文章编号:1000-5404(2007)19-1841-03

论著

MDR1基因修饰的自体骨髓移植后体内表达及时限的研究

王 佚,金先庆,洪思琦 (重庆医科大学附属儿童医院普通外科,重庆 400014)

提 要:目的 研究多药耐药基因1(multidrug resistanle gene 1, MDR1)转染的骨髓单个核细胞自体移植后,外源性MDR1基因在骨髓中的功能性表达及时限。**方法** 体外浓缩病毒上清转染法将MDR1基因导入兔骨髓单个核细胞;经大剂量环磷酰胺化疗预处理后,将转染的骨髓单个核细胞行自体骨髓移植;采用PCR法、免疫组织化学法和柔红霉素(daunorubicin, DNR)排出试验检测MDR1基因在受体骨髓中的整合及功能性表达。**结果** 自体骨髓移植后1~4个月,PCR法检测到外源性MDR1基因在骨髓细胞基因组中的整合;免疫组化法测得骨髓单个核细胞中P-gp阳性率分别为9.5%、8.5%、6.0%、3.5%;柔红霉素排除试验检测到定植的MDR1基因能功能性的表达。**结论** 转染MDR1基因的骨髓单个核细胞自体移植后,MDR1基因能定植于骨髓中并功能性的表达4个月。

关键词: 多药耐药基因;转染;自体骨髓移植
中图法分类号: R394; R457.7; R730.53 **文献标识码:** A

Functional expression and temporality of MDR1 gene in bone marrow of rabbits after autologous transplantation with the gene modification to mononuclear cells

WANG Yi, JIN Xian-qing, HONG Si-qi (Department of Surgery, Chongqing Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To explore the functional expression and temporality of MDR1 gene in bone marrow of rabbits after autologous bone marrow transplantation with MDR1 transferred bone marrow mononuclear cells. Methods The supernatant of the amphotropic virus producer cell line PA317-HaMDR1/A was collected and concentrated to cocultivate with the bone marrow mononuclear cells of the rabbits. After large dose of chemotherapy with cyclophosphamide, the transferred cells were autotransplanted into the bone marrow. The integration, transfection rate and physiological function of MDR1 gene were tested by PCR, SP immunohistochemical method and daunorubicin (DNR) extrusion test respectively. Results After autologous bone marrow transplantation had been executed for 1-4 months, the integration of MDR1 gene in genome of bone marrow mononuclear cells was detected by PCR, and the expression rates of P-gp in cells tested by SP immunohistochemical method were 9.5%, 8.5%, 6.0% and 3.5% respectively. The physiological function of MDR1 gene in bone marrow cells was proved by DNR extrusion test. Conclusion After the autotransplantation with bone marrow mononuclear cells transferred by MDR1 gene, the MDR1 gene can implant into the bone marrow of rabbits and has expressed functionally for 4 months, which has provided a basis for further research on chemoprotection experiment of the MDR1 gene transferred into the bone marrow cells.

Key words: multidrug resistance gene; transfection; autologous bone marrow transplantation

恶性肿瘤是目前造成人类死亡的主要疾病原因,化疗是治疗恶性肿瘤并防止其复发和转移的主要治疗手段。骨髓抑制是化疗后最常见的严重并发症,常常影响化疗方案的实施。本课题研究转染多药耐药基因1(multidrug resistance gene 1, MDR1)的骨髓单个核细胞自体移植后,MDR1基因在骨髓中功能性的表达及时限,为进一步研究MDR1基因在大剂量化疗中对骨髓的保护作用研究提供了实验基础。

基金项目: 国家自然科学基金(30330590, 30600579)
Supported the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30330590, 30600579)

作者简介: 王 佚(1975-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事逆转恶性肿瘤多药耐药性的基因方面的研究,现在外二科。电话:(023)63876994
通讯作者: 金先庆,电话:(023)63876994

收稿日期: 2006-11-01;**修回日期:** 2007-01-18

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 纯种新西兰大白兔8只(重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量1.5~2.0 kg,2~3月龄。

1.1.2 病毒包装细胞 含人全长MDR1 cDNA逆转录病毒包装细胞PA317-HaMDR1/A由中科院天津血研所构建,由本

科实验室保存。

1.1.3 实验试剂 鼠抗人 MDR1 单克隆抗体 C219、链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品，PCR 所需试剂为上海生物工程技术有限公司产品，细胞因子为 Sigma 公司产品，优质胎牛血清、IMDM 培养基为 Gibco 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将 8 只新西兰大白兔按随机数字表法分为 2 组，每组 4 只；实验组动物行 MDR1 基因转染的骨髓单个核细胞自体骨髓移植，对照组动物行未转染的骨髓单个核细胞自体骨髓移植。

1.2.2 制备浓缩病毒上清液 培养产病毒包装细胞，收集上清液经系列稀释法测得病毒滴度为 4.25×10^6 CFU/ml；经 40 000 r/min高速低温离心 2 h(使病毒上清液浓度再提高6～8倍)，沉淀用 10% 胎牛血清 IMDM 重悬后于 -70 ℃冰箱内保存待用。

1.2.3 MDR1 基因体外转染兔骨髓单个核细胞 穿刺兔股骨下端抽取骨髓，密度梯度离心法分选骨髓单个核细胞制成单细胞悬液；采用 1 ml 培养体系，实验组培养体系内含骨髓单个核细胞 $(2.0 \sim 5.0) \times 10^5$ 个、3% Glu、2-ME、Polyberene、10% BSA、EPO、IL-3、IL-6、SCF、GM-CSF 及浓缩病毒上清；对照组培养体系仅以等量培养基替换浓缩病毒上清，其余成分同实验组。37 ℃，5% CO_2 湿性孵育，隔日半量换液，收集转染 4 d 的骨髓单个核细胞[1]。

1.2.4 MDR1 基因转染骨髓单个核细胞的自体骨髓移植 骨髓移植前 24 h，动物接受大剂量环磷酰胺(150 mg/kg)化疗以腾空受体骨髓的"龛位"；预处理后 24 h 和 48 h，将转染和未转染 MDR1 基因的骨髓单个核细胞经耳缘静脉分 2 次自体回输，每次细胞数($10^6 \sim 10^7$)/kg。

1.2.5 MDR1 基因在受体骨髓中功能性表达及时限检测 自体骨髓移植后 1 个月开始进行外源性 MDR1 基因定植及表达时限的检测：取两组动物骨髓，密度梯度离心法分选骨髓单个核细胞，从基因、蛋白质和功能水平检测外源性 MDR1 基因在受体骨髓中的定植和功能性表达情况；每 1～2 个月进行 1 次检测，直至无法检测出 MDR1 基因的表达。

1.2.5.1 PCR 法检测外源性 MDR1 基因的整合 酚-氯仿法提取待检细胞的 DNA；采用 25 μl 扩增体系(引物 P1、P2 各 0.5 μl、*Taq* 酶 0.5 μl、DNA 模板 2 μl、dNTPs 0.5 μl)。循环条件：94 ℃ 5 min→94 ℃ 45 s，58 ℃ 45 s，72 ℃ 60 s 共 35 个循环→72 ℃ 7 min；引物序列：正义链 5′-CCCATCATTGCAATAGCAGG，反义链 5′-GTTCAAACTTCTGCTCCTCA。

1.2.5.2 免疫组化法检测转染率 链霉素抗生物素-过氧化物酶免疫组化试剂盒检测细胞 P-gp 的表达：阳性反应为细胞膜或细胞质染成棕色，细胞膜和细胞质内均无反应者为(－)，细胞膜或细胞质内部分染成浅棕色者为(＋)，细胞膜和细胞质内均染成浅棕色为(＋＋)，染成深棕色为(＋＋＋)，细胞膜有深棕色颗粒集结、细胞质染成深棕色为(＋＋＋＋)。每张涂片计数 200 个细胞，计算各级阳性细胞所占百分比。

1.2.5.3 柔红霉素(daunorubicin，DNR)泵出试验检测基因功能 将柔红霉素加入待检细胞悬液中；37 ℃，5% CO_2 湿性孵育 30 min，离心去上清；洗去细胞膜外柔红霉素孵育 10 min；加入异搏定终止泵功能；洗涤后上流式细胞仪检测。采用 FACS Calibur 型检测仪，收集 10 000 个细胞进行测定；在 Power macintosh 7600 型计算机上用 Cell Quest 软件(B. D. Co USA)分析细胞内 DNR 药物潴留的细胞百分比，并绘出 DNR 含量坐标图。

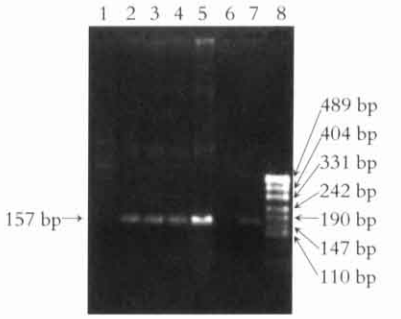
1.3 统计学方法

两组动物骨髓单个核细胞 P-gp 表达阳性率比较采用Fisher精确概率法，DNA 阳性率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 外源性 MDR1 基因在受体骨髓单个核细胞基因组中的整合

应用于本实验载有目的基因 MDR1 的质粒使用特异性引物扩增，可于 157 bp 处见特异性条带[1]。从骨髓移植后 1 个月开始，每月采集两组动物骨髓单个核细胞，提取 DNA 进行 PCR 扩增结果显示：实验组动物在 MDR1 基因转染的骨髓单个核细胞自体骨髓移植后 1～4 个月，骨髓单个核细胞 DNA 扩增产物在 157 bp 处均检测到特异性的条带，说明外源性 MDR1 基因整合到靶细胞基因组达 4 个月(图 1)；而对照组动物同期骨髓单个核细胞 DNA 扩增产物中未见相应的特异性片段。



1：移植后 5 个月；2：移植后 4 个月；3：移植后 3 个月；4：移植后 2 个月；5：移植后 1 个月；6：阴性对照；7：阳性对照(HaMDR1/PA317)；8：标准

图 1 移植后 1～5 个月实验组兔骨髓单个核细胞中 MDR1 基因 PCR 电泳图

2.2 外源性 MDR1 基因在受体骨髓单个核细胞中的表达

免疫组化法检测移植后两组动物骨髓单个核细胞 P-gp 的表达情况(表 1)。随着定植时间延长，P-gp 的表达率逐渐下降；而对照组骨髓单个核细胞 P-gp 阳性率为 0.5% ～1.0%。经 Fisher 精确概率法分析，移植后 1～4 个月两组动物骨髓单个核细胞 P-gp 表达阳性率有显著性差异($P<0.05$)，移植后 5 个月两组间 P-gp 表达无显著性差异($P>0.05$)，说明移植后 4 个月定植于受体动物骨髓内的 MDR1 基因能表达产生 P-gp。

表 1 骨髓移植后两组动物骨髓单个核细胞 P-gp 表达和 DNR 阳性率比较(%)

移植后时间	实验组		对照组	
	P-gp 阳性率	DNR 阳性率	P-gp 阳性率	DNR 阳性率
1 个月	9.5[a]	29.27[a]	0.5	59.69
2 个月	8.5[a]	－	0.5	－
3 个月	6.0[a]	45.01[a]	1.0	79.38
4 个月	3.5[a]	－	0.5	－
5 个月	1.5	87.38[a]	1.0	97.43

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.3　外源性 MDR1 基因在受体骨髓单个核细胞中功能表达

移植后每 1 ~2 个月采用柔红霉素排出试验检测定植于兔骨髓单个核细胞内的 MDR1 基因的药物外排泵功能(表 1)。同时期两组细胞内 DNR 阳性率有显著性差异($P<0.05$)；结合 P-gp 阳性率，说明实验组骨髓单个核细胞 P-gp 表达阳性率高，药物外排泵功能强，细胞内残留柔红霉素含量低。证明 MDR1 基因表达产生的 P-gp 具有药物外排泵功能。

3　讨论

肿瘤细胞耐药和骨髓抑制是严重影响化疗疗效的两大难题，肿瘤细胞过度表达 MDR1 是造成肿瘤耐药的主要原因，而正常的骨髓造血干祖细胞因表达 MDR1 的水平极低而对化疗药物异常敏感[2]。故设想通过病毒载体将外源性 MDR1 导入造血干祖细胞中再移植到肿瘤患者体内，使其骨髓能耐受大剂量化疗而不发生骨髓抑制，同时通过大剂量、短间歇的化疗提高恶性肿瘤的疗效[3]。这一设想首先在动物实验中得到了实现。Carpinteiro 等[4] 通过逆转录病毒载体 SF1m 将 MDR1 导入小鼠骨髓造血细胞并自体移植，紫杉醇化疗后小鼠外周血白细胞数几乎是未转染组的 5 倍；化疗后第 2 周，转染组小鼠外周血白细胞数不但未下降，还呈现上升的趋势，提示转染 MDR1 的造血干细胞在受体骨髓中发挥作用。研究表明，MDR1 对骨髓保护作用的发挥，与转染的骨髓细胞在受体骨髓中定植的数量与时限密切相关。

为提高转染细胞体内定植率，必须对受体骨髓进行预处理，使受体骨髓腾空“龛位”而有利于转染细胞的定植。新西兰大白兔对放射线照射异常敏感而极易发生严重的休克反应死亡，故不宜选用其来进行预处理；再者，本研究采用的是自体骨髓移植方式，采集骨髓时已腾空了部分龛位，所以选择大剂量环磷酰胺化疗来作为预处理方式。如果把干细胞比为“种子”，则龛位则是“土壤”，龛位在预处理后 3 ~4 d 才完成腾空的过程；而移植后干细胞在骨髓内的植入是一个高度特异性的主动过程，称为归巢(homing)，一般在移植后 12 ~36 h 完成。如果没有可供移植干祖细胞及时植入的“龛位”，干祖细胞就进入肝、脾、肺等组织中，而不能进入以后腾空的“龛位”，故不能发挥正常造血作用；而以后腾出的“龛位”则因化疗预处理损伤了造血微环境而导致间质水肿、充血、出血等而消失，从而浪费了“龛位”；因此准确把握预处理后的移植时机非常关键[5]。本研究以富含骨髓造血干祖细胞的骨髓单个核细胞为 MDR1 转染的靶细胞；采取每天 1 次，每次适量(10^6 ~ 10^7/kg)，在化疗后 48 h 内分 2 次回输的程序性移植，这样既充分利用每次腾出的“龛位”，也符合临床骨髓移植前预处理的治疗特点，是一种“种子”与“土壤”兼顾的移植方法。自体移植后 1 个月，外源性 MDR1 基因在受体骨髓中定植率达 9.5%。

但转染 MDR1 的造血细胞移植后，目的基因究竟能在受体骨髓中定植多长时间呢？Licht 等[6] 将转染 MDR1 的造血干细胞回输入经致死剂量放射线照射的 SCID 鼠体内，目的基因可持续稳定表达 4 ~6 个月。本实验显示：PCR 法在移植后 1 ~4 个月均检测到 MDR1 在骨髓单个核细胞基因组中的整合；免疫组化法检测核细胞中 P-gp 表达的阳性率逐渐降低；移植后 4 个月，DNR 排出试验检测细胞表达的 P-gp 仍有药物外排泵的功能。所以，转染的骨髓单个核细胞自体移植后，MDR1 在受体骨髓中可定植并功能性表达 4 个月左右，与同类研究结果相似。定植于骨髓中表达 MDR1 的阳性细胞比例逐月下降，可能与转染 MDR1 基因的造血干祖细胞数量极少，不能持续增殖分裂产生携带 MDR1 的各系造血细胞有关。对于实体瘤患者，MDR1 转染骨髓造血细胞移植旨在化疗时发挥保护骨髓的作用，而不同于某些基因缺陷疾病所需移植基因在受体内的终身表达；并可以通过重复转染和移植的过程来较长时期的保护受体骨髓功能。所以，定植于受体骨髓中的 MDR1 表达时限足够满足保护化疗期间骨髓造血功能的需要。本研究结果为临床应用 MDR1 修饰的自体骨髓移植来预防化疗对骨髓的毒副作用提供了实验依据，但还需进行深入的研究来评价该法的安全性和有效性。

参考文献：

[1] 王　佚，金先庆，王　珊. 多药耐药 mdr-1 基因体外转染兔骨髓造血细胞及其表达与功能的研究[J]. 重庆医科大学学报，2003，28(4)：409 -413.

[2] D'Hondt V，Symann M，Machiels J P. Chemoprotection and selection by chemotherapy of multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) transduced cells[J]. Curr Gene Ther，2001，1(4)：359 -366.

[3] Takahashi S，Ito Y，Hatake K，*et al*. Gene therapy for breast cancer——Review of clinical gene therapy trials for breast cancer and MDR1 gene therapy trial in Cancer Institute Hospital[J]. Breast Cancer，2006，13(1)：8 -15.

[4] Carpinteiro A，Peinert S，Ostertag W，*et al*. Genetic protection of repopulating hematopoietic cells with an improved MDR1-retrovirus allows administration of intensified chemotherapy following stem cell transplantation in mice[J]. Int J Cancer，2002，98(5)：785 -792.

[5] Guo C B，Li Y C，Jin X Q. Chemoprotection effect of retroviral vector encoding multidrug resistance 1 gene to allow intensified chemotherapy *in vivo*[J]. Cancer Chemother Pharmacol，2006，58(1)：40 -49.

[6] Licht T，Aksentijevich I，Gottesman M M，*et al*. Efficient expression of functional human MDR1 gene in murine bone marrow after retroviral transduction of purified hematopoietic stem cells[J]. Blood，1995，86(1)：111 -121.

(编辑　邓强庭)