文章编号:1000-5404(2009)01-0067-04

论著

超声微泡促腺病毒载体转染MDR1基因效率的体外实验研究

王 佚[1*],郭振华[1*],金先庆[1],郭玉霞[1],罗 庆[1],王志刚[2] (重庆医科大学:[1]附属儿童医院外科实验室,重庆 400014,[2]超声研究所,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨超声微泡造影剂在体外促进腺病毒载体介导的MDR1基因转染兔骨髓单个核细胞的效率,并初步探讨其安全性。**方法** 根据是否加入超声微泡造影剂和超声辐照将分选的兔骨髓单个核细胞分为常规培养组(A)、腺病毒MDR1基因转染组(B)、腺病毒MDR1基因转染+超声辐照组(C)、微泡造影剂+腺病毒MDR1基因转染组(D)、微泡造影剂+腺病毒MDR1基因转染+超声辐照组(E)。收集各组细胞,应用RT-PCR法、流式细胞技术等分别从基因、功能及细胞生物学特性等方面检测外源性MDR1基因在骨髓单个核细胞内的功能性表达及安全性。**结果** 收获高滴度的Ad5-MDR1腺病毒载体并成功制备腺病毒微泡造影剂;RT-PCR结果显示,除A组外其余4组在194 bp处均观察到特异性MDR1电泳条带,证实外源性MDR1基因通过腺病毒载体整合到细胞基因组中,且E组MDR1电泳条带的光密度比值明显高于B、C、D组($P<0.05$);柔红霉素排出实验证实外源性MDR1基因表达产物P-gp有药物外排泵功能,且E组P-gp阳性率最高($P<0.05$),而柔红霉素阳性率显著降低;一定强度的超声辐照及微泡造影剂对骨髓单个核细胞的细胞周期无明显影响。**结论** 低频超声波击碎微泡造影剂,能促进以腺病毒为载体介导的外源性MDR1基因转染兔骨髓单个核细胞的效率,且安全可行。

关键词: MDR1基因;超声;微泡造影剂;基因治疗
中图法分类号: R331.22; R394-33 **文献标识码:** A

Ultrasonic microbubbles enhance efficiency of adenovirus vector-mediated MDR1 gene transfection *in vitro*

WANG Yi[1*], GUO Zhen-hua[1*], JIN Xian-qing[1], GUO Yu-xia[1], LUO Qing[1], WANG Zhi-gang[2] ([1]Laboratory of Surgery, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014; [2]Institute of Ultrasonography, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China * Contribute equally to this work)

Abstract: Objective To explore the efficacy and safety of ultrasonic microbubbles to enhance the transfection of adenoviral vector encoding multidrug-resistance gene 1 (MDR1) into rabbit bone marrow mononuclear cells. **Methods** Adenoviral vector Ad5-MDR1 encoding MDR1 gene were prepared and titrated. Bone marrow mononuclear cells were isolated and collected from rabbit bone marrow, and divided into 5 groups (4.0×10^6 to 5.0×10^6 cells in each group) in a 6-well plate, conventional culture group (A), Ad5-MDR1 group (B); Ad5-MDR1 + ultrasound group (C), Ad5-MDR1 + microbubbles group (D) and Ad5-MDR1 + microbubbles + ultrasound group (E). MDR1 gene was transferred into the cells with or without ultrasound wave irradiation (665 kHz, 0.5 W/cm^2, 15 s), and cocultured with ultrasonic microbubbles and/or adenoviral vector. The expression of MDR1 gene in the mononuclear cells, the positive transfection rate and the P-gp function were tested by RT-PCR, and daunorubicin (DNR) efflux testing with flow cytometry. The cell cycle of the mononuclear cells after transfection was tested by flow cytometry. **Results** The Ad5-MDR1 vector with high titer was obtained, and ultrasonic microbubbles were prepared. RT-PCR showed the specific electrophoresis strips were at 194 bp in 4 groups except group A, indicating that the foreign MDR1 gene had been transferred successfully into the cells mediated by adenovirus. The optical density of the strip from group E was higher than that in group

基金项目: 国家自然科学基金(30600579);重庆市教委科学技术研究项目(KJ 060304)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600579) and the Sci & Tech Project of Committee of Education of Chongqing (KJ060304)
作者简介: 王 佚,男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事恶性肿瘤多药耐药方面的研究。E-mail: wy757311@hotmail.com
*:同等贡献者
收稿日期: 2008-07-30;**修回日期:** 2008-08-28

B , C and D ($P<0.05$). DNR efflux testing confirmed that the P-gp of transferred MDR1 gene maintained its biological function, and the function of P-gp in group E was higher than that in other groups ($P<0.05$). The cell cycles of transferred mononuclear cells did not be affected by the gene transfection. **Conclusion** The transfer of foreign MDR1 gene into rabbit mononuclear cells with adenovirus vector is enhanced by the ultrasonic microbubbles, with safety and availability.

Key words: multidrug-resistance gene 1; ultrasound; microbubble; gene therapy

多药耐药基因 1(Multidrug-resistance gene 1, MDR1)及其编码的 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)在肿瘤细胞中的高表达和骨髓造血细胞中的低表达是造成肿瘤化疗中肿瘤细胞耐药和骨髓抑制的重要原因,严重影响了化疗的疗效。研究表明,通过病毒载体将外源性 MDR1 基因转入骨髓造血细胞后移植,能提高受体骨髓对化疗药物的耐受性,从而通过大剂量化疗来有效杀灭肿瘤细胞,取得良好的治疗效果。而外源性 MDR1 基因在骨髓造血细胞内的转染率是影响其移植后发挥受体骨髓保护作用的重要前提。本研究通过体外实验探讨超声微泡造影剂促腺病毒载体介导的 MDR1 基因转染兔骨髓单个核细胞的效率,并对其安全性进行初步探讨,探索一种更安全有效的基因转染方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

全氟显由南方医科大学南方医院药学基地提供,微泡大小 2.0~4.0 μm,细胞数(0.8~1.8)×10^9/ml;Ad-MDR1 重组腺病毒(含绿色荧光蛋白 GFP)由重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所罗庆研究员惠赠;RT-PCR 试剂为 TaKaRa 产品;细胞因子为 R&D 公司产品;优质胎牛血清、培养基为 Gibco 公司产品。

UGT1025 型超声基因转染仪由重庆医科大学超声影像学研究所研制。

1.2 表达 MDR1 基因的重组腺病毒 Ad5-MDR1 的扩增及腺病毒载体微泡造影剂的制备

参照文献[1]的方法,采用有限稀释法测定其滴度为 2.0×10^{10} pfu/ml。将 1 ml 腺病毒与 1 ml 微泡造影剂在 4 ℃混合 2 h,使腺病毒粘附于微泡的外壳,形成的混合物中腺病毒滴度约为 1.0×10^{10} pfu/ml。

1.3 兔骨髓单个核细胞的分选

纯种新西兰大白兔(由重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄不分,体质量 2.0~2.5 kg,3~4 月龄。参照本研究室方法[2]采集兔骨髓,通过密度梯度离心法分选骨髓单个核细胞,调制成为(4.0~5.0)×10^6/ml 的细胞悬液待用。

1.4 细胞分组及处理

将骨髓单个核细胞悬液加入 6 孔板中培养,分为 5 组:常规培养组(A)、腺病毒 MDR1 基因转染组(B)、腺病毒 MDR1 基因转染 + 超声辐照组(C)、微泡造影剂 + 腺病毒 MDR1 基因转染组(D)及微泡造影剂 + 腺病毒 MDR1 基因转染 + 超声辐照组(E)。每组设 3 个复孔,均采用 4 ml 培养体系,内含细胞[(4.0~5.0)×10^6]和细胞因子(SCF、TPO、Flt-3、IL-3、IL-6、G-CSF),B、C 组加入腺病毒载体,D、E 组加入腺病毒载体微泡造影剂。A、B、D 组培养 48 h 半量换液后再培养 48 h,C、E 组行超声辐照(频率 665 kHz、声强 0.5 W/cm^2,超声辐照 15 s)后重复以上实验步骤进行细胞培养。

1.5 转染效率及安全性检测

1.5.1 RT-PCR 法检测骨髓单个核细胞基因组中外源性 MDR1 基因的表达 常规方法裂解各组细胞提取总 RNA,逆转录合成 cDNA 后行 PCR 扩增目的片段,反应结束后,取 4 μl 反应产物于 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。MDR1 引物序列:正义链 5′-TGCGACAGGAGATAGGCTG-3′,反义链 5′- GCCAAAATCACAAGGGTTAGCTT-3′,目的产物 194 bp。β-actin 引物序列:正义链 5′-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3′,反义链 5′-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3′,目的产物 250 bp。电泳结束后分别将各实验组的目的产物条带与 β-actin 产物光密度进行比对,计算各实验组的光密度比值。

1.5.2 柔红霉素泵出实验 待测细胞制成 2×10^6/ml 悬液,每管加入柔红霉素,终浓度为 7.5 μg/ml;37 ℃、5% CO_2 孵箱孵育 30 min,离心除去培养基,用不含小牛血清的新鲜培养基洗去细胞膜外的柔红霉素;37 ℃、5% CO_2 孵箱孵育 10 min。异搏定终止泵功能,其浓度为 10 μg/ml,PBS 洗 2 次,上机待检。结果判定:采用 FACScalibur 型检测仪,每个样品收集 15 000 个细胞进行测定。测定后在 Power macintosh 7600 型计算机上用 cell quest 软件(B-D 公司,美国)分析数据。

1.5.3 骨髓单个核细胞周期生物学特性的检测 待测细胞制成 2×10^6/ml 单细胞悬液;PBS 洗涤 2 次,0.1 μg/ml Rnase 工作液于 37℃水浴处理 30 min,碘化丙锭工作液 4 ℃避光染色 30 min,上流式细胞仪检测;使用 ModFitLT 软件(B-D 公司,美国)分析。

1.6 统计学分析

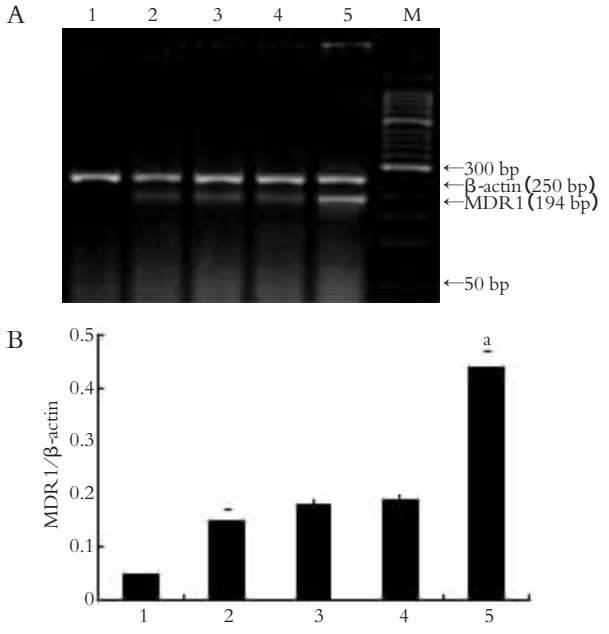
应用 SAS 统计软件分析,检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并经正态检验和方差齐性检验,计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验($\alpha = 0.05$)。

2 结果

2.1 RT-PCR 法检测骨髓单个核细胞基因组中外源性 MDR1 基因的表达

根据实验设计,兔骨髓单个核细胞的 RNA 经过逆转录以后,应用于本实验载有目的基因 MDR1 的质粒,使用特异性引物行 PCR 扩增后可于 194 bp 处见特异性条带。RT-PCR 结果可见产物经琼脂糖凝胶电泳后在各泳道的 250 bp 处均可以观察到 β-actin 的电泳条带,常规培养组在 194 bp 处未见到电泳

条带,即 MDR1 mRNA 表达阴性;其余 4 组在 194 bp 处分别观察到 MDR1 电泳条带,说明外源性 MDR1 基因通过腺病毒作为载体整合到细胞基因组中(图 1)。以 β-actin 作为对比片段,各组 MDR1 mRNA 表达的光密度比值以 E 组最高,与其余各组间差异有显著性($P<0.05$,图 1B)。



A: RT-PCR 电泳结果; B: 定量分析结果

1:常规培养组; 2:腺病毒 MDR1 基因转染组; 3:腺病毒 MDR1 基因转染 + 超声辐照组; 4:微泡造影剂 + 腺病毒 MDR1 基因转染组; 5:微泡造影剂 + 腺病毒 MDR1 基因转染 + 超声辐照组; M: 标准

a: $P<0.05$,与其他组比较

图 1　外源性 MDR1 基因转染后各组骨髓单个核细胞 MDR1 mRNA 表达

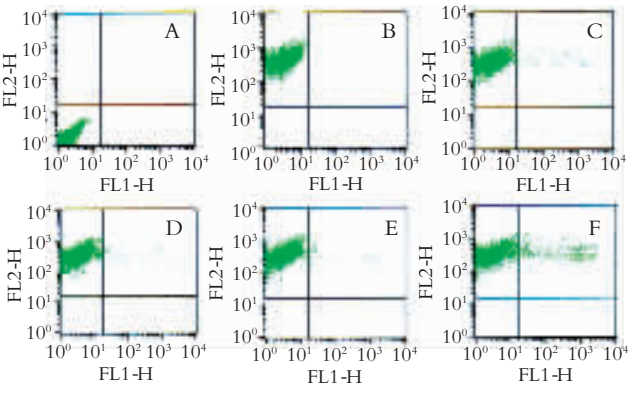
2.2　转染后骨髓单个核细胞中外源性 MDR1 基因功能的检测

柔红霉素为自发荧光(红色)的抗癌药物,通过 FACS 检测细胞内柔红霉素荧光强度可反映转染后 MDR1 基因表达产物 P-gp 的药物外排泵功能;腺病毒载体含绿色荧光蛋白(GFP)基因,通过 FACS 检测细胞内绿色荧光强度间接反映 MDR1 基因转染的效率。经统计学分析, A 组与其余 4 组比较,细胞内 P-gp 表达阳性率最低,柔红霉素阳性率最高;B、C、D 3 组细胞内 P-gp 和柔红霉素阳性率无显著性差异($P>0.05$);E 组与 B、C、D 组比较,细胞内 P-gp 表达阳性率最高($P<0.05$),而柔红霉素阳性率显著降低;可见随着 P-gp 阳性率提高,细胞内柔红霉素阳性率逐渐降低,P-gp 有外排柔红霉素的功能(表 1,图 2)。

表 1　转染后各组细胞内 P-gp 及功能的检测

组别	柔红霉素阳性率(%)	P-gp 阳性率(%)
A 组	99.43	0.54
B 组	94.88	5.09
C 组	94.03	5.93
D 组	94.30	5.60
E 组	70.22	29.73[a]

a: $P<0.05$, 与 B、C、D 组比较



A: 空白对照组; B: 常规培养组; C: 腺病毒 MDR1 基因转染组; D: 腺病毒 MDR1 基因转染 + 超声辐照组; E: 微泡造影剂 + 腺病毒 MDR1 基因转染组; F: 微泡造影剂 + 腺病毒 MDR1 基因转染 + 超声辐照组

图 2　转染后各组细胞柔红霉素排除试验流式细胞仪检测结果

2.3　转染后各组细胞细胞周期检测结果

流式细胞仪检测转染后各实验组细胞的细胞周期,各组细胞周期分布无显著性差异($P<0.05$),亦未见明显细胞凋亡发生(表 2)。

表 2　各实验组细胞处理后细胞周期分布(%)

组别	G_1	G_2	S
A 组	91.35	2.08	6.57
B 组	88.06	5.64	6.30
C 组	86.68	4.54	8.77
D 组	87.22	5.83	6.95
E 组	86.59	5.30	8.11

3　讨论

化疗是目前恶性肿瘤的主要治疗手段之一,其在防止恶性肿瘤复发和转移,最终达到治愈肿瘤的目的方面起着不可替代的作用。研究表明:肿瘤细胞高表达 MDR1 基因,其编码的 P-gp 可以将肿瘤细胞内的化疗药物泵出细胞外,从而使细胞内的药物浓度下降,达不到杀灭肿瘤细胞的作用;而骨髓细胞低表达 MDR1 基因,对化疗药物敏感性高而易受到损伤,常导致严重骨髓抑制,引发出血、感染等威胁生命的严重并发症,造成化疗剂量和疗程受限甚至被迫终止化疗,使恶性肿瘤进一步恶化。基于此,本课题组利用逆转录病毒载体将 MDR1 基因导入实验动物的骨髓单个核细胞中,回输保护骨髓,进而采用大剂量化疗治疗肿瘤,取得良好的治疗效果[3-5]。但已证实逆转录病毒作为基因治疗的载体可能引发受体发生恶性肿瘤,所以被禁止在人体实验中作为目的基因载体。腺病毒作为基因治疗的载体,具有很多优点而被广泛应用[6,7]。然而,腺病毒载体对细胞表面柯萨奇-腺病毒受体(CAR)的亲嗜性,造成其对单个核细胞的转染率很低,导致基因转染达不到理想的效果[8]。近年来,研究表明联合应

用超声和微泡造影剂不但可以用来增强组织显影,而且可以作为一种较理想的基因载体,促进裸 DNA 在组织和细胞的转染[9-11]。超声波可致细胞膜的通透性增高,加入微泡造影剂可增强此效应;处于超声场中的微泡作为一种空化核,在超声波作用下发生压缩和膨胀,当声能达到一定强度,微泡被瞬间击碎产生"空化效应",可致局部微循环细胞连接及靶细胞膜轻度可逆性损害,膜通透性增高,从而使细胞对基因或药物的摄入增强,提高了转染率。

本研究所用全氟显是全氟丙烷人血白蛋白微泡造影剂,构成其外壳蛋白的白蛋白带正电荷,而腺病毒载体带大量负电荷,将超声微泡造影剂与腺病毒载体混合后,由于静电吸附作用,腺病毒载体可以黏附在微泡造影剂的外壳。在超声波作用下微泡造影剂破裂,产生"空化效应",使邻近细胞产生许多小孔,增加细胞膜通透性,有助于腺病毒对细胞的转染。转染后,提取各实验组骨髓单个核细胞的总 RNA 行 RT-PCR 扩增分析,发现外源性 MDR1 基因以腺病毒为载体可转入 B、C、D、E 组兔骨髓单个核细胞的基因组中;根据 PCR 具半定量的特点,以 β-actin 作为对比片段,比对各组 MDR1 mRNA 表达的光密度值,显示 E 组的光密度最高,从基因水平证明超声微泡造影剂可以促进腺病毒介导的 MDR1 对单个核细胞的转染率。根据 MDR1 基因表达产物 P-gp 具有排出柔红霉素的特性来进一步检测其外排泵的功能[12]。柔红霉素作为 P-gp 的底物可被其泵出胞外,P-gp 表达越高、活性越强,底物被泵出的越多,胞内柔红霉素产生的红色荧光强度越弱。所以可根据细胞内荧光强度高低,判断 P-gp 的外排泵功能。我们所采用的腺病毒载体含有 GFP 基因,可以表达绿色荧光蛋白,因此可以通过绿色荧光的表达量来反映 P-gp 的转染率。本实验中 E 组细胞内的 P-gp 表达率最高,柔红霉素的含量最低,与其余各组有显著性差异。进一步从细胞水平证实了外源性 MDR1 基因转染后能功能性地表达 P-gp,并证实超声微泡造影剂可以显著促进以腺病毒为载体的 MDR1 基因转染及转染后功能性的表达。

超声波的空化效应可使基因的转染率提高,但同时也有细胞毒的作用,可损伤 DNA,杀死细胞。Dalecki 等[13]曾有造影剂在超声波的作用下引起心腔内细胞溶血的报道。因此,对超声微泡应用中的安全性进行初步评估是很必要的。流式细胞仪检测显示,实验各组细胞在转染后细胞周期与对照组相比较无显著性差异,亦未见明显细胞凋亡,说明以腺病毒作为载体进行基因转染并辅助一定强度的超声辐照微泡造影剂促转染对靶细胞是安全可行的。

MDR1 基因治疗的应用前景在很大程度上取决于其转染后在靶细胞中稳定、安全及高效的表达[14]。本研究用超声微泡造影剂作为一种新的基因辅助转运工具,不仅对靶细胞的细胞周期、生物学特性无明显影响,而且实现了外源性 MDR1 基因在单个核细胞的高效转染。说明超声破坏微泡造影剂是一种安全、高效的促基因转移方法。

参考文献:

[1] He T C, Zhou S, da-Costa L T, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509-2514.

[2] 王 佚, 金先庆, 洪思琦. MDR1 基因修饰的自体骨髓移植后体内表达及时限的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(19): 1841-1843.

[3] Guo C, Jin X. Chemoprotection effect of multidrug resistance 1 (MDR1) gene transfer to hematopoietic progenitor cells and engrafted in mice with cancer allows intensified chemotherapy[J]. Cancer Invest, 2006, 24(7): 659-668.

[4] 王 佚, 金先庆, 王 荞,等. 超剂量化疗治疗 mdr1 基因转染骨髓移植的 VX2 肝癌兔疗效和毒副作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(5): 645-648.

[5] Wang Y, Jin X Q, Wang S, *et al*. Therapeutic efficacy and bone marrow protection of the mdr1 gene and over-dose chemotherapy with doxorubicin for rabbits with VX2 hepatocarcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2006, 5(4): 545-551.

[6] Douglas J T. Adenoviral vectors for gene therapy[J]. Mol Biotechnol, 2007, 36(1): 71-80.

[7] Khalighinejad N, Hariri H, Behnamfar O, *et al*. Adenoviral gene therapy in gastric cancer: a review[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(2): 180-184.

[8] Rebel V I, Hartnett S, Denham J, *et al*. Maturation and lineage-specific expression of the coxsackie and adenovirus receptor in hematopoietic cells[J]. Stem Cells, 2000, 18(3): 176-182.

[9] Sonoda S, Tachibana K, Uchino E, *et al*. Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(2): 558-564.

[10] Bekeredjian R, Bohris C, Hansen A, *et al*. Impact of microbubbles on shock wave-mediated DNA uptake in cells *in vitro*[J]. Ultrasound Med Biol, 2007, 33(5): 743-750.

[11] Shen Z P, Brayman A A, Chen L, *et al*. Ultrasound with microbubbles enhances gene expression of plasmid DNA in the liver *via* intraportal delivery[J]. Gene Ther, 2008, 15(16): 1147-1155.

[12] Bunting K D, Zhou S, Lu T, *et al*. Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells *in vitro* and repopulating cells *in vivo*[J]. Blood, 2000, 96(3): 902-909.

[13] Dalecki D, Raemen C H, Child S Z, *et al*. Hemolysis *in vivo* from exposure to pulsed ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 1997, 23(2): 307-313.

[14] Norgaard J M, Hokland P. Biology of multiple drug resistance in acute leukemia[J]. Int J Hematol, 2000, 72(3): 290-297.

(编辑 汪勤俭)