论著

文章编号:1000-5404(2008)23-2164-04

多药耐药基因转染对荷瘤小鼠骨髓造血细胞的保护作用

张秀亚,王 珊,李 圆,孔祥如,王江波 (重庆医科大学附属儿童医院肿瘤外科,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨MDR1基因转染荷瘤小鼠骨髓单个核细胞(BM-MNCs)后在体内的分布和对骨髓造血细胞的作用。**方法** 将32只H22肝癌荷瘤BALB/c小鼠随机分为4组:正常对照组(不照射不回输)、空白对照组(照射并回输生理盐水)、阴性对照组(照射并回输未转染的BM-MNCs)、转染实验组(照射并回输已转染的BM-MNCs),每组8只。阿霉素超剂量化疗,监测化疗过程中各组外周血细胞和肿瘤体积的变化,用RT-PCR法和免疫组化法检测外源性人MDR1基因和P-gp在荷瘤小鼠体内的表达和分布。**结果** 化疗后各组红细胞和血小板均无明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$);转染实验组白细胞数于化疗后第4周降至(3.32±0.26),与化疗前(6.64±0.39)相比减少有统计学意义($P<0.05$),化疗后第3周起转染实验组白细胞数高于阴性对照组,增高有统计学意义($P<0.05$);化疗3周后与3个对照组相比转染实验组肿瘤体积较小,减小有统计学意义($P<0.05$);外源性人MDR1基因和P-gp在骨髓和外周血单个核细胞有表达和分布,在心、肝、肺、脾和肾等组织中无表达和分布;肿瘤组织中无外源性人MDR1基因分布,有P-gp表达。**结论** MDR1基因转染荷瘤小鼠BM-MNCs后在超剂量化疗中对骨髓造血功能有保护作用,外源性MDR1基因在心、肝、肺、脾和肾等组织中无表达。

关键词: 多药耐药基因;P-糖蛋白;骨髓单个核细胞;BALB/c小鼠;肿瘤

中图法分类号: R331.22; R73-362; R735.7 **文献标识码:** A

MDR1 gene transfection protects haematogenesis of bone marrow cells in tumor-bearing mouse

ZHANG Xiu-ya, WANG Shan, LI Yuan, KONG Xiang-ru, WANG Jiang-bo (Department of Surgical Oncology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To observe the distribution of bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) after the transfection of exogenous multi-drug resistance gene-1 (MDR1) and its protective effect on the haematogenesis in bone marrow cells in gene therapy. **Methods** Thirty-two BALB/c tumor-bearing mouse were randomly and equally divide into 4 groups, normal control (A), blank control (B), negative control (C) and transfection control(D). The animals of last 3 groups received a radiation of 1.5 Gy and then infusion of normal saline, untransfected and transfected BM-MNCs respectively. Normal control group underwent no treatment. After chemotherapy of overdose adriamycine, their peripheral blood (PB) cells were counted and the tumor volume was measured. The distribution and expression of exogenous human MDR1 and P-gp by were detected by RT-PCR and immunohistochemistry. **Results** No difference was observed on the red cell and platelet count after chemotherapy ($P<0.05$). The white cell count of group D was decreased to (3.32±0.26) after 4 weeks' chemotherapy, significantly lower than that of pre-chemotherapy (6.64±0.39) ($P<0.05$). The white cell count was higher in group D than in group C after 3-week chemotherapy ($P<0.05$), and the tumor growth was slower in the group D ($P<0.05$). The MDR1 and P-gp expression was detected in bone marrow and PB mononuclear cells. There was no MDR1 and P-gp expression in the heart, liver, lung, spleen and kidney. There was P-gp but not MDR1 expression in the tumor mass. **Conclusion** The transfection of MDR1 gene into tumor-bearing mice BM-MNCs may provide chemoprotection for BM haemopoiesis to some extent.

Key words: multi-drug resistance gene; P-gp; bone marrow mononuclear cells; BALB/c mice; tumor

肿瘤化疗失败的主要原因是多药耐药和骨髓抑制。多药耐药基因-1(multidrug resistance gene-1, MDR1)的编码产物P-糖蛋白(P-glucoprotein, P-gp)是一个膜转运蛋白,起着药物外排泵作用,将进入肿瘤细胞内的药物泵出细胞,降低细胞内药物浓度,使肿瘤细胞逃避化疗药物的杀伤作用[1]。通常P-gp只在肿瘤

基金项目: 国家自然科学基金(30471801)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30471801)

作者简介: 张秀亚,女,河北省保定市人,硕士研究生,主要从事小儿肿瘤治疗方面的研究。电话:(023)86527131,E-mail:zhangxiuyaz@163.com

通信作者: 王 珊,电话:(023)63633341

收稿日期: 2008-01-10;**修回日期:** 2008-02-18

细胞大量表达,在骨髓细胞表达很低,因此有人设想将 MDR1 基因转染入骨髓细胞,以对抗化疗时产生的骨髓抑制,增加化疗剂量,提高杀伤肿瘤的效果。本研究观察 MDR1 基因转染荷瘤小鼠的骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)后,化疗对 H22 肝癌荷瘤小鼠的实验治疗效果和外周血细胞变化,探讨外源性 MDR1 基因对骨髓造血的影响。

1　材料与方法

1.1　实验材料

PA317-HaMDRl/A 产病毒包装细胞由中国科学院天津血液研究所惠赠,鼠抗人 P-gp 单克隆抗体、S-P 超敏免疫组化试剂盒由福州迈新生物技术开发公司生产,RT-PCR 试剂盒(AMV)Ver. 3.0 由 TaKaRa 公司生产。BALB/c 近交系小鼠,6 ~ 8 周龄,体质量(20 ± 2)g,由重庆医科大学实验动物中心提供。H22 肝癌细胞由重庆医科大学病理生理学教研室惠赠,阿霉素由浙江海正药业股份有限公司提供。

1.2　浓缩病毒上清收集和转染小鼠 BM-MNCs

PA317-HaMDR1/A 产病毒包装细胞,37 ℃、5% CO_2,10% 小牛血清的 IMDM 培养于孵箱内。隔 2 ~ 3 d 收集上清液,40 000 r/min,2 h 高速离心,弃去上清制成浓缩的病毒上清液[1]。测定病毒滴度为 3.63×10^6 cfu/ml。无菌条件下取小鼠双下肢股骨分离出小鼠骨髓细胞后,用淋巴细胞分离液(相对密度 1.077)密度梯度离心法分离出 BM-MNCs,按每孔含 5×10^5 个细胞接种于 24 孔板,每孔 1 ml,培养体系含 IMDM 培养液(20% 的胎牛血清) 0.4 ml、浓缩病毒上清 0.4 ml、3% L-谷氨酰胺 10 μl (0.3 μg)、2-巯基乙醇 5 μl (10 mol/L)、10% 牛血清白蛋白(BSA)0.1 ml、凝聚胺(Polyberene)7.5 μl (6 μg)、重组小鼠白介素 - 3(rmlL-3)20 μl (50 μg)、rmlL-6 20 μl (50 μg)、rmFlt-3 10 μl (20 μg)、重组小鼠干细胞因子(rmSCF)20 μl (50 μg),37 ℃、5% CO_2 湿性孵育。隔日半量换液。培养 4 d 行骨髓移植及转染效果鉴定。

1.3　MDR1 转染效果鉴定

RT-PCR 法在基因水平检测 MDR1 在 BM-MNCs 中的整合,取转染后的待检细胞,按试剂盒说明提取总 RNA,PCR 反应条件为 95 ℃ 变性 4 min,94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环,循环结束后 72 ℃保温 7 min;引物 P-gp (157 bp):正义 5′-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3′ ,反义 5′-GTTCAA ACTTCTGCTCCTCA-3′; β-actin (612 bp):正义 5′-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3′,反义 5′-AGGGGCCGGACTC-GTCAT-ACT-3′ 。产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,凝胶分析软件 BandLeader 3.0 进行吸光度分析,同 β-actin 比较。按试剂盒说明行免疫组化在蛋白质水平检测 MDRl 的转染率,每个标本 5 张涂片,每张片随机计数 5 个视野下的细胞,计算各级阳性细胞所占百分率。

1.4　肿瘤模型的制备、分组及骨髓程序性移植

H22 腹水型肝癌细胞株,调整浓度注入 BALB/c 小鼠腹腔内,待腹水形成后,抽取腹水,稀释并注射入 BALB/c 小鼠腋部皮下,7 ~ 10 d 即在腋部皮下长成 0.2 cm 见方的结节。

荷瘤 BALB/c 小鼠 32 只,随机分为 4 组(每组 8 只):正常对照组(不照射不回输)、空白对照组(照射并回输生理盐水)、阴性对照组(照射并回输未转染 MDR1 基因的 BM-MNCs)、转染实验组(照射并回输已转染 MDR1 基因的 BM-MNCs)。骨髓移植前除正常对照组荷瘤小鼠外都接受 1.5 Gy 剂量 ^{60}Co-γ 射线照射预处理,^{60}Co-γ 射线照射后 48、72 h 经尾静脉分别给阴性对照组荷瘤小鼠回输未经转染 MDR1 基因的同种小鼠 BM-MNCs,转染实验组荷瘤小鼠回输转染 MDR1 基因的同种小鼠 BM-MNCs,空白对照组荷瘤小鼠回输等量生理盐水。

1.5　化疗及取材

骨髓移植荷瘤小鼠于第 2 次骨髓移植后 2 d 起开始化疗。具体的化疗方案为:正常组不进行化疗,空白组、阴性组和转染组 3 组荷瘤 BALB/c 小鼠均进行阿霉素超剂量化疗,阿霉素初始剂量为 2.5 mg/kg(X),超剂量按 X、1.5X、2.0X、2.5X、3.0X、4.0X、5.0X 逐级加大化疗剂量,每周化疗 1 次,共 6 周,阿霉素剂量按周递增,经腹腔注入。化疗后每 3 天以断尾采血法检测血常规,分别观察空白对照组、阴性对照组、转染组 3 组荷瘤小鼠外周血红细胞、血小板和白细胞计数的变化情况;白细胞对放射及化疗药物均较为敏感,故作为我们实验重点观察检测及分析指标[2]。从化疗第 1 天开始每 3 天测量各组肿瘤的长短径,按公式计算瘤体质量:瘤体质量(mg) = 500 × 短径(cm) × 长径(cm);化疗后每周分别取各组荷瘤小鼠的骨髓和外周血单个核细胞、肿瘤组织、心、肝、脾、肺和肾等,并按实验要求保存。

1.6　RT-PCR 检测

按上述方法行 RT-PCR 在基因水平检测外源性 MDR1 基因在荷瘤小鼠 BM-MNCs、心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织内的整合情况,免疫组化法在蛋白水平检测 P-gp 在荷瘤小鼠骨髓和外周血单个核细胞、心、肝、肺、脾、肾和肿瘤组织内的表达情况。

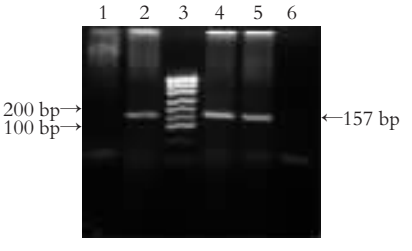
1.7　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并经正态检验和方差齐性检验。应用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验和方差分析,Tukey 进行多组间显著性检验。

2　结果

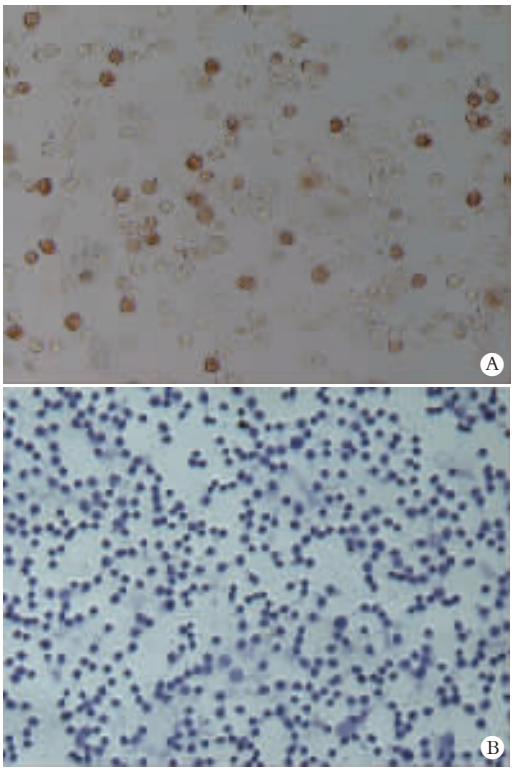
2.1　体外 MDR1 基因转染效果的检测

提取转染 MDR1 基因 BM-MNCs 总 RNA 经 RT-PCR 法扩增在 157 bp 处可检测到 MDR1 基因整合的特异扩增带,证实 MDR1 成功地转入 BM-MNCs。免疫组化显示浓缩病毒上清法转染 4 d 的小鼠 BM-MNCs 转染率为 22.4%,P-gp 主要分布在骨髓细胞膜上。对照组中未见 P-gp 表达。见图 1、2。



1:阴性对照(K562);2:阳性对照(PA317 -HaMDR1/A);3:标准;4:转染 4 d BM-MNCs;5:转染 2 d BM-MNCs;6:未转染 BM-MNCs

图 1　MDR1 基因转染 BM-MNCs RT-PCR 扩增图



A:P-gp 在 MDR1 基因转染的 BM-MNCs 阳性表达;B:P-gp 在未转染的 BM-MNCs 阴性表达

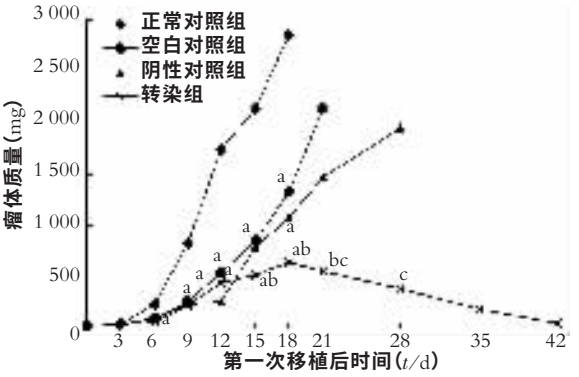
图 2 P-gp 在骨髓单个核细胞表达情况 (S-P×400)

2.2 超剂量化疗对骨髓造血细胞的影响

化疗后红细胞和血小板计数均无明显变化,差异无统计学意义($F=1.937$,$F=2.364$,$P>0.05$)。由于在第 1 次移植前进行放射预处理,化疗时白细胞已不在正常水平,经方差分析表明化疗前各组荷瘤小鼠外周血白细胞数的差异无统计学意义($F=2.136$,$P>0.05$)。经过第 1 周的化疗,实验各组外周血白细数都有明显下降,第 3 周化疗后,转染组白细胞数高于空白对照组和阴性对照组 C 组,差异有统计学意义($q=9.64$、11.38,$P<0.01$)。见表 1。

2.3 肿瘤治疗效果检测

化疗前各组荷瘤小鼠的瘤体质量无显著性差异($F=0.341$,$P>0.05$)。化疗开始前各组肿瘤的生长情况处在同一水平,化疗实验后测得:未治疗的正常对照组在各疗程比其余各组的瘤体质量大,差异均有统计学意义($q=8.36$、9.75、11.26,$P<0.01$);化疗 3 周后,转染组与空白对照组和阴性对照组的瘤体质量相比较小,差异均有统计学意义($q=7.18$、10.73,$P<0.05$),且转染组在化疗 3 周后瘤体质量减小。见图 3。



a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与空白对照组比较;c:$P<0.05$,与阴性对照组比较

图 3 荷瘤小鼠瘤体质量生长折线图

2.4 RT-PCR 法和免疫组化法检测结果

RT-PCR 法检测转染组荷瘤小鼠 BM-MNCs,可见一片段大小约为 157 bp 的清晰条带,在转染组荷瘤小鼠心、肝、脾、肺和肾中均未检测到外源性 MDR1 基因表达的特异扩增带,3 组对照组荷瘤小鼠 BM-MNCs 也未检测到这一特异性条带;免疫组化法在转染组荷瘤小鼠骨髓和外周血单个核细胞中检测到 P-gp 阳性表达,且随着化疗剂量的递增 P-gp 表达阳性率逐渐升高,转染组荷瘤小鼠心、肝、肺、脾和肾等组织 P-gp 阴性表达,3 组对照组荷瘤小鼠骨髓和外周血单个核细胞 P-gp 阴性表达。见表 2、图 4。

2.5 肿瘤组织检测结果

RT-PCR 法在各组荷瘤小鼠肿瘤组织中均未检测到外源性 MDR1 基因的表达;免疫组化法在各组荷瘤小鼠肿瘤组织中均检测到 P-gp 阳性表达,且随化疗剂量递增表达增强。在没有化疗的正常对照组肿瘤组织 P-gp 的表达阳性率为(47.86±10.51)%,各组经单因素方差分析结果显示化疗前 3 周各周的荷瘤小鼠肿瘤组织 P-gp 表达阳性率逐渐增高,有统计学意义($F=92.437$,$P=0.000$),经 Tukey 进行组间多重比较,显示阴性对照组、转染组与空白对照组 P-gp 表达阳性率相比差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3、图 5。

表 1 化疗后荷瘤小鼠外周血白细胞变化情况($\times10^9\cdot L^{-1}$)

组别	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	28 d	35 d	42 d
空白对照组	6.91±0.46	3.73±0.16	3.32±0.12	2.43±0.51	2.12±0.44	1.63±0.56	1.36±0.51	0.88±0.32	–	–	–
阴性对照组	6.78±0.45	6.74±0.51[a]	4.45±0.42	3.93±0.63	3.76±0.35	2.72±0.81	2.53±0.32	1.65±0.47	1.04±0.35	–	–
转染组	6.64±0.39	6.52±0.34[a]	5.67±0.82[a]	5.53±0.54[a]	5.14±0.62[a]	4.84±0.63[ab]	4.37±0.32[ab]	3.97±0.53[ab]	3.32±0.26[b]	2.56±0.34	2.14±0.37

a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与阴性对照组比较

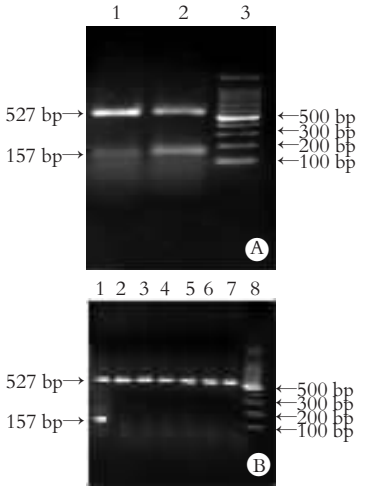
表 2 化疗后小鼠骨髓及外周血单个核细胞 P-gp 的表达阳性率($\bar{x}\pm s$, %)

检测因子	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周
血	11.25±1.23	14.83±1.65	17.36±1.47	18.54±1.63	21.21±1.60	23.48±1.37
骨髓	9.73±1.64	10.54±1.54	11.32±1.21	12.64±1.72	14.42±1.36	18.63±1.84

表 3　化疗后小鼠肿瘤组织 P-gp 的表达阳性率($\bar{x} \pm s$,%)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周
空白对照组	48.34 ± 9.35	51.21 ± 10.47[a]	54.65 ± 10.07[ab]	–	–	–
阴性对照组	46.13 ± 8.62	50.39 ± 10.72[a]	51.17 ± 8.36[ab]	54.54 ± 10.69	–	–
转染组	44.76 ± 10.57	47.15 ± 7.25[a]	50.21 ± 10.38[ab]	52.37 ± 11.24	55.91 ± 8.86	59.63 ± 9.57

a:$P<0.01$,与第 1 周相比;b:$P<0.01$,与第 2 周相比



A:BM-MNCs MDR1 基因表达　1:正常对照组 BM-MNCs;2:转染组 BM-MNCs;3:标准

B:脏器 MDR1 基因表达　1:BM-MNCs;2 ~ 7:分别为肿瘤组织、肾、脾、肺、肝和心条带;8:标准

图 4　RT-PCR 法检测转染组荷瘤小鼠外源性 MDR1 基因表达情况

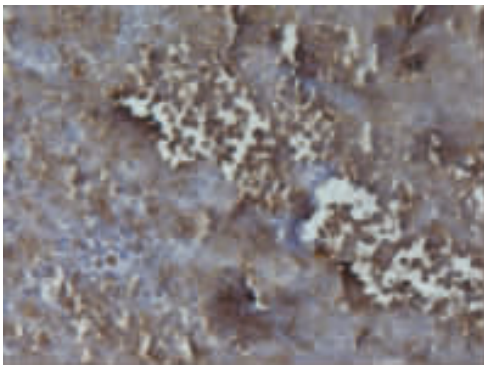


图 5　免疫组织化学检测正常对照组肿瘤 P-gp 阳性表达　(S-P × 400)

3　讨论

白细胞对化疗药物比较敏感,化疗产生骨髓抑制的直接表现是外周血白细胞计数降低,其结果影响化疗的疗程和预后。本实验中阴性对照组在化疗初始时白细胞下降较慢,但第 2 周时迅速下降,说明单纯移植 BM-MNCs 对骨髓造血功能有一定的保护作用,但作用较短暂。转染组白细胞数较阴性对照组下降缓慢,在阿霉素增至 3 倍剂量时能明显抑制肿瘤的生长,且有较高的白细胞水平,说明外源性 MDR1 基因转染的 BM-MNCs 能有效的保护骨髓的造血功能。实验还观察到转染组有 2 只荷瘤小鼠在 4 倍超剂量化疗后,肿瘤组织逐渐缩小并达到无瘤生存,且在 6 周停止化疗后白细胞数迅速恢复,提示在骨髓保护下大剂量化疗可能实现肿瘤治愈率的明显提高。有研究表明阿霉素可使肝癌细胞中 bcl-2/bax 值下降,诱导肝癌细胞凋亡[3]。本实验中应用阿霉素化疗后肿瘤组织生长较未化疗组缓慢,阿霉素抑制肿瘤生长是通过上述途径还是有其他增殖凋亡因子参与,本课题组将进行下一步深入的研究。因本实验的样本量较小,出现无瘤生存是否是小概率事件需进一步进行大样本量的研究。

人的 MDR1 基因与鼠的 mdr1 基因有高度同源性,二者区别集中在氨基端和羧基端的第一个跨膜区,此外人的 MDR1 基因与细菌转运蛋白基因也非常相似,由此推测 MDR 基因是一个高度保守的基因家族[4],所以本实验中免疫组化法在小鼠肿瘤组织中检测到人的 P-gp 表达,而 RT-PCR 法在小鼠肿瘤组织中没有检测到外源性人的 MDR1 基因,提示转染的外源性人的 MDR1 基因未定位到小鼠肿瘤组织。另一方面本实验中没有给予化疗的正常对照组荷瘤小鼠,其肿瘤组织中 P-gp 表达阳性率也高,为(47.86 ± 10.51)%,推测小鼠肝癌组织具有内源性 mdr1 基因,有较高的原发性耐药,这可能是肝癌化疗效果不佳的原因之一。随着化疗剂量的不断加大,肿瘤组织 P-gp 表达阳性率也明显增高,各组之间没有明显的差异,说明阿霉素能上调 mdr1 基因的表达,导致继发性耐药,这与 Zhai 等[5]的研究结果相似。

多药耐药基因转染入骨髓细胞,使骨髓高表达 P-gp,有望解决化疗过程中出现的骨髓抑制,从而提高化疗剂量,有效的杀灭肿瘤细胞,为肿瘤治疗提供新的方案。

参考文献:

[1] 王　珊,金先庆,杨纯正,等. MDR1 基因转染 K562 细胞株及人骨髓干祖细胞的研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2000, 21(4): 238 – 241.

[2] Rentala S, Sagar-Balla M M, Khurana S, *et al*. MDR1 gene expression enhances long-term engraftibility of cultured bone marrow cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335(3): 957 – 964.

[3] 郑建勇,李开宗,王为忠,等. 阿霉素诱导人肝癌细胞凋亡机制的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(7): 509 – 511.

[4] Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1997, 40(Suppl): S3 – S8.

[5] Zhai B J, Shao Z Y, Zhao C L, *et al*. Development and characterization of multidrug resistant human hepatocarcinoma cell line in nude mice[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(41): 6614 – 6619.

(编辑　龙　亮)