

· 论 著 ·

PDGF-B 链基因的三链形成寡核苷酸对大鼠脑胶质瘤生长及细胞周期的影响

李维方^{1,2*}, 周定标², 余新光², 金由辛³

(1. 解放军第306医院神经外科, 北京 100101; 2. 解放军总医院神经外科, 北京 100853; 3. 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室, 上海 200032)

[摘要] 目的: 观察血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)B 链基因的三链形成寡核苷酸(triplex forming oligonucleotide, TFO)对大鼠胶质瘤细胞生长及细胞周期的影响。方法: 所有SD大鼠(36只, 体质量220~250g)均在右尾状核区微量灌注 1×10^6 个C₆胶质瘤细胞, 其中实验I组和II组($n=12$)在细胞接种后的第8天开始分别原位注射TFO 1.5 mg/20 μ l和3.0 mg/20 μ l的生理盐水, 以后每隔72 h注射相同剂量的TFO, 共注射3次。对照组($n=12$)在相同时间原位注射20 μ l生理盐水。实验3周时处死所有的大鼠, 观察肿瘤的生长情况, 标本做常规H-E染色, 流式细胞仪检测肿瘤PDGF-B、PCNA的表达及细胞周期。结果: 实验I组、II组的成瘤抑制率分别为66.1%、91.8%, 两者相比有显著差异($P < 0.01$)。TFO对胶质瘤细胞PDGF-B、PCNA表达有明显的抑制作用($P < 0.01$); TFO能明显降低胶质瘤细胞G₂M期和S期(DNA合成期)的百分率, 阻止细胞由静止期(G₀-G₁期)进入DNA合成期(S期, $P < 0.01$)。以上作用均存在浓度依赖性。结论: 原位应用TFO能抑制PDGF-B表达, 阻碍细胞进入S期, 使胶质瘤细胞增殖降低, 达到抗胶质瘤生长的作用。

[关键词] 胶质瘤; 血小板源生长因子; 三链形成寡核苷酸; 细胞增殖; 细胞周期

[中图分类号] R 730.264 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)09-0966-04

Effect of triplex forming oligonucleotide of PDGF-B chain on tumor growth and cell cycle of rat glioma

LI Wei-Fang^{1,2*}, ZHOU Ding-Biao², YU Xin-Guang², JIN You-Xin³ (1. Department of Neurosurgery, No. 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China; 2. Department of Neurosurgery, PLA General Hospital, Beijing 100853; 3. State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute of Life Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the effect of triplex forming oligonucleotide (TFO) of PDGF-B chain on cell proliferation and cell cycle of rat glioma. **Methods:** 1×10^6 C₆ glioma cells with high-flow microinfusion were seeded into right caudate putamen of rats. TFO was used *in situ* a week after glioma cell inoculation. The treatment group I and II were treated with 1.5 mg/20 μ l and 3.0 mg/20 μ l TFO respectively on 8, 11 and 14 d after cell inoculation. The control group was treated with 20 μ l normal saline with the same procedure. Three weeks after cell inoculation all rats were killed and samples were detected with macroscopic, microscopic histology and immunofluorescence flow cytometric analysis. **Results:** The inhibition rates of tumor growth were 66.1% in the treatment group I and 91.8% in the treatment group II. TFO specifically blocked expressions of PDGF-B and PCNA of glioma cells in a concentration-dependent fashion. TFO obviously inhibited the transit of cells from the G₀-G₁ to S phase in a concentration-dependent fashion. **Conclusion:** TFO can commendably block PDGF-B expression, inhibit cell proliferation and induce C₆ glioma cells arrest in the G₁ phase, and thus inhibit tumor growth of glioma.

[KEY WORDS] glioma; platelet-derived growth factor; triplex forming oligonucleotide; proliferation; cell cycle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(9): 966-969]

* 血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是一种强有力的有丝分裂原和化学趋化剂, 血小板衍生生长因子B链基因(PDGF-B)在多种肿瘤的发生、生长中起到极其重要的作用^[1,2]。新兴的三链技术可以在转录水平上直接作用于基因本身。本实验使用以PDGF-B为靶标的三链形成寡核苷酸(triplex forming oligonucleotide, TFO), 观察TFO对大鼠胶质瘤生长及细胞周期的

影响。

1 材料和方法

1.1 PDGF-B链基因TFO的设计^[2,3] 金由辛教授根据 *c-sis/PDGF-B* 原癌基因5'端上游启动子核

* [基金项目] 全军医药科研“十五”规划课题(01MB066)。

[作者简介] 李维方(1964-), 男(汉族), 博士, 副教授, 副主任医师

* Corresponding author. E-mail: lv64876486@163.com

心区的特殊结构设计,合成的均聚嘌呤组成的 TFO: 5'-GAG A GG GAA GA G GAA A-3'。A: target(+), 5'-CTC TCC CTT CTC CTT T-3'(-39, -24); B: target(-), 3'-GAG A GG GAA GA G GAA A-5'。TFO 是据此靶基因序列设计的可与之以氢键结合成反平行三链的寡核苷酸。

1.2 荷瘤大鼠胶质瘤 TFO 原位治疗的实验分组

雄性 SD 大鼠(购自解放军总医院实验动物中心) 36 只, 体质量 220~250 g。经 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(0.04 g/kg)后, 固定于江湾 I 型大鼠脑立体定向仪(上海实验仪器厂)。按前囟中点前 1.0 mm、矢状缝右旁开 3.5 mm, 硬膜下 5.0 mm 的坐标为右侧尾状核区的靶点定位钻孔, 将细胞悬液(1×10^6 个 C₆ 胶质瘤细胞/20 μ l 生理盐水)以 1 μ l/min 速度注入靶区, 除针前留针 5 min。钻孔部位以骨蜡封闭, 缝合头皮^[4]。细胞接种后第 8 天在大鼠右尾状核区立体定向原位注射 20 μ l 生理盐水, 实验 I 组和实验 II 组(各 12 只), 原位注射分别含 TFO 1.5 和 3 mg 的生理盐水 20 μ l; 对照组(12 只)则原位注射 20 μ l 生理盐水。以后每隔 72 h 原位注射 1 次, 共 3 次。实验周期为细胞接种后 3 周处死检查。

1.3 实验观察指标 (1) 组织病理学检查: 解剖出大鼠全脑, 按大鼠脑表面的接种穿刺点做冠状切口, 按垂直和水平方向测量肿瘤大小, 肿瘤体积 = $a^2 \times b \times \pi/6$ (a 为肿瘤的短径, b 为肿瘤的长径), 抑瘤率 (%) = (对照组平均肿瘤体积 - 实验组平均肿瘤体积) / 对照组平均肿瘤体积 $\times 100\%$ 。每组各 6 只含肿瘤组织的脑标本, 经石蜡包埋后取 7 μ m 切片, H-E 染色。(2) 流式细胞仪检测: 每组的另 6 只全脑标本分离解剖出肿瘤组织, 碾磨后, 500 目铜网过滤制成细胞悬液, 各管调整细胞数为 1×10^6 /ml。经 1 500 r/min $\times 5$ min 离心后, 每管以 300 μ l 生理盐水混悬细胞, 300 μ l 细胞混悬液用注射器迅速注入到 700 μ l 4% 冷无水乙醇中固定, 放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱 24 h 保存后待测。

1.3.1 TFO 对胶质瘤细胞周期的影响 各取 70% 乙醇固定的细胞 200 μ l, 1 500 r/min $\times 5$ min 离心, 去除上清, PBS 洗涤 2 次后, 加入 50 μ g/ml 的 RNase 1 ml, 室温避光 30 h, 去除胞内 RNA。离心去上清后, 加入 50 μ g/ml 碘化丙啶(PD) 1 ml, 室温避光 30 h 后上流式细胞仪检测, 得出各期细胞数占细胞总数的百分比。

1.3.2 TFO 对胶质瘤细胞 PDGF-B 链基因和 PCNA 表达的影响 各取 70% 的乙醇固定的细胞 200 μ l, 1 500 r/min $\times 5$ min 离心, 去除上清, PBS 洗涤 2

次后, 50 μ l 的细胞悬液分别与工作浓度 1:100 的一抗(山羊抗大鼠 PDGF-B 抗体, 购自博士德公司) 50 μ l 工作浓度 1:100 的一抗(小鼠抗大鼠 PCNA 抗体, 购自博士德公司) 50 μ l 混合, 于室温保持 60 h, 离心洗涤 2 次, 50 μ l 的细胞悬液分别与工作浓度 1:100 的二抗(荧光标记的兔抗山羊抗体, 购自华美生物公司)、工作浓度 1:100 的二抗(荧光标记的兔抗小鼠抗体, 购自华美生物公司) 50 μ l 混合, 于室温避光保持 60 h, 离心后洗涤 2 次, 加 500 μ l 生理盐水混悬细胞。另设空白对照组中的 2 孔仅加二抗, 一抗用 PBS 代替, 作为阴性对照。上流式细胞仪检测, 结果以测定 10 000 个细胞的平均荧光强度来表示。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 8.0 统计学软件包进行配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 实验大鼠的肿瘤体积和抑瘤率的变化 实验 I 组和实验 II 组的肿瘤体积分别是 (78.3 ± 7.5) 和 (18.9 ± 5.6) mm³, 均明显小于对照组的 (230.8 ± 21.4) mm³, 且两实验组相比也有显著差异 ($P < 0.01$)。实验 I 组和实验 II 组的抑瘤率分别为 66.1% 和 91.8% ($P < 0.01$)。

2.2 组织病理学检查结果 3 组在光镜下均可见到肿瘤组织, 与脑组织的交界处仍能见到一个较明显的界线。实验 I 组和 II 组尚能观察到大量的液化坏死的肿瘤细胞, 其间夹杂一些岛状的肿瘤细胞团(图 1B、1C)。对照组(图 1A)可见明显的生长活跃的胶质瘤细胞密集成群并向脑组织浸润性生长, 而且有更多的血管分布。

2.3 大鼠肿瘤标本的 PDGF-B 和 PCNA 的表达 实验 II 组、实验 I 组、对照组 PDGF-B 表达的平均荧光强度分别为 98.66 ± 8.01 、 149.28 ± 7.17 、 207.80 ± 10.15 , PCNA 表达的荧光强度分别为 172.96 ± 6.45 、 300.29 ± 7.83 、 518.24 ± 9.98 。结果表明 TFO 对 C₆ 胶质瘤细胞 PDGF-B、PCNA 的表达有明显的抑制作用, 且高剂量组(实验 II 组)的作用更强 ($P < 0.01$)。

2.4 TFO 对大鼠胶质瘤细胞周期的影响 由表 1 可见, 两实验组与对照组相比可明显抑制胶质瘤细胞周期的 S 期和 G₂M 期的 DNA 的百分率, 阻断 G₀-G₁ 期向 DNA 合成的 S 期转化, 差异非常显著 ($P < 0.01$); 实验 I 组和实验 II 组细胞周期之间也有明显差异 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

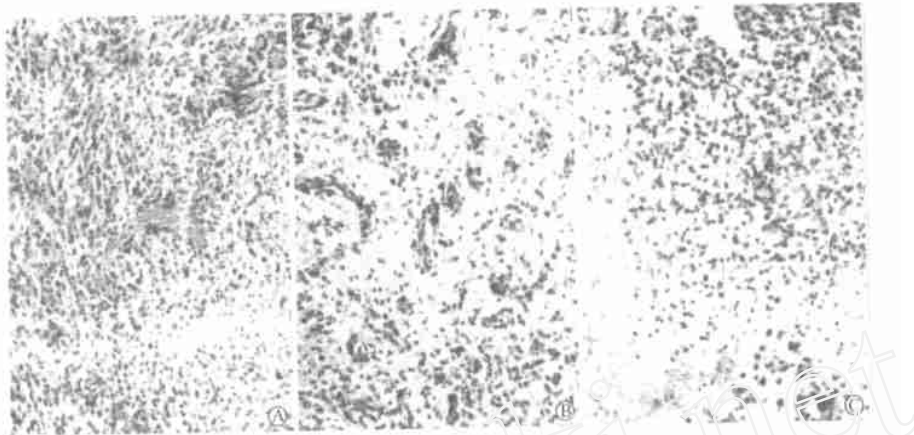


图 1 各组大鼠脑胶质瘤组织的 H-E 染色结果

Fig 1 H-E staining of glioma tissue in each group (×100)

A: Control group, showing high vessel density and active cellular proliferation; B: Treatment I, showing some tumor cells among many metamorphic and necrotic tumor cells; C: Treatment II, showing large number of metamorphic and necrotic tumor cells

表 1 TFO 对大鼠胶质瘤细胞周期的影响

Tab 1 Effect of TFO on cell cycle of rat glioma cells

(n= 6, $\bar{x} \pm s, \%$)

Group	G ₀ -G ₁	G ₂ -M	S
Treatment I	75.83 ± 3.89**	10.67 ± 1.47**	13.50 ± 2.93**
Treatment II	88.87 ± 1.70**	3.79 ± 0.36**	7.32 ± 1.79**
Control	60.84 ± 3.33	16.17 ± 1.31	24.14 ± 2.21

** P < 0.01 vs control group; * P < 0.05, P < 0.01 vs treatment II

3 讨论

3.1 反义基因治疗(antisense gene therapy)的应用 反义基因治疗是指应用生物体合成或人工合成的反义核酸在转录和翻译水平阻断某些异常基因的表达,以阻断瘤细胞内的异常基因传导,使瘤细胞进入正常分化或引起细胞凋亡。新兴的三链技术则具有其优点,即在转录的水平直接作用于基因本身,因此,只需要很少量的 TFO 分子就可以达到调控靶基因表达的目的^[2,3]。

3.2 实验胶质瘤反义基因治疗靶标的选择^[5-9]

PDGF-B 是原癌基因 *c-sis* 的编码产物,其诱导细胞转化的作用已经体外和动物实验证实。PDGF 受体(PDGR)有 α 和 β 两个亚型,均属酪氨酸激酶受体家族成员。胶质瘤细胞 PDGR α 和 PDGR β 及其下游信号传递通路活化水平是由肿瘤细胞 PDGF-B 表达水平所决定的,可能它们共同介导的生物信号既可刺激细胞增殖又可进一步促进 PDGF-B、PDGR α 和 PDGR β 表达,形成一个具有异常正反馈调节作用的自分泌环,使 PDGF-B 生物信号向细胞内传递的速度和频率越来越强,从而成为诱发胶质细胞转化和胶质瘤形成的重要因素之一,并在促进胶质瘤恶化进展方面发挥重要作用。

3.3 PDGF-B 与胶质瘤细胞周期的关系^[5,7,10,11]

细胞周期调控机制主要涉及细胞周期蛋白(cyclin)及细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶(CDKs)。在各类细胞周期蛋白中, *cyd* 被认为是调控 G₁ 期进程的最重要调控因子,驱动细胞周期通过起始点。一些生长因子(如 EGF、PDGF、FGF 等)刺激静止期细胞的增殖与 *cyd* 活性增高有关,生长因子与细胞膜上相应受体相互作用,通过细胞内信号转导途径向细胞周期的机构传递信号,促进转录合成 *cyd*, 启动了细胞周期控制机构的运转。Nitta 等^[10]使用反义寡核苷酸抑制人胶质瘤细胞系 A 172 细胞的 *c-sis* 的表达和细胞生长实验表明,互补于 *c-sis* mRNA 的反义寡核苷酸能够抑制细胞的生长和 *c-sis* 蛋白的合成,作用的效应存在浓度依赖性,而且反义寡核苷酸能够影响细胞周期,抑制细胞进入 S 期,故认为原癌基因的活性是胶质瘤进展中的关键步骤,而且 *c-sis* 蛋白是 A 172 细胞系细胞进入细胞周期 S 期所必需的。

3.4 TFO 对大鼠胶质瘤的生长抑制作用 实验 I 组的抑瘤率 66.1%, 实验 II 组的抑瘤率是 91.8%, 说明 TFO 能够抑制胶质瘤生长。PDGF-B 表达的变化表明, TFO 能够抑制 C₆ 胶质瘤细胞的 PDGF-B 的表达,说明 TFO 可以通过抑制 PDGF-B 的表达来抑制 C₆ 胶质瘤的生长, PDGF-TFO 的浓度越高,效果越好,进一步证实了 PDGF-B 是胶质瘤生长的重要因素。PCNA 表达的变化表明, TFO 能够抑制 C₆ 胶质瘤细胞的 PCNA 的表达。提示 TFO 可以通过抑制 PDGF-B 的表达来抑制 C₆ 细胞的增殖能力。两实验组的 TFO 与对照组相比可抑制 C₆ 胶质瘤细胞周期的 S 期和 G₂-M 期的 DNA 的含量,阻断

G₀-G₁ 期向 S 期转化 ($P < 0.01$), 且有明显的浓度依赖性。

一般来说, 传统的抗肿瘤药物影响细胞的 DNA 合成和细胞的分裂, 故大多在细胞周期的 S 期发挥作用, 而 TFO 作为一种新的反义基因治疗肿瘤药物, 虽然其作用机制与以往传统的抗肿瘤药物不同, 但也有剂量和疗程的问题。实验组的治疗效果能维持多长时间, 一些仍有细胞增殖能力和因使用 TFO 后未进入 S 期, 尚未坏死和凋亡的细胞, 在何时和何种情况下再具备表达 PDGF-B 的能力, 尚需继续探讨和研究。

[参考文献]

- [1] Sehgal A. Molecular changes during the genesis of human gliomas[J]. *Surv in Surgical Oncol*, 1998, 14(1): 3-12
- [2] 刘 静, 徐人欢, 金由辛. 抑制 c-sis/PDGF-B 原癌基因表达的 TFO 设计、体外三链形成及功能的检测[J]. *中国科学(C 辑)*, 2001, 31(1): 36-42
- [3] Liu J, Xu RH, Jin YX, et al. Triplex targeting of human PDGF-B (c-sis, proto-oncogene) promote sepecifically inhibits factors binding and PDGF-B transcription[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(3): 783-791.
- [4] 李维方, 张光霁, 朱 诚, 等. 立体定向大鼠 C₆ 脑胶质瘤动物模型的建立[J]. *立体定向和功能神经外科杂志*, 2000, 13(2): 63-66
- [5] Li W F, Zhang G J, Zhu C, et al. A brain-tumor model of rat C₆ glioma utilizing stereotactic implantation[J]. *Liti Dingxiang He Gongnengxing Shenjing Waike Zazhi (Chin J Stereotact Funct Neurosurg)*, 2000, 13(2): 63-66
- [6] 蔡洪培, 邓志华. 反义核酸抗肿瘤治疗研究中靶基因的选择[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1998, 5(2): 148-150
- [7] 甄海宁. 胶质细胞瘤的反义基因治疗研究进展[J]. *国外医学·神经病学神经外科学分册*, 1998, 25(3): 118-121
- [8] 田长海, 李祺福, 欧阳高亮. 肿瘤反义基因治疗研究进展[J]. *国外医学·肿瘤学分册*, 2001, 28(4): 274-276
- [9] Potapova O, Fakhrai H, Baird S, et al. Platelet-derived growth factor-B/v-sis confers tumorigenic and metastatic phenotype to human T98G glioblastoma cells[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(1): 280-286
- [10] Heldin CH, Westermarck B. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor[J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(4): 1283-1316
- [11] Nitta T, Sato K. Specific inhibition of c-sis protein synthesis and cell proliferation with antisense oligodeoxynucleotides in human glioma cells[J]. *Neurosurgery*, 1994, 34(2): 309-315.
- [12] Kapoor GS, O'Rourke DM. Mitogenic signaling cascades in glial tumors[J]. *Neurosurgery*, 2003, 52(6): 1425-1435.

[收稿日期] 2004-01-27

[修回日期] 2004-05-20

[本文编辑] 孙 岩

Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8⁺ T-cell epitope SSp-1 of SARS-CoV spike protein

Wang B, Chen H, Jiang X, Zhang M, Wan T, Li N, Zhou X, Wu Y, Yang F, Yu Y, Wang X, Yang R, Cao X (Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] A novel coronavirus, severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV), has been identified as the causal agent of SARS. Spike (S) protein is a major structural glycoprotein of the SARS virus and a potential target for SARS-specific cell-mediated immune responses. A panel of S protein-derived peptides was tested for their binding affinity to HLA-A*0201 molecules. Peptides with high affinity for HLA-A*0201 were then assessed for their capacity to elicit specific immune responses mediated by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) both *in vivo*, in HLA-A2.1/K^b transgenic mice, and *in vitro*, from peripheral blood lymphocytes (PBLs) harvested from healthy HLA-A2.1⁺ donors. SARS-CoV protein-derived peptide-1 (SSp-1 RLNEVAKNL), induced peptide-specific CTLs both *in vivo* (transgenic mice) and *in vitro* (human PBLs), which specifically released interferon-gamma (IFN-gamma) upon stimulation with SSp-1-pulsed autologous dendritic cells (DCs) or T2 cells. SSp-1-specific CTLs also lysed major histocompatibility complex (MHC)-matched tumor cell lines engineered to express S proteins. HLA-A*0201-SSp-1 tetramer staining revealed the presence of significant populations of SSp-1-specific CTLs in SSp-1-induced CD8⁺ T cells. We propose that the newly identified epitope SSp-1 will help in the characterization of virus control mechanisms and immunopathology in SARS-CoV infection, and may be relevant to the development of immunotherapeutic approaches for SARS.

[Blood, 2004, 104(1): 200-206]