DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.033
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0079-02

论著

GAP-43基因及TH基因治疗帕金森病的实验研究

刘 俊[1],张可成[1],蔡文琴[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院神经外科,重庆 400037;[2]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 利用基因工程化细胞及双基因表达的方式对生长相关蛋白质(Growth associated protein,GAP-43)基因及酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase,TH)基因在治疗帕金森病(Parkinson's disease,PD)中的作用进行探讨。方法 将GAP-43及TH基因分别构建入逆转录病毒载体中,再将含重组DNA的病毒上清感染培养的星形胶质细胞后移植入PD大鼠脑内,了解PD鼠旋转行为的改善情况。结果 TH基因治疗组及TH+GAP-43基因治疗组PD鼠旋转行为改善明显,GAP-43基因治疗组无明显治疗作用。结论 TH对PD有明显的治疗作用,GAP-43可促进TH的疗效。

关键词:帕金森病;基因治疗;GAP-43基因;TH基因
中图法分类号:R394;R459.9;R745.7 文献标识码:A

Experimental study of gene therapy for Parkinson's disease with GAP-43 and TH genes

LIU Jun, ZHANG Ke-cheng, CAI Wen-qin (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

Abstract Objective To explore the role of growth associtated protein(GAP-43) gene and throsine hydroxylase(TH) gene in the treatment of Parkinson's disease(PD) by using the *ex vivo* gene transfer cells. Method After the construction of GAP-43 gene and TH gene in the retroviral vectors, the astrocytes were cultured with the supernatants containing different recombinant DNA and then were transplanted into the cerebrum of PD rats. The reduction of the rat rotation behavior was evaluated. Results PD rats received TH gene and TH/GAP-43 gene treatment revealed decreasing rotation, but GAP-43 gene treatment group did not. Conclusion TH gene exerts an obvious efficiency on the treatment of PD and GAP-43 gene can enhance the effect of TH gene.

Key words Parkinson's disease; gene therapy; GAP-43 gene; TH gene

帕金森病(Parkinson disease,PD)是一种常见的中枢神经系统(CNS)退化性疾病,利用基因工程方法来纠正PD的多巴胺缺失将成为治疗PD的有效途径之一。我们将GAP-43基因及TH基因分别构建入逆转录病毒载体中,再将含重组DNA的病毒上清感染培养的星形胶质细胞后移植入PD大鼠脑内,对GAP-43基因及TH基因的治疗作用进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

TH质粒由美国Vrana教授提供,GAP-43质粒由美国Cams教授提供,其余试剂来自Promega, Boehringer, Sigma, Oxoid及华美等生物制剂公司。

1.2 实验方法

1.2.1 将提取纯化后的TH及GAP-43 DNA片段与N_2A逆转录病毒载体分别进行连接反应。连接产物转化入DH5α感受态细菌中,提取分别含TH和GAP-43 DNA片段的转化子酶切并鉴定正向阳性重组子。电穿孔法转染PA317细胞,G418筛选抗性克隆细胞并测定PA317细胞产病毒效价(CFU/ml)。提取新生大白鼠中脑组织进行星形胶质细胞的培养。取生长良好、70%~80%密度的星形胶质细胞,分别加入PA317/TH、PA317/GAP-43、PA317/N_2A病毒上清液2 ml并同时加入polybrene(8 μg/ml),于37 ℃, 5%CO_2培养箱培养。

1.2.2 模型动物 选用第三军医大学实验动物中心Wistar大鼠122只,雌雄不拘,体重160~200g,常规喂养。用6-羟基多巴胺(6-OHDA)损毁大鼠左侧黑质区,术后用阿朴吗啡(Apomorphine)皮下注射诱发旋转行为。

1.2.3 动物分组 A组:胶质细胞/GAP-43移植组(n=30);B组:胶质细胞/TH移植组(n=30);C组:胶质细胞/GAP-43及胶质细胞/TH联合移植组(n=30);D组:胶质细胞移植组(n=20)。另分别取6只正常大鼠(Control)和6只模型鼠(PD)备用,以作检测之用。

1.2.4 将培养好的转化星形胶质细胞消化后收集于离心管内,离心,调整细胞密度为1×10^5/μl。取成功的PD动物模型,麻醉后固定于立体定向仪上,将转化的胶质细胞按每点5 μl(5×10^5个细胞)注入损毁侧尾状核头部靶区内(坐标为A:+1.8 mm, L:2.5 mm, V:4.5 mm及A:+0.6 mm, L:2.0 mm, V:4.5 mm。齿棒与内耳线齐平),注射时间15 min,注射完毕留针15 min,骨蜡封闭骨窗,缝合头皮,术后常规喂养,喂养过程中因感染等情况死亡15只。术后7 d,0.5、1、2、3、及4个月分别于皮下注射阿朴吗啡(0.05 mg/kg)诱发动物的旋转行为。术后2个月取脑组织用高效液相色谱-电化学法(HPLC-EC)检测单胺类神经递质多巴胺(DA)及其代谢产物3-4二羟基苯乙酸(DOPAC)。

1.2.5 统计学处理 所得资料进行单因素方差分析及t检验。

2 结果

2.1 PD鼠旋转行为的改善情况

GAP-43及TH基因治疗前后PD鼠旋转行为的改善情况见表1。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39370686)
作者简介:刘 俊(1965-),男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事神经系统疾病临床外科及基础方面的研究,发表论文近20篇。电话:(023)68754631
收稿日期:2001-11-10;修回日期:2001-12-29

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

表 1 GAP-43 及 TH 基因治疗对 PD 鼠旋转行为的影响(turn/min, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of GAP-43 and TH gene treatment on the rotation of PD rats(turn/min, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Before transplantation	After transplantation(d)					
			7	15	30	60	90	120
A	27	13.15±2.7069	12.30±2.491	12.15±2.2197	12.70±2.2825	13.40±2.3108	13.70±2.2383	13.25±2.1418
B	27	12.70±2.3895	10.35±1.9306	9.60±1.7720	6.35±1.2359 *	4.40±1.3928 *	8.10±1.7860	11.70±1.2688
C	26	13.40±2.2226	10.30±1.9000	7.90±1.4456 **	6.10±1.6401 **	3.55±1.3219 **	5.05±1.4990 **	10.85±1.2359
D	15	12.85±1.9306	12.50±2.6551	13.95±2.0365	13.75±1.8131	13.30±1.9773	12.60±1.8547	13.35±2.1426

*: $P<0.01$, **: $P<0.01$ *vs* group D

2.2 DA、DOPAC 的含量变化

术后 2 个月 DA、DOPAC 的含量变化情况, 见表 2。

表 2 术后 2 个月 PD 鼠 DA 及 DOPAC 含量的改变(WB/ng·g^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Contents of DA and DOPAC in PD rats 2 months after transplantation (WB/ng·g^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	DA	DOPAC
A	6	219.7±74.44	27.33±12.80
B	6	679.4±94.01 *	57.40±10.05 *
C	6	759.8±101.80 **	64.00±12.34 **
D	5	221.6±44.71	27.60±12.62
Control	6	3 056.0±716.40	415.00±64.37
Model	6	284.2±79.28	29.17±13.74

*: $P<0.05$, **: $P<0.05$ *vs* group D

3 讨论

用 DA 神经元移植来纠正宿主的去神经支配损害, 对恢复 DA 系统的正常功能的确起到了一定的作用, 但由于对 CNS 解剖和功能了解的限制以及由于技术条件的限制, DA 移植物不可能完全恢复已严重缺失的功能损害。发展其它的治疗方法如基因治疗成为必然[1~4]。PD 病人的黑质纹状体系统内 TH 活性显著减弱, 致使 DA 合成障碍, 而出现一系列临床症状, 将带有正常 TH 基因的基因工程细胞移植到 PD 鼠纹状体区, 外源的 TH 基因在宿主脑内表达以补偿基因缺陷, 并使其病理行为得到明显改善。Wolff(1989)率先展开了 TH 基因修饰细胞移植治疗 PD 的实验研究, 并获得成功。本实验将胶质细胞/TH(B 组)移植入脑内后成功表达 TH, PD 动物模型旋转行为得到明显改善, 持续时间达到 2 个月, 旋转次数由术前的 13 次/min 下降到 4 次/min, 与对照组(D 组)比较 $P<0.01$。相应的 DA 含量明显增加, 由 200 ng 左右增加到 700 ng 左右。疗效超过了 Wolff 报道的持续两周的效果, 但低于 Jiao 报道的疗效持续达 6 个月的效果。这种时间上的差异, 除了使用的基因工程细胞和病毒载体有所不同所产生的差异外, 移植技术的好坏是影响疗效的重要原因之一。

由于引起 PD 的因素很多, 单靠给予某一种基因或因子所起的效果有限, 而两个基因以上的联合应用可能起到更好的效果。本实验采用了 GAP-43 基因和 TH 基因双基因表达的方式共同移植入 PD 鼠纹状体取得了较满意的结果。联合移植组(C 组)动物的旋转行为改善和 DA 递质含量的增高均好于 TH 单基因移植组, 主要表现在疗效的持续时间和程度均比单纯用 TH 基因治疗有较大幅度的提高。术后两个月旋转次数由术前的 13 次/min 下降到 3 次/min 左右。术后 3 个月旋转次数仍保持在 5 次/min 左右。DA 递质含量由 200 ng 左右增加到 800 ng 左右。提示 GAP-43 可通过促进移植细胞的存活, 从而延长和增进 TH 的表达, 有效提高了疗效。但 GAP-43 单基因移植组(A 组)动物的症状没有得到改善, 与目前常用的神经营养因子如 GDNF 等治疗 PD 具有较明显的效果不一样。这可能是因为 GDNF 等本身具有保护 DA 神经元不受 6-OHDA 的损害并能促进 DA 神经元的存活, 故而治疗效果明显[5,6]。而 GAP-43 主要体现在促进神经生长、发育和突触联系的类神经营养因子作用[7,8], 主要通过促进移植的基因工程细胞的存活而延长和增强了 TH 的表达, 在本实验中表现为明显促进了 TH 对 PD 的治疗效果。从本实验结果来看, GAP-43 还不具有 GDNF 样的作用, 其促 DA 能神经元功能发挥的作用也未能在短期内体现。因此, 单纯用 GAP-43 基因治疗组疗效不明显。表明 PD 主要需要 DA 的补充, 而 GAP-43 尚不具备 GDNF 一样的作用和促进 DA 能神经元在短期内恢复递质释放的功能。但 GAP-43 基因与 TH 基因联合应用治疗 PD 的研究, 无疑为 PD 的基因治疗开辟了新的手段和方法。

参考文献:

[1] Freese A. Restorative gene therapy approaches to Parkinson's disease[J]. Med Clin North Am, 1999, 83(2): 537—548.

[2] Mouradian M M, Chase T N. Gene therapy for Parkinson's disease, an approach to the prevention or palliation of levodopa-associated motor complications[J]. Exp Neurol, 1997, 144(1): 51—57.

[3] 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.

[4] Anderson W F. Excitement in gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(12): 1 483—1 484.

[5] Choi-Lundberg D L, Lin Q, Chang Y N, *et al*. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy[J]. Science, 1997, 275(5301): 838—841.

[6] Kozlowski D A, Connor B, Tillerson J L, *et al*. Delivery of a GDNF gene into the substantia nigra after a progressive 6-OHDA lesion maintains functional nigrostriatal connections[J]. Exp Neurol, 2000, 166(1): 1—15.

[7] Alonso G, Destreicher A B, Gispen W H, *et al*. Immunocalization of B-50 (GAP-43) in intact and lesioned neurohypophysis of adult rats[J]. Exp Neurol, 1995, 131(1): 93—107.

[8] Benowitz L I, Routtenberg A. GAP-43, an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity[J]. Trends in Neurosci, 1997, 20(2): 84—91.

(编辑 薛国文)

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