DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.024
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

文章编号:1000-5404(2000)11-1073-04

论著

逆转录病毒上清液瘤内注射介导体内 mdr1 基因转移

易善红,杨唐俊,何 斌,潘进勇,曾 毅 (第三军医大学附属新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨逆转录病毒上清液瘤内及瘤周注射介导体内 mdr1 基因转移。方法 应用逆转录病毒上清液裸鼠皮下移植瘤内及瘤周注射法转移 mdr1 基因,腹腔注射化疗药物观察肿瘤模型的耐药性,免疫组化检测肿瘤细胞 P-GP 的表达,RT-PCR 检测肿瘤内 mdr1 mRNA 的表达量。结果 携带 mdr1 基因的逆转录病毒上清液注射后肿瘤模型表现出多药耐药性,高滴度病毒上清液可达到 60% 细胞表达 P-GP,是病毒原液基因转移率的 2 倍;RT-PCR 表明,基因转移后肿瘤组织内 mdr1 mRNA 的表达量明显增加。结论 逆转录病毒上清液瘤内及瘤周注射,可发生部分肿瘤细胞的基因转移,高滴度的病毒上清液具有较高的基因转移率。

关键词:裸鼠;逆转录病毒;基因转移;膀胱癌;多药耐药性
中图法分类号:R394-33;R737.14 文献标识码:A

mdr1 gene transfer by intra and peri-tumor injection of retrovirus supernatant in nude mice

YI Shan-hong, YANG Tang-jun, HE Bin, PAN Jing-yong, ZENG Yi (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study mdr1 gene transfer by subcutaneous intra-and peri-tumor injection of retroviral supernatant with mdr1 gene in nude mice. Methods The retrovirus supernatant containing mdr1 cDNA was injected into and around the tumors. Multidrug resistance of tumor models was observed by intraperitoneal injection of Adriamycin 5 mg/kg or Colchicine 500 ng/kg. The expressions of P-GP on the membrane and of mdr1 mRNA in cells were detected with immunocytochemical assay and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively. Results Multidrug resistance was showed in the administered tumor models. Comparable high level of P-GP was expressed in 60% cells with the treatment of high titer virus supernatant, which was 2 times of the cells with the low titer virus supernatant. The expression of mdr1 mRNA in the tumor tissues was increased significantly in the injected group as compared with control. Conclusion Mdr1 gene transfer can be efficiently increased by the injection of retrovirus supernatant into and around the tumor. High titer retrovirus supernatant is more efficient.

Key words: nude mice; retrovirus; gene transfer; bladder cancer, multidrug resistance

体内基因转移效率偏低,是目前临床基因治疗的主要难点之一[1]。本实验旨在应用逆转录病毒上清液瘤内注射的方法将 mdr1 基因转移至荷瘤根裸鼠的肿瘤细胞内,以期探讨逆转录病毒介导体内基因转移的可行性,为进一步研究体内肿瘤基因转移提供实验依据;同时建立一种具有稳定耐药性的和接近临床病理变化等特点的多药耐药性肿瘤动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4~6周 BALB/c 裸鼠,15~25 g,雌雄不拘,在 SPF 级饲养条件下喂养。

1.2 细胞

T24 为浸润性人膀胱癌细胞,北京医科大学泌尿外科研究所惠赠。质粒 pHaMDR1/A 为带有 mdr1 cDNA 全序列的逆转录病毒载体,经导入细胞后表达全长的 mdr1 mRNA[2]。PA317、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670824)
作者简介:易善红(1970—),男,河南省息县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事膀胱癌多药耐药性方面的研究。电话:(023)68755114-74624
收稿日期:2000-01-17;修回日期:2000-09-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

NIH3T3 细胞，我校分子生物学教研室提供。

1.3 引物

mdrl 基因核酸序列引物为本科设计[3]，上游引物序列为 5′-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3′，下游引物序列为 5′-GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA-3′，扩增的片段长度为 157 bp。

1.4 病毒包装、收集、浓缩及滴度测定

脂质体 DoTaP 介导将载体 pHaMDR1/A 导入 PA317 细胞，60 ng/ml 秋水仙素筛选。收集细胞培养上清液，0.45 μm 过滤器过滤，6 000 r/min 低温离心 12 h，以原液 1% 的培养液重悬沉淀；−70 ℃保存。NIH3T3 法测定病毒滴度。

1.5 病毒上清液 RNA 的鉴定及辅助病毒检测

参照 TriPure™试剂盒（购自德国 BM 公司）说明提取病毒上清液 RNA，RT-PCR 方法见文献[3]。收集转染阳性 NIH3T3 细胞的培养上清液，0.45 μm 微孔过滤器过滤后再次感染 NIH3T3 的亲代细胞，秋水仙素筛选。

1.6 裸鼠荷瘤模型的建立及基因转染

1×10^7/ml T24 细胞悬液 0.1 ml 接种于裸鼠皮下，待肿瘤体积达到 100 mm^3 以上，瘤周注射 50 μl 逆转录病毒上清液，8 h 后瘤内再次注射 50 μl。隔天注射，连续 3 次。实验分 3 组，对照组注射 DMEM 培养液；高、低滴度组分别注射滴度为 2.4×10^7 CFU/ml 及 3.1×10^5 CFU/ml 的逆转录病毒上清液。

1.7 肿瘤化疗

分别腹腔注射阿霉素（5 mg/kg）及秋水仙素（500 ng/kg）检测各组肿瘤动物模型的化疗效果。

1.8 肿瘤组织内 P-糖蛋白（P-glyco protein，P-GP）的检测

采用 S-P 法免疫组化染色，P-GP 单克隆抗体为 Sigma 公司产品。切片厚度 10 μm。0.01 mol/L PBS 作为漂洗液，DAB 显色，苏木素轻度复染。胞膜有棕黄色颗粒状染色者为阳性。表达强度以阳性细胞所占百分率和显色强度为标准。

1.9 RT-PCR 检测组织内 mdrl mRNA 的表达量

以 TriPure™试剂盒提取肿瘤组织内 RNA。RT-PCR 方法参照文献[3]。

2 结果

2.1 病毒上清液的收集、浓缩及滴度测定

经 DoTaP 介导将 pHaMDR1/A 转染 PA317 细胞，秋水仙素耐药性筛选得到抗性克隆，命名为 PAmdrl。经过滤及离心处理将病毒上清液浓缩 100 倍。NIH3T3 感染法测定病毒滴度，浓缩上清液的滴度为 2.4×10^7 CFU/ml，病毒滴度提高 77 倍。

2.2 病毒上清液 RNA 的鉴定和辅助病毒的检测

PAmdrl 细胞的培养上清液 RNA 扩增出特异性 mdrl 157 bp 条带，而 PA317 和 NIH3T3 细胞未扩增出此特异条带。以转染阳性的 NIH3T3 细胞的培养液进一步感染亲代细胞 NIH3T3，未出现抗性细胞。

2.3 裸鼠荷瘤模型的建立

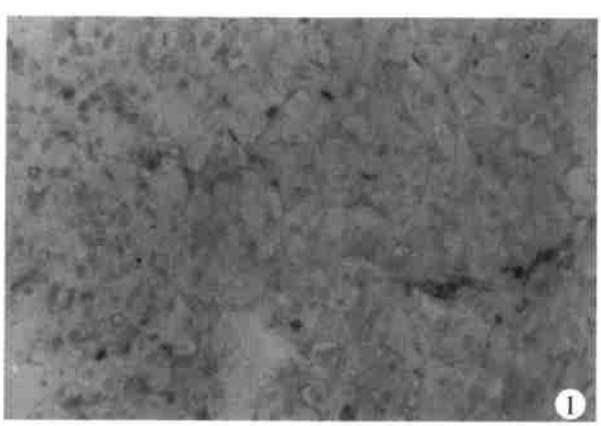
注射 T24 细胞悬液后第 3 天，局部即见肿瘤形成，成瘤率为 100%，1 周后肿瘤直径为 0.3～1.1 cm 不等。

2.4 肿瘤的化疗

高滴度组的肿瘤生长率为 51.2%，低滴度组为 34.5%，空白组为 20.8%，高滴度组与空白组相差显著（$P<0.01$）。

2.5 免疫组化对肿瘤组织内 P-GP 的检测

高滴度组染色明显较强，且阳性细胞分布面广，而低滴度组相对较弱，空白组更弱，见图 1、2。各实验组肿瘤组织 P-GP 染色阳性细胞率，见表 1。



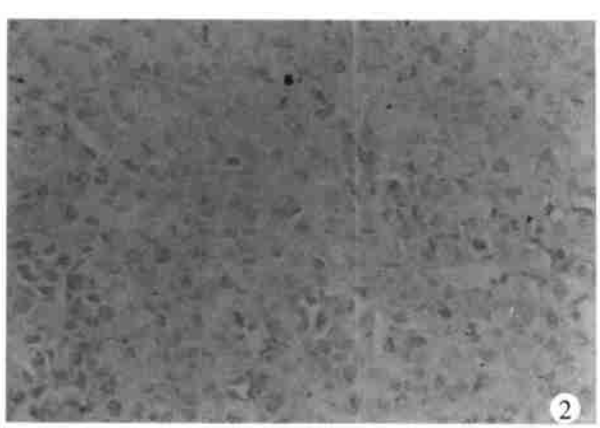


图 1 高滴度病毒注射组肿瘤组织 P-GP 免疫组化染色 （S-P× 400）

Fig 1 Immunohischemical staining with McAb P-GP in human bladder cancer grew in nude mice in high titer virus injection （S-P× 400）

图 2 对照组肿瘤组织 P-GP 免疫组化染色 （S-P× 400）

Fig 2 Immunohischemical staining with McAb P-GP in human bladder cancer grew in nude mice in control group （S-P× 400）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　各组肿瘤组织 P-GP 免疫组化染色阳性细胞率

Tab 1　Positive rate of immunohischemical staining with McAb P-GP in human bladder cancer grew in nude mice

Group	Strong positive	Weak positive	Negative
High titer virus group	0.60±0.02 *#	0.32±0.03	0.08±0.02
Low titer virus group	0.30±0.01	0.50±0.02	0.20±0.01
Control	0.08±0.01	0.55±0.03	0.37±0.03

*: $P<0.05$ *vs* low titer;　#: $P<0.01$ *vs* control

2.6　RT-PCR 对瘤组织内 mdrl mRNA 的检测

3 组β-actin 的扩增条带基本相同(587 bp), 而 mdrl 157 bp 的扩增条带出现明显差异, 以高滴度组的扩增条带最明显, 低滴度组条带次之, 空白组最弱, 见图 3。

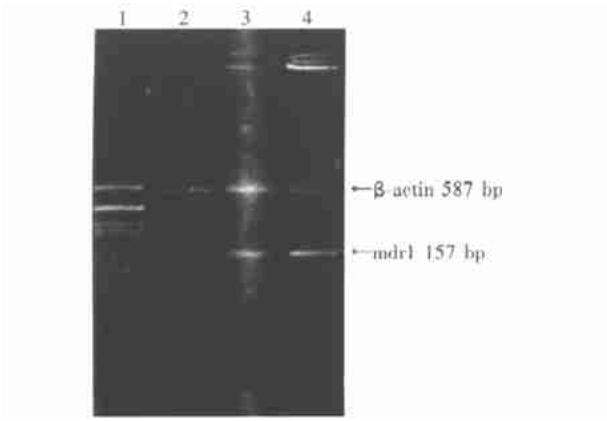


图 3　RT-PCR 检测肿瘤组织内 mdr1 mRNA 量(2% 琼脂糖凝胶)

Fig 3　Confirmation of mdr1 mRNA by RT-PCR in human bladder cancer grew in nude mice (run on a 2% agarose gel and stained by ethidium bromide)

1: pGEM-7zf(+) + *Hae* Ⅲ marker; 2: Control; 3: Low titer virus group; 4: High titer virus group

3　讨论

多药耐药性是肿瘤化疗失败的主要原因之一。目前很多的药物逆转剂, 在细胞培养状态下能很好的逆转肿瘤对化疗药物的抵抗性, 如维拉帕米、喹啉、环孢素 A 等。但是这些逆转剂的应用浓度非常高, 人体毒性大, 几乎没有临床应用的可能。其他如 P-GP 单克隆抗体[4]、mdrl 核酶[3] 多种逆转 MDR 的方法, 也都需要经过动物实验的探讨与证明。

目前认为, 多药耐药性主要是由于细胞内 mdrl 基因过表达, P-GP 增加而产生的。本研究利用已经克隆出 mdrl 基因[2], 采用逆转录病毒注射法向动物肿瘤细胞模型内转移并表达此基因, 进而建立耐药性动物肿瘤模型。我们首先制备裸鼠的荷瘤模型, 而后将 mdrl 逆转录病毒上清液注射至荷瘤裸鼠的瘤内和瘤周。我们观察到在应用阿霉素、秋水仙素腹腔注射(2 次/周, 共 3 周)后该荷瘤模型肿瘤生长依然旺盛, 而对照组肿瘤的生长较慢, 证明注射病毒可使肿瘤对化疗药物的耐受性增加。免疫组化染色结果表明, 高滴度逆转录病毒介导的强阳性细胞率可达到 60%, 低滴度组强阳性细胞率也可达到 30%。RT-PCR 结果也说明基因转移后, 肿瘤组织的 mdrl mRNA 表达量明显增加。以上结果均表明, 病毒注射法建立的 MDR 膀胱癌动物模型具有较高的耐药性表型, 可用于研究 MDR 机制和逆转方法。

实体瘤的体内基因转移作为肿瘤基因治疗的重要环节之一, 已逐渐成为当前研究的热点[5]。尽管体内基因转移尚存在一定的局限性, 如基因转移的效果尚不令人满意, 转移方法可能对机体产生的不良影响等, 但因其具有符合临床应用要求、异质性强和方法简便等优点, 因此体内基因转移技术具有十分广阔的应用前景[6]。

本研究以 DoTaP 介导将携带 mdrl 基因的重组逆转录病毒载体 pHaMDR1/A 导入 PA317 包装细胞, 获得的逆转录病毒原液滴度为 3.1×10^5 CFU/ml。文献认为, PA317 细胞包装产生的病毒颗粒滴度较低(一般仅为 $10^4\sim10^5$ CFU/ml), 严重影响了转基因的效率[7]。本研究也表明, 逆转录病毒原液的基因转移效率确实较低, 限制了其在体内的应用。进而我们采用过滤及低温离心法浓缩逆转录病毒原液, 使病毒滴度提高近 80 倍, 实验证实该方法对病毒颗粒的感染能力无任何影响。由于 NIH3T3 细胞的培养上清液中未能扩增出 mdrl 的特异性的条带, 且再感染实验无细胞克隆形成, 表明 mdrl 逆转录病毒上清液仅具有一次性的感染能力, 即无辅助病毒产生。以上结果表明, 此逆转录病毒上清液不仅含有 mdrl 基因, 而且能安全、有效地应用于实验研究。

现有研究结果表明, 目的基因在肿瘤内部转移并表达的多少直接影响着肿瘤基因治疗的效果。Smiley 等[8] 采用逆转录病毒上清液瘤内注射法, 以实现裸鼠黑色素瘤 HIV-TK 基因转移, 结果表明该方法可使 36%的细胞表达外援基因, 在应用 GCV 后可得到较好的抑瘤效果。本研究将 mdrl 基因病毒上清液注射到荷瘤裸鼠的瘤周及瘤内, 能使 60%的肿瘤细胞发生基

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

因转移,从而肿瘤获得较强的多药耐药性,同时也表明浓缩的病毒上清液具有较好的体内基因转移效率。

参考文献:

[1] Cusack J C, Spitz F R, Nguyen d, *et al*. High levels of gene transduction in human lung tumors following intralesional injection of recombinant adenorirus[J]. Cancer Gene Ther, 1996, 3(4): 245—249.

[2] Pastan I, Gottesman M M, Ueta K, *et al*. A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells[J]. Proc Natl Acad USA, 1988, 85(12): 4 486—4 490.

[3] 何 斌,杨唐俊,金锡御,等.核酶对MDR1基因的体外切割活性[J].中华泌尿外科杂志,1998,19(4):1—3.

[4] Pearson J W, Fogler W E, Volker K, *et al*. Reversal of drug resistance in a human colon cancer xenograft expressing MDR1 complementary DNA by *in vivo* administration of MRK-16 monoclonal antibody[J]. J Natl Cancer Inst, 1991, 83(19): 1 386—1 391.

[5] Bonnekoh B, Greenhalgh D A, Bundman D S, *et al*. Inhibition of melanoma growth by adenoviral mediated HSV-TK gene transfer *in vivo*[J]. J Invest Dermatol, 1995, 104(3): 313—317.

[6] Fujiwara T, Cai D W, Georges R N, *et al*. Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vectors in an orthotopic lung cancer model[J]. J Natl Cancer Inst, 1994, 86(19): 1 458—1 462.

[7] Jolly D. Viral vector systems for gene therapy[J]. Cancer gene therapy, 1994, 1(1): 51—64.

[8] Smiley W R, Laubert B, Bradley D, *et al*. Establishment of parameters for optimal transduction efficiency and antitumor effects with HSV-TK retroviral vector in established solid tumor[J]. Human Gene Therapy, 1997, 8(5): 965—977.

(编辑 潘式文)

(上接1072页)

服1周。两组光疗开始年龄及持续时间比较如表2。两组治疗结果临床痊愈,无胆红素脑病。

表2 两组高胆红素血症患儿光疗开始时间及光疗累积时间比较(t'检验, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	光疗开始时间	光疗累积时间
受试组	340	26.8±16.7**	27.7±7.3*
对照组	200	51.8±19.6	35.7±10.2

*: $P<0.01$, **: $P<0.001$ 与对照组比

两组部分患儿出院1~2年后检测脑干听觉诱发电位。受试组检测50人,潜伏期延长者2人,余正常,异常者占4.0%。而对照组测31人,潜伏期延长者3人,潜伏期延长合并反应阈提高者2人,异常者共5人占16.1%。对照组异常者是受试组的4倍。

2 讨论

对照组单以血清胆红素值足月儿≥205 μmol/L(120 mg/L),早产儿≥256.5 μmol/L(150 mg/L)作诊断高胆红素血症标准及光疗指证。而受试组结合出生体重、日龄及是否存在高危因素个体化处理,这样既可降低高胆红素血症的发生率,又可很大程度上避免胆红素脑病的发生,进而降低高胆红素血症的病死率和致残率[3]。

受试组对早期新生儿高胆红素血症均每日复查胆红素1次,持续1周,光疗期间每日采用微量法测血清胆红素2次,然后根据胆红素值结合出生体重、日龄决定是否进行光疗或停止光疗。而我院(对照组)以往对于早期新生儿在肉眼发现黄疸才开始化验检查,光疗标准同高胆红素血症标准,一般以肉眼观察黄疸消失后停止光疗,故光疗时间明显较实验组长。故光疗指证及停止光疗指证均以受试组为合理。

关于用药,白蛋白辅助治疗应有指证,常规使用是不妥的。而日本新生儿学科在20年前已不用其它药物治疗高胆红素血症,因从疗效的确实性、安全性及副作用来看,尚无值得推荐的药物[4],从实验组资料来看,虽未用其它药物疗效仍好,具有说服力。

我国目前采用的早期新生儿高胆红素血症标准中,早产儿高胆红素血症值为150 mg/L,高于足月儿高胆红素血症值120 mg/L,没有考虑到早产儿这一高危因素,有必要修正[5,6]。

关键词:高胆红素血症;新生儿;蓝光治疗
中图法分类号:R725.52 文献标识码:B

参考文献:

[1] 新生儿医疗联络会 主编.NICUマニュアル[M].东京:金原出版株式会社,1990.245—246.

[2] 仁志田博司 主编.新生儿学入门[M].东京:医学书院出版社,1995.290—291.

[3] 黄务珉.如何降低早期新生儿高胆红素血症经素血症的发病率、病死率和致残率[J].中华儿科杂志,1996,7(34):4 219.

[4] 小川雄之亮,多田裕,仁志田博司 主编.新生儿の诊疗と检查[M].东京:东京医学社,1989.160—161.

[5] 诸福棠,吴瑞萍,胡亚美 主编.实用儿科学[M].第6版.北京:人民卫生出版社,1996.467—467.

[6] 周从乐.高胆红素血症红素血症对新生儿听力损害及脑干听觉诱发电位检查[J].中国实用儿科杂志,1999,14(2):81.

(编辑 冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net