DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.030

论著

文章编号:1000-5404(2001)05-0556-03

TH基因修饰的胶质细胞脑内移植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 通过 *ex vivo* 途径,利用基因工程化细胞对酪氨酸羟化酶(TH)基因在治疗帕金森病中的作用进行探讨。方法 将TH基因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PD鼠旋转行为改善明显。结论 TH对PD有明显的治疗作用。星形胶质细胞可作为有效的基因工程细胞。

关键词:帕金森病;基因治疗;TH基因
中图法分类号:R394.3;R745.705 文献标识码:A

Experimental study of intracerebral transplantation of TH gene modified astrocytes for treating Parkinson's disease

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 tyrosine hydroxylase (TH) gene in the treatment of Parkinson's disease (PD) by using *ex vivo* gene transfer. Methods After the construction of TH gene in a retroviral vector, the astrocytes were cultured with the supernatant containing the recombinant DNA and then grafted into the cerebrum of PD rats. The reduction of the rat rotation behavior was evaluated. Results The rotation of PD rats was markedly improved in the rats with *ex vivo* gene transfer. Conclusion TH has an obvious efficiency on the treatment of PD and the astrocytes can be used as effective gene transfer cells.

Key words: Pakinson's disease; gene therapy; TH gene

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的中枢神经系统(CNS)退化性疾病,通过基因工程方法来纠正PD的多巴胺缺失是目前治疗PD的最有效途径之一。我们将酪氨酸羟化酶(Tryosine hydroxylase, TH)基因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移植入PD大鼠脑内,对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,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 DNA片段与N_2A逆转录病毒载体进行连接反应。连接产物转化入DH5α感受态细菌中,提取含TH DNA片段的转化子酶切并鉴定正向阳性重组子,见图1。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/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。

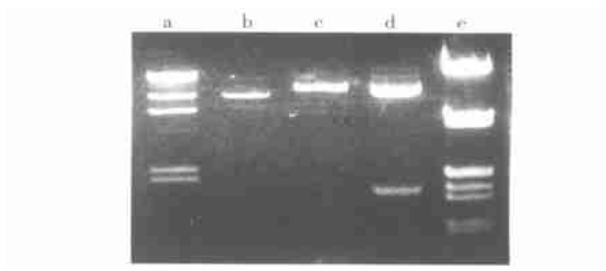


图1 pN_2ATH重组子酶切鉴定图

Fig 1 Identification of pN_2ATH by gel electrophoresis

a: *Hind* Ⅲ marker; b: pN_2A (digested by *Mlu* Ⅰ); c: pN_2ATH (digested by *Mlu* Ⅰ); d: pN_2ATH (digested by *Apa* Ⅰ); e: *Hind* Ⅲ/*EcoR* Ⅰ marker

1.2.2 模型动物 选用本校实验动物中心Wistar大鼠,雌雄不拘,体重160~200 g,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/TH移植组(n=30);B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,因感染等死亡8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,于相应的时间进行ABC

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:2000-07-10;修回日期:2001-01-08

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

法免疫组化染色了解 TH 的表达情况。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　　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

TH 基因治疗前后 PD 鼠旋转行为改善情况见表 1。

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

Tab 1　Effect 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	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
B	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

*: $P<0.01$ *vs* group B

2.2　DA、DOPAC 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(w_B/ ng·g^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

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

Group	n	DA	DOPAC
A	6	679.4±94.01 *	57.40±10.05 *
B	5	221.6±44.71	27.60±12.62
Control	6	3 056±716.4	415±64.37
PD	6	284.2±79.28	29.17±13.74

*: $P<0.05$ *vs* group B

2.3　免疫组化结果

在不同的时间里进行免疫组化染色以了解 TH 在脑内的表达情况, 发现均成功获得表达, 表达局限在移植区, 表达强度没有明显的差别。表达的阳性细胞呈圆形, 少有突起, 主要是一些未成熟的胶质细胞, 见图 2。移植术后 3 个月在局部移植区基本上已见不到 TH 的表达。外源蛋白的表达基本上与动物的行为改善呈平行关系。



图 2　移植术后 2 周移植区 TH 阳性细胞　(ABC× 20)

Fig 2　TH positive cells in grafting region 2 weeks after transplantation　(ABC× 20)

3　讨论

过去 20 年以来, 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[1]。发展其它的治疗方法如基因治疗成为必然[2,3]。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(A 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(B 组)差异显著($P<0.01$)。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。

基因工程细胞主要采用的是成纤维细胞和肌细胞。Gage[4] 及 Horellou[5] 进行了移植基因重组的成纤维细胞的实验, 用免疫组化证实了 TH 阳性蛋白的产生, 与神经细胞不同, 成纤维细胞不会大面积扩增整合到脑组织中, 而只是合成神经递质。从已有报道来看, 无论永生细胞(Immortalized cells)[6], 还是原代细胞(Primary cells)如成纤维细胞(Fibroblast)和肌母细胞(Myoblast), 虽已用于 CNS 的基因转移, 但都难以在宿主脑内长期存活, 植入的细胞有形成肿瘤的危险, 特别是处于分裂状态的细胞。同时存在外源基因的稳定性表达及缺乏 TH 合成所必需的辅助因子四氢蝶啶[7] 等问题。因此基因修饰细胞移植后 3～4 周表达水平便明显下降(降低 60%～70%), 已改善的病理行为不再持续。本实验选用星形胶质细胞作为一种新的基因转移的靶细胞, 是因为目前国内还没有用胶质细胞作为基因转移靶细胞的报道, 国外的研究也刚刚起步, 对胶质细胞作为基因转移靶细胞的效果还不清楚。从理论上讲, 胶质细胞作为神经系统的组成部分之一, 对神经元有支持, 保护和提供营养的功能[8], 同时, 胶质细胞作为 TH 基因工程细胞移植入脑内后不需要额外提供 TH 合成所需的辅助因子四氢蝶啶, 这是一般靶细胞所不具备的, 将胶质细胞作为基因转移靶细胞移植入脑内应该起到较好的作用。本实验显示, 用星形胶质细胞作为基因工程靶细胞进行移植后取得了跟一般常用的工程细胞一样的效果, 外源蛋白获得表达, 动物旋转

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

行为获得改善。免疫组化染色显示 TH 蛋白的表达一直持续到术后 2～3 个月。显示了星形胶质细胞可作为有效的 TH 基因工程细胞而起到治疗作用，且这种作用的发挥不需要辅助因子。但随着时间的延长，TH 表达细胞数量逐渐减少，病鼠的旋转行为又逐渐加重，说明基因修饰的星形胶质细胞脑内移植治疗 PD 有效果，但同样维持的时间有限，术后 3 个月以后免疫组化检测未再发现 TH 蛋白的表达，这种基因表达下调的原因不清楚，可能与病毒启动子的失活有关，并且移植技术直接影响移植后基因表达的效果。因此，星形胶质细胞作为基因工程细胞与其它的基因工程靶细胞相比具有一定的优点，可作为有效的基因工程细胞，但还不具备作为理想靶细胞的条件，有待进一步的研究。

参考文献：

[1] Lowenstein P R. Gene therapy of neurological disorders[J]. Gene Therapy, 1994, 1(Suppl 2): 6－7.
[2] Stern M B, Freese A. Parkinson's disease: the case for novel treatment strategies[J]. Exp Neurol, 1997, 144(1): 2－3.
[3] Freese A. Restorative gene therapy approaches to Parkinson's disease[J]. Med Clin North Am, 1999, 83(2): 537－548.
[4] Gage F H, Kawaja M D, Fisher L J. Genetically modified cells: Applications for intracerebral grafting[J]. Trends Neurosci, 1991, 14(8): 328－333.
[5] Horellou P, Guibert B, Leviel V, *et al*. Retroviral transfer of a human tyrosine hydroxylase cDNA in various cell lines: Regulated release of dopamine in mouse anterior pituitary Aff-20 cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(18): 7 233－7 237.
[6] Ray J, Peterson D A, Schinstine M, *et al*. Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(8): 3 602－3 606.
[7] Bencsics C, Wachtel S R, Milstien S, *et al*. Double transduction with GTP cyclohydrolase I and tyrosine hydroxylase is necessary for spontaneous synthesis of L-DOPA by primary fibroblasts[J]. J Neurosci, 1996, 16(14): 4 449－4 456.
[8] 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.

（编辑 潘式文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)05-0558-01

ELITE ESP 型流式细胞仪堵塞现象的快速排除

Rapid eliminating the obstruction of ELITE ESP flow cytometer

周 萍，周元国 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所分子生物学中心，重庆 400042）

流式细胞仪所检测的细胞要求排列成单列且单个细胞直径＜100 μm。因此，制备细胞悬液十分重要，否则容易堵塞管道，给检测带来困难[1,2]。过去一旦有堵塞现象发生就必须立即关闭仪器，卸下流动室的 Flow cell 把它浸泡入 Coulter clenz 液中过夜，然后用蒸馏水冲洗后安装。开机调节光斑位置，调节入射光、反射光位置、安装透镜；在 Acpuisition 状态下选择 Flow check protocol 方案，进行光路的反复调节，而光路的调节是 ESP 流式细胞仪工作的一个难点，在多数状态下都要求专门的工程师上门服务，费用高且常常影响工作。为此，我们在工作中经过反复摸索，总结了一套简单易行的排堵方法供同行参考，现简介如下：

第一步：一旦发现不能进样，取下样品，按 RUN 看进样针是否有液滴下落，若无液滴下落，按 BE·BUBBLE 键进行排气，看通过排气能否让堵塞现象解除，若仍然堵塞按 VACUUM 键，将触摸屏幕更换成 Valves screen 屏幕，用 Coulter clenz 液清洗仪器，反复抽取，这时观察进样管中的液柱水平有无下降，观察流动室中一盘成圆形的塑料管中有无液体缓缓流动现象，如有液柱水平下降，Flow cell 下有一大液滴珠形成，即可证明堵塞现象解除，仪器进入正常工作状态，否则采用第二步。

第二步：分开与进样针相连接的塑料软管，按下 RUN 键，若软管中有液滴排出，证明为进样针堵塞。此时，可拔下进样针，用 1ml 皮试针抽取蒸馏水或 Coulter clenz 液冲洗，让其通畅，然后装好进样针，仪器即可恢复正常工作状态，否则采用第三步。

第三步：分开与查样针相连接的塑料软管，用 1ml 的皮试针反复往塑料软管里注射蒸馏水或 Coulter clenz 液，这时观察流动室中一盘成圆形的塑料软管，观察软管里的水是否有缓慢流动的现象，同时感觉推动注射器的压力是否减少，如感到压力变小，蒸馏水能很顺利的推入，流动室的水在缓慢流动，Flow cell 下有大滴液珠形成，证明堵塞现象已解除，仪器即可进入正常工作状态。

第四步：按下 VACUUM 键，在触摸屏幕上选择 Valves screen 屏幕，使仪器处于清洗状态，用一浸有 Coulter clenz 的脱脂棉放入 Flow cell 的底部，在 Valves screen 屏幕上选择 Flow Cell Vac° Stop(On) 变成 Off。如此反复，堵塞现象将被排除，仪器即可进入正常工作状态。

ESP 流式细胞仪的堵塞现象，经过上述 4 个步骤处理后一般不难排除，仪器很快就可进入正常工作状态。

关键词：细胞；仪器
中图法分类号：R197.39 文献标识码：B

参考文献：

[1] 陈姗姗. 流式细胞术用于临床检验中的一些问题[J]. 中华医学检验杂志，2000，23(4)：197－198.
[2] 曹云新，刘智广. 流式细胞仪 DNA 染色试剂的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2000，16(3)：S05－S06

（编辑 陈聪连）

作者简介：周 萍(1964－)，女，四川省自贡市人，实验师，主要从事分子生物学方面的研究，发表论文 5 篇。电话：(023)68757463

收稿日期：2001-01-18；修回日期：2001-03-28

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