DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.005
第25卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 11
2003年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2003

文章编号:1000-5404(2003)11-0945-03

论著

胞嘧啶脱氨酶基因修饰神经干细胞及其表达的离体实验研究

吕胜青[1],刘运生[2],杨 辉[1],何家全[1],王 彬[1],Ichiro Yoshimura[3] ([1]第三军医大学附属新桥医院神经外科,重庆 400037;[2]中南大学湘雅医院神经外科,长沙 410008;[3]Department of Urology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan)

提 要:目的 探讨胞嘧啶脱氨酶(Cytimidine deaminase, CD)基因修饰神经干细胞及其基因表达。方法 通过构建真核表达质粒pCMVCD,限制性内切酶消化鉴定后,采用Lipofectamine 2000脂质体介导法转染新生大鼠室管膜下区神经干细胞(Neural stem cells, NSCs),G418筛选阳性克隆,加入不同浓度的5-氟胞嘧啶(5-Flourocytosine, 5-FC),MTT比色法测定NSCs的生存率。结果 本实验成功地培养并鉴定了神经干细胞,并将CD基因成功地转染了神经干细胞,G418阳性NSCs对低浓度5-FC高度敏感。结论 CD基因修饰神经干细胞的离体实验研究为干细胞治疗研究提供依据。

关键词:胞嘧啶脱氨酶;基因转染;基因表达;神经干细胞
中图法分类号:Q343.5;R322.8;R394-33 文献标识码:A

Study of neural stem cells modified by cytosine deaminase gene and its expression *in vitro*

LU Sheng-qing, LIU Yun-sheng, YANG Hui, HE Jia-quan, WANG Bin, Ichiro Yoshimura (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate neural stem cells (NSCs) modified by cytosine deaminase (CD) gene and its expression *in vitro*. Methods Eukaryotic expression plasmid pCMVCD was constructed, and identified by restriction endoenzyme digestion. CD gene was transfected into NSCs from new-born Wistar rats using Lipofectamine2000. Positive clones (named NSCs/CD cells) were screened by G418 presence. 5-Fluorocytosine (5-FC) administration of different concentrations were incubated with NSCs/CD cells. NSCs/CD cells viability ratios were measured by MTT assay. Results NSCs cell culture and identification were carried out, transduction of CD gene was also successfully proceeded. Gene transfer made G418 positive NSCs (NSCs/CD cells) highly sensitive to 5-FC. Conclusion Study of NSCs modified by cytosine CD gene and its expression *in vitro* plays an important role in the studies of stem cell therapy *in vivo*.

Key words: cytosine deaminase; gene transfection; gene expression; neural stem cells

神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)是指具有分化为神经元细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞能力的,能自我更新、自我增殖,多向分化潜能的细胞,它具有迁移、未分化和缺乏分化标志等特性。1992年Reynolds等[1]成功地从哺乳动物脑内分离出神经干细胞,揭开了神经干细胞的研究序幕。以后有关NSCs的研究不断涌现[2~4],这些研究均聚焦于干细胞的生物学性状,例如取材、培养、诱导分化等,而干细胞治疗研究相对较少报道。本实验通过对NSCs基因修饰的离体实验研究为NSCs治疗研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 限制性内切酶*Bam*HⅠ和*Not*Ⅰ(BioLabs Inc, New England),pcDNA3.0(Invitrogen, USA),Lamda DNA/*Hind*Ⅲ Marker(华美生物工程公司),E.Z.N.A. Plasmid Miniprep *Kit*Ⅰ质粒纯化试剂盒(Omega, USA),Lipofectamine2000脂质体、B27、bFGF(Gibco BRL, USA),DMEM/F12培养基(Hyclone, USA),Nestin抗体、5-FU、5-FC、MTT(Sigma, USA),荧光抗体试剂盒(北京中山生物公司)。

1.1.2 实验动物 新生第1天Wistar大鼠由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠神经干细胞取材、培养及其鉴定 新生第1天大鼠,按Yang等[5]介绍的方法取室管膜前下区(SVZa)神经干

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(30130110)
作者简介:吕胜青(1971—),男,江西省星子县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事神经干细胞的基础研究和脑肿瘤的临床方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)68755764
通信作者:杨 辉,电话:(023)68774610
收稿日期:2002-07-03;修回日期:2002-09-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞，制成细胞悬液，用含 B27、bFGF 的 DMEM/F12 培养液常规培养，3～4 d 换液，7 d 传代。培养的 NSCs 采用 Nestin 抗体免疫荧光法染色(浓度为 1∶1 000)。

1.2.2 质粒构建、扩增与抽提 CD 基因插入真核表达载体 pcDNA3.0 多克隆位点构建 pCMVCD 质粒[6](由日本防卫医学院 Ichiro Yoshimura 博士完成)。采用大肠杆菌 $DH_{5\alpha}$进行扩增，按质粒纯化试剂盒说明书操作，抽提足量质粒备用。

1.2.3 酶切鉴定与基因测序 采用限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Not*Ⅰ酶切 pCMVCD 质粒，琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切 CD 片段。并进行基因测序，设计测序引物如下：

5′-GCA ATG CCG TAA TCC TG-3′

1.2.4 脂质体介导法转染神经干细胞 Lipofectamine 2000 脂质体介导法将 pCMVCD 质粒转染第 3 代神经干细胞，200 μg/ml G418 筛选阳性克隆，命名为 NSCs/CD 细胞。

1.2.5 NSCs/CD 细胞对 5-FC 及 5-FU 敏感性测定 96 孔培养板内接种 NSCs/CD 细胞及未转染的 NSCs(5 000 个细胞/孔，每组 5 个复孔)，次日加入不同浓度的 5-FC 和 5-FU，培养 7 d 后，采用 MTT 比色法测定细胞存活率。

$$细胞存活率=\frac{试验组光吸收值}{对照组光吸收值}\times 100\%$$

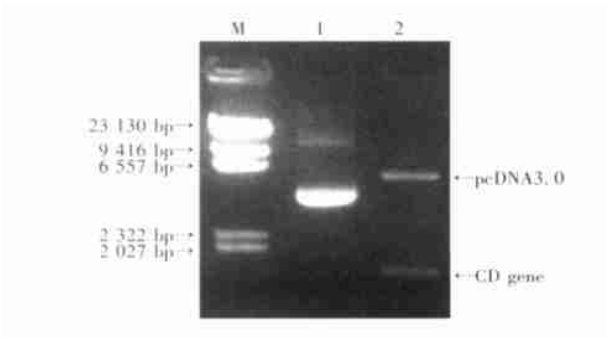
2 结 果

2.1 大鼠神经干细胞培养及其鉴定

我们成功地进行了室管膜前下区神经干细胞取材及培养，Nestin 抗体免疫荧光染色为阳性。

2.2 pCMVCD 质粒构建及酶切鉴定

构建的 pCMVCD 质粒经限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Not*Ⅰ酶切，切出 1 500 bp 的 CD 片段和 pcDNA3.0 载体，见图 1。



M: Lamda DNA/*Hind* Ⅲ Marker; 1: pCMVCD plasmid; 2: Fragments by *Bam*HⅠ and *Not*Ⅰ digestion

图1 pCMVCD 质粒的酶切鉴定

Fig 1 Identification of pCMVCD plasmid with enzme digestion

2.3 CD 基因测序

CD 基因测序结果所示：其编码区片段为 1 284 bp，与任圣俊等[7]和 Austin 等[8]在 Genbank 中公布的序列一致(资料未列出)。

2.4 脂质体介导法转染神经干细胞

采用 Lipofectamine 2000 脂质体介导法，成功地将 pCMVCD 质粒转染了神经干细胞，G418 筛选 2～3 周后获得阳性克隆用于实验。

2.5 5-FC 和5-FU 药物毒性实验

MTT 比色法显示：成功转染的 NSCs/CD 细胞在体外对 5-FC 的敏感性明显增高，其 IC_{50}由转染前的 5 000 μmol/L 降至 10 μmol/L 以下，敏感性提高了 500 倍；而 NSCs 和 NSCs/CD 细胞 5-FU 的 IC_{50}均为 1 μmol/L 左右，见图 2，3。

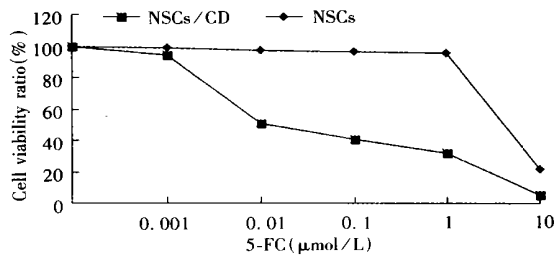


图 2 不同浓度 5-FC 对 NSCs 和 NSCs/CD 细胞生存率的影响

Fig 2 Effect of 5-FC administration on NSCs and NSCs/CD cell viability ratios

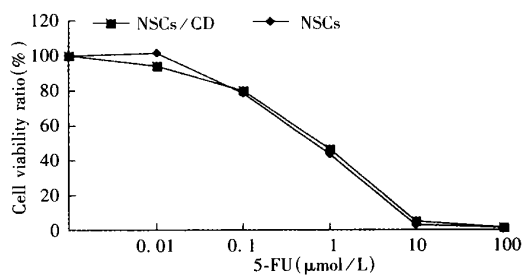


图 3 不同浓度 5-FU 对 NSCs 和 NSCs/CD 细胞生存率的影响

Fig 3 Effect of 5-FU administration on NSCs and NSCs/CD cell viability ratios

3 讨论

近2～3年来，有关神经干细胞治疗研究有明显增多趋势。学者们将其应用于帕金森病[9]、阿尔茨海默病[10]，缺血性脑卒中[11]等的治疗研究，取得了可喜的效果。这些研究依据 NSCs 能够增殖分化及其在中枢神经系统(Central nervous system，CNS)内发生神经整合的特性。然而 NSCs 在 CNS 中迁移(Migration)特性，成为近 3 年干细胞治疗研究的热点。2000 年 Benedetti 等[12]采用 NSCs 治疗实验性脑肿瘤获得成功。2001 年 Dirks[13]报道 NSCs 迁移与脑胶质瘤在 CNS 中浸润生长方向一致。因此，本研究在离体实验条件下，进行 NSCs 基因修饰，为脑胶质瘤基因治疗提供依据。

胞嘧啶脱氨酶(Cytosine deaminase，CD)是大肠杆

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌代谢旁路中发现的一种酶, 后来发现它只存在于细菌、真菌体内, 而哺乳动物不含该酶, 因而不能将 5-氟胞嘧啶(5-flurocytosine, 5-FC)转化成 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)。但通过基因转染技术将 CD 基因转入哺乳动物细胞内, 则该细胞可将原来无毒的原药(抗真菌药)5-FC 转化为有细胞毒性的代谢产物 5-FU, 导致细胞自杀性死亡。5-FC 在高度抗微生物活性的浓度下对哺乳动物无毒性作用, 经 CD 脱氨为 5-FU, 后者则具有高度细胞毒性[14]。学者将 CD/5-FC 系统用于恶性肿瘤的治疗研究, 包括: 结肠癌[8, 14]、前列腺癌[6]、恶性胶质瘤[15]等。

本研究成功构建了真核表达 pCMVCD 质粒, 经限制性内切酶消化而得到的 1 500 bp 的 DNA 片段, 基因测序结果同 Genbank 中公布的序列一致。采用脂质体介导法基因转染, 是目前较常用的基因转染方法, 具有操作简单、转染效率高的优点。本研究 NSCs 转染率为 20%~30%。转染成功的 NSCs 经 G418 筛选获得的阳性克隆, 均能表达 CD 基因, 低浓度 5-FC(≤ 10 μmol/L)状态下, 对处于增殖期的 NSCs/CD 细胞具有高度毒性, MTT 比色测定细胞生存率显著降低($P<0.01$); 该浓度对未转染的 NSCs 无影响。5-FU 作为抗代谢药, 是重要的一线抗肿瘤药物, 但其毒副作用(骨髓抑制、胃肠道反应等)也是临床医生所必须面对的棘手问题。本实验及相关研究[6, 8, 14, 15]的结果指出: 通过基因操作, 采用低浓度对机体无毒副作用的 5-FC 治疗恶性肿瘤, 也能取得 5-FU 同样的效果, 并且作用时间长, 影响范围局限在病变周围。本课题的最终目的是为降低抗肿瘤药物毒副作用作有意的尝试。

参考文献:

[1] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255(5052): 1707-1710.

[2] Ling Z D, Potter E D, Lipton J W, *et al*. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines[J]. Exp Neurol, 1998, 149(2): 411-423.

[3] Gage F H. Mammalian neural stem cell[J]. Science, 2000, 287(5457): 1433-1438.

[4] Rubio F J, Kokaia Z, Arco A D, *et al*. BDNF gene transfer to the mammalian brain using CNS-derived neural precursors[J]. Gene Ther, 1999, 6(11): 1851-1866.

[5] Yang H, Mujtaba T, Venkatraman G, *et al*. Region-specific differentiation of neural tube-derived neuronal restricted progenitor cells after heterotopic transplantation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(24): 13366-13371.

[6] Yoshimura I, Suzuki S, Tadakuma T, *et al*. Suicide gene therapy on LNCaP human prostate cancer cells[J]. Int J Urol, 2001, 8: S5-S8.

[7] 任圣俊, 蒋惠秋, 顾健人. 大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因克隆及其原核表达载体构建、表达[J]. 科学通报, 1997, 42(19): 2039-2046.

[8] Austin E A, Huber B E. A first step in development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing, and expression of Escherichia coli cytosine deaminase[J]. Mol Pharmacol, 1993, 43(3): 380-387.

[9] Raymon H K, Thode S, Gage F H. Application of *ex vivo* gene therapy in the treatment of Parkinson's disease[J]. Exp Neurol, 1997, 144(1): 82-91.

[10] Sugaya K, Brannen C L. Stem cell strategies for neuroreplacement therapy in Alzheimer's disease[J]. Med Hypotheses, 2001, 57(6): 697-700.

[11] Park K I. Transplantation of neural stem cells: cellar & gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury[J]. Yonsei Med J, 2000, 41(6): 825-835.

[12] Benedetti S, Pirola B, Pollo B, *et al*. Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells[J]. Nature Med, 2000, 6(4): 447-450.

[13] Dirks P B. Glioma migration: clues from the biology of neural progenitor cells and embryonic CNS cell migration[J]. J Neuro Oncol, 2001, 53(2): 203-212.

[14] Huber B E, Austin E A, Richards C A, *et al*. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: Significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(18): 8302-8306.

[15] Manome Y, Watanabe M, Abe T, *et al*. Transduction of thymidine phosphorylase cDNA facilitates efficacy of cytosine deaminase/5-FC gene therapy for malignant brain tumor[J]. Anticancer Res, 2001, 21(4A): 2265-2272.

(编辑　陈聪连)

参考文献表中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中, 引用英语文献的比例很高, 但有不少作者将英、美人的姓名搞错, 以至用光盘核对时出现错姓、错名、或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是: 名-名-姓, "名"可以有 1 个、2 个或 3 个, 但"姓"只有 1 个。因此, 从书籍或期刊中的姓名转录到文献表时, 要将次序调过为, 变成姓-名-名。姓是不可以简写的; "名"可以缩写, 用第一个字母大写, 不用缩写点。数据库在著录作者姓名时, 已经调整为姓-名-名, 可照录。

例如: John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net