论著

文章编号:1000-5404(2009)16-1556-03

腺病毒介导的新基因 HA117 对 Jurkat 细胞多药耐药功能的影响

郭玉霞,金先庆,罗 庆,郑改焕,于 洁,戴碧涛,刘筱梅,徐酉华 (重庆医科大学儿童医院血液科,重庆 400014)

摘 要:目的 研究新基因 HA117 对急性淋巴细胞白血病细胞 Jurkat 耐药性的影响,探讨新基因 HA117 多药耐药(multidrug resistance, MDR)相关功能。**方法** 以携带 HA117 基因的重组腺病毒 Ad5-HA117 感染 Jurkat 细胞得到高表达 HA117 基因的细胞 Jurkat/HA117,以荧光显微镜和流式细胞术检测细胞感染效率,RT-PCR 检测感染前后实验细胞 HA117 基因表达,MTT 检测比较高表达 HA117 基因前后 Jurkat 细胞药物敏感性变化。**结果** 新基因 HA117 可使 Jurkat 细胞对多种化疗药物耐药性增强,转染 Ad5-HA117 重组腺病毒的 Jurkat 细胞对 VCR、ADM、Vp-16、DNR、MMC、CTX 药物的药物耐受性均比未转染的 Jurkat 细胞增高,增高 3~7 倍($P<0.05$, $P<0.01$),转染空载体组耐药性跟未转染的 Jurkat 细胞相比无显著差异($P>0.05$)。**结论** 新基因 HA117 可使 Jurkat 细胞的耐药功能增加,证实新基因 HA117 具有多药耐药功能。

关键词: 新基因 HA117;多药耐药;Jurkat 细胞
中图法分类号: R394.6;R733.7;R966 **文献标识码:** A

Multidrug resistant function of adenovirus vector mediated novel gene HA117 in Jurkat cells

GUO Yu-xia, JIN Xian-qing, LUO Qing, ZHENG Gai-huan, YU Jie, DAI Bi-tao, LIU Xiao-mei, XU You-hua (Department of Hematology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the multidrug resistant function of the novel gene HA117 in human acute lymphoblastic leukemia cell line Jurkat. Methods The recombinant adenovirus Ad5-HA117 carrying HA117 gene was transfected into Jurkat cells for the harvest of Jurkat/HA117 cells highly expressing HA117 gene. The efficiency of cell infection was detected by fluorescent microscopy and cytometry. HA117 gene expressions in Jurkat cells before and after infection were detected by RT-PCR. Multidrug resistance function of the new gene HA117 was detected by multidrug resistance test. Results Jurkat/HA117 cells expressed HA117 gene efficiently after infection with Ad5-HA117. The drug-resistance to DNR, ADM, CTX, VCR, MMC and VP-16 of Jurkat/HA117 cells enhanced as high as 3 – 7 folds ($P<0.05$) than that to Jurkat cells. Conclusion The novel gene HA117 could enhance the multi-drug resistance of Jurkat cells, suggesting that HA117 gene might have multidrug resistant function.

Key words: novel gene HA117; multidrug resistance; Jurkat cells

肿瘤细胞对化疗药物产生耐药是化疗成功的最大障碍。因此,研究肿瘤的多药耐药性已成为生命科学研究的重点[1]。本课题组通过建立 HL-60/ATRA 多药耐药细胞系,筛选并克隆出在 HL-60/ATRA 差异表达的耐药相关基因 HA117[2]。为了进一步研究其功能,本实验前期构建新耐药相关基因 HA117 表达的腺病毒穿梭载体,经同源重组后,转染 HEK-293 细胞包装后得到高滴度的重组腺病毒病 pAdeasy-HA117。在本研究中,我们应用腺病毒介导的方法研究新基因 HA117 的多药耐药功能,为进一步探讨全反式维甲酸相关耐药新基因 HA117 的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 表达绿色荧光蛋白、携带 HA117 基因的重组腺病毒 Ad5-HA117 的 HA117 基因由本实验室保存[3,4]。Jurkat 细胞由第三军医大学临床血液教研室司维柯教授惠赠。

1.1.2 酶类和主要生化试剂 RT-PCR 试剂盒、100 bp DNA Marker 及 PCR 引物为 TaKaRa 公司产品。DMEM 培养基、1640 培养基及胎牛血清为 HyClone 公司产品。长春新碱(VCR)购于深圳万乐药业有限公司;环磷酰胺(CTX)购于江苏恒瑞医药股份有限公司;速溶型阿霉素(ADM)及柔红霉素(DNR)购自意大利 Pharmacia 公司,丝裂霉素 C(MMC)购自美国 Sigma 公

基金项目: 国家自然科学基金(30471985)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471985)
作者简介: 郭玉霞,女,河南省开封市人,博士,主要从事儿童血液病/肿瘤方面的研究。电话:(023)63638834, E-mail: guoyuxia9955@yahoo.com.cn
通信作者: 徐酉华,电话:(023)63631545
收稿日期: 2008-10-28;**修回日期:** 2008-12-03

司,鬼臼乙叉甙(Vp-16)购自连云港制药厂,总 mRNA 提取试剂购于 Invitrogen 公司。

1.2　方法

1.2.1　重组腺病毒感染 Jurkat 细胞　　选取生长良好的 Jurkat 细胞各 1 瓶,轻轻加入等量的含 10% 胎牛血清的培养基。然后吸出一半的细胞悬液加入另一个培养瓶中。置入 37 ℃,5% CO_2 孵箱中培养 24 ~ 48 h。如果细胞比较浓,可按 1∶3 分配传代培养。将高滴度的重组腺病毒感染 Jurkat 细胞。

1.2.2　流式细胞仪测定 Jurkat 细胞转染效率筛选最适滴度

用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 调整细胞浓度为 2.0×10^5/ml,按照不同的病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)设立实验组,分别是 MOI 为 1、10、50、100、500 组,每组设立 6 个复孔;在各实验组的每孔中分别加入相对应的 Ad5-HA117;转染 48 h 后 1 000 r/min 离心 5 min 移去上清;PBS 重悬细胞,台盼蓝拒染法检测细胞活力并送流式细胞仪检测感染率。

1.2.3　重组腺病毒在 Jurkat 的表达　　应用 pAd-HA117 重组腺病毒和空载体腺病毒(阴性对照)感染白血病细胞株 Jurkat,48 h 后荧光显微镜下可见较多发绿色荧光细胞,收获细胞,取部分细胞送流式检测其感染率;另一部分细胞提取总 mRNA 进行 RT-PCR 鉴定,上游引物:5′-CAGAGTCAGGGACTTCAGCCTTAT-3′,下游引物:5′-CTGTTTCCTTCTCACTCCCAACCA-3′长度 119 bp;扩增条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,68 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环,72 ℃ 7 min。

1.2.4　肿瘤细胞增殖情况检测　　用 MTT 法分别将对数生长期白血病细胞不同组:Jurkat 细胞组、Jurkat/Ad5 细胞组、Jurkat/Ad5-HA117 细胞组细胞,调整细胞浓度为 10^{-4}/ml,接种于 96 孔微孔板,200 μl/孔,并设立对照组。每个实验孔重复6 次,实验结果行统计学处理。置于 37 ℃,5% CO_2 培养 0、1、2、3、4、5 d,弃培养液,加入不含新生小牛血清的 RPMI1640 培养基 200 μl,然后加入 20 μl MTT(5 μg/ml),37 ℃,5% CO_2 培养 4 h,弃上清,加入 200 μl DMSO 溶解甲臜结晶,37 ℃ 30 min,充分振荡混匀,于酶标仪上,在波长 570 nm 处检测光密度值[D(570)]。

1.2.5　四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测耐药指数　　细胞转染成功 24 h 后,以 $(2 \sim 4) \times 10^4$ 孔$^{-1}$ 平铺于 96 孔板,实验分为 Jurkat 细胞组、Jurkat/Ad5 细胞组、Jurkat/Ad5-HA117 细胞组。每种药物根据预实验选取 6 种浓度,同时设空白及蒸馏水对照,重复 3 孔。37 ℃,5% CO_2 下培养 48 h。弃去培养基,加入 0.05% 的 MTT 20 μl 继续培养 4 h,100 × g 离心 5 min,小心吸去培养基,再加入二甲亚砜 200 μl/孔,将微孔板置于震荡器震荡 2 min,以酶标仪检测波长 490 nm 处吸光度值[D(490)],由吸光度值计算每孔细胞存活率。采用 MTT 法测定比较 3 组实验细胞对 VCR、ADM、MMC、DNR、Vp-16、CTX 的半数抑制浓度(IC_{50}),实验重复 3 次。

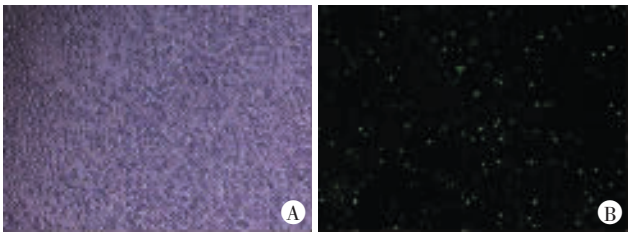
1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验及方差分析。

2　结果

2.1　重组腺病毒感染 Jurkat 细胞

培养的 Jurkat 细胞,细胞生长状态良好,转染重组腺病毒后 48 h 可观察到 16.19% ~20.30% 的细胞发出绿色荧光。见图 1。

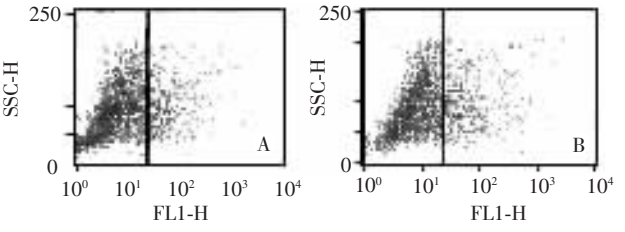


A:平光显微镜观察; B:荧光显微镜观察

图 1　人白血病 Jurkat 细胞感染腺病毒后 48 h 形态学观察　(×100)

2.2　流式细胞仪测定 Jurkat 细胞转染效率筛选最适转染滴度

流式细胞仪检测发现,随着感染复数的增加,病毒对 Jurkat 细胞的感染率也增加(图 2),但 MOI 值大于 100 以后,细胞的活力逐步减弱,死亡细胞明显增加。提示 MOI 值为 100 时细胞的存活率和感染率均较好,最高的感染率可以达到 16.19%,而存活率也保持在 80% 以上,故考虑将 MOI = 100 作为进一步实验的最适转染浓度(表 1)。



A: MOI = 100; B: MOI = 500

图 2　不同 MOI 值下流式细胞仪检测 Ad5-HA117 对 Jurkat 细胞的感染率

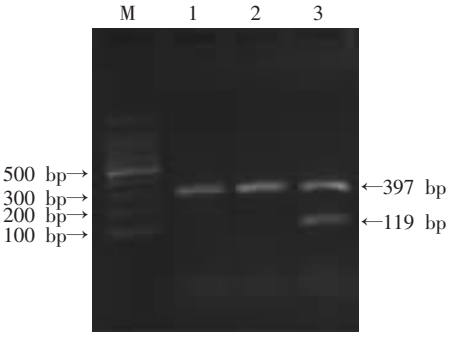
表 1　不同病毒感染复数下 Jurkat 细胞的感染率及存活率

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

MOI	感染率	存活率
1	0.12 ± 0.02	92.33 ± 0.21
10	2.33 ± 0.56	84.01 ± 1.37
50	13.32 ± 0.13	83.46 ± 0.43
100	16.19 ± 0.23	80.65 ± 1.23
500	20.30 ± 0.42	61.25 ± 1.86

2.3　提取细胞总 mRNA 进行 RT-PCR 鉴定

用重组腺病毒 pAd-HA117 感染 Jurkat 细胞,通过提取细胞总 mRNA 进行 RT-PCR 鉴定,可以检测到 119 bp 大小的 HA117 基因 DNA 片段,而转染腺病毒空载体组没有扩增出相应的片段,表明腺病毒具有成功再感染肿瘤细胞功能。见图 3。



M:DNA 标准(100 bp);1:空白 Jurkat 细胞组;2:转染空载体组 HA117 基因对照;3:转染重组腺病毒组 HA117 基因

图 3　重组腺病毒 pAd-HA117 感染 Jurkat 细胞 RT-PCR 鉴定

2.4 肿瘤细胞增殖情况检测

用 MTT 法可检测到,Jurkat 细胞组、Jurkat/Ad5 细胞组、Jurkat/Ad5-HA117 细胞组 3 组细胞,在 RPMI1640 完全培养基中的增殖情况无显著差异($P>0.05$, 表2)。

表2 不同培养时间各组细胞增殖检测结果 [$D(570)$, $n=6$, $\bar{x}\pm s$]

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
Jurkat 组	0.19±0.02	0.30±0.03	0.59±0.02	0.64±0.04	0.66±0.05
Jurkat/Ad5 组	0.20±0.05	0.32±0.07	0.64±0.01	0.67±0.01	0.70±0.06
Jurkat/Ad5-HA117 组	0.19±0.01	0.34±0.03	0.62±0.06	0.68±0.05	0.73±0.02

2.5 肿瘤细胞药物敏感性实验结果

结果表明,转染 Ad5-HA117 重组腺病毒的 Jurkat 细胞对 VCR、ADM、Vp-16、DNR、MMC、CTX 药物的药物耐受性均比未转染的 Jurkat 细胞高,增高 3~7 倍($P<0.05$),转染空载体组耐药性跟未转染的 Jurkat 细胞相比差异无统计学意义($P>0.05$)(表3)。

表3 各组细胞对肿瘤细胞化疗药物的半数抑制浓度

(mmol/L, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

药物	Jurkat 组	Jurkat/Ad5 组	Jurkat/Ad5-HA117 组
VCR	0.203±0.018	0.210±0.014	1.012±0.041[a]
ADM	0.052±0.009	0.031±0.010	0.410±0.060[a]
Vp-16	4.109±0.018	3.926±0.025	12.632±0.780[a]
DNR	0.094±0.012	0.092±0.035	0.896±0.095[a]
MMC	3.657±0.349	3.229±0.341	11.247±1.062[a]
CTX	1.897±0.128	1.868±0.032	6.860±0.221[a]

a: $P<0.05$, 与 Jurkat 组比较

3 讨论

化疗在恶性肿瘤的综合治疗中具有不可替代的作用,肿瘤细胞对化疗药物产生继发性多药耐药严重制约了临床化疗疗效。肿瘤细胞多药耐药的产生是多基因参与调控的复杂过程,如经典的多药耐药基因 mdr1、乳腺癌多药耐药相关基因 bcrp[5]、抗凋亡基因 survivin[6]等。但这些基因并不足以完全阐明肿瘤细胞多药耐药产生的机制,可以推测,在肿瘤细胞中,应该有我们目前所未知的基因参与了其多药耐药的产生。HA117 基因即为本课题组通过抑制消减杂交和基因芯片相结合的方法,从多药耐药细胞株 HL-60/MDR 中筛选出的新基因,其在 HL-60/MDR 的高表达,可能参与调节了细胞对化疗药物产生耐药。在本研究中,应用腺病毒介导的方法使实验 Jurkat 细胞高表达 HA117 基因,研究新基因 HA117 对人急性淋巴细胞白血病细胞 Jurkat 耐药性的影响。

重组腺病毒载体是目前应用最广泛的生物病毒载体之一,具有以下优点:宿主范围广,包装容量大,对人致病性低,在增殖和非增殖细胞中感染和表达基因,能有效进行增殖,滴度高,与人类基因同源[7,8]。改良的腺病毒载体 pAdEasy 系统作为一种载体,以其特有的优点广泛应用于肿瘤基因治疗的研究。因为它同时携带了 GFP,可在包装和扩增的同时直接观察转染和感染的效率,大大缩短了基因治疗的构建和鉴定过程,克服了传统方法步骤周期长,效率低的缺点。

在本研究中我们选用改良的 pAdEasy 系统作为载体构建重组分子。以携带 HA117 基因的重组腺病毒 Ad5-HA117 感染 Jurkat 细胞,可使 HA117 基因在 Jurkat 细胞有效表达,经 MTT 法对感染细胞耐药性检测,高表达 HA117 基因的 Jurkat 细胞对 VCR、ADM、MMC、DNR、Vp-16、CTX 六种化疗药物的耐受性增加 3~7 倍。结果表明转染的外源性 HA117 基因可使 Jurkat 细胞对以上六种化疗药物耐受性增强,提示新基因 HA117 具多药耐药功能。

本研究应用腺病毒介导的方法对转染了 HA117 基因的细胞在多种抗癌药物的敏感性变化,初步证明新基因 HA117 具有多药耐药功能。该研究将有望为临床逆转肿瘤细胞多药耐药,更好的治疗恶性肿瘤提供崭新的疗法和广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Cianfriglia M, Cenciarelli C, Barca S, *et al*. Monoclonal antibodies as a tool for structure-function studies of the MDR1-P-glycoprotein[J]. Curr Protein Pept Sci, 2002, 3(5): 513-530.

[2] 付劲蓉, 刘文励, 周剑锋, 等. Mcl-1 基因在 HL-60 细胞对全反式维甲酸耐药机制中的作用[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26(6): 352-354.

[3] 郭玉霞, 罗 庆, 徐西华. 耐药相关新基因 HA117 的克隆及重组腺病毒制备[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(6): 641-644.

[4] 丁幸坡, 金先庆, 罗小辑, 等. 含 hIGF-1 基因腺病毒的构建及在兔骨髓间充质干细胞的表达[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(14): 1495-1498.

[5] Allen J D, Schinkel A H. Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(6): 427-434.

[6] Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(6): 1133-1139.

[7] Hayashi S, Leu D, Yamii Y, *et al*. Effect of adenovirus-mediated transfer of the CTLA4IG gene in hamster-to-rat xenotransplantation[J]. Transplantation, 2005, 80(4): 494-499.

[8] Kanerva A, Hemminki A. Adenoviruses for treatment of cancer[J]. Ann Med, 2005, 37(1): 33-43.

(编辑 汪勤俭)