

多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃ 纳米颗粒标记不影响神经母细胞瘤干细胞的活化和增殖

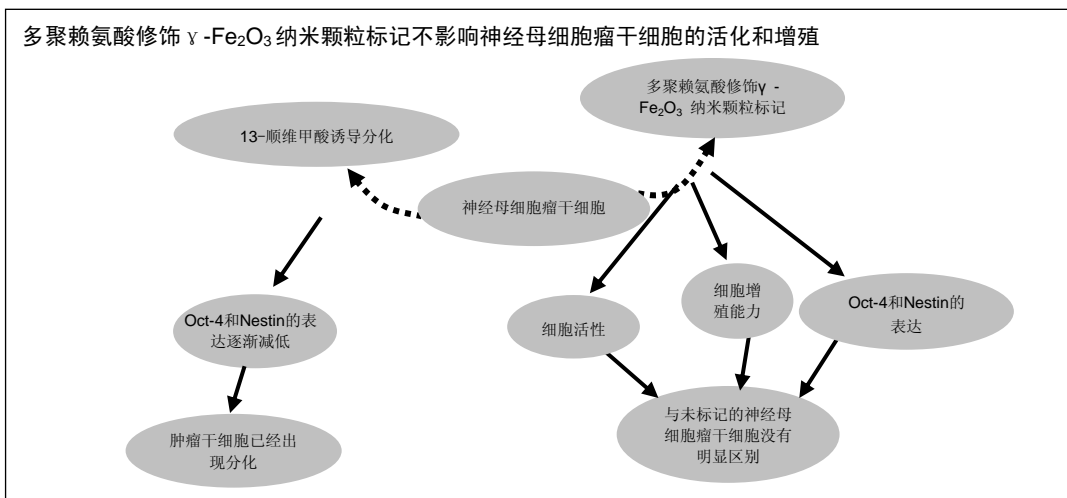
仲智勇, 时保军, 周 辉, 王文博(河北医科大学第二医院小儿外科, 河北省石家庄市 050017)

引用本文: 仲智勇, 时保军, 周辉, 王文博. 多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃ 纳米颗粒标记不影响神经母细胞瘤干细胞的活化和增殖 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(10):1419-1425.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.10.007

ORCID: 0000-0001-9950-0495 (仲智勇)

文章快速阅读:



仲智勇, 男, 1970年生, 河北省唐山市人, 汉族, 1995年河北医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事小儿肿瘤方面的研究。

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)10-01419-07

稿件接受: 2016-01-24

http://www.crter.org

文题释义:

纳米颗粒: 纳米颗粒是一种人工制造的、大小不超过 100 nm 的微型颗粒, 可以为乳胶体、聚合物、陶瓷颗粒、金属颗粒和碳颗粒, 纳米颗粒能够渗透到膜细胞中, 并沿神经细胞突触、血管和淋巴管传播, 纳米颗粒有选择性地积累在不同的细胞和一定的细胞结构中, 为药物的使用提供了有效性。

巢蛋白: 归为第IV类中间丝蛋白, 分布在细胞浆内, 参与细胞骨架的构成。巢蛋白表达起始于胚胎早期神经前体细胞, 在胚胎脑中呈时空序列性表达, 目前主要作为神经干细胞的标记蛋白, 应用于神经干细胞的分离、鉴定和培养。**Nestin** 在中枢神经损伤后能重新表达, 可作为中枢神经系统损伤的早期、快速应答的敏感指标。

摘要

背景: 维甲酸是最有潜力的神经母细胞瘤微小残留病灶的诱导剂, 能诱导体内细胞分化, 同时伴有肿瘤细胞增殖减低。

目的: 探讨纳米颗粒标记对神经母细胞瘤干细胞生物学特性的影响以及 13-顺维甲酸对神经母细胞瘤干细胞的诱导分化作用。

方法: 采用无血清悬浮培养法体外分离培养神经母细胞瘤干细胞, 多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃ 纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞, 在含有 13-顺维甲酸的培养液中诱导分化培养, RT-PCR 法检测标记前后和诱导前后 Oct-4 的表达变化, 用细胞免疫荧光法观察标记前后和诱导前后 nestin 的表达变化。

结果与结论: ①20 例患者的骨髓标本中有 5 例成功培养出神经母细胞瘤干细胞。②多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃ 纳米颗粒标记不影响神经母细胞瘤干细胞的活性和增殖能力, Oct-4 mRNA 表达和 nestin 表达也没有明显变化。③加入 13-顺维甲酸培养后, 细胞形态发生变化, 生长速度减慢, Oct-4 mRNA 表达和 nestin 表达逐渐降低。④结果表明多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃ 纳米颗粒可以用于标记神经母细胞瘤干细胞, 13-顺维甲酸可以诱导神经母细胞瘤干细胞分化。

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 神经母细胞瘤; γ -Fe₂O₃; 纳米颗粒; 13-顺维甲酸; 肿瘤干细胞; 细胞分化

主题词:

肿瘤干细胞; 神经母细胞瘤; 维甲酸; 组织工程

Zhong Zhi-yong, Master,
Associate chief physician,
Department of Pediatric
Surgery, Second Affiliated
Hospital of Hebei Medical
University, Shijiazhuang
050017, Hebei Province,
China

基金资助:
河北省2013年医学科学研究课题计划(20130151)

Polylysine-modified γ - Fe_2O_3 nanoparticle labeling has no effect on neuroblastoma stem cell activation and proliferation

Zhong Zhi-yong, Shi Bao-jun, Zhou Hui, Wang Wen-bo (Department of Pediatric Surgery, Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Retinoic acid is the most promising inducer for neuroblastoma minimal residual lesion, and it can induce cell differentiation *in vivo*, accompanied by reducing tumor cell proliferation.

OBJECTIVE: To study the effect of nanoparticle labeling on biological characteristics of neuroblastoma stem cells, and the role of 13-cis retinoic acid to induce differentiation of neuroblastoma stem cells.

METHODS: Neuroblastoma stem cells were isolated and cultured *in vitro* using serum-free suspension culture method, labeled with polylysine-modified γ - Fe_2O_3 nanoparticles and induced in culture medium containing 13-cis retinoic acid. RT-PCR was used to detect the expression of Oct-4 before and after labeling as well as before and after induction. Immunofluorescence method was used to detect the expression of nestin before and after labeling as well as before and after induction.

RESULTS AND CONCLUSION: Neuroblastoma stem cells were successfully cultured in the bone marrow samples from 5 of 20 cases. Polylysine-modified γ - Fe_2O_3 nanoparticle labeling did no influence the viability and proliferation ability of neuroblastoma stem cells, and also had no effect on Oct-4 mRNA and nestin expression. After cultured in the culture medium containing 13-cis retinoic acid, the cell shape changed and the growth rate slowed down. Moreover, the expression of Oct-4 mRNA and nestin was gradually reduced. These findings indicate that polylysine-modified γ - Fe_2O_3 nanoparticles can be used to label neuroblastoma stem cells, and 13-cis retinoic acid can induce the differentiation of neuroblastoma stem cells.

Subject headings: Neoplastic Stem Cells; Neuroblastoma; Tretinoin; Tissue Engineering

Funding: the Medical Science Research Project of Hebei Province in 2013, No. 20130151

Cite this article: Zhong ZY, Shi BJ, Zhou H, Wang WB. Polylysine-modified γ - Fe_2O_3 nanoparticle labeling has no effect on neuroblastoma stem cell activation and proliferation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(10):1419-1425.

0 引言 Introduction

神经母细胞瘤起源于交感神经系统, 主要通过血液和淋巴转移, 属于神经内分泌肿瘤。神经母细胞瘤的临床表现多种多样, 且发展快, 恶性程度高, 早期就容易发生转移, 大多发现时已处于晚期, 一般预后比较差, 存活率低。治疗手段主要以手术以及放化疗为主, 但总体效果欠佳, 不良反应比较大, 并且容易复发。

肿瘤干细胞是存在于肿瘤组织中一群细胞, 具有与干细胞相似的增殖和分化特性, 与肿瘤的发生和演变有关, 肿瘤的复发转移以及耐药均与肿瘤干细胞有关。神经母细胞瘤细胞在体外培养形成的细胞球具有干细胞的特性, 因此考虑神经母细胞瘤的复发可能与神经母细胞瘤干细胞有关。如何对神经母细胞瘤干细胞进行标记以及诱导其分化是神经母细胞瘤干细胞的研究内容之一。纳米颗粒具有比较好的生物相容性, 可以非侵袭性标记细胞, 并追踪被标记细胞的增殖分化以及在疾病发展和治疗中的作用。维甲酸是神经母细胞瘤细胞的诱

导剂, 能够诱导细胞分化和凋亡, 并可以抑制肿瘤细胞的增殖。

实验对神经母细胞瘤干细胞进行体外分离培养, 用多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记细胞, 观察其对神经母细胞瘤干细胞生物学特性的影响, 并探讨13-顺维甲酸对神经母细胞瘤干细胞的诱导分化作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 于2014年1至11月在河北医科大学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 骨髓液 收集20例伴有骨髓转移的IV期神经母细胞瘤患者的骨髓液, 年龄30-60岁, 骨髓涂片发现有成团的肿瘤细胞, 流式分析仪鉴定 $\text{CD}81^+\text{CD}56^+\text{CD}45^-$ 细胞为神经母细胞瘤细胞。

1.3.2 主要试剂 DMEM/F12培养液、胰蛋白酶

(Gibco); 胎牛血清(Biochrom); 牛血清白蛋白(上海鼎国公司); 13-顺维甲酸、二甲基亚砜、多聚赖氨酸(Sigma); 青链霉素双抗溶液(沈阳东药集团公司); 人表皮生长因子、人碱性成纤维生长因子(Invitrogen); D-Hank's液(上海钮森公司); 小鼠抗人nestin单克隆抗体(Abcam); Cy3标记羊抗鼠IgG二抗(Jackson ImmunoResearch Laboratories); PBS(北京中山生物技术公司); 谷氨酰胺(美国Hyclone公司)。

1.3.3 主要仪器 恒温CO₂培养箱(BIO-RAD公司); 倒置荧光显微镜(Nikon); 细胞计数器(上海添华达公司); -80℃超低温冰箱(中科美菱低温科技有限责任公司); 10 mL移液管、流式细胞仪、酶联免疫检测仪(Bio-Rad); 15, 50 mL离心管和T75培养瓶(Corning); 1.8 mL细胞冻存管(NUNC)。

1.4 实验方法

1.4.1 神经母细胞瘤细胞的分离、培养、传代 分别取20例神经母细胞瘤患者的骨髓液3 mL, 用Ficoll分离液分离出单个核细胞, 置入25 cm²培养瓶中, 重悬于无血清DMEM/F12培养基, 调整细胞浓度为 1×10^8 L⁻¹, 于37℃, 体积分数为5%CO₂培养箱培养, 每3 d向培养基中加入新鲜无血清培养基, 每7 d传代1次。

1.4.2 实验分组 将第3代神经母细胞瘤干细胞分为3组, 一组用于13-顺维甲酸诱导分化, 一组用于多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃纳米颗粒标记, 一组为神经母细胞瘤干细胞对照组, 不做任何处理。

1.4.3 合成 γ -Fe₂O₃纳米颗粒 吸取去离子水+FeCl₃溶液进行搅拌, 加入Na₂SO₃, 当颜色变为黄色时加入NH₃·H₂O, 生成黑色沉淀, 脱氧水洗滌, 蒸馏水稀释后用HCL调整pH值, 在110℃空气中搅拌使溶液颜色变为赤褐色, 洗滌干燥后研磨过滤即可得到 γ -Fe₂O₃纳米颗粒。

1.4.4 多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃纳米颗粒 将 γ -Fe₂O₃纳米颗粒加入到RPMI-1640培养基中混匀加入0.1 g/L多聚赖氨酸1 mL孵育24 h, 即可得到多聚赖氨酸修饰的 γ -Fe₂O₃纳米颗粒。

1.4.5 多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞 收集神经母细胞瘤干细胞球, 用0.25%胰蛋白酶溶液消化, 吹打成单细胞悬液, 接种到24孔板上培养35 h, 加入多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃纳米颗粒标记培养24 h后再加入原培养基培养。

1.4.6 多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞球的活性及增殖能力 神经母细胞瘤干细胞球的活性采用FDA和PI荧光双染法进行分析, 死细胞

被染成红色, 活细胞被染成绿色; 采用MTT法检测神经母细胞瘤干细胞球的增殖能力: 神经母细胞瘤干细胞球去除培养基, 加入MTT液孵育, 酶标仪测定培养12, 24, 72, 120 h的吸光度值, 根据吸光度值分析其增殖能力。

1.4.7 13-顺维甲酸诱导分化 收集培养的第2代神经球, 机械法打散细胞, 在含体积分数为10%胎牛血清DMEM/F12培养基中过夜培养, 细胞贴壁后, 第2天加入5 μ mol/L 13-顺维甲酸, 每3 d消化传代1次, 并加入5 μ mol/L 13-顺维甲酸。

1.4.8 RT-PCR法检测神经球细胞Oct-4 mRNA表达 采用Trizol法分别提取未经13-顺维甲酸诱导、13-顺维甲酸诱导第3天及诱导第9天的神经母细胞瘤神经球细胞的总RNA, 经反转录得到cDNA, 然后进行PCR反应检测干细胞的特异表达基因Oct-4的表达水平。同种方法检测多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞与未标记神经母细胞瘤干细胞的Oct-4表达水平。

1.4.9 细胞免疫荧光法检测nestin的表达 收集未经13-顺维甲酸诱导分化的神经母细胞瘤神经球细胞和经13-顺维甲酸诱导9 d的神经球细胞, 调整细胞浓度为 1×10^8 L⁻¹, 接种于含有盖玻片的24孔培养板中, 待细胞贴壁后取出盖玻片, 经多聚甲醛固定10 min, PBS冲洗后用含0.1% Triton X-100的PBS破膜30 min, 滴加5%BSA室温封闭1 h, 加入nestin一抗孵育2 h, 再用PBS洗滌, 加入Cy3标记的二抗避光反应30 min, DAPI进行核染, PBS冲洗, 待干燥后封固, 荧光显微镜下拍照观察。同种方法检测多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞与未标记神经母细胞瘤干细胞的nestin表达。

1.5 主要观察指标 ①神经母细胞瘤神经球形态。②神经母细胞瘤干细胞的活性。③神经母细胞瘤干细胞的增殖能力。④神经母细胞瘤干细胞Oct-4与nestin的表达。

2 结果 Results

2.1 神经母细胞瘤神经球的培养及诱导分化 20例神经母细胞瘤患者的骨髓液标本中有5例分离出神经母细胞瘤细胞。在无血清培养基中培养4-6 d, 出现悬浮神经球, 经传代培养后, 神经球再次分裂增殖, 其中有3例在传代培养中出现贴壁分化, 有2例稳定传代。神经球细胞在有血清培养基中开始贴壁生长, 呈星形或三角形, 细胞突起较短(图1A), 加入13-顺维甲酸后生长速度减慢, 形态发生改变, 突起增长增多, 连接成网状(图1B, C)。

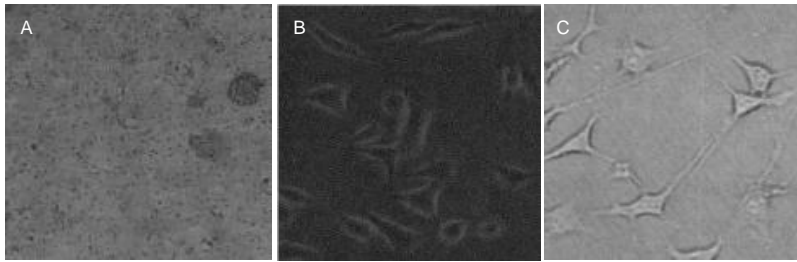


图1 神经母细胞瘤神经球的培养及诱导分化 ($\times 100$)

Figure 1 Culture and induced differentiation of neuroblastoma stem cells ($\times 100$)

图注: 图中 A 为培养 6 d 出现悬浮神经球; B, C 为加入 13-顺维甲酸后 3, 9 d, 神经球细胞形态发生改变, 突起增长增多, 连接成网状。

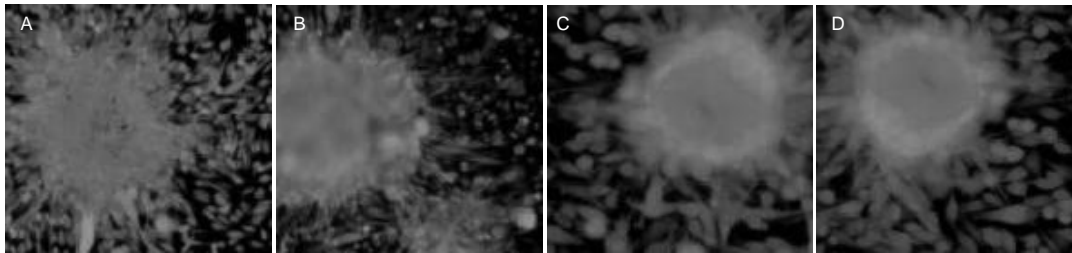


图2 FDA 和 PI 荧光双染法观察多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞球的活性($\times 200$)

Figure 2 FDA and PI fluorescence double staining method to observe the activity of polylysine-modified γ - Fe_2O_3 nanoparticle-labeled neuroblastoma stem cells ($\times 200$)

图注: 图中 A 为培养 72 h 多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记组神经母细胞瘤干细胞; B 为培养 72 h 未标记组神经母细胞瘤干细胞; C 为培养 120 h 多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记组神经母细胞瘤干细胞; D 为培养 120 h 未标记组神经母细胞瘤干细胞。

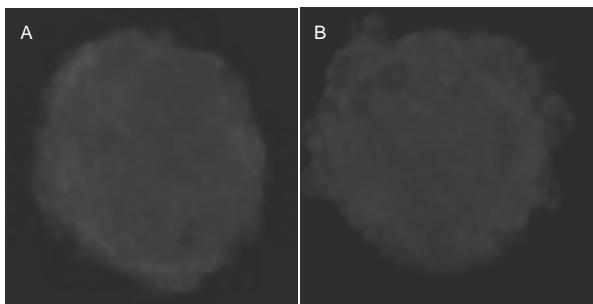


图3 细胞免疫荧光法观察多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞球 nestin 的表达($\times 200$)

Figure 3 Expression of nestin in the neuroblastoma stem cells labeled with polylysine-modified γ - Fe_2O_3 nanoparticles ($\times 200$)

图注: 图中 A 为多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记组; B 为未标记组。

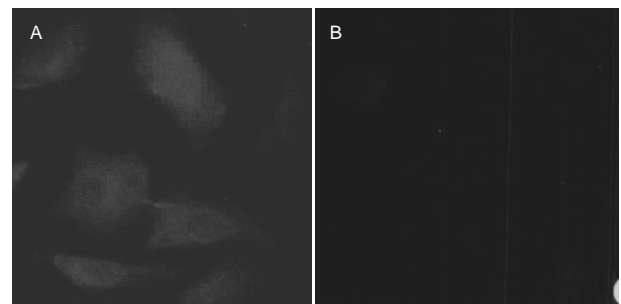


图4 细胞免疫荧光法观察 13-顺维甲酸诱导前后神经母细胞瘤神经球 nestin 的表达($\times 200$)

Figure 4 Expression of nestin in the neuroblastoma stem cells before and after induction with 13-cis retinoic acid (immunofluorescence, $\times 200$)

图注: 图中 A 为未经 13-顺维甲酸诱导神经母细胞瘤干细胞 nestin 表达; B 为经 13-顺维甲酸诱导第 9 天时 nestin 的表达。

2.2 多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞的活性 FDA和PI双染色结果显示: 在培养 24, 72, 120 h 后多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞具有良好的活性, 与未标记组神经母细胞瘤干细胞的活性相似, 两者比较无明显差别, 表明多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞不影响其活性, 见图2。

2.3 多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞的增殖能力 多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞在培养 12, 24, 72, 120 h 增殖旺盛, 其增殖能力与未标记的神经母细胞瘤干细胞没有明显区别, 表明多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3

纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞不影响其增殖能力。

2.4 多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞Oct-4与nestin的表达 多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记的神经母细胞瘤干细胞Oct-4及nestin的表达均呈强阳性, 表明多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记不影响神经母细胞瘤干细胞标志物的表达, 见图3。

2.5 13-顺维甲酸诱导前后神经母细胞瘤干细胞Oct-4和nestin的表达 经RT-PCR检测, 未分化的神经母细胞瘤神经球细胞有Oct-4的表达, 经13-顺维甲酸诱导第3天, Oct-4的表达逐渐减低, 至诱导第9天Oct-4的表达

逐渐消失。经细胞免疫荧光法检测, 未进行13-顺维甲酸诱导的神经母细胞瘤神经球细胞有nestin的表达, 经13-顺维甲酸诱导第9天nestin的表达减弱比较明显, 表明肿瘤干细胞已经出现分化, 见图4。

3 讨论 Discussion

神经母细胞瘤是儿童最常见的肿瘤^[1], 占儿童所有肿瘤的8%–10%, 其中男性多于女性。神经母细胞瘤的恶性程度比较高, 加上治疗强度比较大, 由此引起的不良反应不能忽视^[2], 根据不同的危险度采用不同的治疗方法非常必要, 对于低危患者一般采用手术切除治疗, 有个别手术联合化疗^[3], 对于中危患者一般采用手术和化疗联合治疗, 对于高危患者一般采用综合治疗^[4]: ①诱导治疗^[5]: 诱导治疗的原则是将肿瘤细胞降到最低, 把体内的耐药肿瘤细胞减少到一定程度。一般采用6个疗程的化疗, 第4个疗程化疗后尽可能切除肿瘤。②巩固治疗^[6]: 造血干细胞移植治疗, 自体骨髓移植和异基因骨髓移植的远期效果相似, 目前多采用马法兰为主的单纯化疗进行预处理, 将移植的不良反应降到最低, 对移植是否需要净化的问题^[7], 有研究证实净化并不能提高治疗效果^[8]。③局部放疗: 待移植后血象正常开始进行放疗, 放疗对减少肿瘤原发部位的复发具有重要作用。④维持治疗: 维甲酸可以诱导神经细胞瘤细胞分化, 使移植治疗后残留的神经母细胞瘤细胞分化为成熟细胞, 因此维持治疗多采用维甲酸, 在维甲酸治疗的基础上联合单克隆抗体以及细胞因子治疗也取得一定疗效^[9-10]。对于复发及难治性的高危神经母细胞瘤的治疗处理增加化疗疗程及剂量, 替西罗莫司能够抑制神经母细胞的增殖和分化, 在临床上取得了一定效果^[11], 神经营养素信号抑制剂对于晚期神经母细胞瘤也起到一定作用^[12]。目前的治疗方法对神经母细胞瘤患者的生存率略有增加^[13], 随着新的治疗方法的出现, 其治愈率会不断增加。

维甲酸能够促进上皮细胞的增殖分化和影响骨骼的生长发育^[14], 主要用于治疗银屑病、痤疮等皮肤病^[15-17]。维甲酸能够诱导细胞分化和凋亡、调节细胞的增生、抑制肿瘤细胞的生成^[18]。维甲酸以单纯弥散的途径进入细胞内, 在体内受细胞色素P450酶亚型的调控^[19], 维甲酸受体包括RARs及RXRs两个子受体家族^[20-23]。维甲酸在多种疾病中都有较好的应用: ①皮肤病: 维甲酸在多种皮肤病中被广泛应用, 维甲酸是治疗银屑病的主要药物^[24-25], 通过和维甲酸受体结合, 发挥抗炎、抗微血

管形成、调节细胞增殖分化作用治疗银屑病; 维甲酸治疗痤疮的效果也比较好^[26-28], 主要利用其能够调节炎症、免疫、皮脂腺活性以及角质形成细胞的增殖分化特性治疗痤疮; 维甲酸在皮肤癌中也有广泛应用, 主要利用其诱导癌症细胞生长抑制、分化以及凋亡发挥抗肿瘤作用^[29-30]。②血液系统疾病: 维甲酸可以和急性早幼粒细胞白血病的维甲酸受体结合, 导致低磷酸化, 使受体融合蛋白降解, 诱导呈递细胞分化, 促进急性早幼粒细胞白血病恢复^[31-33]; 维甲酸对细胞分化和细胞凋亡以及基因表达有调控作用, 因此可以用于治疗骨髓增生异常综合征^[34-36]; 维甲酸是一种免疫调节剂及诱导分化剂, 治疗难治性特发性血小板减少性紫癜有一定效果^[37-40]。③实体瘤: 维甲酸对细胞的有丝分裂有调控作用, 可以诱导肿瘤细胞的凋亡, 对肿瘤细胞有杀灭作用^[41], 可用于肝癌、胃癌、肺癌等多种肿瘤的治疗^[42]。④抗纤维化^[43]: 维甲酸有抑制纤维化形成以及降解纤维化物质的作用, 治疗肺和肾纤维化有一定效果。⑤治疗神经疾病: 维甲酸能够诱导和保护神经细胞的生长分化^[44], 使其有可能成为脊髓损伤的有效治疗药物, 在抗胶质瘤方面可以使胶质瘤的特异性趋向升高, 参与神经嵴细胞的增殖和分化^[45-46]。⑥重症肌无力: 维甲酸有免疫调节作用, 重症肌无力为自身免疫性疾病, 维甲酸能够缓解重症肌无力症状, 逆转病理学改变^[47]。⑦心血管疾病^[48]: 维甲酸有改善血管内皮细胞功能和防止动脉粥样硬化的作用, 能够抑制心肌纤维化和血管内膜的增厚。

随着神经母细胞瘤治疗方案的不断改进, 使其预后有所改善, 但晚期复发率和转移率仍比较高。神经母细胞瘤干细胞是一种与干细胞相似的细胞, 具有增殖和分化潜能, 与肿瘤的发生发展以及复发转移等密切相关。神经母细胞瘤干细胞的成功标记也是目前研究的内容之一。纳米颗粒进行细胞标记在很多领域有着广泛应用, 除了标记一般细胞外, 近年来在标记各种干细胞中也被广泛报道。目前对纳米颗粒标记干细胞是否对干细胞的生物学特性造成影响仍有争议, 有研究认为纳米颗粒标记干细胞会影响干细胞部分增殖和分化能力, 也有研究认为纳米颗粒对干细胞的增殖和分化等生物学特性没有影响。实验用多聚赖氨酸修饰 γ -Fe₂O₃纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞, 发现其不影响神经母细胞瘤干细胞的活性及增殖能力, 对其肿瘤标记物的表达也没有影响。

维甲酸是神经母细胞瘤细胞的诱导剂, 能够诱导残

留的微小病灶进行细胞分化, 并可以抑制肿瘤细胞的增殖。研究发现, 神经母细胞瘤干细胞经 13-维甲酸诱导后 Oct-4 和 nestin 的表达逐渐减低, 至诱导后第 9 天两者的表达逐渐消失。Nestin 是神经干细胞与神经祖细胞的特异性标记物, Oct-4 只在多能干细胞内表达, 随着多能干细胞的分化和多能性的消失, Oct-4 的表达也逐渐降低。

综上所述, 多聚赖氨酸修饰 γ - Fe_2O_3 纳米颗粒标记神经母细胞瘤干细胞对其生物学特性没有影响, 13-顺维甲酸能够诱导神经母细胞瘤干细胞分化, 为其治疗神经母细胞瘤残留的微小病灶提供了实验依据。

作者贡献: 第一作者负责设计和实施, 第二、三、四作者负责实施及文章的修改。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 试验方案已经河北医科大学第二医院伦理委员会讨论批准, 经患者和相关家属知情同意, 并签署知情同意书。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 郭海霞, 黎阳, 薛红漫, 等. 儿童神经母细胞瘤的临床分析[J]. 中华妇幼临床医学杂志: 电子版, 2010, 5(1): 50.
- [2] Cohen LE, Gordon JH, Popovsky EY, et al. Late effects in children treated with intensive multimodal therapy for high-risk neuroblastoma: high incidence of endocrine and growth problems. Bone Marrow Transplant. 2014;49(4):502-508.
- [3] 张大伟, 周春菊, 金眉, 等. 儿童神经母细胞瘤临床病理分析[J]. 中国肿瘤, 2009, 18(7): 70.
- [4] Vogelzang NJ, Benowitz SI, Adams S, et al. Clinical cancer advances 2011: Annual Report on Progress Against Cancer from the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol. 2012;30(1):88-109.
- [5] Gaze MN, Gains JE, Walker C, et al. Optimization of molecular radiotherapy with [^{131}I]-meta Iodobenzylguanidine for high-risk neuroblastoma. Q J Nucl Med Mol Imaging. 2013;57(1):66-78.
- [6] 江贤萍, 周家秀, 王国兵, 等. 神经母细胞瘤 24 例临床和病理特点[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 18(1): 55.
- [7] 钟丽, 陈艳霞, 邹杰, 等. 儿童神经母细胞瘤肺转移的临床影像分析[J]. 放射学实践, 2011, 26(8): 883-885.
- [8] Kreissman SG, Seeger RC, Matthay KK, et al. Purged versus non-purged peripheral blood stem-cell transplantation for high-risk neuroblastoma (COG A3973): a randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 2013;14(10):999-1008.
- [9] 胡荣兵, 周文明. 儿童神经母细胞瘤的 CT 诊断[J]. 中国现代医药杂志, 2011, 10(1): 50-52.
- [10] 刘平, 吴惧, 张辉韵, 等. 儿童神经母细胞瘤合并眼球阵挛-肌阵挛综合征 1 例[J]. 中国实用儿科杂志, 2011, 26(11): 875-876.
- [11] Morgenstern DA, Baruchel S, Irwin MS. Current and future strategies for relapsed neuroblastoma: challenges on the road to precision therapy. J Pediatr Hematol Oncol. 2013;35(5):337-347.
- [12] 李彦格, 管玉洁, 邹旭凤, 等. 儿童神经母细胞瘤 26 例临床分析[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(11): 15-16.
- [13] 吴鑫, 何大维, 张永波, 等. 粒细胞集落刺激因子及其受体在儿童神经母细胞瘤中的表达研究[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(12): 1103-1106.
- [14] 黄帆, 刘映孜, 杨秋琨, 等. 全反式维甲酸增强骨形态蛋白 9 诱导间充质干细胞成骨分化作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(4): 328-331.
- [15] 严昉, 陈连军. 维甲酸类药物在皮肤科疾病治疗中的应用[J]. 上海医药, 2010, 31(4): 156-159.
- [16] 孙宇强, 王雪, 关兴芳, 等. 维甲酸及其受体与肿瘤关系的研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(3): 295-301.
- [17] 张斌. 核激素受体在皮肤主要构成细胞和表皮鳞癌 A431 细胞中的表达及其部分配体的调节效应[D]. 重庆: 第三军医大学, 2013.
- [18] Alizadeh F, Bolhassani A, Khavari A, et al. Retinoids and their biological effects against cancer. Int Immunopharmacol. 2014;18(1):43-49.
- [19] Das BC, Thapa P, Karki R, et al. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. Bioorg Med Chem. 2014;22(2):673-683.
- [20] Samarut E, Fraher D, Laudet V, et al. ZebRA: An overview of retinoic acid signaling during zebrafish development. Biochim Biophys Acta. 2015;1849(2): 73-83.
- [21] Álvarez R, Vaz B, Gronemeyer H, et al. Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. Chem Rev. 2014;114(1):1-125.

- [22] Mendoza-Parra MA, Gronemeyer H. Genome-wide studies of nuclear receptors in cell fate decisions. *Semin Cell Dev Biol.* 2013;24(10-12):706-715.
- [23] Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J Lipid Res.* 2013;54(7):1761-1775.
- [24] Zhang Y, Maksimovic J, Naselli G, et al. Genome-wide DNA methylation analysis identifies hypomethylated genes regulated by FOXP3 in human regulatory T cells. *Blood.* 2013;122(16):2823-2836.
- [25] 王忠永, 邱会芬, 蒋延伟. 阿维A对寻常型银屑病患者外周血Th17/Treg细胞转录因子ROR γ t和Foxp3表达影响的研究[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2012, 6(24): 8156-8159.
- [26] 王沪凯. 维甲酸药物对皮肤病的治疗探讨[J]. 中国药物经济学, 2012, 7(3): 24-25.
- [27] 陈辉, 房晶晶, 吴海娟, 等. 痤疮患者经异维A酸系统治疗后外周血CD14+单核细胞TLR2的表达变化[J]. 皮肤病性病诊疗学杂志, 2013, 20(2): 77-79.
- [28] 王忠永, 李侃, 邱盼盼, 等. 寻常痤疮患者外周血单核细胞TLR2的表达及其与IL-8和TNF- α 的相关性研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2011, 44(2): 121-123.
- [29] Leysens C, Verlinden L, Verstuyf A. Antineoplastic effects of 1,25(OH)₂D₃ and its analogs in breast, prostate and colorectal cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(2):R31-47.
- [30] Wang H, Liu K, Geng M, et al. RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res.* 2013;73(10):3097-3108.
- [31] 黄敏, 许洪志, 隋潇徽, 等. 急性早幼粒细胞白血病治疗的研究[J]. 临床血液学杂志, 2011, 24(11): 426-428.
- [32] 郑琼波. ATRA联合三氧化二砷在急性早幼粒细胞白血病治疗中的临床应用研究[J]. 中国现代医生, 2011, 49(20): 73-74.
- [33] 贺甜甜, 史伟, 赵万红, 等. 维甲酸与急性早幼粒细胞白血病(APL)[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 18(10): 2081-2084.
- [34] 马清君, 李伟平, 张怀东. 亚砷酸、维甲酸联合小剂量化疗治疗骨髓增生异常综合征的临床疗效[J]. 现代肿瘤医学, 2005, 13(4): 517-518.
- [35] 李波, 窦芳. 利度胺联合司坦唑醇和维A酸治疗低危骨髓增生异常综合征[J]. 中国实用医药, 2012, 12(7): 192-193.
- [36] 孔荣, 邱宏春, 吴鹏飞, 等. 小剂量沙利度胺联合十一酸睾酮和维A酸治疗低危骨髓增生异常综合征[J]. 临床荟萃, 2010, 25(2): 158-160.
- [37] 董志高, 陈旭艳. 难治性ITP的发病机制和现代免疫治疗[J]. 中国老年保健医学, 2010, 8(5): 60-62.
- [38] 邹乐兰, 黄瑞滨. 难治性特发性血小板减少性紫癜的治疗进展[J]. 实用临床医学, 2011, 16(5): 232-234.
- [39] 刘文宾, 王兆钺, 曹丽娟, 等. 全反式维甲酸对于难治性ITP的疗效观察及其机理探讨[J]. 血栓与止血学, 2010, 16(1): 15-17.
- [40] 刘文宾, 王兆钺, 曹丽娟, 等. 全反式维甲酸治疗难治性特发性血小板减少性紫癜疗效观察及其机制探讨[J]. 苏州大学学报:医学版, 2009, 29(3): 476-479.
- [41] 施锐, 张素梅, 桂淑玉, 等. 全反式维甲酸对人胃癌细胞株caveolin-1表达和定位的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(3): 249-252.
- [42] 邓玉洁, 张强, 王慧, 等. 全反式维甲酸对肝癌HepG2细胞chemerin基因表达的调控[J]. 江苏大学学报:医学版, 2012, 22(2): 198-200.
- [43] 李佳鑫, 海广范, 贾岩龙, 等. 全反式维甲酸对人胚肺成纤维细胞增殖及 α -SMA表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(4): 787-790.
- [44] 钟德君, 康敏, 王高举, 等. 全反式维甲酸促大鼠胚胎神经干细胞向神经元分化中 β 连环蛋白的表达及意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(4): 305-310.
- [45] 梁晨, 郭世文. 全反式维甲酸对NT2细胞系胶质瘤趋向性的影响[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2012, 33(4): 470-473.
- [46] 刘燕雄, 单振潮, 杜勇. 全反式维甲酸诱导大鼠肠神经系统发育异常的实验研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2012, 34(3): 234-236.
- [47] 李芳华, 谢晓丽, 刘静, 等. 全反式维甲酸对实验性自身免疫性重症肌无力的治疗效果[J]. 国际免疫学杂志, 2013, 36(1): 49-53.
- [48] 王育盛. 全反式维甲酸对血管粥样硬化病变作用的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2012, 33(3): 375-378.