文章编号:1000-5404(2011)15-1551-04

论著

多药耐药基因转染骨髓单个核细胞移植联合化疗治疗乳腺癌的实验研究

刘 伟,赵珍珍,赵利华,金先庆 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院普通外科)

[摘要] **目的** 研究外源性人多药耐药基因(human multidrug resistance gene 1,hMDR1)转染骨髓单个核细胞(mononuclear cells,MNCs)移植联合超剂量表阿霉素化疗在4T1乳腺癌治疗中的骨髓保护和治疗作用。**方法** 用携带目的基因hMDR1和绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,GFP)报告基因的复制缺陷型重组腺病毒(rAd-hMDR1-GFP)转染原代培养的MNCs以获取hMDR1基因修饰的MNCs(MNCs-rAd-hMDR1-GFP),将修饰后的MNCs移植到4T1乳腺癌模型体内,在表阿霉素超剂量化疗中观察骨髓造血功能的保护和肿瘤的治疗效果。**结果** hMDR1基因成功转入小鼠骨髓单个核细胞,体外转染率达26.26%;转染细胞移植后能定植于受体骨髓中并功能性表达。在超剂量化疗中,hMDR1基因能有效保护受体骨髓的造血功能,荷瘤动物能耐受3倍剂量表阿霉素化疗,外周血白细胞数能维持在$(5.7\pm0.6)\times10^9$/L;同时超剂量化疗能迅速杀灭肿瘤细胞,使荷瘤动物存活时间明显延长($P<0.05$),治愈率明显提高($P<0.05$)。**结论** hMDR1基因转染骨髓造血细胞移植能明显提高受体骨髓对化疗药物的耐受性,联合超剂量化疗能快速、有效的杀灭肿瘤细胞,提高恶性肿瘤的治愈率。

[关键词] 多药耐药基因;转染;药物疗法
[中图法分类号] R737.9; R73-36 [文献标志码] A

Transplantation of hMDR1-transferred bone marrow mononuclear cells and chemotherapy in breast cancer xenograft in mice

Liu Wei, Zhao Zhenzhen, Zhao Lihua, Jin Xianqing (Department of General Surgery, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] Objective To determine the myeloprotection and therapeutic effects of transplantation of human multidrug resistance gene 1 (hMDR1)-transferred mononuclear cells (MNCs) on over-dosage chemotherapy to the mice with 4T1 xenograft breast cancer. Methods Primary MNCs isolated from bone marrow of BALB/c mice were transfected with a replication-deficient recombinant adenovirus expression vector carrying hMDR1 and GFP (rAd-hMDR1-GFP) to obtain hMDR1-modified MNCs (MNCs-rAd-hMDR1-GFP). The transfected and nontransfected cells were then transplanted into BALB/c mice with 4T1 breast cancer xenograft and over-dose epirubicin (15 mg/kg, once a week). The xenograft mice without any treatment (control), with normal dose epirubicin (5 mg/kg, once a week) and with over-dose epirubicin served as control. The chemoprotection effects of hMDR1 gene for the hematopoietic bone marrow and effectiveness of over-dose chemotherapy were assessed. Results MNCs were transfected with the vector rAd-hMDR1-GFP *in vitro* with a transfection rate of 26.26%. After transplantation, the expression of hMDR1 gene, which confers chemoprotection, was confirmed. The mouse with 4T1 breast cancer xenograft could tolerate the 3 times higher than the usual dose of epirubicin and the leukocytes count in peripheral blood was maintained at $(5.7\pm0.6)\times10^9$/L. Over-dose chemotherapy reduced the breast cancer cells dramatically and extended the survival time of mouse ($P<0.05$). Conclusion Transplantation of hMDR1 transfected bone marrow hematopoietic cells increases the tolerance of xenograft to chermotherapy and improves the therapeutic effect of chemotherapy to the tumor.

[**Key words**] multidrug resistance gene; transfection; drug therapy

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China(30330590). Corresponding author: Jin Xianqing, Tel:86-23-63622049, E-mail: etzhl@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30330590)
[通信作者] 金先庆,电话:(023)63638679,E-mail:etzhl@163.com

近年来,乳腺癌已成为全球范围内发病率最高的女性恶性肿瘤。随着目前诊治水平的整体上升,乳腺癌的整体疗效得到了明显的提高,特别是新辅助化疗在乳腺癌的治疗中正发挥着日益重要的作用,获得病理完全缓解的患者在无疾病生存期与总体生存期上可获得改善[1-2]。蒽环类药物是治疗乳腺癌的经典化疗药物,而其对骨髓的抑制作用制约了化疗的顺利进行。通过腺病毒载体在体外将多药耐药基因转入小鼠骨髓造血细胞中并回输而达到保护骨髓的目的,对抗蒽环等化疗药物对骨髓的抑制,保证化疗的顺利进行,从而提高乳腺癌患者的疗效。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 BALB/c 小鼠50只,6~8周龄,18~20 g,雌性,近交系,清洁级,由重庆医科大学实验动物中心提供,饲养于重庆医科大学实验动物中心的IVC实验动物鼠笼中。实验动物完全随机分组法分为未治疗组(1组)、常规剂量化疗组(2组)、超剂量化疗对照组1(未行骨髓造血细胞转染及移植)(3组)、超剂量化疗对照组2(未转染骨髓移植)(4组)、超剂量化疗实验组(转染骨髓移植)(5组),每组10只。

1.1.2 实验细胞 携带目的基因hMDR1和绿色荧光蛋白报告基因的复制缺陷型重组腺病毒由本实验前期重组[3];鼠4T1肿瘤株购自四川大学人类疾病生物治疗教育部重点实验室。

1.1.3 实验试剂 鼠抗人hMDR1抗体(Sc13131)及二抗(Sc-2005)购自SANTA CRUZ公司,细胞因子购自R&D公司,RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司,RPMI1640、IMDM、DMEM/F12培养基、特等胎牛血清购自HYCLONE公司,柔红霉素购自意大利法玛西亚公司,表阿霉素购自SIGMA公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鼠4T1乳腺癌模型的建立 复苏冻存的4T1肿瘤细胞,用含10% FBS、100 U/ml青霉素及100 mg/L链霉素的RPMI1640培养液于孵箱内培养,收集对数生长的4T1细胞,用无血清RPMI1640离心洗涤3次,然后调制成10^7/ml活细胞浓度;将0.2 ml肿瘤细胞悬液接种于BALB/c小鼠腋下皮下组织,观察肿瘤生长情况,直到能扪及皮下肿瘤包块为止。

1.2.2 鼠骨髓单个核细胞的分离及转染 BALB/c小鼠近交系小鼠断颈处死,75%酒精中浸泡5 min,无菌条件下取小鼠双下肢股骨、胫骨;7号针头抽取3 ml无血清IMDM培养基冲出骨髓之中细胞。7、6、4号针头分别抽吸3次,将细胞制成单细胞悬液;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×20 min离心;绕离心管吸取中间带状白膜层(单个核细胞层),无血清IMDM 1 000 r/min×10 min洗涤1遍,弃上清;台盼蓝拒染法检测细胞活力大于90%,加入含20% FBS的IMDM培养基吹打混匀,并将其调制成为(2.0~5.0)×10^5/ml的细胞悬液待用[4];浓缩病毒上清转染法结合TNF-α预处理转染小鼠骨髓单个核细胞[5]。

1.2.3 转染hMDR1基因的骨髓单个核细胞骨髓腔内注射移植 转染的骨髓单个核细胞回输前24 h,对照及实验组小鼠均接受亚致死剂量^{60}Co-γ射线(照射剂量1.5 Gy)照射进行预处理,麻醉动物后固定在操作台上,常规消毒铺巾;充分固定穿刺侧膝关节,暴露良好;于穿刺侧膝关节行约5 mm皮肤横切口,持50 μl微量注射器从膝关节表面穿过膝腱插入股骨骨髓腔,确定进入骨髓腔后,4组和5组每只受鼠分别注入未转染和转染的骨髓单个核细胞,每只小鼠回输的细胞数为2×10^6,注射液容量为30 μl;其余各组每只小鼠每侧股骨腔分别注入无血清培养液30 μl;注射后应用棉签压迫穿刺点30 s,缝合切口;术后1周内每日消毒伤口2次,预防感染的发生。

1.2.4 化疗实验 荷瘤2周左右开始表阿霉素化疗,2组化疗剂量为5 mg/kg,超剂量组化疗剂量为15 mg/kg,每周1次,根据荷瘤动物外周血和肿瘤生长情况来制定化疗疗程。

1.2.5 骨髓造血功能的保护情况 实验各组动物在化疗前及每次化疗结束1周后,采集外周血进行血液分析(机器自动检测)。

1.2.6 肿瘤治疗效果观察 荷瘤动物模型建立后开始,每周定期利用游标卡尺及超声波测量肿瘤的长径和短径,按公式:瘤质量(mg)=0.5×[短径(mm)]^2×长径(mm)计算瘤质量;同时进行肿瘤转移灶监测,每周定期处死实验小鼠,取死亡后荷瘤小鼠的瘤体、肝、肺、肾、脾、心脏等脏器,肉眼大体观察结合病理监测肿瘤治疗情况以及有无肿瘤转移;另外准确记录动物死亡时间,计算实验动物从荷瘤开始到死亡的存活时间。

1.2.7 外源性hMDR1基因在受体骨髓功能和表达时限的研究 骨髓移植后1个月,采集各组存活荷瘤动物骨髓单个核细胞,分别从基因(RT-PCR)、蛋白质(Western印迹法)和功能水平(柔红霉素泵出法)检测外源性hMDR1基因在受体骨髓中的定植和功能性表达情况[5]。

1.3 统计学处理

采用SAS统计软件(8.0版)进行分析。计量资料采用方差分析、t检验,计数资料采用R×C χ^2检验、Fisher精确概率法。

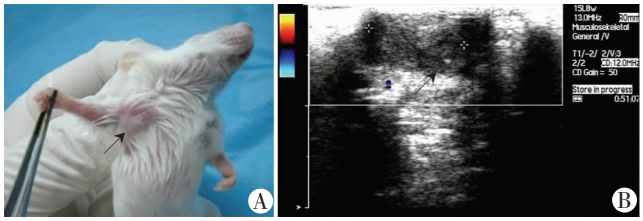
2 结果

2.1 4T1乳腺癌的生长及转移情况

荷瘤动物模型的建立:接种4T1瘤株后5 d左右,肿瘤即形成,并迅速增长,约11 d左右,肿瘤与周围组织的分界即模糊;后肿瘤出现中心坏死(扪及肿瘤时感觉中心有塌陷),同时生长的速度较前减慢;运用超声检测发现4T1乳腺癌在接种后4~5 d,接种部位即可以看见成近似球形的方式生长的肿瘤,为中等稍强的回声,肿瘤边界不甚清晰,随着时间延长,肿瘤体积迅速增大(图1A),肿瘤中心可出现由于血供不足而导致的肿瘤组织坏死、液化形成的无回声区(图1B)。

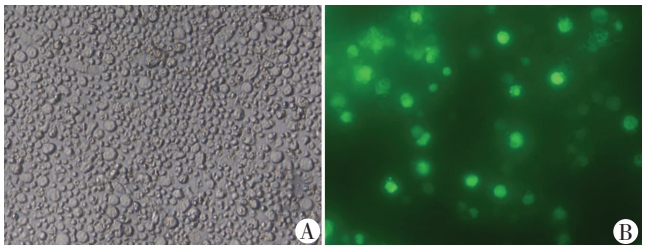
2.2 小鼠骨髓单个核细胞的采集、体外转染及扩增

通过浓缩病毒上清转染法成功的将外源性hMDR1基因导入小鼠骨髓单个核细胞中并功能性的表达,体外培养发现转染4 d的细胞生长状态好,增殖旺盛,可见大量细胞集落出现,每孔细胞数由(2.0~5.0)×10^5增加到(1.0~1.5)×10^7;hMDR1基因的转染率达到26.26%(图2)。



A:大体观察;B:超声观察; ↑:肿瘤

图 1 接种 4T1 肿瘤细胞的小鼠生长及转移情况

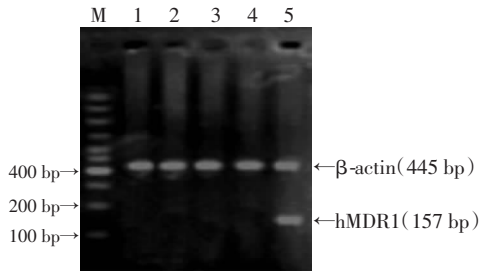


A:折光显微镜观察常规培养小鼠单个核细胞;B:荧光显微镜观察转染后的小鼠单个核细胞

图 2 100 μl TNF-α 浓度处理后 Ad-hMDR1 对小鼠单个核细胞感染率的观察 (×100)

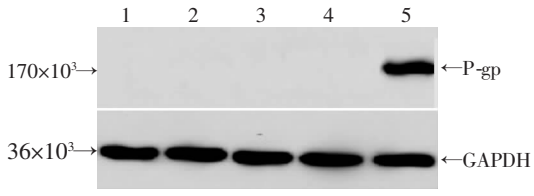
2.3 外源性 hMDR1 基因在荷瘤动物骨髓内的功能及表达

骨髓细胞移植后 1 个月,采集荷瘤动物骨髓并分选骨髓单个核细胞,提取 mRNA 逆转录以后进行 PCR 扩增,5 组动物骨髓单个核细胞的 DNA 扩增产物在 157 bp 处均可见特异性片段,而 1、2、3、4 组的扩增产物未见相应的片段(图 3);Western blot 检测移植后荷瘤动物骨髓单个核细胞 P-gp 的表达情况,测得 5 组荷瘤动物骨髓单个核细胞 P-gp 阳性表达,而 2、3、4 组骨髓单个核细胞未检测到 P-gp 表达(图 4);通过柔红霉素排出实验,发现 5 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,说明外源性 hMDR1 基因在受体荷瘤动物骨髓内有表达,且证明外源性的 hMDR1 基因表达的 P-gp 具有药物外排泵功能(图 5)。



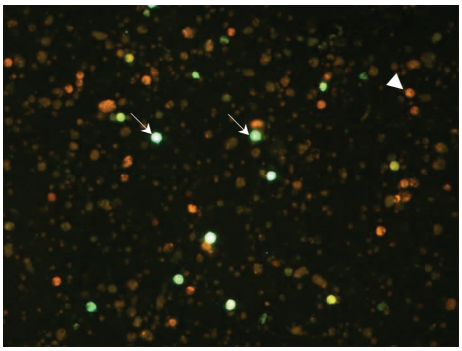
M:标准;1~4:1、2、3、4 组;5:5 组

图 3 RT-PCR 检测外源性 hMDR1 基因在骨髓中的表达



1~4:1、2、3、4 组;5:5 组

图 4 Western blot 检测外源性 P-gp 在骨髓中的表达



↑:转染 hMDR1 基因的细胞;△:未转染 hMDR1 基因的细胞

图 5 柔红霉素排出实验观察骨髓单个核细胞药物外排功能 (荧光显微镜 ×100)

2.4 超剂量化疗中外源性 hMDR1 基因对荷瘤动物骨髓造血功能的保护

化疗过程中各组荷瘤动物外周血白细胞数统计如下:化疗前各组荷瘤动物外周血白细胞数的差异无统计学意义($P>0.05$),经过 1 周的化疗,2、3、4、5 组外周血白细胞都有明显下降,但 5 组白细胞数下降幅度比 1、2、3、4 组均小;经过 2 周的化疗,3、4 组荷瘤动物死于严重骨髓抑制所致并发症,2、5 组白细胞数随化疗的进行进一步下降,但 2 组白细胞数差异有统计学意义($P<0.01$),5 组与 3、4 组的白细胞数差异也有统计学意义($P<0.01$);经过 3 周的化疗,2、5 组荷瘤动物外周血白细胞数差异有统计学意义($P<0.01$),5 组白细胞数高于 2 组,化疗停止后 2 周,2、5 组荷瘤动物外周血白细胞数有了明显回升,5 组较 2 组荷瘤动物白细胞数恢复的幅度更大,两者差异有统计学意义($P<0.05$)(表 1)。

表 1 4T1 乳腺癌小鼠化疗过程中各组外周血白细胞数比较($\times10^9$/L,$\bar{x}\pm s$)

组别	化疗前	1 周	2 周	3 周	停后 2 周
2 组	8.3±1.0	5.4±0.6[a]	3.7±0.5[a]	3.0±0.2[a]	4.4±0.4[a]
3 组	9.1±1.1	3.2±0.6[a]	1.6±0.4[a]	–	–
4 组	8.7±1.1	4.7±0.4[a]	3.8±0.4[a]	–	–
5 组	8.4±1.3	6.9±0.9	6.1±0.8	5.7±0.6	7.3±0.6

a:$P<0.01$,与 5 组比较

2.5 超剂量化疗对 4T1 乳腺癌的疗效

化疗前各组荷瘤动物肿瘤的质量差异无统计学意义($P>0.05$),化疗开始前各组肿瘤的生长情况处在同一水平,可进行化疗实验。化疗过程中及化疗停止后 2 周,各组荷瘤动物肿瘤的质量差异均有统计学意义($P<0.05$)。1 组在各疗程与其余各组的肿瘤质量差异均有统计学意义($P<0.01$),3、4、5 组肿瘤质量差异无统计学意义($P>0.05$),2 组肿瘤质量与 3、4、5 组比较均有统计学差异($P<0.05$)。见表 2。未经治疗的 4T1 乳腺癌生长迅速,但是对化疗敏感,常规剂量化疗可有效地抑制肿瘤的快速生长;而超剂量化疗中肿瘤质量增长缓慢,3 周化疗以后,5 组动物的肿瘤已经停止生长,并且在停药 2 周后仍然没有继续生长、恶化。而观察化疗过程中各组 4T1 乳腺癌小鼠存活情况发现:经过第 1 周的化疗,3、4 组荷瘤动物因严重骨髓抑制而死亡较多,但 5 组荷瘤动物全部存活,显示了hMDR1 基因对骨髓造血功能的保护作用,与 3、4 组存活率间的差异有统计学意义($P<0.05$);2 周的化疗后,3 组荷瘤动物存活 3 只,4 组仅存活 5 只,而 5 组荷瘤动物未死亡,2 组荷瘤动物死亡 3

只,各组存活率间的差异有统计学意义($P<0.05$)。3周的化疗后,3、4组荷瘤动物全部死亡,5组荷瘤动物死亡2只,2组荷瘤动物死亡6只,各组存活率间的差异有统计学意义($P<0.05$)。统计分析显示:5组荷瘤动物由于骨髓造血功能得到有效保护,死亡率明显下降。

表2 4T1乳腺癌小鼠化疗过程中各组肿瘤质量的变化($mg, \bar{x} \pm s$)

组别	化疗前	1周	2周	3周	停后2周
1组	24.99±4.57	278.84±30.18[a]	648.06±49.54[a]	1 712.92±113.62[a]	2 857.67±160.12[a]
2组	24.78±2.82	145.32±22.20[a]	219.18±32.73[a]	313.80±23.55[a]	523.19±37.92[a]
3组	25.30±1.92	58.07±14.21[a]	90.58±7.57[a]	–	–
4组	24.04±3.10	65.04±15.01[a]	85.31±9.19[a]	–	–
5组	23.88±3.57	53.19±7.60	80.68±8.83	108.12±22.42	104.86±24.10

a:$P<0.05$,与5组比较

3 讨论

针对化疗中出现的肿瘤细胞耐药和骨髓抑制这两大严重影响化疗疗效的难题进行了大量的深入研究。正常的骨髓造血干祖细胞因表达hMDR1基因的水平极低而对化疗药物异常敏感,通过病毒载体将外源性hMDR1基因导入造血干祖细胞中再移植到肿瘤患者体内,使患者骨髓能耐受大剂量化疗而不发生骨髓抑制,同时通过适度大剂量、短间歇的化疗来提高恶性肿瘤的治疗效果,延长患者的生存时间。

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤,而且发病率目前有增高趋势,合理剂量表阿霉素的运用以及手术切除的成功与患者预后密切相关。含蒽环类的化疗方案是目前治疗乳腺癌公认的常用方案,随着这些药物的广泛应用,越来越多的患者出现对蒽环类药物的耐药问题。目前公认肿瘤细胞中hMDR1基因过度表达是造成肿瘤多药耐药最主要的原因,针对这一机制采用多种方法来抑制肿瘤细胞hMDR1基因的过度表达以达到逆转肿瘤耐药的目的[6-7],直接逆转肿瘤细胞耐药性的方法多种多样,但由于毒副作用太大或研究尚处于初始阶段而未应用于临床。同时,蒽环类药物对骨髓的抑制作用也限制了化疗的顺利进行,利用载体将外源性hMDR1基因导入骨髓造血细胞中并获得表达,使其对化疗药物的耐受性明显提高,化疗就能得以顺利实施,甚至还可以通过提高化疗剂量来有效杀灭肿瘤细胞,提高恶性肿瘤的治愈率。

本课题组经过十余年的研究,通过逆转录病毒将hMDR1基因转入骨髓造血干细胞,在肿瘤的动物模型中已取得了显著的疗效[8-9],但由于逆转录病毒在转染过程中将外源性基因整合到宿主基因组中可能产生的潜在的危险性,现采用安全性高的腺病毒作为载体将hMDR1基因转入骨髓造血干细胞,实现化疗中的骨髓保护。针对腺病毒载体对造血细胞的低转染率,可以通过病毒改造或修饰、超声微泡作用以及更换其他的载体等方法解决[10-12]。本实验通过TNF-α预处理小鼠单个核细胞以后,提高腺病毒对其的转染率[5,13],而采用^{60}Co-γ射线进行全身放射线照射腾空受体骨髓"龛位"及骨髓腔内注射(intra-bone marrow injection,IBMI)技术提高转染hMDR1基因的造血干/祖细胞归巢率,从而在动物模型中实现了超剂量化疗中对骨髓的保护,而在骨髓得到有效保护下的超剂量化疗有利于对乳腺癌细胞的杀灭,提高了乳腺癌的治愈率,相信本实验的成果能够对肿瘤的治疗提供一些新的思路。

参考文献:

[1] Raina V, Kunjahari M, Shukla N K, *et al*. Outcome of combined modality treatment including neoadjuvant chemotherapy of 128 cases of locally advanced breast cancer: data from a tertiary cancer center in northern India[J]. Indian J Cancer, 2011, 48(1): 80-85.

[2] Kaya A O, Coskun U, Buyukberber S, *et al*. Efficacy and toxicity of preoperative chemotherapy with docetaxel and epirubicin in locally advanced invasive breast cancer[J]. J BUON, 2010, 15(2): 248-254.

[3] 刘伟, 罗庆, 金先庆. 人多药耐药基因1(mdr1)的克隆及重组腺病毒制备[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(2): 113-116, 120.

[4] 齐晓伟, 姜军, 杨新华, 等. 乳腺癌循环肿瘤细胞与原发肿瘤临床病理特征关系的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(9): 850-853.

[5] 刘伟, 罗庆, 金先庆. TNF-α增强多药耐药基因1对骨髓保护的研究[J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(3): 138-141.

[6] Donmez Y, Gunduz U. Reversal of multidrug resistance by small interfering RNA (siRNA) in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2011, 65(2): 85-89.

[7] Kim H G, Hien T T, Han E H, *et al*. Metformin inhibits P-glycoprotein expression *via* the NF-κB pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation[J]. Br J Pharmacol, 2011, 162(5): 1096-1108.

[8] 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 Pharamacol, 2006, 58(1): 40-49.

[9] 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.

[10] Drouin M, Cayer M P, Jung D. Adenovirus 5 and chimeric adenovirus 5/F35 employ distinct B-lymphocyte intracellular trafficking routes that are independent of their cognate cell surface receptor[J]. Virology, 2010, 401(2): 305-313.

[11] 王佚, 郭振华, 金先庆, 等. 超声微泡促腺病毒载体转染MDR1基因效率的体外实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 67-70.

[12] 陈慧玲, 白海. 慢病毒载体介导Mdr1基因转染人骨髓间充质干细胞的实验研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(3): 690-694.

[13] Moldenhauer A, Shieh J H, Pruss A, *et al*. Tumor Necrosis Factor Alpha enhances the adenoviral transduction of CD34 + hematopoietic progenitor cells[J]. Stem Cells, 2004, 22(3): 283-291.

(**收稿**:2011-01-25;**修回**:2011-03-25)

(编辑 王 红)