论著

文章编号:1000-5404(2006)19-1962-03

垂体瘤转化基因反义寡核苷酸抑制胶质瘤增殖的实验研究

程迎新[1],高 原[2],唐文渊[1],陈丙波[3] (重庆医科大学附属第一医院:[1]神经外科,[2]老年科,重庆 400016;[3]第三军医大学实验动物中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察垂体瘤转化基因(pituitary tumor transforming gene,PTTG)反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)对恶性胶质瘤增殖的抑制作用。**方法** 将C6胶质瘤细胞接种于大鼠右侧尾状核。按照不同的PTTG反义寡核苷酸浓度在选定的时间点立体定向原位注射于肿瘤区域。3周后处死大鼠,取标本做GFAP、PTTG、PCNA免疫组化染色。**结果** 不同浓度的PTTG-ASODN对C6胶质瘤模型的增殖抑制呈时间、浓度依赖性,而且高浓度,早期应用,反复应用PTTG-ASODN抑制胶质瘤模型肿瘤增殖的效果明显。**结论** PTTG-ASODN可以抑制胶质瘤的增殖,有望成为胶质瘤基因治疗的一种新策略。

关键词:胶质瘤;垂体瘤转化基因;反义寡核苷酸

中图法分类号:R392.12;R394.2;R730.264 **文献标识码**:A

Antisense oligodeoxyribonucleotide of pituitary tumor transforming gene inhibits proliferation of glioblastoma

CHENG Ying-xin[1], GAO Yuan[2], TANG Wen-yuan[1], CHEN Bing-bo[3] ([1]Department of Neurosurgery, [2]Department of Gerontology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016; [3]Laboratory Animal Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibition effect of pituitary tumor transforming gene (PTTG) antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) on C6 glioblastoma in rats. **Methods** The C6 glioma cells were injected into the right caudate nucleus. PTTG-ASODN of 8 or 16 μg/ml was injected into the tumor-affected area with stereotactic technique immediately, at 1st and 2nd week after inoculation of C6 cells. Three weeks after C6 cell inoculation, all rats were killed and the tumors were excised, then tumor volume was calculated and pathologically analysed, and immunohistochemical statining for GFAP, PCNA ang PTTG was performed. **Results** PTTG-ASODN could suppress the proliferation of C6 glioblastoma in a dose- and time-dependent manner. The inhibition effect was better when large-dose PTTG-ASODN was repeatedly used for glioblastoma as early as possible. **Conclusion** PTTG-ASODN can suppress the proliferation of glioblastoma, which may become a new strategy of gene therapy for glioblastoma.

Key words: glioblastoma; pituitary tumor transforming gene; ASODN

垂体瘤转化基因(pituitary tumor transforming gene,PTTG)是Pei等[1]从鼠垂体瘤细胞株GH4中分离出来的癌基因。研究表明PTTG除了在垂体瘤细胞中高表达外,亦在其他肿瘤,如肺癌、乳腺癌、结肠癌、淋巴瘤和卵巢癌中有较高的表达,有促进肿瘤增殖的作用[2],是一种强有力的肿瘤转化基因,在没有其他辅助癌基因参与下即能引起细胞转化,与大多数肿瘤发生有密切关系,是一个有潜在应用价值的肿瘤基因治疗的新靶点[3]。有报道PTTG在人类胶质瘤中高度表达[4],所以我们研究利用人工合成了硫代修饰的PTTG反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN),为分子靶点对胶质瘤进行基因治疗的可行性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

1640培养基(Gibco USA),神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein GFAP)兔多克隆抗体(北京中杉),PTTG兔多克隆抗体和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)兔多克隆抗体(武汉博士德),正压微量注射泵由重庆医科大学神经病学实验室提供。50只SD雄性大鼠,6~8周龄,

作者简介:程迎新(1977-),男,山东省潍坊市人,博士,主要从事脑胶质瘤基础方面的研究。电话:13206172038, E-mail:cqykdx@hotmail.com

通讯作者:唐文渊,电话:(023)89011159

收稿日期:2006-07-05;修回日期:2006-09-08

体质量 180～220 g，购自重庆医科大学动物实验中心。

1.2　细胞来源和培养

大鼠 C6 脑胶质瘤细胞由第三军医大学西南医院病理科卞修武教授馈赠。C6 脑胶质瘤细胞参照文献[5]的方法培养。

1.3　PTTG ASODN 的合成

PTTG ASODN 由大连宝生生物有限公司设计合成，其序列为：5′-GAAACTCTCAGGACG-3′，其碱基均由硫代磷酸修饰。经 www. genebank. com 检索证明，与 PTTG 以外的大鼠基因序列无同源性。

1.4　大鼠脑胶质瘤模型的制备

大鼠胶质瘤模型的制备参照文献[5]的步骤完成。

1.5　大鼠胶质瘤模型原位脑内 PTTG-ASODN 注射及分组

在选定的不同时间点，各组在立体定向仪引导下沿原穿刺靶点注射 20 μl Hanks 液溶解的不同剂量的 PTTG 反义寡核苷酸，各对照组则沿原穿刺靶点注射 20 μl Hanks 液，均利用微量泵缓慢匀速(1 μl/min)注入，每次 20 min 注射完。具体数据见表 1。C6 胶质瘤细胞接种后 3 周处死检查。

表 1　各实验组的注射时间、剂量、次数

组别	动物数	ASODN-PTTG 注射时间	浓度(μg/ml)	每次剂量	注射次数
实验 1 组	6	细胞接种同时	8	0.16 μg	1
实验 2 组	6	细胞接种同时	16	0.32 μg	1
对照 1 组	6	细胞接种同时	0	20 μl Hanks 液	1
实验 3 组	6	细胞接种后 1 周和 2 周	8	0.16 μg	2
实验 4 组	6	细胞接种后 1 周和 2 周	16	0.32 μg	2
对照 2 组	7	细胞接种后 1 周和 2 周	0	20 μl Hanks 液	2
实验 5 组	6	细胞接种后 2 周	16	0.32 μg	1
对照 3 组	7	细胞接种后 2 周	0	20 μl Hanks 液	1

1.6　实验观察指标

1.6.1　GFAP 免疫组化染色和 PTTG 免疫组化染色　　参照试剂说明书进行。细胞质中出现棕黄色颗粒的为 PTTG 阳性细胞，观察 10 个 400 倍视野，计数 1 000 个细胞中 PTTG 阳性细胞的数量，以 PTTG 阳性细胞所占的百分比做为 PTTG 阳性细胞值。

1.6.2　组织病理学检查　　所有脑标本固定、脱水、石蜡包埋后，接种部位冠状切面取 4 μm 切片，HE 染色，光镜下观察。

1.6.3　增殖检测　　通过增殖细胞核抗原(PCNA)标记，PCNA 表达阳性为细胞核呈棕黄色染色，在 400 倍显微镜下观察，每例组织切片在阳性反应最强的区域选择 5～10 个视野，计数1 000 个细胞，以 PCNA 阳性细胞所占的百分数作为增殖指数 PI。

1.6.4　胶质瘤的体积　　细胞接种后第 3 周将获取的全脑标本按大鼠脑表面的接种穿刺点，即尾状核平面做冠状切口，观察肿瘤生长情况，计算肿瘤体积 = $ab^2/2$(a 为肿瘤的最大径，b 为与最大径垂直的最宽径)。

1.6.5　肿瘤生长抑瘤率　　以(对照组肿瘤体积 - 实验组肿瘤体积/对照组肿瘤体积) ×100% 来表示。

1.7　统计学分析

用北航医学图像分析管理系统 CM-2000B 进行图像分析统计处理，采用 SPSS 10.0 统计软件分析，抑瘤率用 χ^2 检验，其余数据进行方差分析。

2　结果

2.1　大鼠一般情况

治疗结束后采取标本肉眼观察，治疗组肿瘤体积缩呈苍白色，与周围组织易于分离；而对照组瘤组织与周围组织肤黏连较紧。HE 染色见对照组瘤细胞呈椭圆形或梭形，细胞丰富、排列紧密，有的细胞围绕增生的小血管或坏死灶呈花环状，尤其在瘤组织的边缘可见大量的毛细血管；而治疗组瘤组织内坏死区范围明显扩大(图 1)。

2.2　GFAP 免疫组化染色

动物模型的 GFAP 免疫组化染色，棕黄色的阳性物质分布于肿瘤细胞胞浆，证明肿瘤的胶质细胞源性(图 2)。

2.3　不同时间点大鼠胶质瘤模型的增殖指数(PI)和 PTTG 的表达

通过增殖细胞核抗原(PCNA) 标记后显示各实验组和相应对照组瘤细胞增殖差异显著($P<0.05$)，见表 2。实验 1 组的 PTTG 表达见图 3。实验 1 组的 PCNA 表达见图 4。

表 2　第 3 周大鼠胶质瘤模型的增殖指数和 PTTG 的表达 (%，$\bar{x}\pm s$)

组别	PI	PTTG
实验 1 组	36 ± 23[a]	34 ± 12[a]
实验 2 组	23 ± 20[a]	10 ± 9[a]
对照 1 组	53 ± 22	62 ± 32
实验 3 组	34 ± 12[b]	22 ± 10[b]
实验 4 组	2.31 ± 2.3[b]	11 ± 8[b]
对照 2 组	52 ± 22	64 ± 21
实验 5 组	37 ± 11[c]	44 ± 12[c]
对照 3 组	55 ± 21	67 ± 34

a：$P<0.05$，与对照 1 组比较；b：$P<0.05$，与对照 2 组比较；c：$P<0.05$，与对照 3 组比较

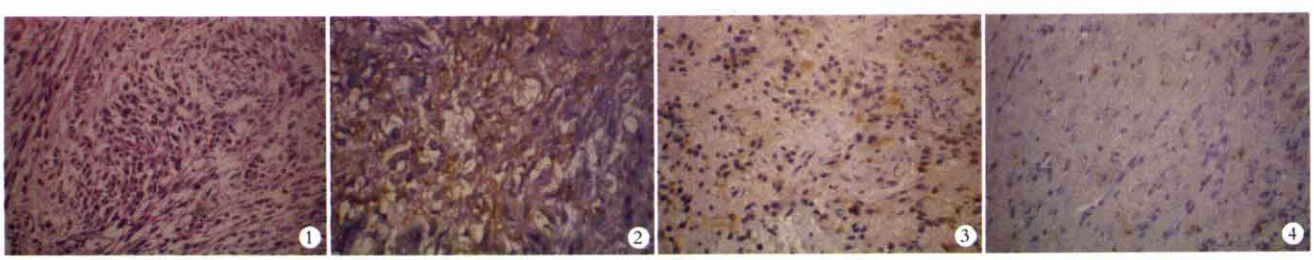


图 1　C6 脑胶质瘤细胞大鼠胶质瘤组织光镜观察　(HE ×200)

图 2　C6 脑胶质瘤细胞大鼠胶质瘤组织 GFAP 表达　(SABC ×400)

图 3　实验组 1 组 C6 脑胶质瘤细胞大鼠胶质瘤组织 PTTG 表达　(SABC ×200)

图 4　实验组 1 组 C6 脑胶质瘤细胞大鼠胶质瘤组织 PCNA 表达　(SABC ×200)

2.4 实验SD大鼠的肿瘤体积和抑瘤率的变化

结果见表3。

表3 SD大鼠胶质瘤模型第3周的肿瘤体积和抑瘤率的变化

组别	肿瘤体积(V/mm^3)	抑瘤率(%)
实验1组	13.2 ±2.7^{ad}	95.6
实验2组	0^{a}	100
对照1组	229.7 ±23.4	—
实验3组	20.2 ±3.7^{be}	92.4
实验4组	16.2 ±1.3^{b}	98.7
对照2组	227.6 ±20.9	—
实验5组	24.5 ±6.8^{c}	82.2
对照3组	226.8 ±21.2	—

a: $P<0.01$,与对照1组比较; b: $P<0.01$,与对照2组比较; c: $P<0.01$,与对照3组比较; d: $P<0.01$, 与实验2组比较; e: $P<0.01$,与实验4组比较

3 讨论

反义技术是应用碱基配对的原理,以体内表达某种特定蛋白质的靶基因为基础,人工设计一段与之互补的基因片段封闭该靶基因,直接阻断该蛋白质的产生,其优点在于其理论上的高度靶特异性(碱基互补)、设计容易、多样且合成简单及高度的局部性和针对性,具有巨大的吸引力和研究价值[4]。适当的化学修饰可使抗核酸酶能力提高10~1 000倍,最常用的方法是以甲基或硫原子取代磷酸二酯键中的非桥性氧原子,形成甲基磷酸和硫代磷酸类似物,尤其是硫代磷酸反义寡核苷酸被广泛认为是最佳选择[6]。本研究针对PTTG mRNA翻译功能区域的序列设计其反义核苷酸序列,该区域对mRNA来讲非常重要,阻断其翻译的过程会造成翻译的中断,而且容易接近。我们以硫原子取代磷酸二酯键中的非桥性氧原子,形成硫代磷酸类似物,不仅能提高摄取量,而且尚能抵抗自身的降解。

我们通过立体定向技术,微量正压向肿瘤区域泵出PTTG-ASODN,大鼠无中毒反应,说明利用立体定向微量正压匀速注射技术可以使用较小剂量就可以在大鼠肿瘤区域造成高浓度的PTTG-ASODN。实验组的大鼠肿瘤生长受到了明显的抑制:实验1、3、4、5组的大鼠肿瘤生长呈不规则的萎缩状态,实验2组肿瘤消失,而实验各组的对照组肿瘤则不断增大,有坏死和明显的水肿。各实验组与相应得对照组肿瘤体积比较均有非常显著的差异。实验各组的抑瘤率均>80%,而且通过增殖指数的检测显示实验组的增殖活性较相应对照组明显下降,实验2组的增殖活性很低,而且注射PTTG -ADOSN后没有发现肿瘤生长,说明脑内原位注射PTTG反义寡核苷酸能较好抑制肿瘤生长。

比较实验4组和实验5组的抗肿瘤生长效应,实验4组的增殖活性和PTTG的阳性表达都很低,结合实验1组和实验2组,说明在肿瘤瘤体较小时,大剂量PTTG反义寡核苷酸能更好抑制肿瘤生长,达到一定浓度时可以使肿瘤停止生长(如实验2组)或者生长停滞(如实验4组)。实验2组、实验3组、实验5组的原位注射的反义寡核苷酸剂量相同,实验2组肿瘤消失,实验3组虽然与对照2组比较也有明显的抑制肿瘤生长的效果,其肿瘤仍呈缓慢生长趋势,实验5组,采取的是一次性大剂量注射,它的肿瘤体积明显缩小,说明相同剂量单次较分次注射抑制肿瘤生长效果好,而且早期应用效果更好。比较实验2组和实验4组,实验2组的抑瘤率是100%,而实验4组虽然反义寡核苷酸的剂量是实验2组的2倍,但是抑瘤率却才98.7%,这说明早期给药治疗能取得更好的治疗效果。比较实验4组和实验5组,说明早期及反复给药能取得更好的疗效。比较实验1组和实验2组、实验3组和实验4组的抑瘤效果有明显的差异,说明PTTG反义寡核苷酸抑瘤有明显的浓度依赖性。通过增殖指数的比较,实验组和对照组之间存在明显差异,说明PTTG反义寡核苷酸抑瘤作用是通过抑制肿瘤增殖活性来实现的,而且早期,反复,大剂量应用PTTG反义寡核苷酸抑瘤作用明显。

目前认为PTTG促进肿瘤发生发展的作用是通过上调bFGF实现的[2],后者可诱导肿瘤组织新生血管形成,促进肿瘤生长、侵袭与转移。我们推测PTTG-ASODN正是通过抑制体内PTTG的表达间接抑制了肿瘤血管的形成,导致肿瘤坏死,这与我们在大体标本上看到的经过PTTG反义寡核苷酸治疗的肿瘤血管稀少,中心坏死的表现相吻合。

PTTG反义寡核苷酸可以抑制胶质瘤的增殖,早期、大剂量、反复应用可以取得更好的疗效。

参考文献:

[1] PEI L, MELMED S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG) [J]. Mol Endocrinol, 1997, 11(4): 433-441.

[2] MINEMATSU T, MIYAI S, KAJIYA H, *et al*. Recent progress in studies of pituitary tumor pathogenesis [J]. Endocrine, 2005, 28(1): 37-41.

[3] SOLBACH C, ROLLER M, PETERS S, *et al*. Pituitary tumor-transforming gene (PTTG): a novel target for anti-tumor therapy[J]. Anticancer Res, 2005, 25(1A): 121-125.

[4] TFELT-HANSEN J, YANO S, BANDYOPADHYAY S, *et al*. Expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) and its binding protein in human astrocytes and astrocytoma cells: function and regulation of PTTG in U87 astrocytoma cells[J]. Endocrinology, 2004, 145(9): 4222-4231.

[5] 张华蓉,陈飞兰,陈剑鸿, 等. 立体定向接种胶质瘤细胞系C6形成大鼠脑内原位移植瘤的生长特性[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(10): 957-960.

[6] GEKELER V, GIMMNICH P, HOFMANN H P, *et al*. G3139 and other CpG-containing immunostimulatory phosphorothioate oligodeoxynucleotides are potent suppressors of the growth of human tumor xenografts in nude mice [J]. Oligonucleotides, 2006, 16(1): 83-93.

(编辑 陈聪连)