维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)05-0645-04

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

王 佚[1]，金先庆[1]，王 荞[2]，罗 庆[1]，罗小辑[1]

（重庆医科大学附属儿童医院 1.普外科；2.超声科，重庆 400014）

【摘 要】目的：mdr1 基因转染的骨髓造血细胞自体移植后，观察 VX2 肝癌兔超剂量化疗中 mdr1 基因的骨髓保护及肿瘤治疗作用；并观测超剂量化疗对心脏的毒副作用。方法：mdr1 基因转入兔骨髓单个核细胞并自体移植；阿霉素化疗，观测外周血白细胞数、VX2 肝肿瘤的生长及转移、心脏结构和功能变化，评价 mdr1 基因对受体骨髓的保护作用、超剂量化疗对肿瘤的治疗作用及对心脏的毒副作用。结果：通过转染的自体骨髓移植将 mdr1 基因导入受体骨髓；超剂量阿霉素化疗后，实验组荷瘤兔外周血白细胞可维持在（4.26 ± 1.03）× 10⁹/L，肿瘤能被有效杀灭，荷瘤动物的生存时间明显高于对照组（$P<0.05$）；同时也观察到超剂量化疗对心脏的严重损害。结论：mdr1 基因能明显提高骨髓对化疗的耐受性；超剂量化疗能有效杀灭肿瘤，同时也对非造血系统脏器造成严重损害。

【关键词】mdr1 基因；骨髓造血细胞；化疗；肝癌

【中国图书分类法分类号】R394 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-07

Research on the effects and side effects of the over-dose chemotherapy to VX2 hepatocarcinoma rabbits with mdr1 gene transferring bone marrow transplantation

WANG Yi, et al

(*Department of General Surgery and Ultrasound, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* In the study, multidrug resistance gene 1 (mdr1) was transferred into the bone marrow mononuclear cells which were autotransplanted into rabbits with VX2 hepatocarcinoma. In chemotherapy experiment with adriamycin, the bone marrow protection of mdr1 gene, curative effects and side effects to heart of over dosage chemotherapy were observed. *Methods:* The bone marrow mononuclear cells transferred with mdr1 gene were autotransplanted into rabbits with VX2 hepatocarcinoma. After chemotherapy with adriamycin, the peripheral white blood cells count, the growth and metastasis of VX2 hepatocarcinoma and cardiac function were detected. Meanwhile, the bone marrow protection of mdr1 gene, the curative effects to VX2 hepatocarcinoma and lesions to heart of over-dosage chemotherapy were evaluated. *Results:* The mdr1 gene was implanted into the bone marrow after the mdr1-transferred bone marrow mononuclear cells had been autotransplanted into rabbits with VX2 hepatocarcinoma. After over-dose chemotherapy with adriamycin, the rabbits in mdr1-transferring group could be survival after treated with 3-fold dosage chemotherapy, and the white blood cell count in peripheral blood was (4.26 ± 1.03) × 10⁹/L. Meanwhile, the tumor cells were killed effectively, and the survival time were improved compare to that of control group ($P<0.05$). However, the severe lesions to heart caused by over dosage chemotherapy were observed. *Conclusions:* The bone marrow of the receptor could be protected from toxic effects of chemotherapy after transplantation of bone marrow mononuclear cells transferred with mdr1 gene, and the malignant tumor cells could be killed effectively and severe lesions to non-hematopoietic systems were caused by over dosage chemotherapy.

【Key words】Mdr1 gene; Hematopoietic cells; Chemotherapy; Hepatocarcinoma

肿瘤细胞耐药和骨髓抑制是严重影响化疗疗效的两大难题，二者均与多药耐药 mdr1 基因的表达有关。本研究通过病毒载体将外源性 mdr1 基因转入 VX2 肝癌兔骨髓造血细胞后移植，提高骨髓对化疗的耐受性；同时观察超剂量化疗对肿瘤的治疗效果及对非造血系统脏器的损害。

1 材料和方法

1.1 实验材料

新西兰大白兔 16 只，体重 1.5~2.0kg，雌雄各半，由重庆医科大学实验动物中心提供；兔 VX2 瘤株由日本京都 Fun-

作者介绍：王 佚(1975-)，男，博士，主治医师，主要研究方向：肿瘤多药耐药的研究。

基金项目：国家自然科学基金重点项目(30330590)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

abshi Farm 公司提供；超声仪为美国 Acuson Sequoia 512 型彩色多普勒超声诊断仪。

1.2 实验方法

1.2.1 建立兔 VX2 肝癌模型 将 VX2 瘤株种植在兔腹部皮下，2 周后制成荷瘤种兔；手术剥离腹部皮下包块，取瘤块边缘生长旺盛的鱼肉样组织制成 1mm³ 瘤块并种植到兔肝脏右中央叶，制成兔 VX2 肝癌模型。

1.2.2 实验分组 将荷瘤兔随机分为两组，每组 8 只；对照组采用常规剂量化疗；实验组兔行 mdr1 基因转染骨髓单个核细胞自体移植后超剂量化疗。

1.2.3 mdr1 基因转染兔骨髓单个核细胞的自体移植 肿瘤模型建立后第 3 天，骨穿采集荷瘤兔骨髓，密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞；浓缩病毒上清转染法将外源性 mdr1 基因转入骨髓单个核细胞，PCR 法和柔红霉素泵出实验证实转染的 mdr1 基因具有药物外排泵功能，免疫组化法测得基因转染率为 35%[1]。大剂量环磷酰胺（150mg/kg）化疗预处理受体骨髓后，将转染的细胞间隔 24h 分两次自体回输，每次回输的细胞数为 10^6~10^7 个 /kg。

1.2.4 阿霉素化疗实验 常规剂量组采用 2.5mg/kg 剂量化疗，每周 1 次，连续 3 周；超剂量组按常规剂量的 1.5 倍、2 倍、3 倍剂量连续化疗 3 周。

1.2.5 肿瘤治疗效果评价

1.2.5.1 肝脏原位肿瘤及转移灶监测[2] 每周超声检查 1 次，观测肝脏肿瘤的大小、回声，计算肿瘤体积（$V=abc\times\pi/6$ a、b、c 分别为肿瘤的左右径、上下径和前后径）；同时采用超声检查监测肿瘤在肾脏、肝脏、腹腔淋巴结等组织器官内有无转移；荷瘤动物死亡后，解剖结合病理切片检查确定肿瘤转移部位。

1.2.5.2 病理学检查 动物死亡后取脏器常规固定包埋、切片染色，显微镜观察。

1.2.5.3 统计荷瘤动物存活时间 计算动物荷瘤开始到死亡的时间。

1.2.6 超剂量化疗的毒副作用监测

1.2.6.1 外周血白细胞计数 每次化疗结束 1 周后，采集外周血计数白细胞。

1.2.6.2 超声心动图监测心功能 心电监视下二维超声心动图常规检查，于胸骨旁左室长轴切面将取样线置于二尖瓣腱索水平，应用 M 型超声图像，每例测量 3~5 个心动周期，测量左室舒张末期内径（LVd）、室间隔厚度（IVs）和左心室心肌重量（LVmass/BSA）。心脏左室收缩功能测值指标为左室射血分数（LVEF%）、左室短轴缩短分数（LVFS%）。

2 结 果

2.1 化疗后 VX2 肝癌的体积变化

如表 1 所示，化疗前两组动物肝脏肿瘤的体积大小无显著性差异（$P>0.05$），化疗过程中及化疗停止后 2 周，两组肿瘤的体积大小有显著性差异（$P<0.05$）。说明：常规剂量化疗不能消灭肿瘤细胞，肿瘤逐渐增大；超剂量化疗可有效杀灭肿瘤细胞，使肿瘤缩小甚至完全消失。

2.2 化疗后 VX2 肝癌原位残存、远处转移及生存时间分析

表 1 化疗前后 VX2 肝癌的体积（cm^3）

	化疗前	1.0/1.5**	1.0/2.0	1.0/3.0	停后 2 周
常规剂量组	0.22 ± 0.09	0.17 ± 0.03	0.21 ± 0.08	0.31 ± 0.09	0.81 ± 0.13
超剂量组	0.23 ± 0.10	0.14 ± 0.10	0.10 ± 0.06	0.02 ± 0.01	0.004 ± 0.002
P 值	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

*统计分析采用 *t* 检验，$\alpha=0.05$；**1.0/1.5 表示常规剂量组化疗剂量为 1.0 倍（2.5mg/kg），超剂量组化疗剂量为 1.5 倍（3.75mg/kg）

如表 2 所示，经 Fisher 精确概率检验法分析，两组动物 VX2 肝癌原位残存率及肝内、肺和肾转移率有显著性差异（$P<0.05$），说明超剂量化疗能有效杀灭原位肿瘤并防止肿瘤向邻近和远处器官转移（注：兔 VX2 肿瘤是 shope 病毒诱发的乳头状瘤，种植到肝脏后能生长为巨块型实体瘤，与人巨块型肝癌相似；但其并非继发于肝硬化后的肝细胞癌，故在生物学特性上与人肝癌不完全相同，其最易发生肺转移，其次是肝内及肾转移）。经 *t* 检验，两组荷瘤动物存活时间有显著性差异（$P<0.05$）；说明常规剂量化疗不能治愈肿瘤，在转染 mdr1 基因有效保护骨髓造血功能的前提下进行超剂量化疗，才能同时兼顾肿瘤杀灭和骨髓保护两方面，使荷瘤动物的生存时间明显延长。

2.3 化疗后荷瘤动物外周血白细胞计数

如表 3 所示，通过 *t* 检验，化疗前及第一次化疗后两组动物外周血白细胞数无显著性差异（$P>0.05$）。经过第二、三次化疗，白细胞数明显下降，两组间有显著性差异（$P<0.05$），说明定植于受体骨髓中的外源性 mdr1 基因功能性表达，增强了骨髓对化疗的耐受性。化疗停止 2 周后，两组外周血白细胞数有了明显回升，超剂量组较对照组白细胞数恢复的幅度更大，两者差异有显著性（$P<0.05$），说明 mdr1 基因转入了原始造血干祖细胞中并使其不被超剂量

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 荷瘤兔 VX2 肝癌残存率、转移率及存活时间表

	原位残存	肝内转移	肺转移	肾转移	存活时间（天）
常规剂量组	100%（8/8）	25%（2/8）	87.5%（7/8）	62.5%（5/8）	49.33 ± 10.11
超剂量组	50%（4/8）	0%（0/8）	12.5%（1/8）	0%（0/8）	97.00 ± 46.75
P 值	3.83×10^{-3}	6.61×10^{-7}	1.61×10^{-5}	2.16×10^{-3}	0.0001

统计分析采用 Fisher 精确概率检验和 *t* 检验，$\alpha = 0.05$

表 3 VX2 肝癌兔化疗过程中外周血白细胞数（$\times 10^9$）

	化疗前	1.0/1.5**	1.0/2.0	1.0/3.0	停后 2 周
常规剂量组	11.44 ± 1.71	7.80 ± 2.33	3.90 ± 0.58	3.42 ± 1.61	4.75 ± 1.19
超剂量组	11.74 ± 1.06	7.69 ± 1.83	5.95 ± 0.77	4.26 ± 1.03	6.06 ± 1.32
P 值	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

*统计分析采用 *t* 检验，$\alpha = 0.05$；**1.0/1.5 表示常规剂量组化疗剂量为 1.0 倍（2.5mg/kg），超剂量组化疗剂量为 1.5 倍（3.75mg/kg）

化疗杀灭，化疗停止后能迅速恢复造血。

2.4 超剂量阿霉素化疗对心脏结构和功能的影响

统计分析采用 *t* 检验。如表 4 所示，化疗前两组动物各项心功能指标无显著性差异（$P > 0.05$）。前两次化疗结束后，两组动物 IVS 和 LV vol 有显著性差异（$P < 0.05$），而 LVmass/BSA、LVEF% 和 LVFS% 无显著性差异（$P > 0.05$），提示超剂量化疗在初期可能使心肌细胞肿胀，使室间隔厚度增加，左室舒张末期容积减小，但对心脏收缩功能和心肌肥厚的影响不比常规剂量化疗严重。第三次化疗结束后，两组动物所有心功能指标均有显著性差异（$P < 0.05$），提示超剂量化疗对心肌结构及舒缩功能的损害比常规剂量化疗更严重。化疗结束 2 周后，两组动物所有心功能指标均有显著性差异（$P < 0.05$），与化疗时比较，各指标均有所好转，但超剂量化疗造成的心肌肥厚和收缩功能下降仍比常规剂量化疗组严重；病理检查发现，超剂量组即使在化疗停止数月后，动物仍可出现心包积液、左心室扩张、左心衰竭并诱发急性肺水肿导致动物死亡；而对照组动物全部死于晚期肿瘤的扩散。

3 讨 论

表 4 常规剂量组/超剂量组化疗过程中心功能指标表

		IVS（cm）	LVmass/BSA（g/m^2）	LV vol（ml）	LVEF%	LVFS%
常规剂量组	化疗前	0.21 ± 0.01	16.7 ± 0.89	5.40 ± 0.05	76.93 ± 3.18	41.7 ± 2.78
	第 1 次化疗	0.24 ± 0.03	35.3 ± 3.74	5.20 ± 2.42	57.33 ± 5.89	27.83 ± 3.73
	第 2 次化疗	0.38 ± 0.15	46.65 ± 20.72	5.00 ± 0.28	57.45 ± 12.94	27.8 ± 8.20
	第 3 次化疗	0.37 ± 0.13	28.6 ± 2.35	4.60 ± 1.13	53.6 ± 4.53	24.75 ± 2.47
	停后 2 周	0.34 ± 0.04	42.6 ± 3.65	3.80 ± 0.21	54.9 ± 3.21	25.3 ± 2.14
超剂量组	化疗前	0.22 ± 0.04	17.5 ± 1.02	5.55 ± 0.21	72.60 ± 12.3	39.4 ± 2.05
	1.5 倍化疗	0.37 ± 0.08	34.45 ± 1.77	4.10 ± 0.68	52.2 ± 9.05	24.15 ± 4.88
	2.0 倍化疗	0.51 ± 0.05	40.0 ± 0.83	1.40 ± 0.14	49.8 ± 3.84	22.1 ± 5.11
	3.0 倍化疗	0.54 ± 0.07	44.9 ± 1.75	2.50 ± 0.08	43.5 ± 5.95	18.7 ± 3.27
	停后 2 周	0.49 ± 0.09	52.7 ± 1.32	4.54 ± 0.11	46.6 ± 2.22	20.8 ± 3.04

随着基因工程及分子生物学技术逐渐应用于临床，采用基因疗法来治疗恶性肿瘤已逐渐成为现实。研究发现：肿瘤细胞因过度表达 mdr1 基因而对化疗药物产生多药耐药性[3]，骨髓造血细胞因表达 mdr1 基因不足而对化疗药物异常敏感导致骨髓抑制[4]，两者直接或间接造成临床化疗的失败。针对化疗中肿瘤细胞耐药和骨髓抑制这两大严重影响疗效的难题，设想通过病毒载体将外源性 mdr1 基因导入造血细胞中再移植到肿瘤患者体内，使受体骨髓能耐受大剂量化疗而不发生骨髓抑制，同时通过大剂量、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。

2002 年 Alexander[5]等将 mdr1 基因导入小鼠骨髓造血细胞并移植，紫杉醇化疗后检测发现，转染

维普资讯 http://www.cqvip.com

组小鼠外周血白细胞数几乎是未转染组小鼠的 5 倍;在化疗的第 2 周,转染组小鼠外周血白细胞数不但未下降,还呈现上升的趋势,提示定植的转染 mdr1 基因的耐药造血干细胞在发挥作用;同时还发现,转染组小鼠外周血红细胞数、血小板数、红细胞压积及血红蛋白量等指标均明显高于未转染组;化疗过程中,转染组小鼠体重下降幅度较轻,生存状态较好,说明转染 mdr1 基因的造血细胞保护骨髓造血的同时,也明显改善受体在化疗中的生存状态。本研究发现超剂量化疗组动物外周血白细胞数明显高于对照组,显示了化疗中 mdr1 基因的保护作用;化疗停止后 2 周外周血白细胞数较快恢复,表明 mdr1 基因已转移到原始造血干祖细胞中使其对化疗的耐受性增强,化疗结束后能迅速恢复造血功能。所以 mdr1 基因转染骨髓造血细胞移植能有效保护化疗中骨髓造血功能,避免严重骨髓抑制的发生,使超剂量化疗成为可能。

Skipper[6]等通过动物肿瘤模型实验证实,当化疗剂量减小 20%会导致治愈率下降 50%。在生长指数较高的人类肿瘤,剂量增加 2 倍,常常杀灭的肿瘤细胞数就增加 10 倍。目前已建立临床和实验恶性肿瘤的剂量—反应模型,显示随着药物剂量的增加,对肿瘤细胞的杀伤呈对数生长,临床疗效与化疗药物剂量呈正相关关系。因此,改进治疗方案中的药物组成和剂量是当务之急。转染 mdr1 基因的自体造血细胞移植为达到此目的提供了条件。在本研究中,实验组在完成 3 次超剂量化疗后,原发肿瘤明显缩小,部分荷瘤兔肝脏肿瘤连高分辨率的超声检查也难以检测到;常规剂量化疗后,对照组动物体内肿瘤生长虽减慢,但肿瘤细胞仍在增殖,肿瘤继续增大。综合病理及超声检查结果,实验组荷瘤动物中有 50%未发现种植部位肿瘤残存,且仅有 1 例动物(12.5%)肺内发现转移灶;而对照组动物经过 3 次常规剂量化疗后,全有种植部位肿瘤残存,并向肝内、肺和肾脏广泛转移;说明超剂量化疗能快速有效的杀灭肿瘤,并有效防止肿瘤细胞向局部蔓延和远处转移。

定植于受体骨髓的 mdr1 基因能防止超剂量化疗所致的骨髓毒性,但不能防止其对其它脏器的损害。心脏毒性是 ADM 最严重的毒性反应,ADM 诱导产生的大量自由基、超氧化物和过氧化脂质对细胞及细胞核起破坏作用,可致心肌细胞变性坏死、心肌肥厚。超剂量阿霉素化疗后,实验组动物肝脏肿瘤被有效杀灭,而骨髓的造血功能也能维持,但最终大部分仍死亡。超声及病理检查发现:超剂量化疗对实验组动物心功能造成严重损害,出现心肌肥厚及舒缩功能的明显下降;即使化疗停止数月后,实验组动物仍出现心室扩张和心力衰竭,并成为其死亡的主要原因。所以,我们在重视化疗对骨髓的毒副作用的同时,也不能忽视其对非造血系统脏器结构和功能的损伤;不能因为有效保护了骨髓的造血功能,为了达到快速、彻底治疗肿瘤的效果而盲目加大化疗的剂量,应选择“最适化疗超剂量”作为化疗的剂量;同时应根据具体每种化疗药物的特殊毒副作用,采取相应的处理办法来有效防止超剂量化疗对非造血系统的损伤。这样,既能维持骨髓和非造血系统脏器的基本功能,保证生命体征的平稳,又能更有效的杀灭肿瘤,使恶性肿瘤的治愈率提高,肿瘤患者的生存状态得到改善。本研究所探讨的方法如成功应用于临床,对恶性肿瘤尤其是实体瘤的治疗将具有重大的意义。

(通讯作者:金先庆,男,教授,主任医师,研究方向:肿瘤多药耐药的研究)

参 考 文 献

[1] 王 佚,金先庆,王 珊. 多药耐药 mdr1 基因转染兔骨髓造血细胞及其表达与功能的研究[J].重庆医科大学学报, 2003;28(4):409-413.

[2] 王 荞,王 佚,王少春,等.兔 VX2 肝癌模型的建立及超声影像监测的研究[J].重庆医科大学学报,2003;28(5):585-587.

[3] Licht T, Gottesman MM, Pastan I, et al. Transfer of the MDR1 (multidrug resistance) gene: protection of hematopoietic cells from cytotoxic chemotherapy, and selection of transduced cells in vivo [J].Cytokines Mol Ther, 1995;1(1):11-20.

[4] D'Hondt V, Symann M, Machiels JP.Chemoprotection and selection by chemotherapy of multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) transduced cells[J].Curr Gene Ther, 2001;1(4):359-366.

[5] Alexander C, Stefan P, Wolfram O, et al.Genetic protection of repopulating hematopoirtic cells with an improved mdr1-retrovirus allows administration of intensified chemotherapy following stem cell transplantation in mice[J]. Int J Cancer, 2002;98:785-792.

[6] Skipper H. Data and analysis having to do with the influence of dose intensity and duration of treatment on lethal taxicity and therapeutic response of exoerimental neoplasms[J]. Birmingham, AL, *Southern Research* Institute, Booklets, 13, 1986, and 2-13, 1987.