论著

文章编号:1000-5404(2010)03-0242-04

mdr-1基因转染的骨髓细胞对大剂量MMF治疗的耐受性研究

李 钺,栾晓峰,陈 勇,龚建平,陈先锋,丁 雄,刘作金 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆市肝胆外科重点实验室)

[摘要] **目的** 检测转染多药耐药基因-1(multidrug resistance gene-1,mdr-1)的骨髓细胞能否耐受大剂量霉酚酸脂(mycophenolate mofetil,MMF)的杀伤作用,为体内实验提供依据。**方法** 将重组腺病毒Ad-EGFP-mdr-1转染大鼠骨髓细胞。RT-PCR法和Western blot法检测mdr-1 mRNA及蛋白的表达水平;柔红霉素排出试验检测转染mdr-1基因后的骨髓细胞有无功能表达;MTT法检测不同浓度MMF处理后转染mdr-1基因骨髓细胞的存活情况。**结果** 骨髓细胞病毒转染率为30.14%,存活率为89.25%;转染后骨髓细胞mdr-1的mRNA及蛋白质水平都存在功能性表达;导入的mdr-1表达产物P-gp有药物外排泵功能;不同剂量的MMF处理后,转染mdr-1基因的骨髓细胞存活率没有明显差异($P>0.05$)。**结论** 转染mdr-1的大鼠骨髓细胞能有效耐受超大剂量MMF治疗。

[关键词] 多药耐药基因-1;霉酚酸脂;骨髓细胞
[中图法分类号] R331.22; R394.2; R979.12 [文献标志码] A

Tolerance of mdr-1 transfected bone marrow cells to overdose mycophenolate mofetil

Li Yue, Luan Xiaofeng, Chen Yong, Gong Jianping, Chen Xianfeng, Ding Xiong, Liu Zuojin (Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Key Laboratory of Hepatobiliary Surgery, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether bone marrow cells (BMC) transfected with multidrug resistance gene-1 (mdr-1) can tolerate to the killing effect of overdose mycophenolate mofetil (MMF). **Methods** BMC were transfected with recombinant adenovirus, Ad-EGFP-mdr-1. Expression levels of mdr1 mRNA and protein were detected by RT-PCR, Western blotting and daunorubicin (DAM), respectively. The survival of mdr-1 transfected BMC after treatment with MMF at different concentrations was detected by MTT. **Results** The transfection efficiency of the virus was 30.14%, and the survival rate of BMC was 89.25%. The mdr-1 mRNA and protein were functionally expressed in transfected BMC. The expressed product, P-gp, was found to have a pumping function induced by mdr-1. No obvious difference was found in survival of mdr-1 transfected BMC ($P>0.05$). **Conclusion** mdr-1 transfected MBC can efficiently tolerate to overdose MMF, thus providing a basis of its *in vivo* experiments.

[**Key words**] multidrug resistance gene-1; mycophenolate mofetil; bone marrow cell

Supported by the Chinese Postdoctoral Science Foundation (20070411151), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSCT2007BB0266, CSCT2008BB5229) and the Natural Science Foundation of Fuling District (2008-48). Corresponding author: Liu Zuojin, Tel: 86-23-63693533, E-mail: liuzuojin66@hotmail.com

目前肝移植术后采用的细胞毒性药物、神经碱钙抑制剂和类固醇的三联用药规范,使得急性排斥反应(acute rejection,AcR)得到良好控制,但机体肿瘤免疫机能不可避免的进一步被削弱,进而成为肝癌肝移植术后肿瘤转移、复发的重要原因[1-4]。霉酚酸酯(mycophenolate mofetil,MMF)是选择性的嘌呤合成抑制剂,可明显降低AcR发生率,同时还能杀伤肿瘤细胞,但治疗剂量的MMF也会造成较严重骨髓抑制[5]。由多药耐药基因-1(multidrug resistance-1,mdr-1)编码的P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)是一种能量依赖性药物输出泵,可将药物泵出细胞而避免药物在细胞内堆积。机体不能耐受超大剂量MMF治疗的关键原因之一,就是骨髓造血细胞因缺乏这种P-gp介导的保护机制[6,7]。因此,我们设想通过将mdr-1基因导入骨髓造血细胞以实现骨髓保护,从而保证大剂量MMF治

[基金项目] 中国博士后科学基金(20070411151);重庆市自然科学基金(CSTC2007BB0266,CSTC2008BB5229);重庆市涪陵区自然科学基金(2008-48)
[通信作者] 刘作金,电话:(023)63693533, E-mail: liuzuojin66@hotmail.com

疗的顺利实施。

1 材料与方法

1.1 材料

重组腺病毒 Ad-EGFP-mdr-1 及 HEK 293 细胞由重庆医科大学儿童医院罗庆研究员赠送；雄性健康 BN 大鼠 10～12 周龄，体质量 220～250 g，购自北京联合利华公司；总 RNA 提取试剂盒，胶回收试剂盒，逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司；兔抗鼠 P-gp 多克隆抗体购自 Imgenex 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒的扩增 采用乒乓感染法多轮感染产病毒包装细胞 HEK293，通过荧光观察细胞生长状态。取 2 μl Ad-EGFP-mdr-1 病毒液转染培养于 250 ml 培养瓶中的 HEK 293；培养 3～5 d，待大部分细胞飘浮后，1 000 r/min 离心 5 min；冻溶细胞，收集上清得到病毒液，保存于 -20 ℃ 待用；将 HEK293 细胞按 2×10^5/孔接种 6 孔板中，取病毒原液作不同比例稀释（$1:10^3$～$1:10^{10}$），每种浓度 3 个复孔；每孔 400 μl 加病毒稀释液，37 ℃，5% CO_2 孵养 24 h，离心收集细胞，采用流式细胞仪计数 GFP 阳性细胞数；按下列公式计算重组腺病毒的滴度：病毒滴度（pfu/ml）= GFP 阳性细胞数 × 病毒上清稀释倍数/0.4 ml。

1.2.2 BN 大鼠骨髓细胞的制备及病毒转染 BN 大鼠断颈处死，无菌条件下取双下肢股骨、胫骨；7 号针头抽取 3 ml 无血清 IMDM 培养基冲出骨髓中之细胞并制成单细胞悬液；取等体积淋巴细胞分离液至于离心管中（密度 1.077），将细胞悬液轻轻叠加于其上；2 000 r/min 离心 20 min；吸取中间带状白膜层，台盼蓝拒染法检测细胞活力 > 90%。加入含 20% FBS 的 IMDM 培养基吹打混匀，并将其调制成为 2.0×10^5 个/ml 的细胞悬液，加入 Ad-EGFP-mdr-1 调整感染复数（multiplicity of infection，MOI）= 50。每毫升培养体系中含 10% BSA 0.1 ml，TPO 10 ng/ml，FLt-30 ng/ml，SCF 20 ng/ml，G-CSF 15 ng/ml，IL-30 ng/ml，IL-65 ng/ml，3% L-Glu 10 μl。PBS 替代病毒液为对照组。观察细胞的生长状况，荧光显微镜检测绿色荧光蛋白的表达；转染 48 h 后，收集细胞，1 000 r/min 离心 5 min。移去上清，PBS 重悬细胞，流式细胞仪检测转染率。

1.2.3 骨髓细胞的 mdr-1 mRNA 及蛋白表达水平检测 采用 RT-PCR 测定 mdr-1 mRNA 表达水平。mdr-1 上游引物 5′-AAAGCTGTCAAGGAAGCCAA-3′，下游引物 5′-ACTCCATCATCG AAA CCA GC-3′，扩增产物为 157 bp。Western blot 法测定 P-gp 蛋白表达，结果用 Quantity One 4.0 图像分析软件（美国 Bio-Rad 公司）进行扫描分析。

1.2.4 柔红霉素排出实验检测骨髓细胞 P-gp 的功能 将骨髓细胞制成 2.0×10^6/ml 的细胞悬液；加入终浓度为 7.5 μg/ml 的柔红霉素；37 ℃，5% CO_2 孵育 30 min；1 500 r/min 离心 5 min，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 孵育 10 min；加入异搏定，使其终浓度为 10 μg/ml，终止其泵功能；荧光显微镜观察 P-gp 的功能。

1.2.5 MMT 法检测不同浓度 MMF 处理后骨髓细胞存活情况 将骨髓细胞加入 6 孔板，调整细胞浓度为 5.0×10^3 个/ml；设空白对照组（不加 MMF）、对照组（加入 MMF 药物溶解剂）和不同浓度的 MMF 处理组（浓度分别为 10、30、60 μg/ml）（该剂量根据人 MMF 化疗的最大剂量换算所得：常规剂量为 20 mg/kg，大剂量 60 mg/kg，超剂量按 120 mg/kg），每组设 18 个复孔；在加入 MMF 后第 3、7、14 天吸去培养液，每孔依次加入 150 μl 四唑盐及二甲亚砜（DMSO）2 ml，用酶标仪在 492 nm 波长下测定各孔的光密度值[D(492)]。

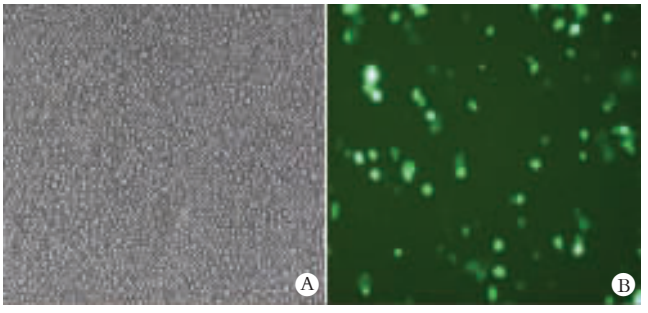
1.3 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件，多组间均数比较经方差齐性检验后用方差分析，组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠骨髓细胞体外培养及病毒转染

采用倍比稀释，流式细胞仪检测重组腺病毒 Ad-EGFP-mdr-1 病毒滴度为 8.4×10^9 pfu/ml。倒置显微镜下观察发现大鼠骨髓干细胞生长状态好，细胞有明显扩增，呈圆形，饱满、均质而透明，折光性强（图 1A）；重组腺病毒转染细胞与 PBS 对照组细胞，在光镜下观察，形态学上无明显差异，但荧光显微镜下可表达绿色荧光（图 1B）。流式细胞仪检测骨髓细胞的 Ad-EGFP-mdr-1 平均转染率为 30.14%，背景荧光为 0.36%。

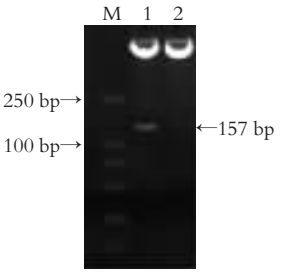


A：常规培养细胞（折光显微镜）；B：转染后的细胞，可表达绿色荧光（荧光显微镜）

图 1 常规培养及转染 mdr-1 基因的骨髓细胞 （×100）

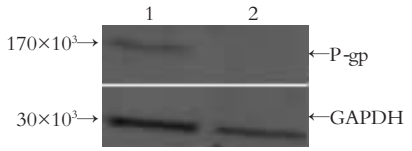
2.2 mdr-1 mRNA 及 P-gp 在骨髓细胞中的表达

RT-PCR 结果显示（图 2）：Ad-EGFP-mdr1 病毒转染组 mdr-1 mRNA 的表达明显高于 PBS 对照组，差异具有显著性（$P<0.05$）。Western blot 结果显示（图 3）：转染组在 170×10^3 处可观察到蛋白条带，而未转染组未见到蛋白条带，其 P-gp 表达的差异存在显著性（$P<0.01$）；同时，随着转染时间的延长，P-gp 表达逐渐下降。



M：标准；1：转染组；2：对照组

图 2 RT-PCR 检测 mdr-1 mRNA 的表达

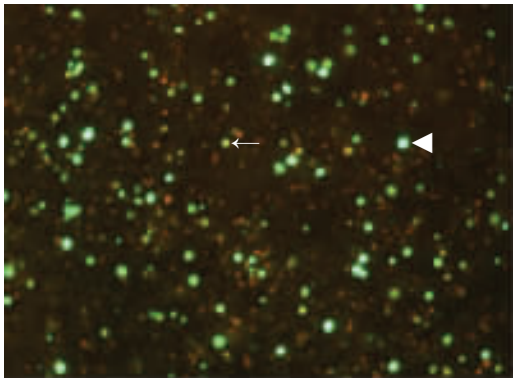


1:转染组;2:空白对照组

图3 Western blot 检测 P-gp 的表达

2.3 柔红霉素排出实验

柔红霉素为自发荧光的抗癌药物,同时也是 P-gp 的作用底物,通过荧光显微镜可以直观观察到细胞内聚集的柔红霉素,从而间接了解 P-gp 的功能。转染了 mdr-1 基因的骨髓细胞内无或仅有少量的柔红霉素的聚集,明显表达绿色荧光,而无或表达少量呈红色荧光,表明转染了 mdr-1 基因后的骨髓细胞通过表达 P-gp 而具有外排泵的功能;而未转染的骨髓细胞内有柔红霉素的大量聚集,表达红色荧光(图4)。



▲:有 P-gp 功能的骨髓细胞; ↑:无 P-gp 功能的骨髓细胞

图4 柔红霉素排出实验 (荧光显微镜 ×100)

2.4 MMT 法检测不同浓度 MMF 处理后大鼠骨髓细胞存活率

MTT 法结果显示经不同浓度 MMF 处理后的转染 mdr-1 基因的大鼠骨髓细胞第1、3、5 天及 7 天的 $D(492)$ 分别为 10 μg/ml 组(0.057、0.054、0.056、0.055)、30 μg/ml 组(0.056、0.055、0.054、0.054)、60 μg/ml 组(0.056、0.054、0.055、0.055),各处理组各时间点差异无显著性($P>0.05$),表明转染 mdr-1 基因的大鼠骨髓细胞存活率没有明显差异,转染后的细胞能耐受较大剂量的 MMF 处理。

3 讨论

目前即使是全球最先进的肝移植中心也有约 1/3 的受者为肝癌患者,如何预防肝移植术后肿瘤复发已成为肝移植外科必须面对的严峻挑战。但化疗能否有效控制肿瘤复发目前尚无定论,甚至有大剂量化疗反而促进肿瘤复发的报道[7,8]。机体肿瘤免疫以细胞免疫为主,主要效应细胞是 $CD8^+$ 的细胞毒性 T 细胞,自然杀伤细胞和巨噬细胞[9]。大剂量化疗药物除直接造成上述细胞功能受损外,还抑制骨髓造血功能。同时,肝移植后为预防 AcR 而常规采用的神经碱钙抑制剂,细胞毒性药物和类固醇,均使得机体细胞免疫机能不可避免的进一步被削弱,进而成为术后肿瘤复发的重要原因[10]。

MMF 是选择性的嘌呤合成抑制剂,其作用位点是单磷酸次黄嘌呤脱氢酶,该酶是淋巴细胞和恶性肿瘤细胞中嘌呤核苷酸合成时的限速酶。因此 MMF 在杀伤肿瘤细胞的同时,还对淋巴细胞具有选择性,毒副作用较小。但即使治疗剂量的 MMF 也会造成较严重骨髓抑制,很多患者不能耐受[5]。人类 mdr-1 基因位于 7q21.1,其编码的 P-gp 由 1 280 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 170×10^3,蛋白质组分为 140×10^3,糖基占 30×10^3。P-gp 分子的 N 端和 C 端呈分子内对称结构,共有 12 个跨膜结构域,细胞质的亲水基团形成 2 个 ATP 结合位置。P-gp 是一种能量依赖性药物输出泵,广泛表达于如肝、肾上腺、肠、睾丸等正常的人体组织细胞,它可将药物泵出而避免在细胞内堆积。然而,骨髓细胞却缺乏这种 P-gp 介导的保护机制,这是机体不能耐受大剂量 MMF 治疗的关键原因[6,7]。因此,如能解决骨髓抑制问题,肝移植后采用大剂量 MMF 冲击不仅能预防 AcR,又能杀灭微转移细胞防治肿瘤复发,达到一箭双雕的目的。

我们前期研究发现,移植转染 mdr-1 基因的骨髓细胞后,机体即可耐受大剂量药物治疗[10]。目前,实验室常用两种方法来富集骨髓细胞:密度梯度离心法和免疫磁珠法。前者收集的细胞数量多但未纯化,而后者获得的细胞纯度更高,但数量甚少。此外,在相同的转染条件下,过度纯化的细胞因培养体系中缺乏体内各种细胞间相辅相成的细胞微环境及骨髓基质细胞等的调控作用,转染率较低[11,12]。因此,在本研究中,我们采用密度梯度离心法筛选骨髓细胞作为靶细胞进行基因转染。台盼蓝检测示转染后有活性细胞数量达约 89% 左右,从而能保证活体试验时有足够数量的存活细胞行骨髓回输。我们采用携带 mdr-1 的腺病毒载体转染体系,平均转染率达 30.14%。RT-PCR 及 Western blot 证实,转染组骨髓细胞的 mdr-1 mRNA 及 P-gp 表达明显高于对照组。而柔红霉素排出实验证实,转染 mdr-1 的骨髓细胞所表达的 P-gp 具有药物外排泵的生物学功能;MTT 法则进一步发现转染 mdr-1 基因的骨髓细胞能够在体外耐受 2 倍乃至 3 倍于常规剂量的 MMF 化疗,证明转染 mdr-1 基因后的表达产物P-gp,能发挥外排泵的作用,将 MMF 泵出体外,保护宿主细胞,从而为进一步的体内试验提供了基础。我们还发现,转染3、7、14 d 的骨髓单个核细胞的 P-gp 表达虽然没有明显差异,但已经呈下降趋势。提示活体实验时,应选择转染 3 d 的骨髓细胞进行移植,以防止转染时

间过长、细胞状态不良等导致体内实验失败。

综上所述,我们采用携带 mdr-1 的腺病毒载体,转染大鼠骨髓细胞后,能够在体外耐受 2 ~3 倍于常规剂量的 MMF 治疗。本研究结果为肝癌肝移植时超大剂量 MMF 治疗时骨髓抑制问题的解决,提供了实验基础。

参考文献:

[1] Varona M A, Del-Pino J M, Barrera M, *et al*. Hepatocellular carcinoma and liver transplantation: a 12-year experience[J]. Transplant Proc, 2009, 41(3): 1005 - 1008.

[2] Ushitora Y, Tashiro H, Ogawa T, *et al*. Suppression of hepatocellular carcinoma recurrence after rat liver transplantation by FTY720, a sphingosine-1-phosphate analog[J]. Transplantation, 2009, 88(8): 980 - 986.

[3] Fan J, Yang G S, Fu Z R, *et al*. Liver transplantation outcomes in 1, 078 hepatocellular carcinoma patients: a multi-center experience in Shanghai, China[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(10): 1403 - 1412.

[4] Santoyo J, Sanchez B, de-la-Mata M, *et al*. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: results of a multicenter study with common priorization criteria[J]. Transplant Proc, 2009, 41(3): 1009 - 1011.

[5] 郑树森. 肝脏移植围手术期处理[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 192 - 218.

[6] Zhang Y S, Yuan F J, Jia G F, *et al*. CIK cells from patients with HCC possess strong cytotoxicity to multidrug-resistant cell line Bel-7402/R[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(22): 3339 - 3345.

[7] 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.

[8] Lau W Y, Lai E C, Lau S H. The current role of neoadjuvant/adjuvant/ chemoprevention therapy in partial hepatectomy for hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2009, 8(2): 124 - 133.

[9] Calmus Y. Liver transplantation for cancer[J]. Rev Prat, 2008, 58(16): 1745 - 1748.

[10] Rampone B, Schiavone B, Martino A, *et al*. Current management strategy of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(26): 3210 - 3216.

[11] Togo S, Tanaka K, Masui H, *et al*. Usefulness of prophylactic transcatheter arterial infusion of anticancer agents with lipiodol to prevent recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatic resection[J]. Int Surg, 2005, 90(2): 103 - 108.

[12] 王佚, 金先庆, 王荞, 等. mdr1 基因转染骨髓造血细胞移植联合超剂量化疗治疗兔 VX2 肝癌的实验研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2004, 25(3): 274 - 278.

(**收稿**:2009-07-10;**修回**:2009-10-11)

(编辑 汪勤俭)

(上接 237 页)

2 讨论

近来的资料表明 LID 的发生与长期左旋多巴治疗引起的纹状体内多巴胺受体长期非生理性、波动性刺激,引起的下游突触后神经元功能改变所导致的直接通路和间接通路失衡有关,但确切机制仍未明了,导致 LID 的治疗困难[1]。LID 主要有 3 种形式:剂峰运动障碍、双向运动障碍和肌张力障碍,可以通过调整 L-dopa 剂型、剂量、给药时间或加用缓释型多巴胺受体激动剂以改善症状[2,3]。如病例 1 患者,因不规律服用 L-dopa 诱发 LID,通过调整调整 L-dopa 剂型并加用缓释型多巴胺受体激动剂而症状改善。但临床上更多发现通过调整 L-dopa 剂型、剂量、给药时间或加用缓释型多巴胺受体激动剂并不能理想控制 LID 症状。曾有不少人尝试使用镇静剂、肌松剂,甚至抗癫痫药物治疗,可以取得一定疗效但总体效果不理想。

国外研究报道氯氮平除了对 PD 患者精神症状有良好效果,同时小剂量氯氮平(Clozapine)治疗明显改善 LID 症状。病例 2 属 PD 晚期患者,通过调整 L-dopa 剂型及剂量 LID 症状无改善,给予小剂量氯氮平 25 mg,早、晚各 1 次,症状缓解约 50%,1 周后改为氯氮平 100 mg/d,随访 3 个月,患者症状缓解 80% ~90%,明显改善生活质量,患者进食及睡眠不再受 LID 症状干扰,并且无明显嗜睡等不良反应。病历 3 患者用 L-dopa 治疗 3 年后出现 LID,其 LID 发病可能和他不规律服用 L-dopa 制剂有关,曾尝试用氯硝西泮、巴氯芬、氟哌啶醇、苯巴比妥等药治疗,但不自主运动症状无明显改善,终给小剂量氯氮平而取得理想效果。

氯氮平属二氮氧苯平类抗精神病药物,不良反应有流涎、便秘,偶有发热、粒细胞减少及直立性低血压,因其无锥体外系不良反应的特点,已较广泛应用于控制 PD 患者中左旋多巴诱导的精神症状。病例 2 患者使用小剂量(每日 100 mg)氯氮平能显著改善 PD 患者左旋多巴诱导的异动症,而且没有恶化患者的运动功能;并通过体位训练、站立前准备而无直立性低血压发生,随访本组后 2 例患者血象未发现粒细胞减少,若发现严重粒细胞减少应停药。

参考文献:

[1] Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, *et al*. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia[J]. Ann Neurol, 2005, 57(1): 17 - 26.

[2] Picconi B, Paille V, Ghiglieri V, *et al*. L-dopa dosage is critically involved in dyskinesia *via* loss of synaptic depotentiation[J]. Neurobiol Dis, 2008, 29(2): 327 - 335.

[3] Durif F, Debilly B, Galitzky M, *et al*. Clozapine improves dyskinesias in Parkinson disease: a double-blind, placebo-controlled study[J]. Neurology, 2004, 62(3):381 - 388.

(**收稿**:2009-05-10;**修回**:2009-06-04)

(编辑 张 维)