

# 骨髓间充质干细胞-胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶自杀基因治疗系统的构建及效应\*★

曹始波<sup>1</sup>, 孟庆海<sup>1</sup>, 金 澎<sup>1</sup>, 王洪伟<sup>1</sup>, 栗世方<sup>1</sup>, 窦以河<sup>1</sup>, 孟承东<sup>2</sup>, 阎晶杰<sup>3</sup>

## Construction and effects of bone marrow mesenchymal stem cells-cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system

Cao Shi-bo<sup>1</sup>, Meng Qing-hai<sup>1</sup>, Jin Peng<sup>1</sup>, Wang Hong-wei<sup>1</sup>, Li Shi-fang<sup>1</sup>, Dou Yi-he<sup>1</sup>, Meng Cheng-dong<sup>2</sup>, Yan Jing-jie<sup>3</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** *In vivo* study has verified that bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) can migrate and integrate in the brain as neural stem cells (NSCs). If BMSCs can be used in system pathway transplantation, it will simplify the procedures of transplantation.

**OBJECTIVE:** To construct recombinant expression plasmid pEGFP-N3-CD containing cytosine deaminase (CD). Liposome Lipofectamine2000 was used to transfect rat BMSCs. To observe CD gene expression and suicide effects of BMSC-CD/5-fluorocytosine (FC) suicide gene therapy system on C6 glioma cells *in vitro*.

**METHODS:** The pEGFP-N3-CD plasmid was constructed, and determined by enzyme digestion and DNA sequence. BMSCs were harvested and cultured using the whole bone marrow method. The pEGFP-N3-CD plasmid was used to transfect rat BMSCs *in vitro* using Lipofectamine2000. CD gene protein expression of G418-resistant clones (named BMSCs-CD cells) was detected by immunocytochemistry. Apoptosis of C6 cells cultured with BMSCs-CD cells in Transwell culture system induced by 5-FC (24 hours later) in BMSCs-CD cells genetically modified to express CD was investigated by applying TUNEL, MTT and flow cytometry analysis techniques (72 hours later).

**RESULTS AND CONCLUSION:** The pEGFP-N3-CD plasmid containing complete CD gene sequence was constructed. CD gene was transfected to BMSCs, and fully expressed in gene and protein levels. Under *in vitro* co-culture conditions of BMSCs-CD and C6 glioma cells, apoptotic rate of C6 glioma cells showed dose-dependent effects, and significant difference was detected as compared with control group ( $P < 0.01$ ). Results have indicated that BMSCs-CD/5-FC suicide gene therapy system exhibits significant inhibitory effects on growth of C6 glioma cells.

Cao SB, Meng QH, Jin P, Wang HW, Li SF, Dou YH, Meng CD, Yan JJ. Construction and effects of bone marrow mesenchymal stem cells-cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(27):4964-4969. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 体内研究已经证实骨髓间充质干细胞能够像神经干细胞一样在脑内迁移和整合, 如果骨髓间充质干细胞用于系统途径移植成为可能, 将会显著简化移植的步骤。

**目的:** 构建含胞嘧啶脱氨酶(CD)基因的重组表达质粒 pEGFP-N3-CD, 用脂质体 Lipofectamine2000 转染大鼠骨髓间充质干细胞, 体外观察 CD 基因的表达及 BMSCs-CD/5-氟胞嘧啶自杀基因治疗系统对 C6 胶质瘤细胞的杀伤作用。

**方法:** 构建 pEGFP-N3-CD 质粒, 酶切、DNA 测序鉴定。全骨髓贴壁法分离培养骨髓间充质干细胞, 脂质体 Lipofectamine2000 介导重组表达质粒 pEGFP-N3-CD 转染大鼠骨髓间充质干细胞。G418 筛选培养获取阳性克隆(BMSCs-CD 细胞), 免疫细胞化学染色检测 BMSCs-CD 细胞的 CD 基因蛋白表达。Transwell 小室共培养 BMSCs-CD 细胞和 C6 胶质瘤细胞, 24 h 后加入前体药物 5-氟胞嘧啶, 72 h 后 TUNEL、MTT、流式细胞术检测 C6 胶质瘤细胞的凋亡情况。

**结果与结论:** 构建的重组表达质粒 pEGFP-N3-CD 含完整的 CD 基因序列, CD 基因转染至骨髓间充质干细胞并在基因及蛋白水平有完整表达。BMSCs-CD 和 C6 胶质瘤细胞体外共培养条件下, C6 胶质瘤的凋亡率呈剂量依赖性, 与对照组相比差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。结果提示体外共培养条件下, BMSCs-CD/5-氟胞嘧啶自杀基因治疗系统对 C6 胶质瘤细胞生长有显著的抑制作用。

**关键词:** 胞嘧啶脱氨酶; 转染; 骨髓间充质干细胞; transwell 共培养; 胶质瘤; 基因疗法

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.27.006

曹始波, 孟庆海, 金澎, 王洪伟, 栗世方, 窦以河, 孟承东, 阎晶杰. 骨髓间充质干细胞-胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶自杀基因治疗系统的构建及效应[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(27):4964-4969.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

资料表明, 恶性胶质瘤的 5 年病死率仅次

于胰腺癌和肺癌居第 3 位, 其 5 年存活率不足 5%。近 20 年来, 胶质瘤的疗效及预后无明显改善, 寻求有效的治疗措施刻不容缓。近年来, 随着细胞生物学及分子生物学的发展, 基因疗

法有望成为治疗胶质瘤的一个突破点。一些实验成果已经试用于临床, 取得了一定的效果<sup>[1]</sup>, 利用自杀基因的旁观者效应治疗胶质瘤就是其中之一<sup>[2]</sup>。胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)是存在于大肠杆菌和真菌中的一种代谢酶, 哺乳动物不含该酶。此酶可将原药 5-氟胞嘧啶(5-Fluorocytosine, 5-FC)代谢为 5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU), 从而导致载体的凋亡。自杀基因作为目的基因可通过骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的定向迁移作用而向肿瘤定向递送<sup>[3]</sup>。本实验构建了带有加强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)标记的 BMSCs-CD/5-FC 自杀基因治疗系统, 并在实验中观察了该系统体外对 C6 胶质瘤细胞的抑制作用。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞体外培养及观察。

**时间及地点:** 实验于 2008-11/2009-08 在青岛大学医学院附属医院脑血管病研究中心完成。

**材料:**

**细胞和实验动物:** 含 CD 基因的质粒 pWZLneoTKglyCD 由齐鲁医院马道新教授惠赠, C6 胶质瘤细胞由青岛大学医学院附属医院中心实验室隋爱华副教授惠赠。大肠杆菌 *Escherichia Coli* DH5 $\alpha$  及质粒 pEGFP-N3 购自南通市百奥生物技术有限公司。SPF 级 Wistar 大鼠 30 只, 1 月龄, 体质量 80 g 左右, 雌雄不限, 购自青岛市实验动物中心。实验过程中对动物的处置参照国家科学技术部 2006 年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[4]</sup>。

**主要试剂:**

主要试剂	来源
脂质体 Lipofectamine2000	Invitrogen 公司
5-FC、G418、DMEM、MTT	Sigma 公司
绵羊抗-CD 多克隆抗体	Biogenesis 公司
T <sub>4</sub> 连接酶、EcoR I 和 Xho I 限制性内切酶	NEB 公司
1 kb plus DNA ladder	Tiangen 公司
TUNEL 凋亡试剂盒、Annexin V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒	碧云天

**实验方法:**

**重组表达质粒 pEGFP-N3-CD 的构建:** BamH

I 单酶切质粒 pWZLneoTKglyCD, 得 CD 基因片段, 单酶切质粒 pEGFP-N3 成线性, 连接酶连接重组得重组表达质粒 pEGFP-N3-CD, 常规扩增、提取、酶切、测序。

**BMSCs 原代分离培养及鉴定**<sup>[5]</sup>: 无菌条件下取 80 g 左右 SPF 级 Wistar 大鼠双胫股骨, 用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 冲洗髓腔, 得全骨髓细胞悬液, 调整细胞浓度  $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 接种至 6 孔板, 每孔接种悬液容积 3.5 mL (细胞密度为  $1.94 \times 10^6 / \text{cm}^2$ )。常规培养, 72 h 初次换液, 细胞融合度达 90% 以上, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。第 1 次传代按 1:3 传代, 以后按 1:2 传代。一般三四天即传代 1 次。取第 4~6 代细胞, 流式细胞仪测定细胞表面抗原 CD29、CD45、CD90 的表达。

**转染及筛选:** 取指数生长期 BMSCs 在 6 孔培养板中进行转染。转染步骤按照 Lipofectamine2000 说明书进行。转染 24 h 后加含终质量浓度 200 mg/L G418 的培养基加压筛选, 培养基使用条件培养基, 荧光显微镜下每日观察绿色荧光蛋白表达情况, 镜下计数观察 EGFP 表达的阳性细胞数量。阳性克隆形成后转 24 孔板扩增培养。

**免疫细胞化学染色检测 CD 基因蛋白表达**<sup>[6]</sup>: 制备转染与未转染 CD 基因的 BMSCs 和 BMSCs-CD 细胞玻片, 以 CD 多克隆抗体检测 CD 基因蛋白的表达。

**高效液相色谱检测:** 6 孔板内接种 BMSCs-CD, 每孔  $2 \times 10^5$ , 次日用含终质量浓度为 100 mg/L 的 5-FC 的培养基换液。药物孵育 72 h 收集培养上清, 采用高效液相色谱测定 5-FU 浓度, 检测波长 270 nm, 以 BMSCs 为对照。

**两种细胞共同培养:** 以 24 孔板、膜孔径为 0.4  $\mu\text{m}$  的 transwell 共培养系统培养两种细胞。上室接种 BMSCs-CD 或 BMSCs, 加液 200  $\mu\text{L}$ ; 下室接种 C6 胶质瘤细胞, 加液 500  $\mu\text{L}$ 。细胞浓度均为  $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 。培养液统一使用 DMEM+ 体积分数为 10% 胎牛血清。第 2 天融合度在 80%~90% 之间。加不同质量浓度 5-FC (0, 50, 100, 200 mg/L), 共培养 72 h 后检测 C6 细胞的存活和凋亡情况。

**MTT 试验**<sup>[7]</sup>: 取不同质量浓度 5-FC 孵育 72 h 后的共培养系统的 C6 细胞, 常规行 MTT 检测细胞的存活率, 设置空白组及对照组 (空白组不加细胞, 对照组即 5-FC 为 0 mg/L 组), 检测波长为 570 nm。计算公式: 细胞存活率 = 实验组

青岛大学医学院附属医院, <sup>1</sup> 神经外科, <sup>2</sup> 放射科, 山东省青岛市 266003; <sup>3</sup> 临邑县德平医院, 山东省临邑县 251500

曹始波★, 男, 1972 年生, 山东省临邑县人, 汉族, 青岛大学医学院神经外科在读硕士, 主治医师, 主要从事胶质瘤的基因治疗研究 QYC020542@126.com

通讯作者: 孟庆海, 博士生导师, 教授, 青岛大学医学院附属医院神经外科, 山东省青岛市 266003 qhmeng301@sohu.com

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2010)27-04964-06

收稿日期: 2010-03-03  
修回日期: 2010-03-31  
(20100303006/M·Q)

吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。

**TUNEL 试验:** 取共培养细胞于 24 孔板中行 TUNEL 细胞检测。设阳性对照(另加 100  $\mu\text{L}$  DNase I 反应液)和阴性对照(不加 TdT 液)。按照试剂说明进行, 荧光显微镜下观察。

**流式细胞仪检测:** 收集共培养系统中的 C6 胶质瘤细胞, 制成单细胞悬液, PBS 洗涤, 按照 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒说明, 调整细胞浓度, 进行细胞染色, 上机检测, Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI 为凋亡细胞, 以凋亡率作为检测指标。以上室中不含 BMSCs 的共培养体系作为对照。流式细胞仪自带软件进行数据分析处理。

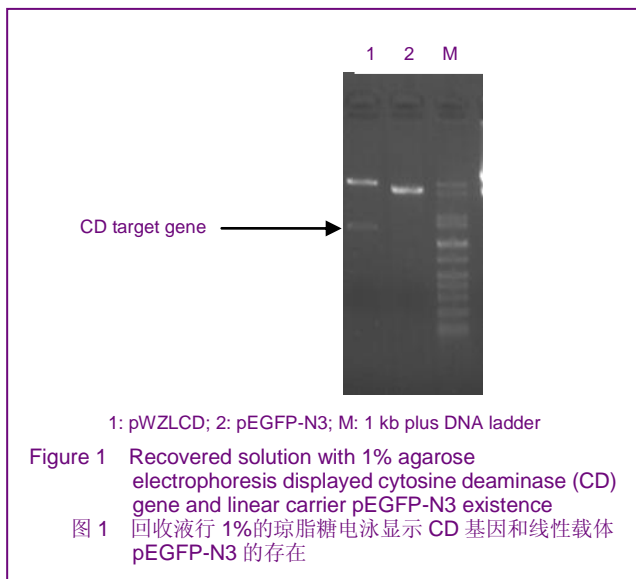
**主要观察指标:** BMSCs 及 BMSCs-CD 的生长状况, 质粒 pEGFP-N3-CD 的转染率, pEGFP-N3-CD 与 C6 胶质瘤细胞共培养后 C6 胶质瘤细胞的凋亡情况。

**设计、实施、评估者:** 为本文作者, 均经系统培训, 未采用盲法评估。

**统计学分析:** 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。以  $\bar{x} \pm s$  表示, 进行方差分析(流式细胞仪检测所得百分数数据经平方根反正弦函数转换后进行方差分析)和  $t$  检验。结果以  $P < 0.01$  为差异有显著性意义,  $P > 0.01$  为差异无显著性意义。

## 2 结果

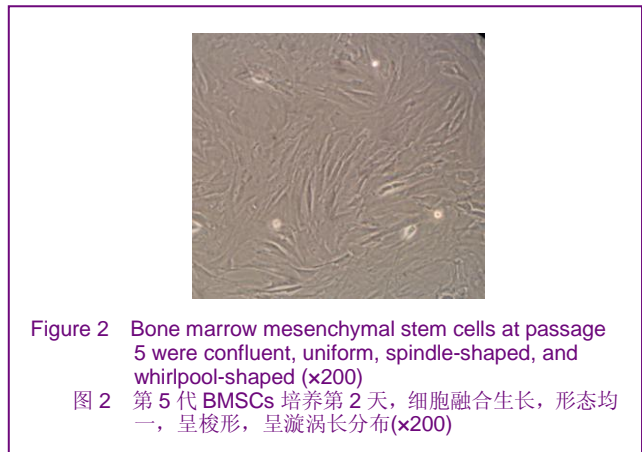
**2.1 重组表达质粒 pEGFP-N3-CD 的构建** BamH I 酶切质粒 pWZLneoTKglyCD 后回收 CD 基因, BamH I 酶切质粒 pEGFP-N3 后回收线性质粒载体。取 2  $\mu\text{L}$  回收液行凝胶电泳, 获得 1.28 kb 的 CD 基因及 4.7 kb 的线性 pEGFP-N3, 见图 1。



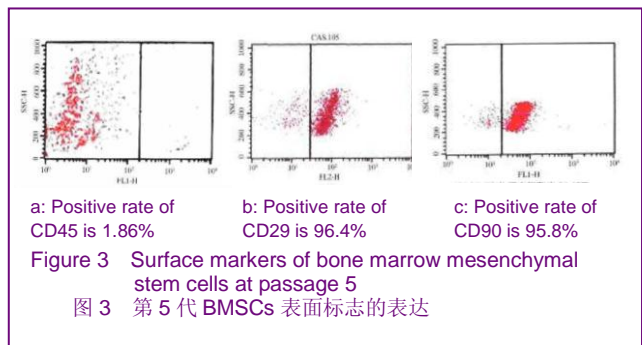
T<sub>4</sub> 连接酶于连接体系中进行连接反应。常规扩增、抽提。测序证实所得重组质粒 pEGFP-N3-CD 含有 CD

基因, 且其序列与基因库中 CD 基因序列一致。

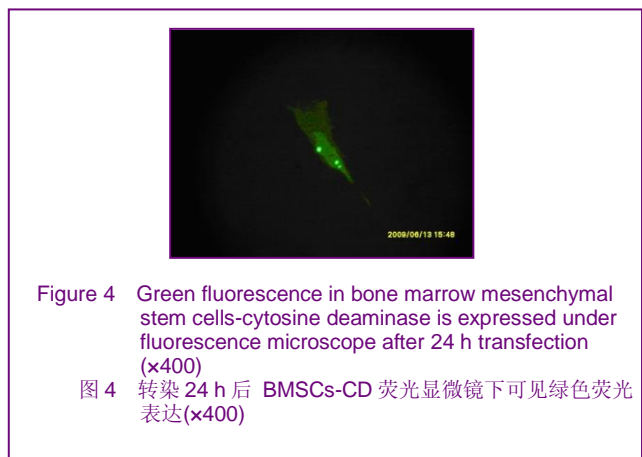
**2.2 BMSCs 的分离培养及鉴定结果** 原代细胞培养在第 1 次换液后即可见到为数众多的贴壁细胞克隆集落。胞体在贴壁初期较小, 多呈短梭形、三角形、圆形。几经换液传代纯化, 细胞多呈长梭形, 以均匀有序的成纤维细胞样分布, 呈漩涡状排列, 杂质细胞明显减少, 见图 2。



10 代以后的细胞胞体扩大呈菱形, 多角形, 胞内颗粒增多, 老化现象趋于明显。取第 4~6 代细胞, 测定细胞表面抗原 CD45, CD29, CD90 的表达。CD45 的表达率不足 2%, 而 CD29 和 CD90 的表达率在 95% 以上。可以认为所得细胞为 BMSCs 且纯度较高, 见图 3。



**2.3 重组表达质粒 pEGFP-N3-CD 的转染结果** 见图 4, 5。





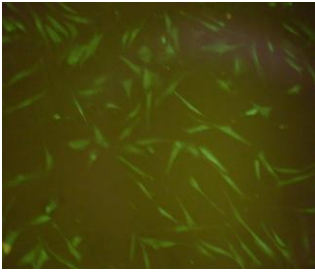


Figure 5 Green fluorescence in proliferative bone marrow mesenchymal stem cells-cytosine deaminase is expressed under fluorescence microscope (x200)  
图 5 转移扩增后的 BMSCs-CD 荧光显微镜下绿色荧光表达(x200)

由图 4, 5 可见, EGFP 基因与 CD 基因为融合基因, 转染成功者, 荧光显微镜下可看到绿色荧光存在, 镜下计数, 转染后带有绿色荧光的细胞最多能达到 10% 左右, 命名为 BMSCs-CD。

**2.4 免疫细胞化学染色结果** 应用 CD 多克隆抗体进行常规染色显示, BMSCs-CD 细胞内有棕黄色颗粒表达, 见图 6; 而对照组 BMSCs 和阴性对照均未见棕黄色颗粒表达。

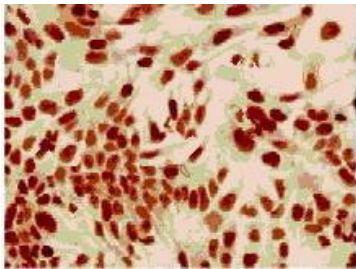


Figure 6 Cytosine deaminase polyclonal antibody staining in bone marrow mesenchymal stem cells-cytosine deaminase cells (3,3'-diaminobenzidine coloration, x400)  
图 6 BMSCs-CD 细胞 CD 多克隆抗体染色 (DAB 显色, x400)

**2.5 TUNEL 试验结果** 实验组细胞在荧光显微镜下可见到大量的凋亡信号, 见图 7; 而对照组无细胞染色。

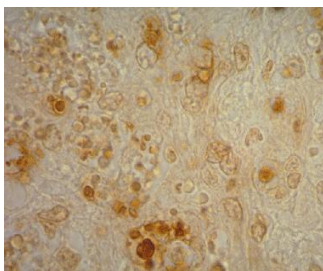


Figure 7 Under co-culture conditions, apoptosis of C6 cells (3,3'-diaminobenzidine coloration, x400)  
图 7 共培养条件下 C6 细胞凋亡(DAB 显色, x400)

**2.6 流式细胞术检测结果** 流式细胞术检测 C6 细胞凋亡率结果显示, 实验组 C6 细胞最高凋亡率 20.7%, 见图 8; 与对照组相比差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 见图 9。说明共培养系统中的 C6 细胞对前药 5-FC 敏感, 见表 1。

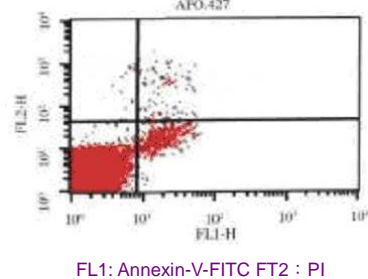


Figure 8 Apoptotic rate of co-cultured C6 cells tested by flow cytometry is 20.7% in the experimental 5-fluorocytosine 200 mg/L group  
图 8 实验组共培养条件下的 C6 细胞流式细胞术检测 5-FC 200 mg/L 组凋亡率 20.7%

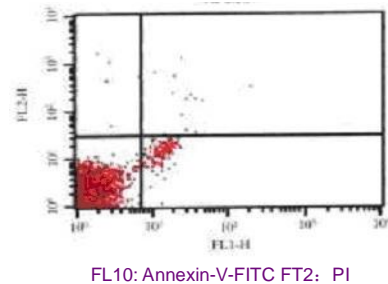


Figure 9 Apoptotic rate of co-cultured C6 cells tested by flow cytometry is 2.8% in the control group  
图 9 对照组共培养条件下的 C6 细胞流式细胞术检测凋亡率 2.8%

表 1 流式细胞术检测共培养条件下 C6 胶质瘤细胞的凋亡率

Table 1 Apoptotic rate of co-cultured C6 glioma cells tested by flow cytometry ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Cells	5-FC (mg/L)	Apoptotic rate (%)
BMSCs	0	7.02±1.73
BMSCs	50	7.55±1.74
BMSCs-CD	0	6.75±1.45
BMSCs-CD	50	8.46±2.23
BMSCs-CD	100	18.52±1.52 <sup>a</sup>
BMSCs-CD	200	25.37±1.15 <sup>a</sup>

BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; CD: cytosine deaminase; 5-FC: 5-fluorocytosine; <sup>a</sup> $P < 0.01$ , vs. other groups (raw data by the square root of the arcsine function of conversion)

**2.7 MTT 试验结果** 共培养系统中的 C6 胶质瘤细胞存活率与对照组 C6 细胞的存活率相比, 差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 在实验范围内, C6 细胞的存活率随着 5-FC 的浓度升高而降低, 各组间细胞存活率差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 见表 2。

表 2 MTT 检测共培养条件下 C6 胶质瘤细胞的吸光度值  
Table 2 Absorbance value of co-cultured C6 glioma cells tested by MTT ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Cells	5-FC (mg/L)	Absorbance
BMSCs	0	1.53±0.13
BMSCs	50	1.54±0.10
BMSCs-CD	0	1.31±0.08
BMSCs-CD	50	1.06±1.10
BMSCs-CD	100	0.86±0.06
BMSCs-CD	200	0.71±0.10

BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; CD: cytosine deaminase; 5-FC: 5-fluorocytosine;  $P < 0.01$  among groups

2.8 高效液相色谱检测结果 以 5-FC 孵育的 BMSCs-CD 和 BMSCs 两种细胞进行药物质量浓度的检测结果显示, BMSCs-CD 的培养上清可同时检测到 5-FC 和 5-FU 的存在, 而 BMSCs 的培养上清内只有 5-FC 的存在, 见表 3。

表 3 5-FC 孵育后细胞培养液内 5-FU 质量浓度测定  
Table 3 Mass concentrations of 5-Fluorouracil (5-FU) in cell culture medium containing 5-fluorocytosine (5-FC) ( $\bar{x} \pm s, n=6, \text{mg/L}$ )

5-FC (mg/L)	24 h	72 h	96 h	168 h
0	0	0	0	0
50	0.299±0.010	0.689±0.042	0.897±0.090	0.845±0.096
100	3.003±0.316	5.070±0.623	11.986±0.978	14.534±1.359
200	11.284±1.461	22.477±3.164	71.877±8.216	146.614±11.829

BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; CD: cytosine deaminase; 5-FC: 5-fluorocytosine

### 3 讨论

p-EGFP-N3 载体是真核细胞表达载体。从结构上看, 该质粒具有多克隆位点, 可插入目的基因; 含有高效的功能强大的启动子 SV40 和 PCMV, 使其具有很强的复制能力, 可以使目的基因在增殖细胞中稳定表达, 满足随宿主细胞分裂时跟随胞质遗传给新生的子细胞; 载体带有 neo 基因, 可以采用 G418 筛选已成功转染了该载体的靶细胞。更重要的是该载体带有增强型绿色荧光蛋白基因, 它可在多种异源生物中表达且无细胞毒性, 由于其基因片段较小(约 717 bp), 易于构建融合基因。在荧光显微镜下, 用波长 490 nm 的紫外线激发后, 便可直接观察到绿色荧光, 其敏感度高, 为追踪、研究目的基因的表达提供了极大的方便。将 CD 基因亚克隆至 p-EGFP-N3 载体的 EcoR I 和 BamH I 的酶切位点之间。经酶切, DNA 测序证实, 融合基因构建正确。实验中观察到, 在转染后发出绿色荧光的阳性细胞的培养液中, 可以检测到 5-FU 的存在, 说明目的基因功能完整。两融合基因 EGFP 和 CD 均得到完整表达。

BMSCs 是广泛存在于体内的一类成体干细胞, 具有自我复制、多向分化潜能和定向迁移的特性。临床取材方便, 来源丰富, 体外培养较易, 在临床应用方面可实现自体移植, 不受伦理方面的影响, 这是 BMSCs 作为基因载体功能时其他各类干细胞所不及的。神经干细胞作为基因载体靶向治疗颅内胶质瘤在实验中取得一些进展<sup>[2]</sup>, 但目前的技术条件尚难为临床提供充足的神经干细胞<sup>[8]</sup>。目前有关 BMSCs 的实验研究进展较快, BMSCs 不仅具有低免疫原性, 可广泛迁移, 易于周围组织整合, 而且多种基因修饰的 BMSCs 其功能未发现有明显缺陷, 可在体内高效长期表达, 并在相当长的时期内保持本身特性不变<sup>[9-13]</sup>。有实验证实, 颅内移植和经颈内动脉移植的 BMSCs 可经过正常的大脑组织, 向肿瘤组织迁移, 均匀分布在瘤体与脑组织交界处<sup>[14]</sup>。也有实验发现, 经颈内动脉途径移植的 BMSCs 主要分布在瘤体内, 且沿血管分布<sup>[15]</sup>。基因修饰后的 BMSCs 不但保留了趋瘤性, 而且达到了治疗肿瘤的目的。Hamada 等<sup>[16]</sup>以白细胞介素 2 基因转染 BMSCs, 颅内移植治疗 9L 胶质瘤模型鼠, 结果发现实验组鼠的生存期明显延长。另外一些实验提示<sup>[16-18]</sup>: 基因修饰的 BMSCs 治疗胶质瘤, 一方面转导的基因可抑制和杀伤肿瘤细胞, 另一方面, BMSCs 可分泌多种因子, 这些因子本身具有抑制肿瘤和保护脑组织的作用。

CD/5-FC 自杀基因治疗系统已广泛用于实验中治疗各种肿瘤模型, 其主要通过‘旁观者效应’杀伤肿瘤细胞<sup>[19]</sup>。其机制包括缝隙连接、细胞凋亡、免疫吞噬等<sup>[20]</sup>。本实验中, 构建了带有增强型绿色荧光蛋白的重组质粒 p-EGFP-N3-CD, 成功以脂质体为载体将其转染入 BMSCs 得到 BMSCs-CD 细胞, 且转入 BMSCs 的 CD 基因功能完整。实验显示, 转染后的 BMSCs-CD 细胞与 BMSCs 在形态上变化不大, 仍为三角形、长梭形, 胞体也未见明显增大。课题组设计了用 transwell 共培养系统, 研究体外共培养条件下的 C6 胶质瘤细胞的凋亡情况。为观察其‘旁观者效应’, 应用了 0.4 μm 的膜孔径, 防止 BMSCs-CD 细胞的迁移和对实验结果的干扰。实验显示 5-FC 与 BMSCs-CD 单独存在时对 C6 细胞生长均无明显影响( $P > 0.01$ )。实验中, 共培养条件下的 C6 细胞, 随 5-FC 质量浓度的升高其凋亡率增加 ( $P < 0.01$ )。共培养 72 h 后, 在 200 mg/L 质量浓度的 5-FC 作用下, C6 细胞的凋亡率最高达到 20.7%, 平均  $0.1838 \pm 0.0156$ 。共培养实验中两种细胞并无接触, 0.4 μm 的膜孔径也避免了 BMSCs-CD 细胞迁移, 说明旁观者效应除上述机制外还有其他机制在起作用。可能是 BMSCs-CD/5-FC 系统分泌的毒性物质致使 C6 细胞的凋亡<sup>[21]</sup>。

真核细胞的转染工具目前应用最多的是病毒载体, 其转染率高, 但安全性是最大的临床应用障碍。非病毒

载体中脂质体应用最多,安全性高,但转染率亟待提高。脂质体转染率的高低与多种因素关系密切:脂质体的量,及其与DNA含量、靶细胞数量三者之比,靶细胞的生长状态、暴露时间及其对脂质体的耐受性,培养液成分等。实验应用脂质体作为转染的工具,是出于应用安全的初衷,却也避不开转染率低的缺点。实验中得到的最高的转染率也仅为10%左右,与文献中一致<sup>[22]</sup>。基因治疗的安全性和转染率是目前其发展亟待解决的问题。相信,随着高转染率新的非病毒载体的发现和高安全性病毒载体的构建<sup>[23-24]</sup>,基因治疗将会有更广阔的应用前景。

#### 4 参考文献

- [1] Jiang T,Zhao ZG.Beijing:People's Medical Publishing House.2008.江涛,赵志刚.脑肿瘤的化疗[M].北京:人民卫生出版社,2008.
- [2] Li S, Gao Y, Tokuyama T, et al. Genetically engineered neural stem cells migrate and suppress glioma cell growth at distant intracranial sites. *Cancer Lett.* 2007;251(2):220-227.
- [3] Zhang JF,Meng QH,Jin P,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(12):2240-2244.张建富,孟庆海,金澎,等.全骨髓贴壁法获纯化BMSC向神经干细胞的诱导分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(12):2240-2244.
- [4] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见.2006-09-30.
- [5] Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol.* 2003;123(4):702-711.
- [6] Cai WQ,Wang BY.Chengdu:Sichuan Science & Technology Press. 1994.蔡文琴,王伯云.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M].成都:四川科学技术出版社,1994.
- [7] Situ ZQ,Wu JZ.Xi'an: World Publishing Corporation.2000:134.司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,2000:134.
- [8] Ehtesham M, Kabos P, Gutierrez MA, et al. Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell-mediated delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.* 2002;62(24):7170-7174.
- [9] Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol.* 2003;31(8):723-732.
- [10] Crevensten G, Walsh AJ, Ananthkrishnan D, et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):430-434.
- [11] Deng ZF,Wang Y,Song SX,et al.Jiepaoxue Zazhi. 2005;28(5):500-503.邓志锋,汪泱,宋书欣,等.BMSC移植对大鼠脑缺血区血管新生及神经前体细胞增殖的影响[J].解剖学杂志,2005,28(5):500-503.
- [12] Rookmaaker MB, Smits AM, Tolboom H, et al. Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 2003;163(2):553-562.
- [13] Lee K, Majumdar MK, Buyaner D, et al. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol Ther.* 2001;3(6):857-866.
- [14] Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells.* 2006;24(4):1030-1041.
- [15] Li CH,Jiao BH,Kang CS,et al.Zhongguo Shenjing Jingshen Jibing Zazhi. 2006;32(4):289-293.李春晖,焦保华,康春生,等.骨髓间充质干细胞向脑胶质瘤趋向性的初步研究[J].中国神经精神疾病杂志,2006,32(4):289-293.
- [16] Hamada H, Kobune M, Nakamura K, et al. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoagents for gene therapy. *Cancer Sci.* 2005;96(3):149-156.
- [17] Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, et al. Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res.* 2003;63(12):3370-3377.
- [18] Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 2005;65(8):3307-3318.
- [19] Kuriyama S, Masui K, Sakamoto T, et al. Bystander effect caused by cytosine deaminase gene and 5-fluorocytosine in vitro is substantially mediated by generated 5-fluorouracil. *Anticancer Res.* 1998;18(5A):3399-3406.
- [20] Dilber MS, Abedi MR, Christensson B, et al. Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo. *Cancer Res.* 1997;57(8):1523-1528.
- [21] Yang XJ,Pu PY,Yao KT.Zhonghua Shiyuan Waikie Zazhi. 1999;16(1):54-55.杨学军,浦佩玉,姚开泰.恶性胶质瘤自杀基因治疗中旁效应的机理[J].中华实验外科杂志,1999,16(1):54-55.
- [22] Clements BA, Incani V, Kucharski C, et al. A comparative evaluation of poly-L-lysine-palmitic acid and Lipofectamine 2000 for plasmid delivery to bone marrow stromal cells. *Biomaterials.* 2007;28(31):4693-4704.
- [23] Haleem-Smith H, Derfoul A, Okafor C, et al. Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Biotechnol.* 2005;30(1):9-20.
- [24] Aluigi M, Fogli M, Curti A, et al. Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24(2):454-461.

来自本文课题的更多信息——

**基金资助:** 山东省自然科学基金重点项目(Z2006C02), 课题名称: 基因工程化神经干细胞治疗胶质瘤的实验研究。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

#### CRTER 杂志 “干细胞培养与移植” 的组稿内容: 本刊学术部

- 干细胞系的获取、建立及质量控制程序
- 干细胞标志物
- 干细胞重编程
- 干细胞的优化筛选
- 干细胞体内迁移与示踪
- 干细胞表观遗传
- 干细胞培养的具体方案及扩增
- 干细胞生长微环境
- 多能干细胞的诱导
- 干细胞培养基及试剂
- 干细胞基因转染
- 干细胞移植的临床应用
- 干细胞的分化、诱导、增殖、冻存
- 干细胞调控因子及信号通道
- 干细胞生物学特性的鉴定与分析
- 干细胞归巢