维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)04－0409－05

多药耐药 mdr－1 基因体外转染兔骨髓造血细胞及其表达与功能的研究

王 侠，金先庆，王 珊

(重庆医科大学儿科学院外科，重庆 400014)

【摘 要】目的：探讨浓缩病毒上清转染法在体外将多药耐药 mdr－1 基因转入兔骨髓造血细胞的条件及检测转染后 mdr－1 基因在兔骨髓造血细胞中的表达及功能。方法：用秋水仙碱(90ng/ml)筛选含人类全长 mdr－1 cDNA 的产病毒包装细胞 PA317－HaMDR1/A1 后进行细胞培养并制备浓缩病毒上清。采集新西兰大白兔骨髓并分离富含造血细胞的单个核细胞。骨髓造血细胞与浓缩病毒上清及细胞因子组合共培养。采用免疫组织化学法检测转染率，PCR 法检测外源性 mdr－1 基因的整合，柔红霉素(daunorubicin DNR)泵出试验检测导入的 mdr－1 基因的功能。结果：秋水仙碱筛选后，产病毒包装细胞 P－糖蛋白(P－glycoprotein P－gp)表达增强；外源性 mdr－1 基因能成功的导入兔骨髓造血细胞，转染 2 日、4 日、6 日的转染率分别为 22%、37%、39%，但转染 4 日组细胞生长状态最好；转入的 mdr－1 基因能发挥药物外排泵的功能。结论：采用浓缩病毒上清转染法能成功的将外源性 mdr－1 基因导入兔骨髓造血细胞中并获得稳定的功能性表达，为进一步研究 mdr－1 基因转染骨髓造血细胞后自体回输在大剂量化疗中对骨髓保护作用的研究提供了依据。

【关键词】多药耐药基因；转染；造血细胞

【中国图书分类法分类号】R394 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－08－29

Study on the expression and function of the mdr－1 gene transferred into hematopoietic cells of rabbit bone marrow in vitro

WANG Yi, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To explore the optimal transfection conditions in which the concentrated virus supernatant transfer the foreign mdr－1 gene into hematopoietic cells of rabbit bone marrow, and test the expression and function of the mdr－1 gene in cells. *Methods*: An amphotropic virus producer cell line, PA317－HaMDR1/A1 which contains a full－length cDNA of human mdr－1 gene, was screened with colchicine(90ng/ml), and the supernatant was collected and concentrated. The bone marrow cells of the New Zealand rabbits were gathered and the mononuclear cells which contain many hematopoietic cells were enriched. The hematopoietic cells were cocultivated with concentrated virus supernatant and interleukins. The transfection rate was determined by SP immunohistochemical methods; the integration of mdr－1 gene in rabbit mononuclear cells was tested by PCR method, and the physiological function of mdr－1 gene was tested by DNR extrusion test. *Results*: After screening by colchicine, the expression of P－glycoprotein(P－gp) of PA317－HaMDR1/A1 was enhanced. The foreign mdr－1 gene was transferred into hematopoietic cells of rabbit bone marrow successfully, and the transduction rate of 2 days, 4days and 6 days were 22%, 37%, and 39% respectively. However, the state of the 4 days was the best. The transferred mdr－1 gene had its physiological function. *Conclusion*: The foreign mdr－1 gene can be transferred into hematopoietic cells of rabbit bone marrow successfully by concentrated virus supernatant transfection method, and the transferring gene can be expressed stably and effectively. The study has provided a basis for the further research on chemoprotection experiment of the mdr－1 gene transferred into the bone marrow cells.

【Key words】 Multidrug resistance gene; Transfection; Hematopoietic cells

恶性肿瘤是目前严重威胁人类生命健康的主要疾病，占人类疾病死亡原因的第二位。化疗在恶性肿瘤的综合治疗措施中占有重要的地位，而解决化

作者介绍：王 侠(1975－)，男，博士研究生，主要研究方向：肿瘤多药耐药的研究。

基金项目：国家自然科学基金项目(30070781)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

疗中出现的骨髓抑制问题是更好发挥化疗作用的关键。本文通过逆转录病毒载体在体外将多药耐药 mdr－1 基因转入兔骨髓造血细胞中，用 PCR 法、免疫组化法及柔红霉素泵出试验检测外源性 mdr－1 基因的整合及其产物 P－糖蛋白的表达和功能；为进一步研究 mdr－1 基因转染骨髓造血细胞后自体回输在肿瘤患者大剂量化疗中对骨髓保护作用的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

纯种新西兰大白兔(由重庆医科大学实验动物中心提供)10 只，雌雄不分，体重 1.5～2.0kg，月龄 2～3 月。

1.1.2 病毒包装细胞

PA317－HaMDR1/A_1 由中科院天津血研所构建，本实验室贮存。

1.1.3 实验试剂

鼠抗人多药耐药基因单克隆抗体 C219、链霉素抗生物素蛋白－过氧化酶免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品，PCR 所需试剂为上海生物工程技术有限公司产品，细胞因子为 Sigama 公司产品，优质胎牛血清、IMDM 培养基为 Gibco 公司产品，秋水仙碱为 Emerck 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 浓缩病毒上清的制备

用含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养产病毒包装细胞 PA317－HaMDR1/A_1，加入秋水仙碱使其终浓度为 90ng/ml。培养 15 代后，收集上清经 40000r/min×2h 高速离心，沉淀用含 10% 胎牛血清的 IMDM 重悬(按 6.5 倍浓缩)后经灭菌待用。

1.2.2 兔骨髓单个核细胞的分离

选取新西兰大白兔膝关节间隙上方 1.0～1.5cm 处为骨髓穿刺点：8% 硫化钠脱去穿刺部位的毛；称量动物，用速眠灵(0.1ml/kg)麻醉并固定在操作台上，常规消毒铺巾；用 16 号骨髓穿刺针分别自左右两侧穿刺点垂直于股骨轴线穿刺，共抽取骨髓 4～6ml，加入等体积肝素抗凝(30～50U/ml)的无菌 PBS 液混匀；将稀释的骨髓液叠加入内含等体积、比重为 1.077 的淋巴细胞分离液的离心管中，2000r/min×30min 离心；收集界面的有核细胞层，用 PBS 液洗涤后加入含 20% 胎牛血清的 IMDM 吹打混匀制成单细胞悬液。

1.2.3 mdr－1 基因转染兔骨髓单个核细胞

将骨髓细胞悬液加入 24 孔板中，采用 1ml 培养体系，内含细胞 $2.0\sim5.0\times10^5$ 个、3% Glu 10μl、2－ME 5μl(10^{-4} mol/L)、Polyberene 30μl(200μg/ml)、10% BSA 0.1ml、EPO 40μl(50μ/ml)、IL－3 50μl(2000U/ml)、IL－6 50μl(100ng/ml)、SCF 50μl(2000ng/ml)、GM－CSF 50μl(400ng/ml)、浓缩病毒上清 0.4ml。37℃，5% CO_2 湿性孵育，隔日半量换液以补充新鲜病毒上清液及营养成份，但 Polyberene 浓度要降至 4μg/ml。对照组除用 IMDM 代替浓缩病毒上清外，其余成份均相同，共培养 6 天。

1.2.4 PCR 法检测外源性 mdr－1 基因的整合

酚－氯仿法提取待检细胞的 DNA。采用 25μl 扩增体系(含蒸馏水 17μl、引物 P1 P2 各 0.5μl、Buffer 2.5μl、Taq 酶 0.5μl、DNA 模板 2μl、dNTPs0.5μl、$mgcl_2$1.5μl)。循环条件：94℃ 5min→94℃ 45s，58℃ 45s，72℃ 60s 共 35 个循环→72℃ 7min；引物序列：正义链 5′—CCCAT CATTG CAATA GCAGG 反义链 5′—GTTCA AACTT CTGCT CCTCA。

1.2.5 免疫组化法检测转染率

选用链霉素抗生物素－过氧化物酶免疫组化检测试剂盒对秋水仙碱筛选前后的 PA317－HaMDRl/A_1 细胞、转染/未转染的骨髓单个核细胞的 P－gp 表达进行检测。结果判断标准：P－gp 表达阳性反应为胞膜或胞浆染成棕色，胞膜和胞浆内均无反应者为(－)，胞膜或胞浆内部分染成浅棕色者为(＋)，胞膜和胞浆内均染成浅棕色为(＋＋)，胞膜和胞浆内染成深棕色为(＋＋＋)，胞膜有深棕色颗粒集结、胞浆染成深棕色为(＋＋＋＋)。每张涂片计数 200 个细胞，计算各级阳性细胞所占百分比。

1.2.6 柔红霉素泵出试验

将待检细胞制成 2×10^6/ml 悬液：每管加入柔红霉素(7.5μg/ml)；37℃，5% CO_2 湿性孵育 30min，离心去上清；用培养液洗去细胞膜外的柔红霉素，37℃，5% CO_2 湿性孵育 10min；加入异搏定(10μg/ml)终止泵功能；PBS 液洗涤 2 次，上流式细胞仪待检。结果判定：采用 FACS Calibur 型检测仪，收集 1×10^4 个细胞进行测定；测定后在 Power macintosh7600 型计算机上用 Cell quest 软件(B. D. Co USA)分析数据。细胞内的 DNR 含量用坐标图表示：横坐标表示荧光强度，纵坐标表示细胞数。

2 结 果

2.1 秋水仙碱筛选前后 PA317－HaMDR1/A_1 细胞 P－gp 表达情况

经秋水仙碱(90ng/ml)筛选后，PA317－HaMDR1/A_1 细胞 P－gp 表达增强，与筛选前比较，两者差异在统计学上有显著性意义($P<0.05$)。提示秋水仙碱(90ng/ml)筛选能增强 PA317－HaMDR1/A 细胞 P－gp 表达(见表 1)。

2.2 mdr－1 基因转染兔骨髓单个核细胞后细胞的生长状况

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 秋水仙碱筛选前后 PA317－HaMDR1/A 细胞 P－gp 表达情况

组别	n	－	＋	＋＋	＋＋＋	＋＋＋＋
筛选前	200	4	42	82	57	15
筛选后	200	0	32	83	62	23

*统计学方法采用两级等级资料平均 Ridit 分析法，$\alpha=0.05$

表 2 转染前后骨髓单个核细胞 P－gp 的表达情况

待检细胞	P－gp		阳性等级		转染率
	＋	＋＋	＋＋＋	＋＋＋＋	
未转染	1	0	0	0	1%
转染 2 日	10	7	4	1	22%
转染 4 日	11	9	11	4	35%
转染 6 日	9	11	13	4	37%
阳性对照	16	41	31	12	100%

*统计学方法采用 t 检验，$\alpha=0.05$

表 3 转染细胞 P－gp 功能的检测

待检细胞	柔红霉素阳性率	P－gp 阳性率
未转染组	98.33%	22%
转染 2 日组	46.36%	35%
转染 4 日组	25.76%	37%

*统计学方法采用 χ^2 检验，$\alpha=0.05$

体外转染兔骨髓单个核细胞，隔日半量换液，倒置显微镜观察：转染 2 日和 4 日组细胞生长状态好，细胞均质而透明；转染 4 日组出现大量细胞集落，每孔细胞数量由 $2.0\times10^5\sim5.0\times10^5$ 增加到 $1.0\times10^6\sim1.5\times10^6$。而转染 6 日组细胞生长状态较差，细胞轮廓反差增强，胞质中出现颗粒、空泡。故选择转染 2 日、4 日组细胞进行下列实验。

2.3 PCR 法检测外源性 mdr－1 基因的整合

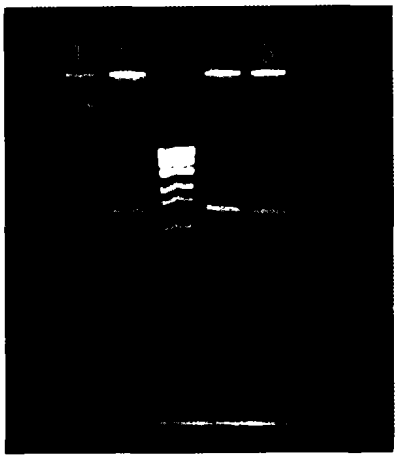


图 1 PCR 法检测体外转染兔骨髓细胞中 mdr－1 基因的嵌入

1. K562 细胞(阴性对照) 2. PA317－HaMDR1/A_1 细胞(阳性对照) 3. Marker 4. 转染 4 日兔骨髓细胞 5. 转染 2 日兔骨髓细胞 6. 未转染 mdr－1 基因兔骨髓细胞

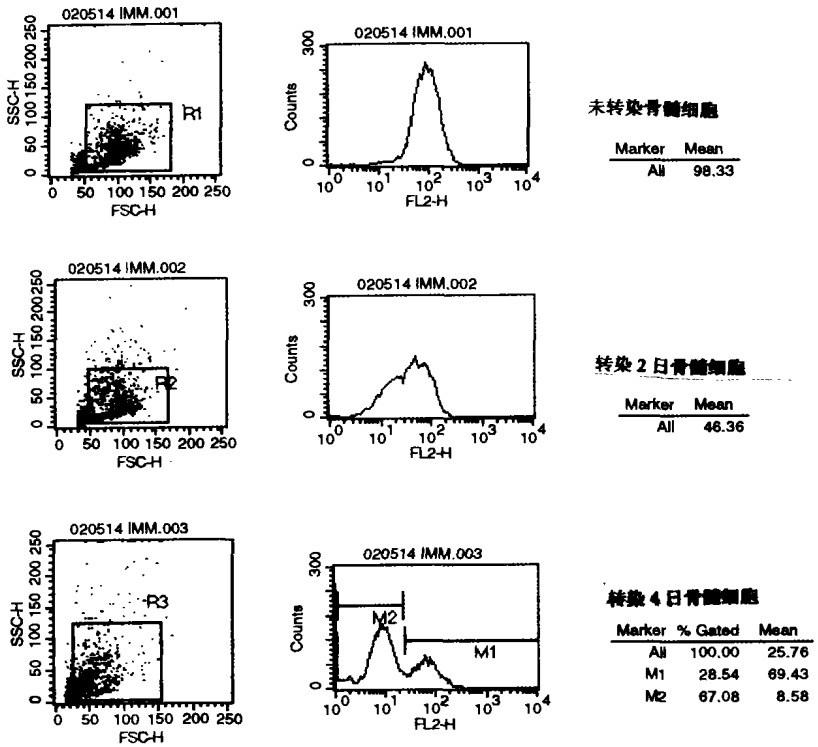


图 2 未转染/转染骨髓细胞柔红霉素阳怀率流式图

维普资讯 http://www.cqvip.com

根据中科院血研所实验结果,应用于本实验的载有目的基因 mdr－1 的质粒使用特异性引物行 PCR 扩增,可于 157bp 处见特异性条带[1]。PCR 扩增发现阳性对照(PA317－HaMDR1/A_1 细胞)、转染 2 日和 4 日细胞在 157bp 处有特异性扩增产物条带,而阴性对照(K562 细胞)和未转染细胞则无此条带(见图 1),证明外源性基因成功整合到靶细胞 DNA 中。

2.4 *免疫组化法检测骨髓单个核细胞的转染率*

转染 2 日、4 日、6 日和未转染的兔骨髓单个核细胞,PA317－HaMDR1/A 细胞 P－gp 表达阳性率如下表(表 2)。经统计学分析,转染组和未转染组 P－gp 表达阳性率的差异有显著性意义($P<0.05$);转染天数越长,转染率越高。

2.5 *柔红霉素泵出试验检测转入的 mdr－1 基因的功能*

经统计学分析,未转染组、转染 2 日组和转染 4 日组骨髓单个核细胞内柔红霉素阳性率差异有显著性意义($P<0.05$);转染细胞 P－gp 表达越强,泵出到细胞外的柔红霉素就越多,细胞内剩余的柔红霉素就越少(表 3,图 2)。

3 讨 论

恶性肿瘤是一种全身性、异质性的疾病,全身化疗在恶性肿瘤的综合治疗措施中占有举足轻重的地位。但在临床治疗中,化疗效果往往不尽人意,主要原因有两点:其一,肿瘤细胞产生多药耐药性(Mulidrug Resistance, MDR),,即肿瘤细胞对一种抗种瘤药产生耐药的同时 对结构和作用机理不同的多种抗肿瘤药产生交叉耐药。研究发现,肿瘤细胞中 mdr－1 基因过度表达产生大量 P－gp 导致的耐药是多药耐药的主要机理[2]。表达在细胞膜上的 P－gp 能将细胞内的药物泵出细胞外而使细胞内的药物浓度降低。根据这一机理,人们采用 P－gp 单克隆抗体封闭 P－gp、钙通道抑制剂等药物逆转剂、反义核酸技术[3]、核酶技术[4]及细胞因子基因治疗[5]等手段来逆转肿瘤细胞过度表达 P－gp,但由于副作用太大而难以应用于临床。其二,化疗带来的严重损害如骨髓抑制使化疗被迫终止。研究发现恶性肿瘤细胞的杀伤效果与化疗药物剂量之间存在明显的正相关,但加大化疗剂量会对正常组织产生严重损害。实验证明,骨髓细胞 P－gp 表达极低,对化疗药物极为敏感而易产生骨髓抑制[6]。因此,如果将 mdr－1 基因转入骨髓造血细胞中并使之高表达 P－gp,就可以增强骨髓对化疗的耐受性;进而使患者能耐受大剂量、足疗程的化疗。1982 年 Deberham 等首先采用 DNA 介导的方法将耐药细胞中的 mdr－1 基因转移到鼠 LTA 细胞中。Bertolini 和 Rmehauf 等利用双向性包装细胞和逆转录病毒载体成功的将人 mdr－1 cDNA 导入人脐血细胞、骨髓细胞及外周血造血前体细胞,并成功的用 Rh－123 进行了测评。上述研究证实了人类 mdr－1 基因可转染到多种类型的细胞中稳定表达。

将 mdr－1 基因导入骨髓造血细胞中,回输后使其定植于受体骨髓中发挥功能,关键在于如何提高 mdr－1 基因在体外的转染率以及转染有 mdr－1 基因的骨髓造血细胞在体内的定植率。本研究选择 mdr－1 基因转染兔骨髓单个核细胞,探讨转染行为的可行性及高效、稳定的转染条件,为进一步建立转染 mdr－1 基因自体骨髓移植模型及体内化疗实验打下基础。

影响基因转染效率高低的因素很多,首先是选择的载体类型。将含 mdr－1 cDNA 的 Harvey 肉瘤逆转录病毒载体 HaMDR1/A 导入目前较为常用的包装细胞 PA317,建立起双向性第二代产病毒包装细胞 PA317－HaMDR1/A_1。该细胞一方面能产生双向性病毒颗粒感染鼠、兔、鸡、猴及人等细胞,可用于较广范围的细胞转染;另一方面,该细胞的包装结构与载体结构至少要经过二次独立的重组才能形成有复制能力的野生型病毒,因而大大提高了其安全性。美国食品药物管理局已于 1992 年批准将 PA317 包装细胞用于人类基因治疗;目前,尚未见有产生辅助病毒的报告[7]。构建的产病毒包装细胞在反复的冻存、复苏和传代过程中,部分导入的基因会逐渐丢失;我们采用秋水仙碱筛选的方法来去除不含 mdr－1 基因的细胞,增强细胞中 mdr－1 基因的表达,从而提高病毒上清的浓度,以达到提高转染率的目的。其次,转染靶细胞的选择。我们采用密度梯度离心法选择兔骨髓单个核细胞作为靶细胞进行基因转染。兔骨髓单个核细胞中富含造血干祖细胞等较原始的细胞,我们没有进行纯化的原因在于兔的 CD_{34}^{+}细胞较之人而言数量少,很难获取足量的细胞进行基因转染。第三,转染体系的建立。由于人类和兔等哺乳动物的造血干祖细胞多处于静止

维普资讯 http://www.cqvip.com

期或 G_0 期。而逆转录病毒载体与靶细胞表面受体结合进入靶细胞以后，只有在靶细胞进行有丝分裂时才能进入核膜而整合到宿主基因组中。因此，在培养体系中加用细胞因子促使靶细胞进入细胞周期有利于目标基因的成功整合[8]。有研究表明 IL－3、IL－6、SCF 组合是提高转染率的最加组合。本研究选用 IL－3、IL－6、SCF、EPO、GM－CSF 等多种因子组合，体外诱导富含 CD_{34}^+ 细胞等多种造血干祖细胞的兔骨髓单个核细胞进入细胞周期，以利于目的基因的整合；同时促使干祖细胞的体外扩增。SCF、IL－6 直接调节造血干细胞、早期祖细胞增殖和分化；IL－3 及 GM－CSF 主要刺激祖细胞的增殖和分化；EPO 主要作用于单向造血祖细胞，使其进一步分化为前驱细胞和成熟细胞。经过 4 日培养，24 孔板内每孔细胞数由 $(2.0\sim5.0)\times10^5$ 扩增至 $(1.0\sim1.5)\times10^6$，镜下可见集落形成。转染体系中 Polyberene 起着吸附病毒颗粒的作用，对成功转染起着协同作用；但其浓度过高或过低都对转染不利。本课题组在以往的研究中发现，转染体系中 Polyberene 的浓度低于 2μg/ml 或高于 8μg/ml 均会导致转染的失败；本研究 Polyberene 的浓度为 6μg/ml，转染 48h 后降至 4μg/ml，对成功转染起到了良好的协同作用。

检测 mdr－1 基因在靶细胞中能否成功的整合、有效的表达及具有生物活性是进一步研究的基础。我们用 PCR 的方法检测到转染组外源性 mdr－1 基因整合及表达的特异性扩增条带位于 157bp 处，而未转染组则无此条带，从而从基因水平证明了外源性 mdr－1 基因已有效的整合到靶细胞的基因组中；用免疫组化的方法检测到未转染组、转染 2 日、4 日、6 日组的 P－gp 表达的阳性率分别是 1%、22%、35% 和 37%，可见随着转染时间的延长和半量换液次数的增加，P－gp 表达的阳性率逐渐增高，但转染 6 日组细胞生长状态较之 4 日组明显变差，可能系骨髓单个核细胞体外培养缺乏体内生存的微环境，如多种造血调控因子、基质细胞的支持等。柔红霉素是可自发荧光的 P－gp 底物，能被 P－gp 泵排出细胞外，P－gp 表达越高、细胞内的荧光强度越低，而细胞外的荧光强度越高。本研究中柔红霉素排出试验发现未转染组、转染 2 日、4 日组柔红霉素阳性率分别为 98.33%、46.36%、25.76%，结合免疫组化结果，可发现随着转染率的提高，柔红霉素阳性率不断下降，从而在细胞水平证实导入的外源性 mdr－1 基因表达产物 P－gp 具有药物外排泵的功能。

综上所述，采用逆转录病毒浓缩病毒上清转染法可有效的将外源性 mdr－1 基因导入兔骨髓单个核细胞中，并有功能性表达。本研究为进一步进行 mdr－1 基因转染兔骨髓单个核细胞后自体骨髓移植在荷瘤兔化疗中对骨髓保护作用的研究打下试验基础，也为解决恶性肿瘤病人在化疗中的骨髓抑制提供了可靠的试验依据。

参 考 文 献

[1] 刘炳仁，杨纯正. 用逆转录－多聚酶链反应检测白血病患者多药耐药基因的表达[J]. 中华血液杂志，1995；16(2)：65－68.

[2] Chen G, Jaffrezou JP, Flening WH, et al. Prevalence of multidrug resistance related to activation of the mdr－1 gene in human sarcoma derived by single－step doxorubicin selection [J]. Cancer Res, 1994；54(18)：4980－4987.

[3] Marthinet E, Divita G, Bernaud J, et al. Modulation of the typical multidrug resistance phenotype by targeting the MED－1 region of human MDR1 promoter[J]. Gene Ther, 2000；7(14)：1224－1233.

[4] Watanabe T, Sullenger BA. Induction of wide type p53 activity in human cancer cells by ribozymes that repair mutant p53 trancripts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000；97(15)：8490－8494.

[5] Walther W, Stein U, Fichtner I, et al. Mdr1 promoter－driven tumor necrosis factor－alpha expression for a chemotherapy－controllable combined in vivo gene therapy and chemotherapy of tumors[J]. Cancer Gene Ther, 2000；7(6)：893－900.

[6] Pileri SA, Sabattini E, Fulini B, et al. Immunohistochemical detection of the multidrug transport protein P170 in human normal tissue and malignant lymphomas [J]. Histopathology, 1991；19(2)：131－140.

[7] Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production[J]. Mol Cell Biol, 1986；6：2895－2902.

[8] Hao QL, Thieman FT. Extended long－term culture reveals a highing quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population[J]. Blood, 1996；88：3306－3313.