维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)03－0279－05

荷瘤小鼠多药耐药(MDR1)基因转染后 P－gp 体内表达的研究

郭春宝，金先庆，康　权，安淑华，王　珊

(重庆医科大学儿科学院普外科，重庆　400014)

【摘　要】目的：探讨恶性肿瘤 MDR1 基因治疗过程中，MDR1 基因在体内的表达。方法：骨髓造血细胞转染 MDR1 基因后，程序性移植入预先照射亚致死剂量^{60}Co－γ 射线的荷瘤小鼠，取骨髓造血细胞、肿瘤实体做 P－糖蛋白免疫组化并做 RT－PCR 以观察 MDR1 基因的表达情况。结果：各剂量组 MDR1 基因转染后随时间骨髓造血细胞 P－糖蛋白表达逐渐增加，各剂量组之间无明显差异。P－糖蛋白表达化疗剂量较大组明显高于化疗剂量较小组。结论：MDR1 基因转染在骨髓造血细胞有较高表达，对肿瘤实体、肝脏、肾脏 P－糖蛋白表达无影响。

【关键词】基因治疗；多药耐药；阿霉素；P－糖蛋白；骨髓移植

【中国图书分类法分类号】R73　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－03－13

The expression of P－gp during the MDR1 gene transferring into the hematopoietic cells of the Balb/c mouse bone marrow

GUO Chunbao, et al

(*Department of Surgery, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: The study was to improve the protection effect of the bone marrow during the chemotherapy of earlier hepatocarcinoma Balb/C mice, to observe the expression of P－gp in tumor tissues and important organs and to examine the influence of MDR1 gene on Balb/C mouse. *Methods*: MDR1 gene was transferred into hematopoietic cells of murine bone marrow by the mediation of retrovirus vecter and transplanted into the Balb/c mouse with hepatocarcinoma exposure with ^{60}Co－γ ray in advance. The function and the expression of MDR1 gene in hematopoietic cells, and tumor tissue was detected by RT－PCR method and IC method in vitro. *Results*: There was no P－gp expression in the two control groups, but that of the different dose experiment group was higher than that of control groups obviously ($P<0.01$). The P－gp expression of every experiment groups rose following the high－dose chemotherapy time. The P－gp expression was higher than the following chemotherapy dose of every group. *Conclusion*: There were higher P－gp expression in hematopoietic cells with MDR1 gene transplanted into the body of the bone in the Balb/C mice with hepatocarcinoma.

【Key words】Gene therapy; Multidrug resistance; Doxorubicin; P－gp; Marrow transplant

肿瘤化疗中肿瘤细胞耐药和骨髓的抑制，往往造成肿瘤临床治疗的失败。MDR1 基因及其编码产生的 P－糖蛋白(P－gp)是导致多药耐药的主要原因，而正常骨髓造血干祖细胞 P－gp 的表达却很低甚至不表达，通过将 MDR1 基因导入骨髓造血细胞之中，使其表达 P－gp，对抗化疗药物对骨髓细胞的毒性，从而提高化疗的剂量，以达到杀灭和抑制肿瘤的作用。1995 年 Licht T 等[1]探讨了将 MDR1 基因转入体内的可能性。

但是，人们关注 MDR1 基因转染入体内的过程和方法比较多，MDR1 进入体内的代谢情况，及对各系统器官的影响研究的不多。2001 年[2]Lee CG 等研究了病毒整合体进入体内的安全性，发现经改造的逆转录病毒进入体内是安全可靠的，且 MDR1 基因表达效果显著。

本文探讨了经骨髓造血干祖细胞携带外源 MDR1 基因进入体内后的分布格局及表达情况。研究外源 MDR1 基因在各重要脏器的分布及表达，动态观察其在大剂量化疗诱导下的变化。通过研究外源 MDR1 基因对整个机体的影响，探讨 MDR1 基因

作者介绍：郭春宝(1973－　)，男，博士，
主要研究方向：小儿肿瘤。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(No. 30070781)

维普资讯 http://www.cqvip.com

治疗的安全性和可行性,为 MDR1 基因治疗早日应用于临床打下基础。

实验证明,骨髓造血细胞 P-gp 表达极低,并对化疗药物极为敏感易产生化疗中的骨髓抑制。因此,如将耐药基因 MDR1 导入骨髓造血细胞之中,使之产生相对高表达的 P-gp,即能增强其化疗耐受作用。基因转入体内的安全性也已充分证明[1]。以上实验结果为将 MDR1 基因应用于恶性肿瘤的临床治疗提供了必需的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

Balb/c 近交系小鼠共 60 只,6~8 周龄,雌性,体重 20~25g,由重庆医科大学动物实验中心提供。将实验鼠随机分为 5 组,分别为空白对照组、阴性对照组和阿霉素 1 倍剂量组、阿霉素 2 倍剂量组、阿霉素 4 倍剂量组、及逐渐加量组,其中 1 倍剂量为阿霉素 5mg/kg/周,逐渐加量组按(1-2-4-6-8-8 倍)程序加量,空白对照组和阴性对照组用药为 1 倍剂量,每组 10 只。空白对照组为未进行骨髓移植的实验组、阴性对照组为骨髓移植中输入未转染 MDR1 基因的小鼠骨髓单个核细胞组,各剂量组为骨髓移植中输入转染 MDR1 基因的单个核细胞组。

1.2 浓缩病毒上清液制备

PA317-HaMDR1/A(产病毒包装细胞)由中科院天津血研所构建,27℃,5% CO_2,10% 小牛血清的 IMDM 培养于 CO_2 孵箱内。2~3 天后收集上清液,40,000r/min,2h 高速离心制成浓缩病毒上清液[3]。

1.3 小鼠骨髓单个核细胞悬液制备

无菌条件下取小鼠双下肢股骨,用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离出骨髓单个核细胞,按每孔含细胞 5×10^5 接种于 24 孔板,制备小鼠骨髓单个核细胞悬液。

1.4 浓缩病毒上清法转染小鼠骨髓单个核细胞

表 1 病毒上清转染小鼠骨髓单核细胞体系组成

加入物名称	工作液浓度	加入量	终浓度
细胞			5×10^5/ml
谷氨酰胺	3%	10μl	3×10^{-5}g/l
2-巯基乙醇	2×10^{-2}M	5μl	10^{-4}M
促红细胞生成素	2.5×10^3U/ml	20μl	50U/μl
10% 牛血清白蛋白	10%	0.1ml	
polyberene	6666μg/ml	30μl	200μg/ml
白细胞介素 3	2×10^5U/ml	5μl	1000U/ml
白细胞介素 6	2×10^6U/ml	10μl	20000U/ml
重组鼠干细胞生长因子	2000ng/ml	5μl	10μg/ml

取上述制备的小鼠骨髓单个核细胞,采用 1ml 转染体系,每孔(1ml)(4 孔/只)转染体系含表 1 所示成分:

37℃,5% CO_2 湿性孵育。隔日半量换液,每孔吸出上层液体 400μl,加入以上因子等各半量,不足量用 20% FBS 的 IMDM 补足至 1ml。共 2 次。第 5 天收集待检细胞免疫组化法进行小鼠骨髓造血细胞染色,测定 P-gp 表达[3],同时回输入小鼠体内。

1.5 肿瘤模型的制备

将培养的 H22 腹水型肝癌细胞调整浓度注入 Balb/c 小鼠腹腔内,待 1~2 周小鼠腹水形成后,取腹水稀释并注射入 Balb/c 小鼠腋部皮下,10^5 肝癌细胞/只,1 天后进行 $^{60}Co-\gamma$ 射线照射。第二天回输骨髓造血细胞,隔日进行化疗时,已长成 0.2cm 见方的结节,大小相近,成功率 100%。

1.6 骨髓程序性移植预处理

对照及实验组小鼠均接受亚致死剂量 $^{60}Co-\gamma$ 射线照射,照射剂量 1.0Gy。24h 后进行骨髓程序性移植。

1.7 骨髓程序性移植

取培养 5 日的转染 MDR1 基因的骨髓单个核细胞经尾静脉回输实验组小鼠。照射后 48h,即第一次回输后 24h 进行第二次回输,方法同第一次,共输注同种纯系小鼠骨髓单个核细胞 2×10^6 个/只[4]。

1.8 化疗

各实验组在小鼠骨髓移植后 3 天起采用腹腔注射阿霉素进行化疗,化疗每间隔 1 周进行 1 次[6]。第六周时,每组处死动物五只,取肿瘤组织、肝、肾各一半放入 10% 的甲醛保存,石蜡包埋,5μm 连续切片。做 HE 染色及免疫组织化学,计算阳性表达率。另一半组织提取 RNA 做 MDR1 基因的 RT-PCR,琼脂糖凝胶电泳,观察 MDR1 基因的表达[6]。p-8p(157bp):正义 5′-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3′,反义 5′-GTT CAA ACT TCT GCT CCT CA-3′;β-actin(612bp):正义 5′-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AGG-3′,反义 5′-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3′。

1.9 统计

应用 SPSS10.0 for windows 统计软件分析,检测数据以均数±标准差(Mean±SD)表示,并经正态检验和方差齐性检验。计数资料采用行×列表资料 χ^2 检验,计量资料组间比较采用 t 检验、单因素方差分析,指标间关系用直线相关性分析。$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 大剂量化疗对小鼠体内骨髓造血细胞 MDR1 基因表达的影响

化疗第六周时各组小鼠骨髓造血细胞 MDR1 基因表达:

2.1.1 经免疫组织化学染色,计算 P-gp 表达阳性率,显示:空白对照组及阴性对照组 P-gp 表达

维普资讯 http://www.cqvip.com

为阴性;各化疗剂量组均有 P-gp 的阳性表达,经单因素方差分析差异无显著性意义(表 2)。(图 1)

2.1.2 提取骨髓造血细胞 RNA 做 RT-PCR,琼脂糖凝胶电泳显示:转染 MDR1 基因各组有一片段大小约为 157 的清晰条带,使用核酸定量扫描仪,molecular analysist 分析软件,volume analysis 方法,用 MDR1 目的片段同内参 β-actin 的 volume(total counts/area)比值见表 2,行×列表资料 χ^2 检验显示差异无显著性意义;而空白对照组及阴性对照组无此特异条带。(图 2)

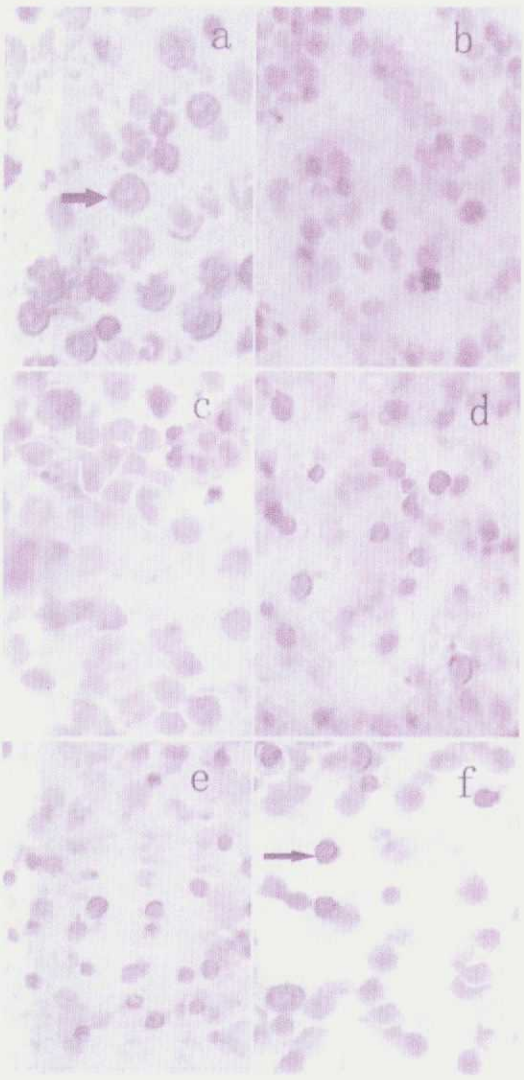


图 1 化疗第六周时各组小鼠骨髓造血细胞 P-gp 阳性表达(×40)

a.体外培养骨髓造血细胞 MDR1 基因转染五天 b.空白对照组 c.阴性对照组 d.1X 组 e.2X 组 f.4X 组

2.2 逐渐加量组小鼠各周骨髓造血细胞 MDR1 基因表达

2.2.1 经免疫组织化学染色,计算 P-gp 表达阳性率,计算方法同上,每周均有 P-gp 的阳性表达,经单因素方差分析差异有显著性意义(表 3)。

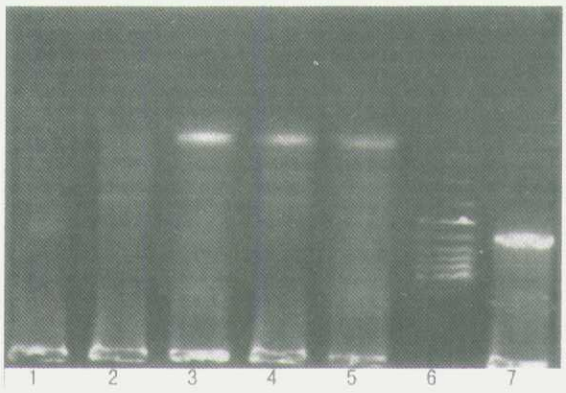


图 2 化疗第六周时各组小鼠骨髓造血细胞 MDR1mRNA 表达

Fig3: expression of MDR1mRNA of every groups after hematopoietic cells were transplanted in six weeks Line1 negative control group Line2 blank control group Line 3 4X group(157bp ladder) Line4 2X group(157bp ladder) Line5 1X group (157bp ladder) Line 6 100bp ladder marker Line7 β-actin

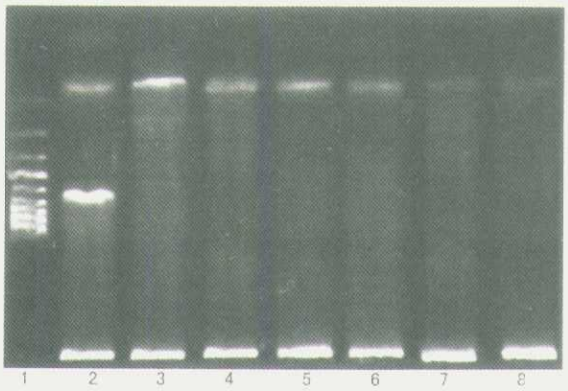


图 3 各周逐渐加量组小鼠骨髓造血细胞 MDR1mRNA 表达

Fign4:expression of MDR1mRNA of every weeks of 1-2-4-6-8-8X groups after hematopoietic cells were transplanted Line1 100bp ladder marker Line2 β-actin Line3 the sixth week(157bp ladder) Line4 the fifth week(157bp ladder) Line5 the forth week(157bp ladder) Line6 the third week (157bp ladder) Line7 the second week(157bp ladder) Line8 the first week(157bp ladder)

2.2.2 提取骨髓造血细胞 RNA 做 RT-PCR,琼脂糖凝胶电泳显示:转染 MDR1 基因各组有一片段大小约为 157 的清晰条带,使用核酸定量扫描仪,molecular analysist 分析软件,volume analysis 方法,用 MDR1 目的片段同内参 β-actin 的 volume(total

维普资讯 http://www.cqvip.com

counts/area)比值见表 3,行×列表资料 χ^2 检验显示有统计学差异(表 3)。

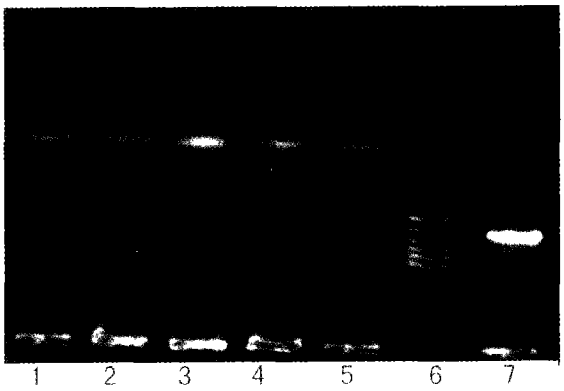


图 4 化疗第六周时各组小鼠肿瘤组织 MDR1mRNA 表达

Fig5:expression of MDR1mDNA of tumor tissue every groups after hematopoietic cells were transplanted in six weeks

Line1 negative control group Line2 blank control group Line3 4X group(157bp ladder) Line4 2X group(157bp ladder) Line5 1X group(157bp ladder) Line6 100bp ladder marker Line7 β-actin

2.3.1 化疗第 6 周时各组小鼠肿瘤组织 P-gp 表达 每鼠取 5 切片,经免疫组织化学染色,计算 P-gp 表达阳性率显示:空白对照组、阴性对照组及 1X 组 P-gp 表达无明显差异;2X、4X 组 P-gp 表达高于前三组(表 4);统计采用多个样本两两比较的秩和(Nemenyi 法)检验,空白对照组、阴性对照组及 1X 组 P-gp 表达无明显差异,2X、4X 组分别与前三组均有差异,2X、4X 组之间也有统计学显著差异($P>0.05$)。

2.3 转染 MDR1 基因以及大剂量化疗对肿瘤组织 P-gp 表达的影响

2.3.2 逐渐加量组小鼠各周肿瘤组织 MDR1mRNA 表达 逐渐加量组每周取肿瘤组织提取 RNA 进行 RT-PCR,扩增产物再进行琼脂糖凝胶电泳,观察条带大位置以及亮度,可见各周标本均有一片段大小约为 157 的清晰条带,使用核酸定量扫描仪,molecular analysist 分析软件,volume analysis 方法,用目的片段同内参 β-actin 的 volume(total counts/area)比值所得的相对值 MDR1mRNA/β-actin 随剂量加大其 MDR1 基因表达逐渐增强(图 4)

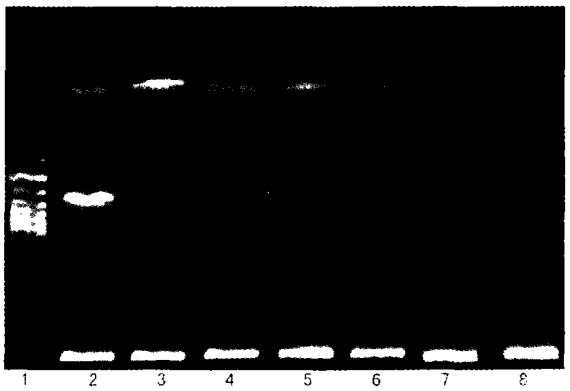


图 5 各周逐渐加量组小鼠肿瘤组织 MDR1mRNA 表达

Fig7:expression of MDR1mRNA of tumor tissue every weeks 1-2-4-6-8-8X groups after hematopoietic cells were transplanted

Line1 100bp ladder marker Line2 β-actin Line3 the sixth week(157bp ladder) Line4 the fifth week(157bp ladder) Line5 the forth week(157bp ladder) Line6 the third week(157bp ladder) Line7 the second week(157bp ladder) Line8 the fifst week(157bp ladder)

表 2 化疗第 6 周时各组小鼠骨髓造血细胞 P-gp 阳性表达

	空白对照组	阴性对照组	1X 组	2X 组	4X 组
阳性率	0	0	8.66±0.53	8.87±0.13	9.15±0.21★
积分指数			0.21±0.07	0.20±0.06	0.24±0.06
DNR 阳性率	98.39	97.31	75.43	72.14	76.39
MDR1mRNA/β-actin			0.296±0.014	0.290±0.019	0.306±0.014

(★:$P>0.01$ vs 1X group)

表 3 各周逐渐加量组小鼠骨髓造血细胞 P-gp 阳性表达

	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
阳性率(%)	8.76±0.65	8.71±0.70	9.06±0.71	9.95±0.82	10.98±1.30★	12.14±0.85★☆
积分指数	0.18±0.01	0.19±0.01	0.18±0.02	0.18±0.02	0.20±0.01★	0.21±0.03★
MDR1mRNA/β-actin	0.296	0.284	0.321	0.315	0.311	0.328

(★:$P<0.01$ vs 第 1 周、第 2 周、第 3 周、第 3 周;☆:$P<0.01$ vs 第 5 周)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 4 第六周时肿瘤组织 P-gp 的表达

mg	空白对照组	阴性对照组	1X 组	2X 组 ★	4X 组 ▲★▼
(-)	8	9	8	3	1
(+)	6	7	6	9	8
(++)	2	2	3	10	15
合计	16	18	17	22	24
阳性率(%)	64(16/25)	72(18/25)	68(17/25)	88(22/25)	96(24/25)

(▲: $P<0.01$ vs control; ★: vs 1X group; ▼ vs 2X group)

3 讨 论

MDR1 基因治疗在肿瘤的化疗中越来越受到人们的关注,MDR1 基因在肿瘤细胞耐药当中起重要作用,MDR1 基因编码产生的 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。MDR1 基因转染入体内后,可以在骨髓造血干细胞内有效表达,减弱化疗药物对骨髓的抑制,保护骨髓,维持外周血白细胞在较高水平,给提高化疗药物的剂量提供充足的空间。在保持外周血白细胞较高的空间内明显加大化疗剂量,以杀灭肿瘤细胞。2000 年,Motoji T[7]等研究了 MDR1 基因在治疗急性白血病中的作用。结果显示白血病细胞 P-gP 阳性的病人治愈率远远小于白血病细胞 P-gP 阴性的病人,所以应用对抗 P-gp 功能的药物可以提高抗肿瘤药物的敏感性。MDR1 基因治疗除了其较好的效果之外,其实施过程的安全及稳定性也引起人们的关注。MDR1 基因治疗的应用前景在很大程度上取决于其稳定性、安全性及高效表达[8]。本研究应用荷瘤小鼠模型通过 MDR1 基因治疗观察了转染 MDR1 基因后,骨髓、肿瘤、肝、肾等组织 P-gp 的表达,结果发现:MDR1 基因在骨髓干细胞有稳定而且高水平的表达,且只与 MDR1 基因的转染有关,与药物的化疗剂量关系无关,随时间其表达逐渐减弱。但是当化疗剂量较大时,P-gp 的阳性表达反而增高,分析其原因为大剂量的化疗药物杀死 P-gp 的表达较低的骨髓干细胞,P-gp 阳性表达的骨髓干细胞相对增多。MDR1 基因在肿瘤组织的表达与化疗药物的诱导有关,随时间逐渐增加,但与体内转染入 MDR1 基因无关。肝、肾在研究中 P-gp 的表达始终为阴性,说明 MDR1 基因的转染以及化疗药物均无作用。2000 年,Norgaard JM[8]等研究也证实了在体内 MDR1 基因表达的稳定性和高效表达。

MDR1 基因治疗是一种有效对抗化疗药物骨髓毒性作用的治疗方法,其临床应用的可行性除了在化疗中的好的辅助效果之外,还应该考虑实施的安全和稳定性,这一方面的问题正逐渐受到人们的重视,可以预见,采用 MDR1 基因保护骨髓细胞将具有良好的临床应用前景。

参 考 文 献

[1] Licht T, Aksentijevich I, Gottesman MM, et al. Efficient expression of functional human MDR1 gene in murine bone marrow after retroviral transduction of purified hematopoietic stem cells [J]. Blood, 1995; 86(1): 111-21.

[2] Lee CG, Vieira WD, Pastan I, et al. An episomally maintained mdr1 gene for gene therapy [J]. Hum Gene Ther, 2001; 12(8): 945-953.

[3] 王 珊,金先庆,杨纯正,等. MDR1 基因转染 K562 细胞株及人骨髓干祖细胞的研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2000; 21: 238-241.

[4] 曹履先,主编. 临床骨髓移植[M]. 北京:军事医学科学出版社, 1999: 32-41.

[5] Hosoda J, Unezaki S, Maruyama K, et al. Antitumor activity of doxorubicin encapsulated in poly(ethylene glycol)-coated liposomes[J]. Biol Pharm Bull, 1995; 18(9): 1234-1237.

[6] Fu J, Chen Z, Wang W. Efficient expression of multidrug resistance gene mdr1 in retroviral vector under control of an internal ribosome entry site [J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 1998; 19(12): 619-622.

[7] Motoji T, Motomura S, Wang YH. Multidrug resistance of acute leukemia and a strategy to overcome it [J]. Int J Hematol, 2000; 72(4): 418-424.

[8] Norgaard JM, Hokland P. Biology of multiple drug resistance in acute leukemia [J]. 16: Int J Hematol, 2000; 72(3): 290-297.