维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)03－0292－04

mdr1 基因转染 K562 细胞株的高效及安全性实验

王 珊，金先庆，杨纯正

(重庆医科大学儿科医院外科，重庆 400014)

【摘 要】目的：mdr1 基因转染 K562 细胞株，了解转染的持续稳定性、功能性及安全性 方法：磷酸钙沉淀法建立一株双向性产病毒包装细胞，浓缩病毒上清液法感染 K562 细胞，分别用集落筛选法、流式细胞仪及 SP 免疫组化法检测转染率，柔红霉素泵出实验及 MTT 法测定外源性 Pgp 功能，流式细胞仪测细胞周期及 PI 分析，免疫组化测 bcl－2、c－myc 的表达，"三形图、折线图及配对 t 检验进行统计学分析。结果：①最高转染率为 34%，秋水仙碱筛选后达 84%。②外源性 mdr1 基因可持续表达 4 月多，但表达率及强度逐渐降低。③转染的 mdr1 基因产物 Pgp 具有外排泵功能 ④被转染的 K562 细胞获得 1.46～2.22 倍的多药耐药功能。⑤转染行为对靶细胞生长、增殖、凋亡呈一过性、轻度的、可逆的影响。结论：mdr1 基因转染 K562 细胞获得外源性 Pgp 高效、持久、功能、安全地表达，这为进一步研究 mdr1 基因修饰的骨髓移植在化疗中保护骨髓免受化疗损害奠定了基础。

【关键词】mdr1 基因；K562 细胞株；转染；凋亡

【中国图书分类法分类号】R73－36 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－08－29

Experiment of the effect and safety of mdr1 gene transferring into k562 cells

WANG Shan, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To transfer full－length human mdrIcDNA into K562 cells and assess the feasibility and safety in vitro. *Methods*: PA317 cells were transducted via a virus vector, pHaMDR1/A, containing full－length human mdr1cDNA by calcium phosphate precipitation. The K562 cells were infected with the virus supernatant. The transfection rate was determined by using CFU selection, FACS and SP immunohistochemical methods respectively. The foreign Pgp function was tested by MTT assay and DNR exclusion with FACS analysis . The cellular cycle and the expression of bel－2 and c－myc gene were detected by using CFU selection, FACS and SP immunohistochemical methods respectively. The foreign Pgp function was tested by MTT assay and DNR exclusion with FACS analysis. The cellular cycle and the expression of bel－2 and c－myc gene were detected by using PI via FCM and SP stain respectively. These data were analyzed with statistic graph and T－test for match pairs. *Results*: ①The highest transfection rate of K562/MDR6－18 cells were 34%, even up to 84% after colchicine selection. ②The exogenous Pgp expression of K562/MDR6－18 cells lasted for more than 4 months with a slow decrease after 10 generations. ③The exogenous Pgp got an exclusive pump function. ④K562/MDR6－18 cells appeared 1.46－2.22 times cross multidrug resistance phenotype. ⑤K562/MDR6－18 cellular proliferation showed a mild, short, restored change. There was no abnormal apoptosis or proliferation. *Conclusions*: It implies a feasible, attractive and safe way that mdr1 gene transfers into target cells to get exogenous effective MDR. They also provide the basic protocol for using mdr1 gene modifying bone marrow transplantation against the myelosuppressive effects of anticancer drugs.

【Key words】mdr1 gene; Transfection; K562; Apoptosis

化疗实施中引起的肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性和化疗药物引起的骨髓抑制是化疗成功的最大障碍。研究表明，这种化疗抗性主要机理为一种多药耐药基因(Multidrug resistance, MDR)mdr1 在肿瘤细胞过量表达，其产物 P－糖蛋白(P－glycoprotein, Pgp)在细胞膜上含量增多，Pgp 作为单向性药物外排泵，使胞内药物浓度降低，肿瘤细胞对化疗产生耐药[1]。为克服耐药，可采用大剂量冲击式化疗方法，但化疗药物可同时杀伤正常骨髓造血细胞引起骨髓抑制，严重者导致死亡。辩证施治，近年研究人员设想将 mdr1 基因转移进骨髓造血细胞，使其具

作者介绍：王 珊(1963－)，女，副教授，博士，主要研究方向：小儿肿瘤

基金项目：重庆市科委应用基金资助项目(1999－2002)

维普资讯 http://www.cqvip.com

外源性抗药性,在化疗中获得骨髓保护,提高化疗根治率。本研究选用人类 K562 细胞株作为 mdrl 基因转移的靶细胞,监测转染的持续稳定性;转染的靶细胞所获得的功能及在化疗中的价值评估;转染行为对靶细胞生长、凋亡的影响。为进一步用 mdrl 基因转染人骨髓干祖细胞及评估其可行性与可靠性奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒及细胞

pHaMDRl/A 由美国国立癌症研究所 Michael M. Gottesman 教授惠赠。

K562(人类慢性粒细胞白血病急性红白变细胞系)重庆医科大学检验系生化室提供。

1.2 磷酸钙沉淀法建立一株双向性产病毒包装细胞 PA317 - HaMDRl/Al,含人类全长 mdrlcDNA,病毒滴度为 3.35 × 10^5CFU/ml,方法参照文献[2]。

1.3 浓缩上清液法转染 K562 细胞

PA317 - HaMDRl/A1 产病毒包装细胞以 10^6 接种于 25ml 含 10% FBS 的 3ml IMDM 培养液的培养瓶中,孵育 48h 后收集上清低温离心 4 × 10^4rpm,2h,浓缩 6 倍的上清液 -30℃ 保存备用。K562 细胞以 2.5 × 10^5/ml/孔接种于 24 孔板内,每日换新鲜浓缩上清液并保持 Polyberene 6μg/ml 的浓度,1 周左右,取一部分转种进行扩增和各种测定,另一部分用 18ng/ml 秋水仙碱筛选 10 天后挑选阳性集落进行扩增和各种测定。

1.4 集落筛选法测定转染率

24 孔板接种 10^5/ml/孔待测细胞,经 3 ~ 180ng/ml 秋水仙碱梯度筛选 7 ~ 10 天,比较 K562 细胞、转染的 K562 细胞、不加秋水仙碱的转染的 K562 细胞集落形成情况。

1.5 流式细胞仪(FACS 法)检测 mdrl 基因转染率

每种经不同处理的待测细胞视为一个实验组,每组分实验管及阴性对照管。应用 FACS Calibur 型检测仪,收集 1 万个细胞,测定细胞膜上 Pgp 后,在 Power Macintosh 7600 型计算机上用 Cell quest 软件(B. D CO. USA)分析数据。

Pgp 阳性率 = Pgp 阳性细胞数/总细胞数% - 非特异性染色细胞数%

1.6 SP 免疫组化法(SPIC 法)检测 Pgp、bcl - 2、c - myc 的表达

K562 细胞作阴性对照,PA317 - HaM R1/A1 细胞作阳性对照,具体实验步骤照试剂盒说明书完成。

1.7 柔红霉素(DNR)泵出实验测 Pgp 功能

取生长良好的待测细胞 5 × 10^5/ml 接种于 24 孔板内,实验组加入 DNR 10μg/ml,置 37℃ 5% CO_2 湿性孵育 2h,分别收集对照组和实验组细胞,PBS 洗涤后,应用 FACS Calibur 仪检测,激发波长为 488nm,发射光用 585nm 带滤色光片测定细胞内 DNR 红色荧光强度。用 Cell quest 软件分析细胞内 DNR 含量。

1.8 MTT 法检测转染细胞功能性耐药倍数

详见文献[3]的方法。

1.9 流式细胞仪分析细胞周期及检测 PI(碘化丙啶)

收集待测细胞,PBS 洗涤后加 PI 一步染液,4℃ 冰箱内避光孵育 30min,FACS Calibur 检测。数据用 Mod Fit LT2.0 版应用软件分析。

1.10 统计学分析

应用 Microsoft Excel 统计软件分析,率及倍数的比较用折线图、柱形图表示,两均数比较用配对 t 检验。

表 1 K562/MDR 细胞的转染率

测定方法	K562/MDRm - n 细胞	Pgp 阳性等级%				转染率
		+	+ +	+ + +	+ + + +	
集落法	K562/MDR6					31.37%
FACS 法	K562/MDR6					27.04%
SPIC 法	K562/MDR6	0	4	20	10	34%
SPIC 法	K562/MDR6 - 18	2	30	25	27	84%

K562/MDRm - n:m 表示转染体系中 Polyberene 在 6μg/ml 最佳浓度点 n 表示 18ng/ml 秋水仙碱筛选后

表 2 K562/MDR6 - 18 细胞 Pgp 表达的动态变化

细胞传代	筛选	阳性等级%				Pgp 表达率%
		+	+ +	+ + +	+ + + +	
1	未	0	10	20	10	34
10	已	8	30	25	27	84
23	已	31	20	15	9	69
31	已	20	20	5	0	39

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结 果

2.1 三种方法所测得的 K562 细胞的转染率见表 1。

2.2 转染的稳定持续性监测见表 2。

表 2 显示在常规传代培养 31 代(约 4 个月)过程中,K562/MDR6－8 细胞的外源性 mdr1 基因产物 Pgp 表达率和强度逐渐递降。

2.3 转染基因在靶细胞的功能性表达见表 3 和图 1。

表 3 细胞 DNR 潴留阳性与其 Pgp 表达

细胞名称	细胞 DNR 潴留阳性率%	Pgp 表达率%
K562(阴性对照)	97.62	6
K562/MDR6－9	77.59	76
K562/MDR6－18	39.83	90
PA317－HaMDR1/A1 (阳性对照)	27.32	100

表 3 反映了转染的 K562 其 mdr1 基因表达产物 Pgp 具有外排泵功能,能有效将其细胞内 DNR 外排至胞外。

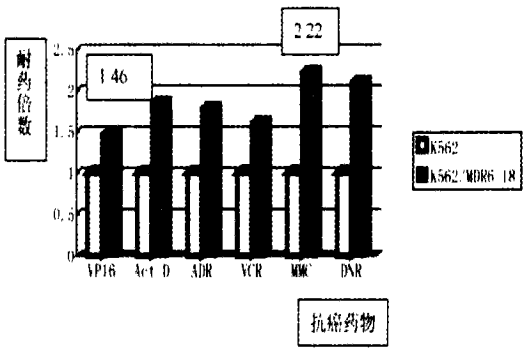


图 1 K562/MDR6－18 细胞获得性耐药程度

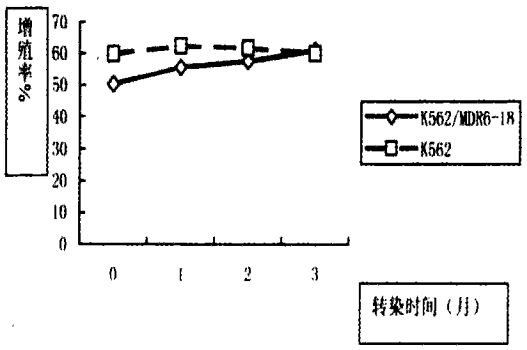


图 2 K562/MDR6－18 细胞增殖度曲线

图 1 提示用 MTT 法检测 K562/MDR6－18 细胞,其对临床常用抗癌药物,分别获得 1.46～2.22 倍的多药耐药功能,比 K562 细胞明显提高了耐药性($P<0.01$, $P=0.00121$)。

2.4 转染行为对靶细胞生长、增殖和凋亡的影响见图 2

从图 2 所见,靶细胞 K562 接受转染后,其增殖速度可逆性放缓,随时间推移其增殖状态逐渐恢复如前。

用 SP 免疫组化法检测得 bcl－2 及 c－myc 表达强度在被转染的 K562 细胞转染初期有增高现象,随时间推移,其表达强度逐渐下降,恢复至转染前水平,该变化过程与细胞增殖状态呈负相关,与其 Pgp 表达率和强度呈正相关。

3 讨 论

3.1 转染的持续稳定性

80 年代以来,随着现代分子生物学、免疫生物学和肿瘤学的发展,基因治疗恶性肿瘤倍受关注。我们采用耐秋水仙碱的人 KB 细胞的 mdrlcDNA 通过逆转录病毒介导转到 K562 细胞中,探讨转染行为的有效性及安全性。

逆转录病毒由产病毒细胞以出芽的方式释放出来,它与靶细胞膜上的受体蛋白结合然后进入细胞,通过病毒编码的逆转录酶复制成为双链 DNA 中间形式,称为前病毒。前病毒进入核内,然后随机地整合到宿主基因组中,目的基因被稳定地整合到被转染细胞的基因组中,这是被转移的目的基因稳定表达的基础[4]。本实验用多种方法均测得被转染的 K562 细胞较未转染的 K562 细胞,其 Pgp 表达率及强度有显著差异,尤其是秋水仙碱筛选后。用秋水仙碱筛选出的 MDR 细胞是由内源性 mdrl 基因表达增高引起的,还是由外源性 mdrlcDNA 表达所致?实验中,我们严格按照同样的条件用秋水仙碱梯度同时筛选了 K562 细胞及转染的 K562 细胞,在 7－10 天内,最低浓度梯度的秋水仙碱(3ng/ml)均导致未转染的 K562 细胞无集落产生及细胞内出现粗大颗粒、僵硬衰亡。而在转染的 K562 细胞中,18ng/ml 浓度的秋水仙碱培养梯度中,集落生长很好,这表明 K562/MDR 细胞耐药的产生是由外源性 mdrl 基因表达所致。

我们监测转染的 K562/MDR 细胞,发现其外源性 Pgp持续表达4月多,传代30余代,随培养时间

维普资讯 http://www.cqvip.com

的延长，Pgp 表达率及强度呈进行性下降趋势，推测可能的因素有二：一为培养环境中未加入耐药诱导因子；二为整合有 mdrl 基因的耐药细胞基因组不稳定，长时间无耐药诱导的体外培养条件下可能发生 mdrl 基因表达减弱，可用药物诱导产生耐药细胞及体内药物筛选提高表达率证实。Crinchuk 等[5]发现对 ADR 耐药的人类 K562 细胞株的亚群 B_2、B_3 和 C_9 在长期培养中，它们的核型可呈现一定比例的不同改变，这些改变通过检测认为是 K562 细胞的多药耐药性导致了基因组不稳定性的结果，这种不稳定可能与启动子类型有关。

3.2 *转染的功能性及其应用价值*

资料显示临床上 mdrl 基因转录增高导致的低度耐药性足以在某些肿瘤中产生多药耐药[6]，实验中，转染了 mdrlcDNA 的 K562/MDR6－18 细胞在 5 代时用 FACS 技术检测其对 DNR 的耐药倍数是 K562 细胞的 25.28 倍；转染了 mdrlcDNA 的 K562/MDR 细胞秋水仙碱集落培养法显示对秋水仙碱的耐药倍数约为 K562 细胞的 6 倍以上。用 MTT 法检测传代 7～10 代以上的 K562/MDR6－18 细胞显示了对多种临床常用抗癌药物的低倍的交叉耐药现象，这表明，转染了 mdrlcDNA 的 K562/MDR6－18 细胞不仅表达由外源性 mdrlcDNA 合成的 Pgp，而且该 Pgp 还具有正常的将细胞内药物泵出细胞外的转运功能，使被转染的靶细胞在化疗中能发挥显著的抗药性，在加大剂量的化疗中也表现出色，这提示了 mdrlcDNA 转染应用于临床在化疗中保护骨髓干祖细胞免受损害的潜在价值。

3.3 *转染行为的可行性及可靠性探讨*

我们用 FCM 检测转染过程中细胞分裂周期的动态变化，靶细胞 K562 接受转染后，其分裂增殖速度减缓，G_2－M 期及 S 期百分率下降，但无凋亡峰及同步峰出现，倒置显微镜下见细胞胞体较转染前小，增殖缓慢，约 2 周后，转染细胞胞体变大、生长渐旺盛，同时，G_2－M、S 期逐渐恢复到转染前水平，提示转染行为对靶细胞分裂增殖的影响是有限的、暂时的、可逆性的。Palissot 等[7]比较了 mdrlcDNA 转染前后的 LR73 细胞，发现其 DNA 含量仅非常有限的改变。推测为外源性基因整合到靶细胞基因组后干扰造成短暂的细胞生长可逆性减缓，但这种外界入侵引起的生长减缓的情况很快得以自身修复，且插入的外源 mdrl 基因还能发挥功能性表达作用，可见人体细胞能接纳这一正常人体防御性基因，这为 mdrl 基因治疗提供了可行性和可靠性。

bcl－2 是能特异地阻遏或延迟细胞凋亡发生的一种原癌基因，在细胞凋亡的调控中具有重要作用，c－myc 是凋亡调控中另一重要基因，具有诱导增殖和凋亡双重作用，可与其它基因相互影响，共同调节细胞凋亡。我们发现转染 mdrlcDNA 的 K562 细胞，bcl－2 和 c－myc 表达近同比增强，两者增强均随着转染行为后时间的推移而逐渐恢复接近转染前的表达水平。这提示转染行为没有导致调控凋亡的基因打破原来的协调与平衡，未诱发异常增殖或凋亡，可以推测，mdrl 基因转染对靶细胞的生长增殖有一定的影响，但这种影响是缓和的、无不良性的、可接受的、可逆的，对靶细胞无实质性改变及损害。

参 考 文 献

[1] 王 珊，金先庆，杨纯正，等. 儿童实体恶性肿瘤多药耐药基因的表达[J]. 中华小儿外科杂志，1997；18(5)：259－262.

[2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al, Molecular Cloning A Laboratory Manual[M]. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989；16－32.

[3] 金先庆，汤为学，王 珊，等. 儿童恶性肿瘤抗癌药物敏感试验[J]，中华小儿外科杂志，1995；16(5)：265－267.

[4] Watt PC, Sawicki MP and Jrpassaro E. A review of gene transfer techniques[J]. Am J Surg. 1993；165：350－356.

[5] Crinchuk TM, Pavlenko MA, Lipskaia LA, et al. Resistance to adriamycin in human chronic promyeloleukemia line K562 correlates with directed genome destabilization amplification of MDR1 gene and nonrandom changes in karyotype structure [J]. Tsitologiia 1998；40(7)：652－657.

[6] Fojo AT. Ueda K, Slamon DJ, et al. Expression of a multidrug－resistance gene in human tumors and tissues[J]. Pro Natl Acad Sci USA, 1987；84：265－269.

[7] Palissot V, Liautaud－Roger F, Carpentier Y, et al. Analysis of DNA content in multidrug－resistant cells by image and flow cytometry[J]. Cell Prolif 1996；29(10)：549－555.