不同剂量尿酸保护性治疗帕金森病大鼠对炎性因子、肾、关节及血管内皮的影响

缪桂华 张 宁 舒海洋 张琪林 刘 晶 罗蔚锋

摘 要 目的 探讨不同剂量尿酸对帕金森病大鼠炎性因子、肾、关节及血管内皮的影响。**方法** 将 30 只 SD 大鼠分为 5 组,分别予生理盐水、尿酸 50、100、200、400mg/kg 连续腹腔注射 10 天,每天 2 次。于第 5 天第 1 次腹腔注射生理盐水和尿酸后,右侧纹状体缓慢注入 6 - OHDA,建立帕金森病大鼠模型。于第 5、10 天第 2 次注射后 1h 采取尾静脉血;于第 10 天采血后处死大鼠,迅速取脑、肾、踝关节、颈总动脉、腹主动脉。分别检测血、组织上清液的 CRP、IL - 6、TNF - α 和肌酐。**结果** (1)CRP、IL - 6、TNF - α 和肌酐:血浆和组织上清液的 CRP、IL - 6、TNF - α 水平各组之间比较无统计学差异,血浆肌酐 400mg/kg 组较生理盐水组显著升高($P < 0.05$)。(2)病理 HE 染色:400mg/kg 组肾脏轻度损伤改变,其余各组病理正常;踝关节各浓度组滑膜均无明显炎症改变;颈总动脉和腹主动脉各浓度组均无明显动脉粥样硬化和炎症改变。**结论** 适当尿酸水平的提高对 6 - OHDA - PD 大鼠肌酐、CRP、IL - 6、TNF - α 及肾脏、关节、动脉血管无明显影响。

关键词 尿酸 帕金森病 6 - OHDA Cr CRP IL - 6 TNF - α

[中图分类号] R742 [文献标识码] A

Effects of Different Doses of Uric Acid on Inflammatory Cytokines, Kidneys, Joints and Vascular Endothelium in Rats with Parkinson's Disease. *Miao Guihua, Zhang Ning, Shu Haiyang, et al. Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu 215004, China*

Abstract Objective To explore the effects of different doses of uric acid on inflammatory cytokines, kidneys, joints and vascular endothelium in rats with Parkinson's disease. **Methods** Thirty SD rats were divided into five groups, 6 in each group. Normal saline or uric acid at 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg, 400mg/kg were intraperitoneal injected for ten days respectively in each group, 2 times a day. On the fifth day after the first intraperitoneal injection of saline or uric acid, 6 - OHDA was slowly injected into the right striatum of every rat to set up Parkinson's disease modals. One hour after the second injection on the fifth and tenth day, tail vein blood of every rat was drawn. All rats were killed on the tenth day after tail vein blood was draw. Kidney, ankle, carotid artery, abdominal aorta were then quickly extracted and fixed in 10% formalin. CRP, IL - 6, TNF - α, and creatinine from blood or tissue supernatant were tested. **Results** (1)CRP, IL - 6 or TNF - α, from plasma or tissue supernatant, didn't show any significant difference among different treatment groups. Plasma creatinine in the uric acid 400mg/kg group was markedly higher than in the saline group ($P < 0.05$). (2)Kidney from the 400mg/kg uric acid group showed mild damage while kidney from other groups were normal. Synovium of ankle from all groups showed no obvious inflammatory changes. Carotid artery and abdominal aorta from all groups showed no apparently atherosclerosis and inflammatory changes. **Conclusion** Appropriately increasing of uric acid level has no obvious influence on creatinine, CRP, IL - 6, TNF - α, kidneys, joints or arterial in 6 - OHDA lesioned Parkinson rats.

Key words Uric acid; Parkinson's disease; 6 - OHDA; Cr; CRP; IL - 6; TNF - α

近年来流行病学及临床研究发现帕金森病(Parkinson's disease,PD)发病与尿酸水平密切相关,血尿酸水平相对低的人群 PD 的发生率较高[1]。PD 患者血、脑脊液及黑质纹状体尿酸水平明显低于健康对照者[2~4]。在 PD 患者中,尿酸水平相对高的患者比尿酸水平低的患者病情进展缓慢[5]。笔者的前期体外及在体研究也进一步证明提高尿酸水平对多巴胺能神经元具有保护作用[6,7]。另一方面,高尿酸血症患者常伴有 IL - 6、TNF - α 等炎性因子的水平的升高以及肾、关节、动脉内皮细胞的损害[8~10]。本研究观察用于保护多巴胺能神经元的不同剂量的尿酸对炎性因子水平,以及肾、关节、动脉内皮的影响,报道如

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2010229);苏州市科技支撑计划基金资助项目(SS201112)

作者单位:215004 苏州大学附属第二医院神经内科(缪桂华和张宁为共同第一作者)

通讯作者:罗蔚锋,电子信箱:lwfwxx@126.com

下。

材料与方法

1. 一般材料：清洁级健康雄性 SD 大鼠 30 只，体重 180～220g，由苏州大学实验动物中心提供。

2. 主要试剂及仪器：6－OHDA（Sigama 公司），IL－6 ELISA 试剂盒（北京欣博盛生物科技有限公司），TNF－α ELISA 试剂盒（R&D Systems，USA）。酶标仪（广东丹利科技有限公司）、光学显微镜（OLYMPUS，model：BX41TF）。

3. 方法：（1）实验大鼠分组及给药方法：将 30 只 SD 大鼠分为 5 组，每组 6 只，分别予生理盐水、尿酸 50、100、200、400mg/kg 连续腹腔注射 10 天，每天 2 次。于第 5 天第 1 次腹腔注射生理盐水后，右侧纹状体缓慢注入 6－OHDA，建立帕金森病大鼠模型。于第 5、10 天第 2 次注射后 1h 采取尾静脉血；于第 10 天采血后处死大鼠，迅速取肾、踝关节、颈总动脉、腹主动脉置于 10% 甲醛中固定以备制作石蜡切片，进行 HE 染色；取额叶、小脑皮质、纹状体、海马、中脑、中脑和肾置于－80℃冰箱以备超声裂解提取取上清液。分别检测血、组织上清液的肌酐、CRP、IL－6、TNF－α。（2）6－OHDA 帕金森病大鼠模型制作：麻醉 SD 大鼠，将大鼠固定在立体定向架上，剃去大鼠头顶处毛发。用 75% 乙醇消毒头皮后，正中纵行切开头皮，分离皮下组织，暴露颅骨，找到前囟，以前囟为基准点，确定右侧纹状体坐标，选择两个位点：①前囟后 0.7mm，右侧 3.0mm，进针深度 4.5mm；②前囟后 0.2mm，右侧 2.6mm，进针深度 6.0mm。每点注射 6－OHDA 5μg（10μg 6－OHDA 加入 5μl 含 0.02% 抗坏血酸的生理盐水中），注射速度 0.5μl/min，注射结束留针 5min，撤针速度 1mm/min，拔针后，缝合关闭伤口，消毒，放入笼中继续饲养。（3）组织超声裂解取上清液：保存于－80℃冰箱中的脑组织（取 20mg 左右）和肾脏（取 100mg 左右），溶于 RIPA 组织裂解液（1mg∶5μl），超声裂解后静置 30min，再 4℃、2000*g*、15min 离心后取上清液。（4）检测肌酐（Cr）和炎症因子（CRP、IL－6、TNF－α）：Cr 采用肌氨酸氧化酶法，试剂来自日本世诺临床诊断制品株式会社，使用东芝 TBA－120FR 测定；CRP 采用免疫比浊法，试剂来自 Orion Diagnostica Oy，使用 Kone Specific 分析仪测定；IL－6 和 TNF－α 采用 ELISA 法检测（IL－6 试剂来自北京欣博盛生物科技有限公司，TNF－α 试剂来自 R&D Systems），按试剂盒说明书方法稀释、加样、洗板、孵育，测定 450nm 波长处的吸光度（A 值），以 A 值为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线，根据标准曲线计算各样品浓度。（5）HE 染色观察肾脏、踝关节、颈总动脉病理改变：10% 甲醛固定组织常规方法脱水、包埋、切片、HE 染色，显微镜下观察。

4. 统计学方法：采用 SPSS 17.0 软件分析实验数据，数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较应用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 不同剂量尿酸对血 CRP、TNF－α、Cr 水平的影响：分别予生理盐水、50、100、200、400mg/kg 尿酸连续腹腔注射 10 天，各组第 5、10 天的血 CRP、TNF－α、Cr 水平见表 1。CRP 水平在各组间比较无统计学差异（$P>0.05$）。随着腹腔注射尿酸剂量的增加及天数的延长，TNF－α 水平在不同的组别中有增高的趋势，但无统计学差异（$P>0.05$）；Cr 水平变化相对明显，第 5、10 天 400mg/kg 尿酸组 Cr 水平显著高于生理盐水组（$P<0.05$）。

2. 不同剂量尿酸对脑组织 TNF－α 水平的影响：各组第 10 天大脑皮质、小脑皮质、左纹状体、海马、左侧中脑、右侧中脑 TNF－α 水平见表 2。大脑皮质、小脑皮质、左纹状体、海马、左侧中脑、右侧中脑组织上清 TNF－α 值不同浓度尿酸注射组分别与生理盐水对照组比较差异均无统计学意义。（$P>0.05$）。

表 1　各组别血 CRP、TNF－α、Cr 水平（$\bar{x} \pm s$）

组别	CRP（mg/L）		TNF－α（pg/ml）		Cr（μmol/L）	
	5 天	10 天	5 天	10 天	5 天	10 天
生理盐水组	4.15 ± 0.10	4.18 ± 0.18	80.33 ± 17.38	82.55 ± 15.15	14.67 ± 3.20	15.50 ± 3.83
50mg/kg 尿酸组	4.18 ± 0.15	4.23 ± 0.21	83.11 ± 16.79	86.44 ± 9.76	15.83 ± 2.48	16.33 ± 4.23
100mg/kg 尿酸组	4.27 ± 0.18	4.27 ± 0.12	85.89 ± 22.77	90.89 ± 17.05	16.67 ± 3.56	18.67 ± 3.27
200mg/kg 尿酸组	4.28 ± 0.15	4.37 ± 0.10	88.67 ± 22.78	92.56 ± 10.68	17.17 ± 1.72	19.50 ± 3.51
400mg/kg 尿酸组	4.28 ± 0.13	4.38 ± 0.27	88.67 ± 22.97	94.78 ± 7.20	19.83 ± 1.47*	19.67 ± 1.86*

与生理盐水组相比，*$P<0.05$

表 2　各组第 10 天大脑皮质、小脑皮质、左纹状体、海马、左右侧中脑 TNF－α 水平（$\bar{x} \pm s$，pg/mg）

组别	大脑皮质	小脑皮质	左纹状体	海马	左侧中脑	右侧中脑
生理盐水组	2.04 ± 0.81	2.25 ± 0.89	3.22 ± 1.07	4.31 ± 1.60	3.22 ± 1.60	3.57 ± 0.94
50mg/kg 尿酸组	2.90 ± 1.64	2.32 ± 0.62	3.56 ± 1.41	3.65 ± 1.11	3.72 ± 1.59	3.61 ± 0.79
100mg/kg 尿酸组	3.15 ± 1.72	3.10 ± 0.75	3.72 ± 0.82	4.58 ± 1.87	3.92 ± 2.18	4.09 ± 1.77
200mg/kg 尿酸组	3.19 ± 1.14	3.37 ± 1.23	4.20 ± 0.81	5.31 ± 2.39	4.07 ± 1.78	4.10 ± 2.10
400mg/kg 尿酸组	3.24 ± 1.18	3.48 ± 0.16	4.31 ± 1.60	5.38 ± 2.30	5.40 ± 3.41	4.78 ± 2.77

3. 不同剂量尿酸对肾脏 CRP、IL－6、TNF－α、Cr 水平的影响：各组第 10 天肾脏组织 TNF－α、IL－6、TNF－α 和 Cr 水平见表 3。TNF－α、IL－6、TNF－α、Cr 各组之间无统计学差异（$P>0.05$）。

表 3　各组肾脏 CRP、IL－6、TNF－α、Cr 水平（$\bar{x}\pm s$）

组别	CRP（mg/L）	IL－6（pg/mg）	TNF－α（pg/mg）	Cr（μmol/L）
生理盐水组	11.28±2.86	29.84±16.22	12.44±6.83	104.33±3.44
50mg/kg 尿酸组	11.07±1.65	30.73±20.05	14.31±4.61	105.67±4.23
100mg/kg 尿酸组	11.30±2.75	35.01±19.05	14.36±14.06	106.33±2.88
200mg/kg 尿酸组	11.37±2.53	36.48±22.76	15.31±5.09	109.33±4.27
400mg/kg 尿酸组	11.77±2.11	40.98±21.98	17.46±9.81	109.33±4.55

4. 不同剂量尿酸对肾脏、踝关节、颈总动脉、腹主动脉内皮 HE 染色的影响：（1）肾脏 HE 染色：各浓度肾脏组织中均无尿酸盐结晶沉积，无内皮细胞和系膜细胞增生。其中 400mg/kg 组 HE 染色可见肾脏轻度损伤改变（肾小球毛细血管丛轻度扩张，近曲肾小管上皮细胞水变性或气球样变，管腔内可见蛋白管型或细胞管型），见图 1～图 3。（2）踝关节 HE 染色：踝关节各浓度组中均无尿酸盐结晶沉积，滑膜组织无充血水肿，无红细胞、中性粒细胞及纤维素渗出，滑膜上皮排列整齐，无断裂（图 4）。（3）颈总动脉和腹主动脉 HE 染色：颈总动脉和腹主动脉各浓度组均无明显动脉粥样硬化和炎症改变。无明显内膜及肌层增厚，各层无淋巴细胞和浆细胞为主的炎性细胞浸润，无粥样硬化的脂纹和纤维斑块（图 5、图 6）。

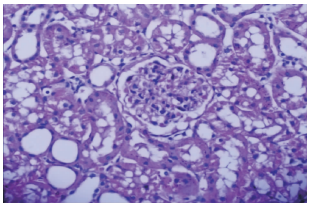

图 1　0mg/kg 尿酸组肾脏（HE 染色，×400）

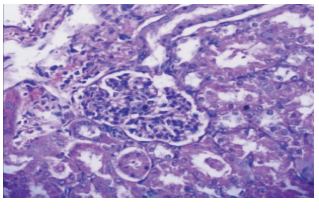

图 2　200mg/kg 尿酸组肾脏（HE 染色，×400）

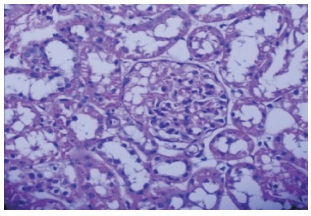

图 3　400mg/kg 尿酸组肾脏（HE 染色，×400）

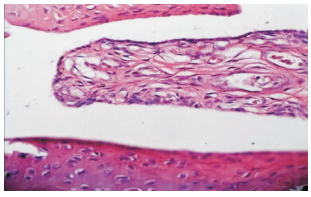

图 4　400mg/kg 尿酸组踝关节（HE 染色，×400）

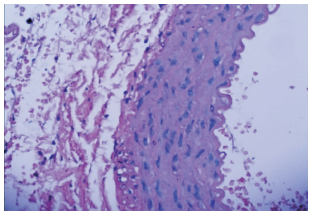

图 5　400mg/kg 尿酸组颈总动脉（HE 染色，×400）

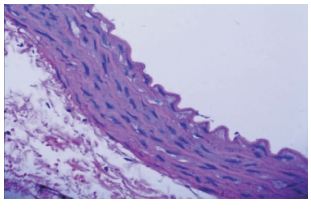

图 6　400mg/kg 尿酸组腹主动脉（HE 染色，×400）

讨　论

尿酸对多巴胺能神经元具有保护作用。Chen 等[11]应用敲除尿酸氧化酶（urate oxidase，UOx，降解尿酸为尿囊素）基因 6－OHDA 帕金森病小鼠模型，通过测定中脑黑质多巴胺能神经元数目、纹状体多巴胺含量和行为改变，发现尿酸水平的升高可以减轻 6－OHDA 对黑质纹状体系统多巴胺能神经元的毒性作用。相反，UOx 过表达的小鼠，尿酸水平显著降低，则加剧了 6－OHDA 对黑质纹状体多巴胺能神经的损害，说明尿酸可以减轻 6－OHDA 对多巴胺能神经

元的毒性作用;朱红灿等[12]研究发现腹腔注射适当剂量的尿酸可改善 6 - OHDA - PD 大鼠学习记忆能力,本研究前期的体外研究结果也表明,100 ~ 400μmol/L 尿酸可显著减轻 6 - OHDA 作用 6、12、24h 后造成的 PC12 细胞生存率下降,减少 6 - OHDA 导致 caspase - 3 激活,从而降低细胞的凋亡[6]。Gong 等[13]发现腹腔注射尿酸可以提高血浆和脑组织中的尿酸水平,能够增加谷胱甘肽水平和超氧化物歧化酶活性,降低丙二醛在 6 - OHDA 帕金森病 SD 大鼠纹状体内的聚积,结果提示尿酸对中脑黑质多巴胺能神经元具有保护作用,与其调节 Akt/GSK3β 信号通路功能有关。王丽君等[7]发现 100、200mg/kg 尿酸处理的 6 - OHDA 帕金森病 SD 大鼠组较正常生理盐水组行为学改善显著,纹状体多巴胺含量降低最少,认为 100、200mg/kg 尿酸组具有最佳多巴胺能神经元保护作用,250mg/kg 尿酸组其保护作用减弱,提示尿酸发挥神经保护作用具有一定的范围,若超过此范围,保护作用降低甚至可能出现毒性作用。

尿酸是人体主要的抗氧化剂之一,清除自由基及螯合金属离子,减少体内氧化应激的水平[14]。流行病学及临床研究结果均提示尿酸对帕金森病具有保护作用,适当相对高水平的尿酸能够显著降低 PD 的发生,然而,高水平尿酸与炎症因子水平的增高、动脉粥样硬化、高血压、冠心病、脑卒中、痛风、关节和肾脏损害密切相关。在高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)患者中,有临床症状的肾损害占 41%,但尸检几乎都有肾损害,肾小管损害较突出。本研究发现血浆肌酐 400mg/kg 组较生理盐水组显著升高,HE 染色发现 400mg/kg 组肾小球毛细血管丛轻度扩张,近曲肾小管上皮细胞水变性或气球样变,管腔内可见蛋白管型或细胞管型,肾脏发生轻度损伤改变,表明过高尿酸会对肾脏产生损坏作用。人体中 70% 尿酸经肾脏排泄,主要通过人尿酸转运蛋白(human urate transporter protein, hUTP)在细胞内外进行跨膜转运;hUTP 基因位于第 17 号染色体的短臂上,含有 11 个外显子,分为 3 种亚型,属于贯穿细胞膜脂质的离子通道,具有高度的选择性,广泛存在于体内多种组织细胞膜中,其中肾脏中含量最高[15]。尿酸更容易在肾脏中蓄积而造成肾脏损害,可能与 hUTP 这一分布特点有关。

本研究检测的炎性因子包括 IL - 6、TNF - α 和 CRP。它们分别是机体炎性反应、应激反应以及非特异炎症反应的敏感标志物。高尿酸血症与炎性因子水平升高、血管内皮损害密切相关,可能与以下因素有关:(1)尿酸在血液中物理溶解度较低,高尿酸血症时尿酸微结晶容易析出,沉积于血管壁,引起局部炎症。在炎症反应期间 IL - 6 与 TNF - α 可以相互作用,TNF - α 促使 IL - 6 的产生和释放,IL - 6 又可以对 TNF - α 发挥调节作用;同时 IL - 6、TNF - α 作为刺激物又可共同促进肝脏合成及释放急性期蛋白 CRP,从而导致 CRP 的增高[8]。(2)尿酸是嘌呤、黄嘌呤氧化酶代谢途径的产物,尿酸的生成过程伴有氧自由基的产生。氧自由基增多加重氧化应激反应,而氧化应激反应是血管内皮功能损害的一个重要因素。(3)尿酸在血管平滑肌细胞内通过激活 NF - KD 而激活单核细胞趋化因子,尿酸也可直接刺激单核细胞释放 IL - 1、IL - 6 和 TNF - α。本研究发现不同浓度尿酸处理后 SD 大鼠血浆和组织上清液的 CRP、IL - 6、TNF - α 水平各组之间无统计学差异,血浆肌酐 200mg/kg 及以下尿酸组与生理盐水组比较无统计学差异,病理提示肾脏 200mg/kg 及以下尿酸组、踝关节各浓度组、颈总动脉和腹主动脉各浓度组均无明显炎症改变,提示适当尿酸水平的提高对 6 - OHDA - PD 大鼠肌酐、CRP、IL - 6、TNF - α 及肾脏、关节、动脉血管无明显影响。

总之,本研究结果提示对 6 - OHDA 帕金森病大鼠黑质 - 纹状体系统多巴能神经元具有显著保护作用 100、200mg/kg 尿酸组,以及更小剂量尿酸组对炎性因子 IL - 6、TNF - α、CRP,以及血管内膜、肾脏和关节滑膜无明显影响。为今后从实验室到临床的转化,适当提高尿酸水平,预防及优化帕金森病治疗提供了一定的依据。

参考文献

1 De Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, *et al*. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson's diease[J]. Ann Neurol, 2005, 58(5): 797 - 800

2 王丽君,罗蔚锋,王恒会,等. 帕金森病患者血尿酸水平[J]. 中华神经科杂志, 2008, 41(3): 157 - 158

3 Church WH, Ward VL. Uric acid is reduced in the substantia nigra in Parkinson's disease: effect on dopamine oxidation[J]. Brain Res Bull, 1994, 33: 419 - 425

4 Fitzmaurice PS, Ang L, Guttman M, *et al*. Nigral glutathione deficiency is not specific for idiopathic Parkinson's disease[J]. Mov Disord, 2003, 18: 969 - 976

5 Weisskopf MG, O'Reilly E, Chen H, *et al*. Plasma urate and risk of Parkinson's disease[J]. Am J Epidemiol, 2007, 166: 561 - 567

6 叶艳,罗蔚锋,朱婷鸽,等. 尿酸减轻 6 - 羟基多巴胺对 PC12 细胞的毒性作用[J]. 中国临床神经科学, 2010, 18(2): 135 - 139

7 王丽君,罗蔚锋,王恒会,等. 尿酸对 6 - 羟基多巴胺致大鼠黑质纹状体系统毒性的影响[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(19): 1362 -

1365
8 Johnson RI, Kang D, Feig D, *et al*. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? [J]. Hypertension, 2003, 41(6): 1183 - 1190
9 王庆文, 刘志红. 高尿酸血症与慢性肾脏病的关系[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(8): 510 - 511
10 Zhang Z, Bian L, Choi Y. Serum uric acid: a marker of metabolic syndrome and subclinical atherosclerosis in Korean men[J]. Angiology, 2012, 63(6): 420 - 428
11 Chen X, Burdett T, Desjardins C, *et a*1. Disrupted and transgenic urate oxidase alter urate and dopaminergic neurodegeneration[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(1): 300 - 305
12 朱红灿, 耿利娇, 蔡春生, 等. 尿酸对帕金森病大鼠学习记忆能力的影响及其机制[J]. 中华神经外科杂志, 2010, 27(2): 227 - 229
13 Gong L, Zhang Q, Zhang N, *et al*. Neuroprtection by urate on 6 - OHDA - lesioned rat model of Parkinson′s diease: linking to Akt/GSK3βsignaling pathway[J]. J Neurochem, 2012, 123: 876 - 885
14 Hink HU, Santanam N, Dikalov S, *et a*1. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity[J]. Arterioscler Thromb Vase Biol, 2002, 22: 1402 - 1408
15 Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions[J]. Mole Asp Med, 2013, 34: 413 - 435

(收稿日期: 2013 - 11 - 03)
(修回日期: 2013 - 11 - 29)

慢病毒介导的自杀基因对树突状细胞的杀伤作用

程婷婷 徐 希 葛杭萍 陈枫煜 梁 彬 俞 康

摘 要 目的 探讨慢病毒介导的自杀基因胸腺激酶(TK)对小鼠树突状细胞(DC)的杀伤作用。**方法** 构建含自杀基因 TK 的慢病毒载体质粒,转染树突状细胞后通过更昔洛韦激活自杀基因使细胞死亡。**结果** 阳性重组质粒酶切及测序鉴定与预期结果相符,成功构建其真核表达载体。收集含自杀基因的慢病毒,测其效价为 2×10^9 TU/ml,达到实验要求。慢病毒转染树突状细胞后,观察树突状细胞的形态、大小及数量与对照组比较无明显差异,经流式细胞仪检测绿色荧光蛋白(GFP)表达率为 96.43%。CCK - 8 法检测发现,树突状细胞随着更昔洛韦药物浓度的增加,细胞凋亡率逐渐上升。药物浓度 100μg/ml 作用时间 48h 时,为药物对细胞的最佳杀伤作用时间;更昔洛韦该药物对正常的树突状细胞未发现有毒性作用。**结论** 慢病毒介导的自杀基因 TK 对小鼠树突状细胞具有显著的杀伤作用。

关键词 树突状细胞 自杀基因 慢病毒 胸腺激酶 更昔洛韦
[**中图分类号**] R733 [**文献标识码**] A

Cytotoxicity Effect of Lentivirus - mediated Suicide Genes on Dendritic Cells. *Cheng Tingting, Xu Xi, Ge Hangping, et, al. The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China*

Abstract Objective To explore the killing effect of lentivirus - mediated suicide gene thymidine kinase(TK) on dendritic cells (DC) in mice. **Methods** The lentiviral vector plasmid containing suicide gene TK was constructed and transfected into the dendritic cells. Dendritic cells was leading to death by activating suicide gene through ganciclovir treatment. **Results** The outcome of restriction endonuclease digestion of positive recombinant plasmids and DNA sequencing were in consistence with the expected. The TK gene was successfully cloned and eukaryotic expression vector were constructed successfully. Titer lentivirus which contain the suicide gene was harvested and concentrated. Adenoviral titer was 2×10^9 TU/ml which achieved the requirement of our experiment. After lentiviral vector transferred into the dendritic cells, we observed the morphology, size and number of dendritic cells, and found there was no significant differences between the control group and experiment group. Dendritic cells were infected by lentivirals with a Green Fluorescent Protein (GFP) of 96.43%, which was confirmed by flow cytometry. CCK - 8 assays showed that the death rates of the dendritic cells increased with the increasing ganciclovir concentration. With the drug concentration of 100μg/ml for 48 hours, it could get the maximum drug effects. In the meantime we found ganciclovir had no toxic effects on the normal dendritic cells. **Conclusion** The lentiviral vector - mediated suicide gene thymidine kinase has marked cytotoxicity effects against dendritic cells in mice.

Key words Dendritic cells; Suicide gene; Lentivirus; Thymidine kinase; Ganciclovir

---

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y2101069、LY12H08002)
作者单位: 325000 温州医科大学附属第一医院(程婷婷、葛杭萍、陈枫煜); 325000 温州医科大学附属第一医院血液科(徐希、梁彬、俞康)
通讯作者: 俞康, 教授, 硕士生导师, 电子信箱: yukang62@126.com