

阳离子脂质体介导 HSV-TK/ACV 系统对人脑胶质瘤细胞增殖活性的影响

苏 君,杨海城,肖 宏,张学新

摘要:目的 探讨 HSV-TK/ACV 系统对人脑胶质瘤细胞增殖活性的影响。方法 用阳离子脂质体 Lipofectamine 将 pCR3-Uni 及含 HSV-TK 基因的真核表达载体 pCR3-TK 转染至人脑胶质瘤细胞株 TJ905 中,筛选出阳性克隆,阳性细胞克隆给予 ACV (50mg/ml),72 小时后,收集玻片,进行 AgNOR 染色。结果 转染 HSV-TK 基因的细胞,在给予 ACV 后,细胞增殖活性明显降低,转染 pCR3-Uni 和 pCR3-TK 细胞克隆的 AgNOR 颗粒数分别为 14.33 和 6.67 ($P < 0.01$)。结论 AgNOR 计数是一种操作简便、检测细胞增殖活性的方法,为研究 HSV-TK/ACV 系统的抗肿瘤机制提供帮助。

关键词: Lipofectamine; HSV/ACV 系统; 胶质瘤; AgNOR; 增殖活性

中图分类号: R73-36⁺2; R730.264 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2002) 02-0085-02

Effect of the proliferation activity of human glioma cells with HSV-TK/ACVs system mediated by cationic liposome

SU Jun, YANG Hai-cheng, XIAO Hong, et al

Department of Neurosurgery,

Third Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To study the effect of the proliferation activity of human glioma cells with HSV-TK/ACVs system. **Methods** The eukaryotic expression vectors pCR3-TK contain the HSV-TK gene and pCR3-Uni were retransferred into TJ905 cells with cationic liposome, Lipofectamine. After transfection, G418 was used to select the positive clones. The positive clones were given ACV (50 μg/ml) and collected after 72 hours. The glass slides were stained with silver. **Results** The number of silver stained AgNORs in the cell clones (transfected with pCR3-Uni and pCR3-TK) was 14.33 and 6.67, respectively. The proliferation activity of glioma transfected with pCR3-TK was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** AgNOR was a simple method of checking the proliferation activity of cells. It provided with an aid on studying the antitumor principle of HSV-TK/ACVs system.

Keywords: Lipofectamine; HSV-TK/ACV; Glioma; AgNOR; Proliferation activity

胶质瘤是颅内最常见的原发性恶性肿瘤,尽管近十年来,在手术、放疗、化疗、免疫治疗等方面取得了很大进步,但胶质瘤的预后并没有明显的改善。

基因治疗为胶质瘤的治疗提供了一条可探索的新路。本文利用阳离子脂质体将新近克隆并构建的含单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 (HSV-TK) 的真核表达载体 pCR3-TK 转染到人脑胶质瘤细胞中,给予抗病毒药物阿昔胞苷 (ACV),利用银染技术检测胶质瘤细胞增殖活性的变化。

1 材料和方法

1.1 质粒

pCR3-Uni 由哈尔滨兽医研究所生物技术室国家

收稿日期: 2001-04-10; 修回日期: 2001-11-27

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D00-33)

作者单位: 150040 哈尔滨医科大学附属第三医院神经外科

重点实验室提供 ,pCR3-TK 由本文作者构建。pCR3-TK 中的 TK 基因是以 HSV-1CL101 株中的 TK 基因序列设计引物,以 Stocker 株 DNA 为模板,以 PCR 技术扩增的 DNA 片段。酶切和序列分析证实含完整的 TK 基因^[1,2]。

1.2 细胞

人脑胶质瘤细胞株 TJ905 由天津神经病学研究所蒲佩玉教授惠赠。该细胞用含 10% 的小牛血清,100mg/ml 青链霉素的 DMEM 的培养液,37℃ 含 5% CO₂ 孵育箱中培养传代。

1.3 以 Lipofectamine 介导 DNA 转染

将质粒 pCR3-Uni 及 pCR3-TK 转染 TJ905 细胞。转染过程按照试剂盒提供的方法进行。72 小时后更换选择培养基(含 G418600mg/ml 的 DMEM)继续培养。14 天后获抗性克隆。将细胞克隆从 96 孔板开始逐渐扩大培养,一直用选择培养基。将对照组细胞、转染质粒 pCR3-Uni 及 pCR3-TK 的 TJ905 细胞分别命名为 G、G-p 及 GpTK。

1.4 细胞增殖活性的测定

将处理过的玻片平铺于 6 孔培养板上,然后接种 G、G-p 及 GpTK 细胞,24h 后更换含 50mg/mlACV 的培养液,72h 后收集玻片,进行 AgNOR 染色,采用的是一步银染法^[3]。

2 结果

2.1 真核表达质粒 pCR3-TK 的鉴定(图略)。

表 1 不同细胞克隆 AgNOR 染色颗粒数

细胞克隆 (n)	AgNOR 染色颗粒数	F 值	P 值
(1) G(6)	14.83 ±1.47		
(2) Gp(6)	14.33 ±1.21	80.59	<0.01
(3) GpTK(6)	6.67 ±1.03		

注:(3)与(1)、(2)比较 P<0.01; (1)与(2)比较 P<0.05

2.2 不同细胞克隆的细胞增殖活性

通过 AgNOR 嗜银染色测定结果显示 GpTK 细胞 AgNOR 平均数明显低于 G 及 Gp 细胞,而 Gp 与 G 细胞无明显区别,见表 1。

3 讨论

肿瘤细胞增殖活性的检测是研究增殖动力学的重要方面,对于判断肿瘤的恶性程度及评估生物学行为是重要指标之一。近年来采用 Ki67 指数及核仁组织区嗜银蛋白(AgNOR)等简便方法可靠的方法来

评估肿瘤细胞的增殖活性。在人类的第 13,14,15,21 及 22 对染色体短臂上,有明显的次级缢痕(secondary constriction),该处染色较浅,被称为核仁组成区(NORs),与核仁形成有关。可用银染方法显示。细胞化学研究证明,银既不与 rDNA,也不与 rRNA 结合,而是与用 rRNA 相关的酸性非组蛋白结合,后者被称为核仁组成区嗜银蛋白。银染的方法可显示 NORs 的酸性非组蛋白(AgNORs),它与 rRNA 的转录密切相关,其含有 rRNA 基因的 DNA 片段,通过 RNA 聚合酶 I 转录成核糖体 RNA(rRNA),rRNA 基因代表细胞代谢功能,其产物能影响细胞的增殖和分化调节。一般认为,AgNORs 的数目、大小和分布的改变可能反映了 rRNA 的转录水平及细胞活性,它是增殖分化的一项指标。应用 HSV-TK/ACV 系统对肿瘤细胞杀伤作用的研究报道较多^[4,5],肿瘤细胞增殖活性影响方面的研究,国内外尚未见报道。本研究所用的 TJ905 细胞是天津市神经病学研究所建立的体外胶质母细胞瘤系,细胞形态学观察及生物学特征符合多形性胶质母细胞瘤的特征。TJ905 细胞及其转染 pCR3-Uni 和 pCR3-TK 的细胞在给予 ACV 后的 AgNOR 计数分别为 14.83,14.33 和 6.67。可以看出 GpTK 细胞在 ACV 作用下,细胞增殖活性明显降低,HSV-TK/ACV 达到了抑制肿瘤细胞生长的作用。AgNOR 计数是一种操作简便,不需要特殊装备,在一般实验室都可完成的方法。AgNOR 对肿瘤细胞的多方面研究都能提供帮助。

参考文献:

- [1] 苏君,张学新,张相彤,等.单纯疱疹病毒 tk 基因的克隆及其真核表达载体的构建[J].中国肿瘤生物治疗杂志,1999,6 (1): 27-30.
- [2] 苏君,张相彤,戴黎明,等.单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶基因 Stocker 株的分子克隆及序列分析[J].哈尔滨医科大学学报,1999,33 (3):173-175.
- [3] PlotonD,Mena gerM,JeannessonP,etal.Improvement in the staining and visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organiser region at the optical level[J].Histochem J,1986,18 (1):5-14.
- [4] DemecoF,BenedettiS,Colombo MP,etal.Perspective for the gene therapy of malignant gliomas by suicide gene transfer[J].J Neurogurg Sci,1997,41 (3):227-234.
- [5] HlavatyJ,HlubnovaK,AltaneroV,etal.Treatment of rat glioma with recombinant retrovirus harboring herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene[J].Neoplasma,1997,44 (6):342-347.

(贺文校对)