消失,推测Nestin可以用来鉴定NSCs^[12]。研究表明移植入脑内的NSCs具有

向胶质瘤迁移的特性。当 NSCs 植入荷瘤鼠体内肿瘤后,遍布整个肿瘤,并随肿瘤向其他部位迁移^[13-16]。我们的实验检测了转染后 NSCs 的增殖能力,转染后 7d NSCs 转染率约为 53.5%,并且 NSCs 培养 2~3d 后病毒转染组 OD 值为 0.23764 ± 0.02917 ,对照组为 0.25027 ± 0.02644 ($P > 0.05$),说明转染前后对 NSCs 增殖活性无明显影响。

NSCs 研究处于初级阶段,其作为转基因载体的安全性一直存在争议。Aboody^[17]进行了 NSCs 介导的前体药物针对胶质瘤治疗的临床前研究,未发现载有自杀基因的 NSCs 具有毒性,而且经过前体药物的治疗,肿瘤体积明显缩小。本课题组成功分离 NSCs,并通过慢病毒将 CD-TK 基因转染至 NSCs 中,证明 CD-TK 融合基因转染对 NSCs 增殖无影响。采用合适的 MOI 值感染 NSCs 后,Nestin 染色阳性,说明 NSCs 转染效率较高,并且保留了分化能力。由此证明 NSCs 可以作为 CD-TK 基因的载体。

我们的实验发现经过 CDglyTK-NSC+GCV/5-Fc 治疗后,大鼠的生存时间延长,肿瘤体积缩小,细胞凋亡增加,说明 CDglyTK-NSC+GCV/5-Fc 对 C6 胶质瘤细胞具有较好的治疗效果,表明 NSCs 介导的双自杀基因/前药治疗法对脑肿瘤具有潜在治疗价值。由于 NSCs 携带自杀基因可以与肿瘤细胞一起被杀死,因此在保证治疗效果的前提下可以降低其毒性,为今后临床研究提供参考。

参考文献:

- [1] Martínez-Serrano A, Björklund A. Ex vivo nerve growth factor gene transfer to the basal forebrain in presymptomatic middle-aged rats prevents the development of cholinergic neuron atrophy and cognitive impairment during aging[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 95(4): 1858-1863.
- [2] Baklaushev VP, Grinenko NF, Savchenko EA, et al. Neural progenitor and hemopoietic stem cells inhibit the growth of low-differentiated glioma[J]. Bull Exp Biol Med, 2012, 152(4): 497-503.
- [3] Wong AM, Hodges H, Horsburgh K. Neural stem cell grafts reduce the extent of neuronal damage in a mouse model of global ischaemia[J]. Brain Res, 2005, 1063(2): 140-150.
- [4] Chen HY, Shao CJ, Chen FR, et al. Role of ERCC1 promoter hypermethylation in drug resistance to cisplatin in human gliomas[J]. Int J Cancer, 2010, 126(8): 1944-1954.
- [5] Lv SQ, Liu YS, Yang H, et al. Study of neural stem cells modified by cytosine deaminase gene and its expression in vitro[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2003, 25(11): 945-947. [吕胜青, 刘运生, 杨辉, 等. 胞嘧啶脱氨酶基因修饰 NSCs 及其表达的离体实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(11): 945-947.]
- [6] Hopkins K, Chandler C, Eatough J, et al. Direct injection of 90Y MoAbs into glioma tumor resection cavities leads to limited diffusion of the radioimmunoconjugates into normal brain parenchyma: a model to estimate absorbed radiation dose [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998, 40(4): 835-844.
- [7] Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy[J]. Cancer Res, 1986, 46(10): 5276-5281.
- [8] Barton KN, Paielli D, Zhang Y, et al. Second-generation replication-competent oncolytic adenovirus armed with improved suicide genes and ADP gene demonstrates greater efficacy without increased toxicity[J]. Mol Ther, 2006, 13(2): 347-356.
- [9] Wang Y, Xu HX, Lu MD, et al. Expression of thymidine kinase mediated by a novel non-viral delivery system under the control of vascular endothelial growth factor receptor 2 promoter selectively kills human umbilical vein endothelial cells[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(2): 224-230.
- [10] Martínez-Serrano A, Rubio F, Navarro B, et al. Human neural stem and progenitor cells: in vitro and in vivo properties, and potential for gene therapy and cell replacement in the CNS[J]. Curr Gene Ther, 2001, 1(3): 279-299.
- [11] McKay R. Stem cells and the cellular organization of the brain[J]. J Neurosci Res, 2000, 59(3): 298-300.
- [12] Qian X, Davis AA, Goderie SK, et al. FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells[J]. Neuron, 1997, 18(1): 81-93.
- [13] Li Y, Chen J, Wang L, et al. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells[J]. Neurology, 2001, 56(12): 1666-1672.
- [14] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [15] Lu D, Mahmood A, Wang L, et al. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome[J]. Neuroreport, 2001, 12(3): 559-563.
- [16] Aboody KS, Brown A, Rainov NG, et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(23): 12846-12851.
- [17] Aboody KS, Najbauer J, Metz MZ, et al. Neural stem cell-mediated enzyme/prodrug therapy for glioma: preclinical studies[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(184): 184ra59.