

携带 CD 基因骨髓间充质干细胞对 C6 大鼠胶质瘤体内抑制作用研究 *

宋 飞^{1, 2)**} 邢 琪^{3)**} 宋克东^{2)**} 刘 健¹⁾ 姬广春¹⁾ 马郁芳⁴⁾

刘天庆²⁾ 马学虎^{2)***} 田晓峰^{5)***}

¹⁾大连医科大学第二附属医院神经外科, 大连 116027;

²⁾大连理工大学精细化工国家重点实验室干细胞与组织工程研发中心, 大连 116024;

³⁾大连医科大学第一附属医院麻醉科, 大连 116011; ⁴⁾大连医科大学生物化学与分子生物学系, 大连 116044;

⁵⁾大连医科大学第二附属医院普外科, 大连 116027)

摘要 为了研究自杀基因——胞嘧啶脱氨酶基因(cytosine deaminase gene, CD 基因)对大鼠脑胶质瘤的体内治疗效果, 采用基因转导系统将慢病毒包装的 CD 基因转染骨髓间充质干细胞(MSC)并使其长时间、高效表达, 然后移植到使用颅内立体定向接种法制作的 40 只 SD 大鼠胶质瘤模型中。按接种细胞类型将实验 SD 大鼠分为 5 组, 每组 8 只: ① C6 胶质瘤; ② C6+MSCs 细胞(1:1); ③ C6+MSCs 细胞(1:2); ④ C6+MSC-codA/eGFP 细胞(1:1); ⑤ C6+MSC-codA/eGFP 细胞(1:2)。瘤龄 7 天后腹腔注射 500 mg/(kg·d) 5-氟胞嘧啶(5-flucytosine, 5-FC), 共 14 天。用磁共振成像(MRI)动态监测肿瘤的体积并进行了大鼠存活期观察、常规病理分析、RT-PCR 检测、HE 染色。结果显示, 第①组瘤龄 14 天时病灶呈圆形, 中心见坏死区, 肿瘤平均 246 mm³, 均存活期 15.3 天, 第②组平均生存期 16.0 天, 第③组平均生存期 16.6 天, 第④⑤组自然存活期均大于 30 天, 14 天时病灶平均体积分别为 55 mm³、40 mm³, 28 天时肿瘤抑制率分别为 77.24%、83.28%。MRI 扫描可清楚显示肿瘤的大小、形态和内部结构, 与病理结果高度相关; MRI 动态观察可证实携带 CD 基因的骨髓间充质干细胞及 5-FC 治疗系统治疗 C6 颅内胶质瘤有效; RT-PCR 检测结果证实肿瘤组织内有胞嘧啶脱氨酶表达。

关键词 磁共振成像, 胶质瘤, 基因治疗, CD 基因, 骨髓间充质干细胞

学科分类号 R318

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00157

脑胶质瘤是目前神经外科治疗中最棘手的难治性肿瘤之一, 由于其恶性度高、生长快、病程短、侵袭性强、手术完全切除困难^[1-3], 尽管术后辅以积极的放、化疗, 但术后仍然很快复发^[4-7], 死亡率高, 严重威胁人类健康。近年来关于胶质瘤的基因治疗有了许多尝试, 但在实际临床应用仍存在许多问题有待解决, 像基因表达载体的免疫原性、治疗基因的表达效率、治疗基因对肿瘤组织的靶向性等问题都没有解决。由于上述问题的存在, 也使得目前大部分肿瘤基因治疗研究仍处于基础理论研究水平, 很少进入实际临床应用。

胞嘧啶脱氨酶基因(cytosine deaminase gene, CD 基因)是近年来研究较成功的一类肿瘤自杀基因^[8-9], 利用载体将 CD 基因转移至肿瘤组织内, 其表达的

胞嘧啶脱氨酶可以将对人体无害的 5-氟胞嘧啶(5-flucytosine, 5-FC, Sigma)转化成对肿瘤有杀伤作用的 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU), 5-FC 在高度抗微生物活性的浓度下对哺乳动物无毒性, 经 CD 脱氨为 5-FU, 后者则具有高度细胞毒性, 从而

* 辽宁省自然科学基金(20092165), 辽宁省教委科技攻关项目(2008Z081)和大连市科学技术基金(2008E13SF203)资助项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

马学虎. Tel: 0411-84706360, Fax: 0411-83633080

E-mail: xuehuma@dlut.edu.cn

田晓峰. Tel: 0411-84671291, Fax: 0411-84672130

E-mail: txfdl@hotmail.com

收稿日期: 2011-09-06, 接受日期: 2011-12-12

在肿瘤组织中发挥其靶向的肿瘤杀伤作用。但大多实际临床实验结果显示, CD 基因对体内肿瘤的杀伤效果并不十分令人满意, 总结原因可能有以下几种: a. 基因载体的转染效率低下, 不能有效地表达治疗基因。b. 基因载体在人体内到达肿瘤的方式有限, 大多通过静脉注射给药, 但通过静脉给药的基因载体很难靶向性地达到肿瘤组织。c. 由于人体内复杂免疫系统的存在, 进入体内的基因载体往往在达到肿瘤组织前被免疫系统清除。基于以上问题, 本课题选用骨髓间充质干细胞作为治疗基因的载体。a. 骨髓间充质干细胞可以在人体采集并回输, 避免了免疫系统清除。b. 大量研究表明骨髓间充质干细胞具有肿瘤趋向性, 可以靶向性将治疗基因带到肿瘤细胞周围。c. 骨髓间充质干细胞是一种良好的基因载体, 可以有效地表达多种外源基因。因此, 本实验采用基因转导系统将慢病毒包装的 CD 基因转染骨髓间充质干细胞并使其长时间、高效表达, 然后移植到大鼠胶质瘤模型中, 并通过 MRI 观察、大鼠生存期分析及肿瘤病理等手段以证实转染了 CD 基因的 MSCs 治疗胶质瘤的有效性。

1 材料与方法

1.1 材料

C6 大鼠脑胶质瘤细胞系购置于上海中国科学院细胞库; 携带 CD 基因的骨髓间充质干细胞 C57BL/6 mMSC-codA/eGFP 为本实验前期成功构建后^[10]冻存。实验动物为 SPF 级 SD 大鼠, 由大连医科大学动物实验中心提供, 鼠龄 4~6 周, 体重 (200 ± 10) g, 共 40 只, 雌雄各半。

1.2 方法

1.2.1 C6 胶质瘤细胞的培养与传代。C6 胶质瘤细胞培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中, 并添加了(体积比)1% 双抗与 1% 谷氨酰胺, 置 37℃、饱和湿度、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 每隔 2~3 天用 0.25% 胰酶消化, 以 1:2~1:4 传代 1 次。

1.2.2 间充质干细胞(MSCs)的培养。按 1.2.1 的培养方法培养 MSCs 至第三代。接种时以 0.25% 胰蛋白酶消化, 见细胞回缩、间隙增大时吸除胰酶, PBS 液冲洗 2 遍, 加入 5 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化。用吸管反复吹打培养瓶壁细胞, 移入离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 再用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬, 放入

37℃ 恒温摇床备用。

1.2.3 MSC-codA/eGFP 细胞的传代培养。MSC-codA/eGFP 细胞在含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 0.1 g/L、L- 谷氨酰胺 2 mmol/L 的 LDMEM 培养液中培养。待细胞接近铺满瓶底约 80% 时用 0.125% 胰蛋白酶、0.02% EDTA 在 37℃ 条件下消化, 约 3 min 后立即加入含 10% FBS 的培养液终止消化。用吸管轻轻吹打培养瓶底壁, 制成单细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 然后弃上清, 加入新培养液, 按 1:2 比例接种到新的培养瓶, 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中继续培养。每 2~3 天换液 1 次。

1.2.4 动物模型的建立。

a. 细胞接种前准备: 将 MSC-codA/eGFP 细胞消化后制成 $1 \times 10^6/15 \mu\text{l}$ 的不含血清的单细胞悬液备用, 台盼蓝排斥试验检测细胞活力, 待接种的细胞活力应 > 90%。

b. 接种靶点: 鼠右侧脑尾状核为靶点, 其坐标为大鼠中点前 1.0 mm, 矢状缝右旁开 3.0~3.5 mm, 硬膜下 6.0 mm。

c. 接种方法: 术前 12 h 大鼠禁食禁水, 用 10% 水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠后, 头部用立体定位仪固定, 两耳针深入外耳道对称固定, 剪去头顶毛发, 碘酒、酒精消毒后铺洞巾, 沿正中矢状线纵向切开头皮约 1.5 cm, 分离暴露顶骨(头顶双侧眼裂连线后大约 1.5 cm 处横向切开头皮, 暴露前囟颅骨标志), 按坐标大致定位, 颅骨钻孔, 孔径 2.0 mm, 深达硬脑膜。微量注射器进针深度为硬膜下 6.0 mm, 后退回针 1.0 mm。按每只鼠 15 μl 细胞悬液于 10 min 内注入靶区, 留针 5 min, 使细胞充分沉积。缓慢拔针后用骨蜡封闭骨孔, 用生理盐水冲洗, 1 号丝线缝合头皮切口。

d. 实验分组: 按接种细胞类型分 5 组(①~⑤), 每组 8 只大鼠。① 1×10^6 C6 胶质瘤; ② 1×10^6 C6 + 1×10^6 MSCs 细胞(1:1); ③ 1×10^6 C6 + 2×10^6 MSCs 细胞(1:2); ④ 1×10^6 C6 + 1×10^6 MSC-codA/eGFP 细胞(1:1); ⑤ 1×10^6 C6 + 2×10^6 MSC-codA/eGFP 细胞(1:2)。

e. 治疗方法: 5 组均在瘤龄 7 天后, 腹腔注射 5-FU 500 mg/(kg·d), 连续给药 14 天。

1.2.5 观察指标。

a. 大鼠行为状态观察: 记录大鼠进食饮水及活动情况、症状、体征及死亡日期, 定期称重。

b. 病理解剖学检查: 在各组动物出现颅内压

增高症状, 或者出现眶周出血、眼球外突、癫痫样发作、偏瘫等症状濒临死亡时, 用 10%水合氯醛 (3 ml/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 再用生理盐水和 4%多聚甲醛灌注固定取脑, 之后放到 4%多聚甲醛中固定过夜, 将全脑标本按大鼠脑表面的接种穿刺点做冠状切口, 观察肿瘤形态。

c. 动态磁共振(MRI)监测: Signal 5TMR 机 (GE 公司), 3 英寸表面线圈, FOV 8 cm×4 cm, 矩阵 512×256. 扫描序列 T1WI (TR 500 ms, TE 15 ms, 3 次激励); T2WI (TR 3000 ms, TE 78 ms, 3 次激励); 增强扫描经鼠尾静脉注射 0.2 mmol/kg 钆双胺. 在矢状定位像以嗅沟为标志作鼠脑冠状面定位; 冠状、矢状位扫描层厚 3.0 mm 或 2.0 mm, 间隔 0.5 mm. MRI 检查为 1 次 / 周. MRI 检查时使用 10%水合氯醛 (3 ml/kg) 腹腔注射麻醉. 病灶体积测量取强化病灶的最大冠状和矢状面, 测量最大前后径(L)、宽径(W)和高径(H), 并按下式计算肿瘤体积(V). $V = (4/3 \times \pi \times L \times W \times H) \times 1/8$. 记录各组肿瘤平均生长曲线。

1.2.6 RT-PCR 法检测 codA mRNA 的表达: 动物模型建立后第 7 天, 经磁共振检测动物模型建立成功后, 各组分别随机处死 2 只, 取肿瘤组织行 RT-PCR 检测, 证实 codA 基因存在及胞嘧啶脱氨酶表达. 根据 RNA 抽提试剂盒的步骤, 提取总 RNA. 引物根据 codA 基因序列设计引物, 在 5' 端分别加上 attB1 和 attB2 位点, 上下游引物分别为: 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG-GCTGCCACCATGTCGAATAACGCTTTACAA 3' 与 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG-TTCAACGTTTGTAAATCGATGG 3'. 以上面提取的 codA mRNA 为模板合成 cDNA, 利用 TAKARA 试剂盒完成反转录和扩增的全过程. 逆转录体系 (10 μ l): MgCl₂ 2 μ l; 10×RT 缓冲液 1 μ l; RNase Free dH₂O 3.75 μ l; 10 mmol/L dNTP mix 1 μ l; RNase Inhibitor 0.25 μ l; AMV Reverse Transcriptase 0.5 μ l; Random 9mers 0.5 μ l; Positive control RNA 1 μ l. 反转录条件: 30℃ 10 min, 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min; 1 个循环. PCR 体系 (50 μ l): 5×PCR 缓冲液 10 μ l; 灭菌蒸馏水 28.75 μ l; Ex Taq HS DNA 聚合酶 0.25 μ l; Control F-1 Primer 0.5 μ l; Control R-1 Primer 0.5 μ l; cDNA 模板 10 μ l. PCR 条件: 预变性 94℃, 2 min, 1 个循环; 变性 94℃, 30 s, 退火 60℃, 30 s, 延伸 72℃, 1 min, 35 个循环; 35 个循环后, 再充分延伸 72℃, 5 min.

之后置 4℃ 保存. 琼脂糖凝胶电泳: 配制 1%的琼脂糖凝胶, 取 5 μ l 的 PCR 产物加 1 μ l 的 6×上样缓冲液电泳, 120 V, 100 mA, 30 min, (溴化乙锭染色), 凝胶成像系统上观察结果, 拍照并记录结果。

1.2.7 HE 染色病理组织形态学观察. 在 MSC-codA/eGFP 细胞接种后第 8 天, 随机选取治疗组大鼠 1 只, 生理盐水和 4%多聚甲醛灌注固定取脑, 放到 4%多聚甲醛中固定过夜, 之后再放到 30%蔗糖中脱水 48 h, 然后 OTC 包埋组织, 组织用冰冻连续切片, 切片的厚度为 10 μ m, 相邻的两张为一组, 一张 HE 染色, 在普通的光镜下观察, 一张用荧光显微镜观察. 因 MSC-codA/eGFP 细胞携带增强型绿色荧光蛋白基因, 在 488 nm 波长的荧光激发下可发出绿色荧光, 因此可以直接在荧光显微镜下观察 MSC-codA/eGFP 细胞在组织切片中的分布。

1.2.8 TUNEL 法检测胶质瘤细胞的凋亡. 取各组实验组动物在出现颅内压增高症状, 或者出现眶周出血、眼球外突、癫痫样发作、偏瘫等症状濒临死亡时, 用 10%水合氯醛 (3 ml/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 再用生理盐水和 4%多聚甲醛灌注固定取脑, 并放到 4%多聚甲醛中固定过夜, 石蜡包埋, 制作石蜡切片, 切片的厚度为 4 μ m. 参照 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒 (KeyGEN 凯基生物, cat: KGA7022) 的说明进行凋亡检测。

1.2.9 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.5 统计软件, 对实验数据作单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较运用 LSD - t 检验, 同组之间的比较用配对 t 检验, 若 $P < 0.05$ 则认为有统计学差异。

2 结 果

2.1 C6+MSC-codA/eGFP 细胞作用组延长平均生存期

各组试验鼠自接种后第 1 天就能自行觅食, 但进食饮水较正常鼠减少, 体重下降, 反应迟钝, 从接种后第 4 天开始, 进食饮水正常, 体重有所增加. C6 胶质瘤组 (第①组) 中实验鼠从接种后第 7 天, 进食饮水减少, 体重开始明显下降, 直到接种后 12 天出现不同程度颅内压增高症状, 部分鼠出现眶周出血、眼球外突、癫痫样发作、偏瘫等症状, 出现这些症状后 14 天~18 天第①组实验鼠全部死亡. C6+MSC-codA/eGFP 细胞作用组 (第④⑤组) 中实验鼠在接种后第 7 天, 经腹腔注射 5-FC

后, 进食饮水逐渐增多, 体重开始增加, 平均生存期较 C6 胶质瘤组(第①组)和 C6+MSCs 作用组(第②③组)明显延长. 各组实验鼠存活情况见图 1, C6 胶质瘤组(第①组)平均生存期 15.3 天, C6+MSCs 细胞(1:1)组(第②组)平均生存期 16.0 天, C6+MSCs 细胞(1:2)组(第③组)平均生存期 16.6 天, C6+MSC-codA/eGFP 细胞(1:1)组(第④组)平均生存期 32.3 天, C6+MSC-codA/eGFP 细胞(1:2)组(第⑤组)平均生存期 45.9 天.

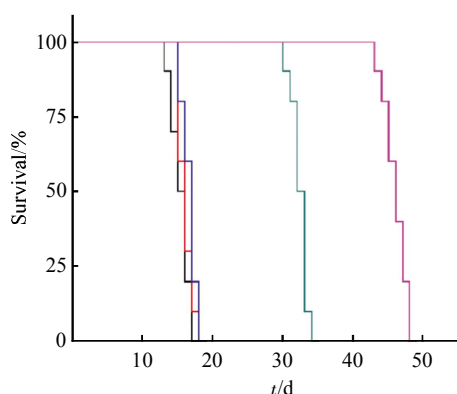


Fig. 1 The survival curves of experimental rats inoculated with C6 glioma from five groups

After 7 days of C6 glioma inoculation, the animal models were constructed. Around 500 mg/(kg·d) of 5-FC were injected into the abdominal cavity from day 7 to day 14 for a total of 7 days. The mean survival time of group ① to ⑤ were 15.3 days ($n=8$), 16.0 days ($n=7$), 16.6 days ($n=7$), 32.2 days ($n=7$) and 45.9 days ($n=7$), respectively. —: ① C6 glioma; —: ② C6+MSCs cells(1:1); —: ③ C6+MSCs cells(1:2); —: ④ C6+MSC-codA/eGFP cells(1:1); —: ⑤ C6+MSC-codA/eGFP cells(1:2).

2.2 MRI 监测大鼠肿瘤体积的动态演变

肉眼观察肿瘤组织(图 2)可见, 各大鼠右尾状核区均有团块状肿瘤形成, 实性, 呈不规则形或椭圆形, 无包膜, 色白呈鱼肉状, 边界较清楚, 向周围脑组织浸润性生长, 肿瘤中心有出血坏死.

我们经过磁共振(MRI)动态监测肿瘤的体积, 从 C6 胶质瘤接种以后每 7 天进行一次磁共振(MRI)检测, 结果发现: C6 胶质瘤接种后第 7 天, 即未给 5-FC 药之前, 统计分析 5 组的胶质瘤生长体积无显著性差异($F=2.176$, $P=0.092$). C6 胶质瘤接种后第 14 天, 即给 5-FC 药后第 7 天, 比较 5 组肿瘤的体积, 有显著性差异($P<0.001$). 组间比较(LSD 法)发现: C6+MSC-codA/eGFP(1:1)组和

C6 组的肿瘤体积相比, 差异有显著性. C6+MSC-codA/eGFP(1:2)组和 C6 组的肿瘤体积相比, 也有显著性差异. 但 C6 组与 C6+MSC 组的肿瘤体积比较没有明显的差异($P>0.05$). C6+MSC-codA/eGFP(1:1)组、C6+MSC-codA/eGFP(1:2)组的体积抑瘤率分别为 77.24%、83.28%. C6+MSC-codA/eGFP(1:1)组的肿瘤体积在肿瘤接种后第 14 天与肿瘤接种后第 7 天相比有所减小($T=8.780$, $P<0.001$), C6+MSC-codA/eGFP(1:2)组的肿瘤体积在肿瘤接种后第 14 天与肿瘤接种后第 7 天相比减小更明显($T=29.705$, $P<0.001$). 肿瘤接种后第 21 天, 即给 5-FC 药后第 14 天, 仅 C6+MSC-codA/eGFP(1:1)组与 C6+MSC-codA/eGFP(1:2)组的动物存活, 比较两组肿瘤的体积, 有显著性差异($T=35.439$, $P<0.001$). 结果表明, MSC-codA/eGFP 细胞的数量越多, 抑瘤效果越显著. 肿瘤接种 21 天后停止给 5-FC 药, 直到肿瘤接种后第 28 天, C6+MSC-codA/eGFP(1:1)组与 C6+MSC-codA/eGFP(1:2)组的动物仍存活, 但肿瘤的体积都较肿瘤接种后 21 天时的体积有所增加. 但比较两组肿瘤的体积, 差异显著($T=35.905$, $P<0.001$), 这也说明共同接种细胞中 MSC-codA/eGFP 细胞的比例越高, 增强抑瘤的效果越明显. 4 个时间点各组肿瘤细胞典型 MRI 表现及各组荷胶质瘤大鼠移植瘤平均生长曲线分别见图 3、图 4.

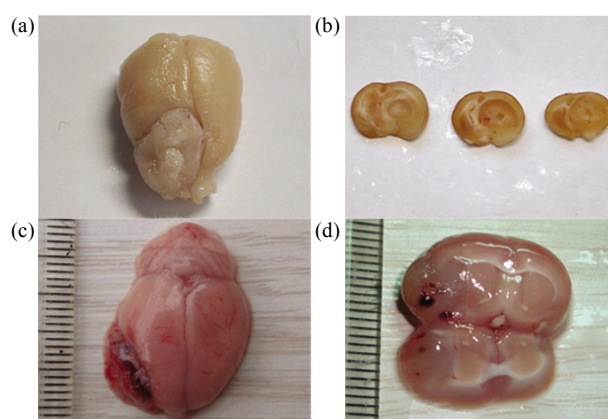


Fig. 2 Morphology observation of tumor coronal section after the brain tissue was dissected

(a) and (b) were the brains taken from samples that were perfused and fixed with 4% of paraformaldehyde, (c) and (d) were the brains taken from samples without being treatment. (a) Massive tumor from mouse brain. (b) Rough shape of the mouse brain. (c) Hemorrhagic necrosis in the center of the tumor. (d) Image of the tumor containing brain.

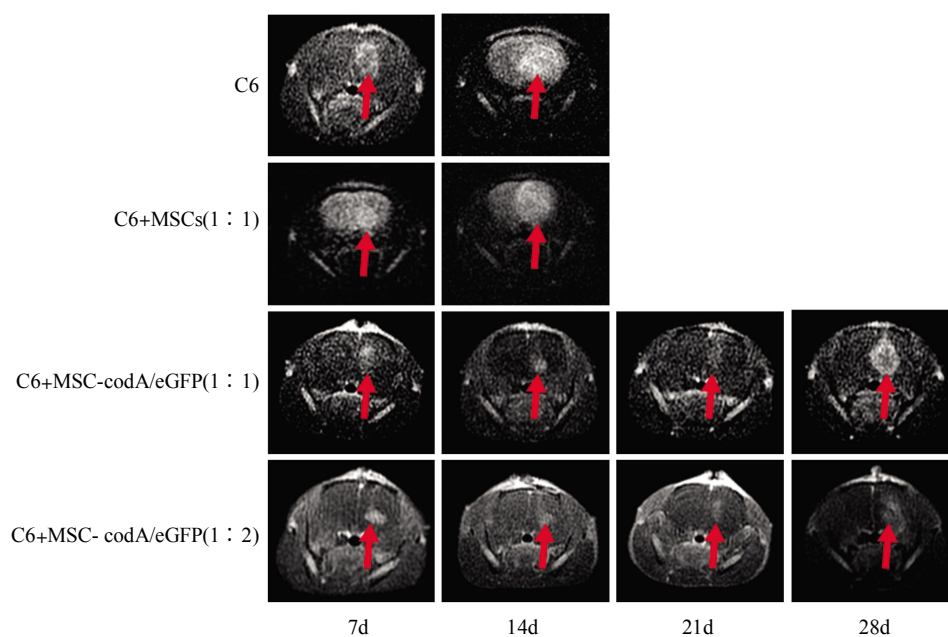


Fig. 3 The *in vivo* depressant effects of BMSC carrying CD gene on the rat C6 glioma were evaluated by MRI

After 7 days of tumor formation, the abdominal cavity of rats were injected with 5-FC at 500 mg/(kg·d) for 14 days. The MRI was carried out every week after 7 days of tumor formation.

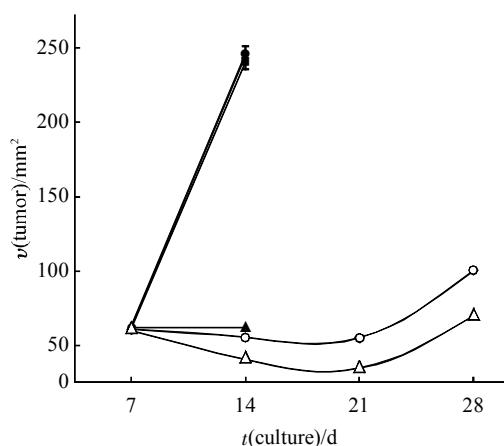


Fig. 4 Growth curves of rat glioma tissues from five different groups

●—●: C6; ▲—▲: C6+MSCs(1:1); ■—■: C6+MSCs(1:2); ○—○: C6+MSC-codA/eGFP(1:1); △—△: C6+MSC-codA/eGFP(1:2).

2.3 CodA 基因有效抑制肿瘤生成

从各组大鼠在不同时间点经过磁共振(MRI)动态监测肿瘤的体积(表 1), 可以看出④⑤组大鼠模型肿瘤体积在 4 个时间点均明显小于①组、②组和③组, 在第 7 天时, ④⑤组与①组、②③组差别不显著($P > 0.05$), 但在 14 天以后, ④⑤组与①组、②③组差别显著($P < 0.05$), 与①组差别非常显著($P < 0.01$), 说明此时肿瘤生长进入快速期, 但④⑤组由于导入 MSC-codA/eGFP, CodA 基因有效地抑制了肿瘤的生成, 从而使肿瘤生长缓慢. ④组与⑤组相比, 在第 14 天以前, 差别无显著性, 在第 21 天以后, 差别具有显著性($P < 0.05$), 分析原因可能在肿瘤进入快速生长期时, MSC-codA/eGFP 对肿瘤生长抑制作用与其接种的数量呈正相关性.

Table 1 Tumor volume of rat encranial model at four time points in five groups

Group	Tumor volume/mm ³			
	7d	14d	21d	28d
C6	62.06 ± 1.69	246.11 ± 6.00	—	—
C6+MSC(1 : 1)	61.92 ± 1.29	242.42 ± 6.24	—	—
C6+MSC(1 : 2)	61.67 ± 1.05	241.53 ± 6.05	—	—
C6+MSC-codA/eGFP(1 : 1)	60.84 ± 1.72	55.39 ± 1.14*	55.36 ± 1.18**	100.67 ± 1.98
C6+MSC-codA/eGFP(1 : 2)	60.46 ± 0.71	40.70 ± 1.35*	34.69 ± 1.16	70.25 ± 1.35

抑瘤率：在第 28 天，按照公式抑瘤率=(对照组平均瘤体积-治疗组平均体积)/ 对照组平均体积×100%，4 组相对于 2 组、3 组的抑瘤率分别为：77.24%，83.28%。

2.4 codA mRNA 在肿瘤组织中的阳性表达

RNA 的纯度：经 TRIZOL 法提纯的肿瘤组织 RNA，经紫外线光度计检测 $A_{260}/A_{280} \approx 1.8$ 。由图 5 可见混合接种 C6 和 MSC-codA/eGFP 细胞的组织中 codA 基因 cDNA 扩增出 360 bp 的预期片段，证实了 codA 基因在组织中 mRNA 水平的表达。

2.5 HE 染色未见肿瘤转移

大体形态观察大鼠脑胶质瘤呈不规则形或椭圆形，无包膜，边界轮廓稍模糊，切面呈鱼肉状，随着肿瘤的发展，肿瘤侵蚀硬脑膜和颅顶骨，肿瘤中心出现出血和坏死，大体解剖未见颅外转移。图 6 中 HE 染色结果显示，从不同组中均可见生长活跃的胶质瘤细胞呈假栅栏状或珊瑚状排列，密集成群，并向正常脑组织浸润生长。脑组织与肿瘤交界

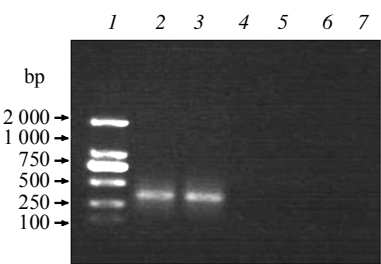


Fig. 5 The codA gene was amplified by PCR

1: Negative control (using water replace DNA template); 2: DL2000 marker; 3: C6+C57MSC-codA/eGFP (1 : 1), cDNA of rat tumor tissues; 4: C6+C57MSC-codA/eGFP (1 : 2), cDNA of rat tumor tissues; 5: C6+C57MSC (1 : 1), cDNA of rat tumor tissues; 6: C6+C57MSC (1 : 2), cDNA of rat tumor tissues; 7: cDNA of C6 glioma cells.

处可见到肿瘤细胞侵入脑实质，边界较模糊。肿瘤中心有囊变、坏死和肿瘤血管生成。肺部、肝脏及肠系膜淋巴结病理切片 HE 染色均未见肿瘤转移灶。

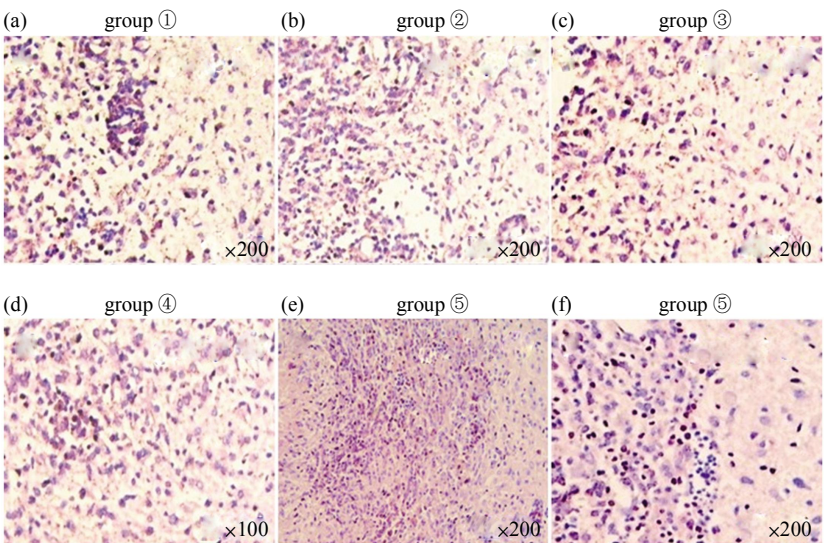


Fig. 6 HE staining of rat C6 glioma tissues

HE staining from group ① (a), ②(b), ③(c), ④(d), ⑤(e) and ⑤(f).

2.6 MSC-codA/eGFP 细胞的包绕状分布

从荧光显微镜下观察可以得知, 在第④和⑤组中, MSC-codA/eGFP 细胞分布于 C6 胶质瘤组织的内部和边缘部位(图 7a~d), MSC-codA/eGFP 细胞主要分布于胶质瘤不规则形状的边缘, 呈包绕状

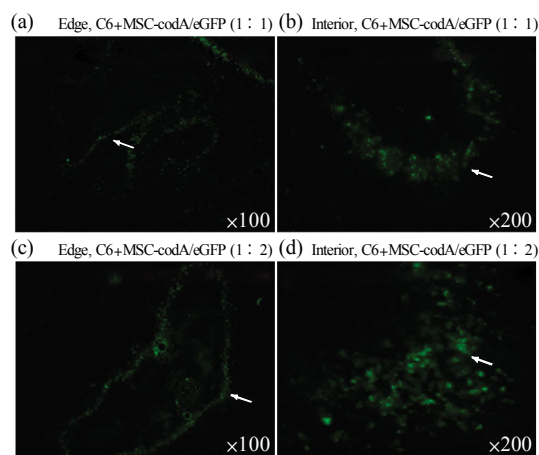


Fig. 7 The distribution of MSC-codA/eGFP cells

within tissue section under a fluorescence microscope

MSC-codA/eGFP cells were situated at the edge of C6 glioma tissues with a circumvolution-like distribution in group ④ (a) and group ⑤ (c), $\times 100$; MSC-codA/eGFP cells were situated at the interior of C6 glioma tissues in group ④ (b) and group ⑤ (d), $\times 200$.

分布. 图 7a, b 显示为第④组的观察结果, 较于第⑤组而言, 绿色荧光细胞所显示的胶质瘤不规则形状不够清晰, 且肿瘤内部显示细胞数量也较少. 这主要因为, 在第⑤组使用了数量较多的 MSC-codA/eGFP 细胞, 使得 MSC-codA/eGFP 对肿瘤生长抑制作用更为明显, 这和 MRI 检测的结果相一致.

2.7 呈阳性表达的 TUNEL 检测

在光学显微镜下观察, 肿瘤组织中染色阳性的瘤细胞细胞核呈棕黄色、细胞核固缩、有的呈碎片状、不规则、大小不一致, 染色质凝聚、浓缩、边缘化, 呈凋亡细胞的形态学征象, 也有胞体胞核体积形态基本正常染色阳性的肿瘤细胞. C6 组和 C6+MSCs 组(第①~③组)的肿瘤组织中很少有阳性细胞, 实验组 C6+MSC-codA/eGFP(1:1) (第④组)和 C6+MSC-codA/eGFP(1:2) (第⑤组)组的肿瘤组织中有较多的阳性细胞, 主要分布在肿瘤组织的内部(图 8a~f), TUNEL 阴性对照均未见有染色阳性的细胞核(图 8g~h). 用 DNase I 处理的 TUNEL 阳性对照整个载玻片显示为均匀一致的核染色阳性.

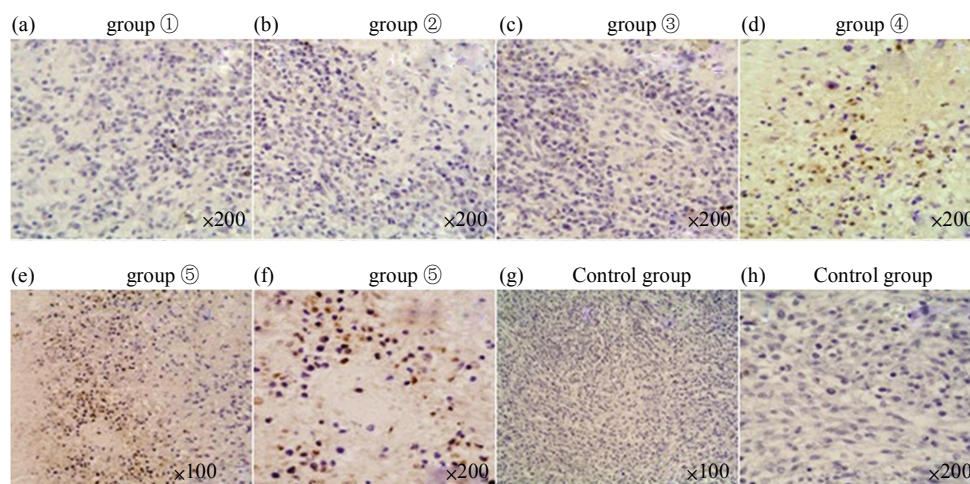


Fig. 8 TUNEL staining of glioma tissues was carried out via paraffin section

There were very few positive tumor cells in tumor tissues from group ① (a), ② (b) and ③ (c); large number of nuclei of positive tumor cells in tumor tissues were yellowish-brown in group ④ (d) and ⑤ (e, f). No positive cells in control groups (g, h); a~d, f, h, $\times 200$; e, g, $\times 100$.

3 讨 论

脑胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤, 尽管外科手术治疗和辅助放化疗已经有了很大进展, 但恶性胶质瘤的术后治疗效果仍然很差, 因为胶质瘤对传

统放、化疗易产生抵抗性, 而且具有极强的迁移能力, 容易浸润邻近正常组织. 胶质瘤肿瘤细胞可以从原发灶移行到远处形成卫星灶, 即便是广泛根治性手术也不能完全清除卫星灶和原发灶边缘的瘤细胞, 因而常导致初治后肿瘤复发^[4-7]. 分子生物学

的进展已使颅内基因治疗成为恶性胶质瘤的新治疗方法, 例如自杀基因^[10], 溶瘤病毒^[11-12]等基因治疗策略, 这些方法在动物实验中对胶质瘤显示了一定的治疗效果, 但临床疗效却不理想, 其一是因为基因或细胞因子本身的毒性作用, 其二, 这些研究中所利用的治疗载体多是逆转录病毒或腺病毒载体, 尽管病毒载体对静止或增殖瘤细胞都有高感染力, 但将治疗基因直接注入原发肿瘤内部或手术后肿瘤残腔时, 并不能转染新生肿瘤细胞, 因而治疗效果不理想。

为解决这些问题, 有学者利用神经干细胞(neural stem cells, NSCs)作为基因转染载体治疗胶质瘤。NSCs 颅内植入后的分布遍及原发肿瘤灶并具有向脑肿瘤组织迁移的能力^[13], 而且, 将 NSCs 植入远离肿瘤的部位时, 它们可以穿过正常脑实质而进入肿瘤, 研究也证实了利用 IL-4、IL-12 以及肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)等基因修饰 NSCs 后植入颅内, 对动物脑胶质瘤具有良好的治疗效果^[14-16]。但是, NSCs 多来源于胚胎组织, 在临床应用时会受到细胞来源以及伦理道德方面的限制, 而利用永生化 NSCs 细胞系则具有潜在的致癌性。另外, 异体 NSCs 移植可能会产生移植组织排斥反应, 甚至需要在移植前人为制造免疫抑制状态, 这些都限制了 NSCs 在临床的广泛应用^[17]。临床中理想的种子细胞应该是容易获取的自体细胞, 并可以在体外高效扩增, 然后自体回输。1987 年 Friedenstein 等发现从骨髓中分离出的单个核细胞在一定的条件下可诱导分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞和肌母细胞, 而且这些细胞扩增 20~30 代后仍能保持多分化潜能, 这类细胞被称为间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs), 又叫骨髓基质干细胞^[18]。研究显示, MSCs 具有干细胞自我更新、自我复制的特性, 并可在一定条件下分化为多种组织细胞^[19]。MSCs 具有多向分化性, 而且来源广泛, 取材方便, 因此是组织工程理想的种子细胞, 同时也有学者以 MSCs 作为肿瘤基因治疗的载体, 取得了较好的效果^[20-21]。已经证实 MSCs 可以分化为星形胶质细胞和神经元样细胞, 因此 MSCs 可能具有神经前体细胞的功能^[21]。Nakamizo 等^[21]最近报道, 人骨髓来源 MSCs 具有与胚胎来源的 NSCs 相似的肿瘤定向迁移能力。他们从健康志愿者骨髓中分离得到 MSCs, 同时建立裸鼠脑内人胶质瘤异种移植模型, 发现 MSCs 静脉输入后可以选择性地分布到肿瘤组织中, 而移植到

大脑半球的 MSCs 更容易向肿瘤组织迁移。我们在研究中也发现, MSCs 对胶质瘤组织具有良好的趋向性, 原位移植主要分布于肿瘤组织。这些结果提示 MSCs 可以替代 NSCs 作为胶质瘤基因治疗的载体。

在本实验中, 我们利用前期实验构建成功的、携带自杀基因(CD 基因)的骨髓间充质干细胞原位接种于大鼠 C6 脑胶质瘤模型中, 然后腹腔注射 5-FC 观察其对胶质瘤细胞的生长抑制作用。为了接近临床胶质瘤的治疗过程, 应在肿瘤形成后开始治疗。前期实验观察到接种细胞后 7~10 天开始出现症状, MRI 也可见到肿瘤形成, 因此我们选择的治疗起始时间为第 7 天。结果发现, MSC-codA/eGFP 经 5-FC 作用后可以明显改善大鼠症状, 延长生存期, MRI 可以观察到治疗组肿瘤体积明显小于对照组, HE 染色发现治疗组肿瘤发生坏死、出血等改变, 而在对照组则较少出现。同时, 以 eGFP 作为示踪剂标记 MSCs, 观察其在肿瘤组织内的分布, 结果表明, MSC-codA/eGFP 细胞分布于 C6 胶质瘤组织的内部和边缘部位, 且主要分布于胶质瘤不规则形状的边缘, 呈包绕状分布。与 Aboody 等^[13]报道的 NSCs 的分布模式相似, 此分布特点可以充分发挥所携带基因的治疗效果, 并有利于限制肿瘤进一步扩大和浸润, 更好地发挥抗肿瘤作用。

本实验还发现, 单纯 MSCs 移植也能对肿瘤产生一定的抑制作用, 延缓症状的发展。Nakamura 等^[22]也发现, 共同注射单纯 MSCs 或转染有非治疗基因(EGFP)的 MSCs 均可延长荷 9L 胶质瘤大鼠的生存时间, 而且在体外 MSCs 可以抑制共同培养的 9L 细胞的生长。MSCs 抑制肿瘤的具体机制还不明确, 有学者报道, MSCs 可以产生多种神经营养因子, 其中包括神经营养因子 NGF, 它可以在体外诱导 C6 胶质瘤细胞的分化并抑制其增殖^[23], 这可能是 MSCs 抗肿瘤效应的机制之一。另外, NGF 可以通过抑制神经元凋亡发挥神经保护作用, 这也可在 MSCs 延长荷胶质瘤鼠生存期的过程中发挥作用。在 Nakamura 的实验中还发现, MSCs 分泌大量的血管生成因子, 如血管生成素-1(Ang1), Ang1 在体内可以抑制肿瘤血管渗漏和肿瘤生长^[24], 减轻脑水肿以保护脑实质, 这是 MSCs 抗肿瘤作用的又一重要组成部分。Kang 等^[25]最近发现, MSCs 可以抑制 9L 脑胶质瘤细胞生长, 当用 IL-2、IL-15、GM-CSF 等活化 MSCs 后, 其作用更加明

显, 检测细胞培养上清液发现, MSCs 作用后 IL-4, γ -INF 的分泌量增加, 同时 FasL 等凋亡相关蛋白的表达也增加, 因此推测 MSCs 的抗肿瘤作用可能通过增加免疫活性和诱导凋亡来实现. 尽管 MSCs 能发挥一定的抗肿瘤作用, 但这种作用似乎不能持续, 我们发现虽然 MSCs 延缓了肿瘤的生长, 但肿瘤仍然继续增大, 最终导致大鼠死亡.

虽然利用 codA/eGFP 基因修饰的 MSCs 能明显延长荷瘤大鼠的生存期, 但并不能使肿瘤完全消退. 一方面可能是基因修饰 MSCs 的早期排除, 另外由于 MSCs 主要分布于肿瘤组织周围, MSC-codA/eGFP 所表达的胞嘧啶脱氨酶将达到肿瘤组织周围的 5-FC 转化为 5-FU, 这个过程本身可能受到 5-FC 通过血脑屏障的限制及胞嘧啶脱氨酶局部表达量的限制, 从而使肿瘤组织周围不能产生足够的有彻底杀灭肿瘤作用的 5-FU 浓度. 因此, 提高转染效率, 增加治疗次数, 或者联合应用其他免疫细胞因子, 以及联合放疗是治疗脑胶质瘤非常有希望的途径.

参 考 文 献

- [1] Yonekawa Y. On the occasion of my retirement as head of the Neurochirurgische Universitätsklinik Zürich—changing aspects of treatment modality in modern neurosurgery and of neuroscience research. Presentation of our experience and historical backgrounds. *Brain Nerve*, 2008, **60**(5): 538–546
- [2] Benzagmout M, Gatignol P, Duffau H. Resection of World Health Organization Grade II gliomas involving Broca's area: methodological and functional considerations. *Neurosurgery*, 2007, **61**(4): 741–752
- [3] Duffau H, Capelle L, Lopes M, *et al.* Medically intractable epilepsy from insular low-grade gliomas: improvement after an extended lesionectomy. *Acta Neurochir (Wien)*, 2002, **144**(6): 563–572
- [4] Davis F G, McCarthy B J, Berger M S. Centralized databases available for describing primary brain tumor incidence, survival, and treatment: Central Brain Tumor Registry of the United States; Surveillance, Epidemiology, and End Results; and National Cancer Data Base. *Neuro Oncol*, 1999, **1**(3): 205–211
- [5] Mitchell P, Ellison D W, Mendelow A D. Surgery for malignant gliomas: mechanistic reasoning and slippery statistics. *Lancet Neurol*, 2005, **4**(7): 413–422
- [6] Tsao M N, Mehta M P, Whelan T J, *et al.* The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) evidence-based review of the role of radiosurgery for malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, **63**(1): 47–55
- [7] Aoki T. Chemoradiotherapies for malignant gliomas. *Nippon Rinsho*, 2005, **63**(Suppl 9): 472–477
- [8] Ito S, Natsume A, Shimato S, *et al.* Human neural stem cells transduced with IFN-beta and cytosine deaminase genes intensify bystander effect in experimental glioma. *Cancer Gene Ther*, 2010, **17**(5): 299–306
- [9] Lv S Q, Zhang K B, Zhang E E, *et al.* Antitumor efficiency of the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system on malignant gliomas: an *in vivo* study. *Med Sci Monit*, 2009, **15**(1): BR13–20
- [10] 邢 琪, 宋 飞, 刘 健, 等. 构建携带胞嘧啶脱氨酶基因骨髓间充质干细胞及其对胶质瘤细胞的体外抑制作用. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, **15**(14): 2577
- Xin Q, Song F, Liu J, *et al.* *J Clinical Rehabilitative Tissue*, 2011, **15**(14): 2577
- [11] Grignet-Debrus C, Cool V, Baudson N, *et al.* The role of cellular- and prodrug-associated factors in the bystander effect induced by the Varicella zoster and Herpes simplex viral thymidine kinases in suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 2000, **7**(11): 1456–1468
- [12] Kyritsis A P, Sioka C, Rao J S. Viruses, gene therapy and stem cells for the treatment of human glioma. *Cancer Gene Ther*, 2009, **16**(10): 741–752
- [13] Aboody K S, Brown A, Rainov N G, *et al.* Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (23): 12846–12851
- [14] Benedetti S, Pirola B, Pollo B, *et al.* Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med*, 2000, **6**(4): 447–450
- [15] Ehteshami M, Kabos P, Kabosova A, *et al.* The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. *Cancer Res*, 2002, **62**(20): 5657–5663
- [16] Ehteshami M, Kabos P, Gutierrez M A, *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
- [17] Ehteshami M, Stevenson C B, Thompson R C. Stem cell therapies for malignant glioma. *Neurosurg Focus*, 2005, **19**(3): E5
- [18] Studeny M, Marini F C, Dembinski J L, *et al.* Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst*, 2004, **96**(21): 1593–1603
- [19] Hamada H, Kobune M, Nakamura K, *et al.* Mesenchymal stem cells (MSCs) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Sci*, 2005, **96**(3): 149–156
- [20] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, *et al.* Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 2000, **61**(4): 364–370
- [21] 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
- [22] Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, *et al.* Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther*, 2004, **11**(14): 1155–1164
- [23] Kimura S, Yoshino A, Katayama Y, *et al.* Growth control of C6 glioma *in vivo* by nerve growth factor. *J Neurooncol*, 2002, **59**(3):

199-205

[24] Stoeltzing O, Ahmad S A, Liu W, *et al.* Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res*, 2003, **63**(12): 3370-3377

[25] Kang S G, Jeun S S, Lim J Y, *et al.* Cytotoxicity of rat marrow stromal cells against malignant glioma cells. *Childs Nerv Syst*, 2005, **21**(7): 528-538

Investigation on The Inhibition Effects of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells With CD Gene on Glioma in C6 Rat*

SONG Fei^{1,2)**}, XING Qi^{3)**}, SONG Ke-Dong^{2)**}, LIU Jian¹⁾, JI Guang-Chun¹⁾,
MA Yu-Fang⁴⁾, LIU Tian-Qing²⁾, MA Xue-Hu^{2)***}, TIAN Xiao-Feng^{5)***}

⁽¹⁾ Department of Neurosurgery, Second Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116027, China;

⁽²⁾ Dalian R&D Center for Stem Cell and Tissue Engineering, State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

⁽³⁾ Department of Anesthesia, First Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116011, China;

⁽⁴⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China;

⁽⁵⁾ Department of General Surgery, Second Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Abstract The *in vivo* treatment effect of CD (cytosine deaminase) suicidal genetic system on the glioma in rat was explored. The lentivirus carrier which was composed of CD genes was fabricated and the mouse BMMSCs were transfected by such CD genes to obtain constantly expressed cells, then BMMSCs were transplanted into the animal model which was built through an intracranial stereotactic inoculating method using a group of 40 SD rats. The rats were divided into 5 groups uniformly according to the cell type inoculated, i.e. ① C6 glioma, ② C6+MSCs(mesenchymal stems cells) cells (1 : 1), ③ C6+MSC cells (1 : 2), ④ C6+MSC -codA/eGFP cells (1 : 1) and ⑤ C6+MSC-codA/eGFP cells (1 : 2). After 7 days of tumor formation, the abdominal cavity of rats were injected with 5-FC at 500 mg/(kg • d) for 14 days. Intensive scanning was carried out weekly to observe tumor volume using MRI. Simultaneously, survival times, routine pathological test, RT-PCR assay and HE staining were also operated. The results of MRI showed that the focus of infection in group ① presented round shape. The necrosis area of tumor found in the center, achieved an average volume of 246 mm³, and the survival time of the center area was 15.3 days. About the group ② and ③, the survival times were 16.0 and 16.6 days respectively. But in group ④ and ⑤, the survival times were both larger than 30 days, the necrosis area of tumor was 55 and 40 mm³ respectively at day 14, and the inhibition efficiency was 77.24% and 83.28% respectively after 28 days of treatment. It was concluded that the MRI scanning could clearly show the volume, shape, and internal structure of the tumor, which was highly related to the results of pathology. The treatment effect of bone marrow MSCs with CD genes and 5-FC therapy system on C6 intracranial glioma could be verified through dynamic MRI observation. Moreover, the RT-PCR test confirmed the expression of cytosine deaminase inside tumor organization.

Key words magnetic resonance imaging, glioma, gene therapy, CD gene, bone marrow mesenchymal stem cells

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00157

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Liaoning Province of China (20092165), Educational Commission of Liaoning Province of China (2008Z081) and Science and Technology Planning Project of Dalian of China (2008E13SF203).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

MA Xue-Hu. Tel: 86-411-84706360, Fax: 86-411-83633080, E-mail: xuehuma@dlut.edu.cn

TIAN Xiao-Feng. Tel: 86-411-84671291, Fax: 86-411-84672130, E-mail: txfdl@hotmail.com

Received: September 6, 2011 Accepted: December 12, 2011