

文章编号:1673-1689(2005)03-0019-03

# 导入以腺病毒为载体多药耐药基因的脐血有核细胞 对化疗药物的耐受性

赵福广<sup>1</sup>, 陈军<sup>2</sup>, 陶文沂<sup>1</sup>

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214036; 2. 吉林省肿瘤防治研究所, 吉林长春 130012)

**摘要:** 通过腺病毒载体介导使多药耐药基因转染入脐血有核细胞, 提高其对化疗药物的耐受性。结果表明, 与未转染的脐血有核细胞相比, 转染MDR1基因的脐血有核细胞对化疗药物有明显的抵抗性( $P < 0.01$ )。通过腺病毒介导的MDR1基因转染脐血有核细胞能有效的抵抗化疗药物对其损伤, 从而有望对临床肿瘤的大剂量化疗提供一种有效防护细胞损伤的方法, 提高化疗效果。

**关键词:** 多药耐药基因; 腺病毒载体; 化疗药物; 脐血有核细胞

中图分类号: R 730.53

文献标识码: A

## Resistance of Cord Blood Nucleate Cells Transfected with Adenovirus-MDR1 Gene to Chemotherapeutic Drug

ZHAO Fu-guang<sup>1</sup>, CHEN Jun<sup>2</sup>, TAO Wen-yi<sup>1</sup>

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Academe of Cancer Prevention and Cure of Jilin Province, Changchun 130012, China)

**Abstract:** To explore a method that can prevent haematopoietic cells from chemotherapeutic drugs during chemotherapy of tumor. MDR1 gene was transferred to cord blood nucleate cells (CBNC) mediated by adenovirus vector, for enhancing its resistance to chemotherapeutic drugs. The CBNC transferred with MDR1 gene have significant resistance to chemotherapeutic drugs compared with the CBNC without gene transfer ( $P < 0.01$ ). The CBNC transferred with MDR1 gene can obviously resist the damage of chemotherapeutic drugs, provide a method to prevent the cells damage during chemotherapy of patients, and enhance the effect of chemotherapy.

**Key words:** MDR1; adovirus vector; chemotherapeutic drugs; cord blood nucleate cells

化疗是目前常用的治疗恶性肿瘤的方法之一, 但在化疗过程中, 随着肿瘤的杀灭, 正常的组织细胞和骨髓细胞也同时受到损伤, 从而影响化疗效果。如何克服这种副反应, 保证化疗的顺利进行及疗效, 是目前化疗研究的重点。本研究以脐血有核

细胞(Cord Blood Nucleate Cells, CBNC)作为靶细胞, 采用腺病毒载体介导的方法, 将多药耐药(Multidrug Resistance, MDR1)基因转染其中, 通过使用化疗药物验证其转染后的抗药性, 取得了较好的效果。

收稿日期: 2005-01-10; 修回日期: 2005-03-08.

作者简介: 赵福广(1965-), 男, 吉林长春人, 发酵工程博士研究生。

万方数据

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

多药耐药(MDR1)基因质粒(pHAMDR1):由美国国立健康研究院 Carol O. Cardarelli 博士惠赠;腺病毒表达试剂盒,腺病毒修平试剂盒:均购于 Takara 公司;脐带血:由长春市妇产科医院提供; $^3\text{H-TdR}$ :购于上海原子能研究所;LE293 细胞:本实验室保存。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取和扩增 见参考文献[1].

1.2.2 CBNC 的制备 见参考文献[2].

1.2.3 MDR1-粘粒(Cosmid)载体的构建 首先用 DNA Blunting Kit 修平 MDR1 基因并纯化,加入经 *SwaI* 酶切的 Cosmid 载体(Adenovirus Expression Kit 提供),通过连接反应将二者连接,构建 MDR1-Cosmid 载体。

1.2.4 MDR1-Cosmid 载体的获取 用  $\lambda$  包装试剂盒包装 MDR1-Cosmid 载体,感染 LE293 细胞,收获 MDR1-Cosmid 载体。

1.2.5 制备重组腺病毒载体 将 MDR1-Cosmid 和 DNA-TPC(腺病毒载体试剂盒提供)混合,用磷酸钙沉淀法将混合物导入完全融合的 LE293 细胞,收获重组腺病毒。

1.2.6 病毒滴度测定 用倍比稀释法稀释重组腺病毒载体,感染 LE293 细胞,检测病毒滴度约为  $4 \times 10^9$  PFU/mL。

1.2.7 病毒转染 CBNC 调 CBNC 为  $1 \times 10^7$  /mL,加入 96 孔板,每孔加  $50 \mu\text{L}$  ( $5 \times 10^5$  /孔),分 3 组加病毒悬液。第 1 组 1~36 孔,每孔加  $50 \mu\text{L}$  病毒悬液,37 °C 感染 1 h 后,加含体积分数 10% 的胎牛血清(FCS)的 RPMI 1640 培养液至总体积为  $200 \mu\text{L}$ 。第 2 组 37~72 孔,每孔加  $50 \mu\text{L}$  病毒悬液,37 °C 感染 1 h 后,加含体积分数 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液至总体积为  $200 \mu\text{L}$ ;24 h 后,重复感染 1 次。

第 3 组为对照组(73~96 孔),每孔加含体积分数 10% FCS 的 RPMI 1640  $150 \mu\text{L}$ 。

1.2.8 CBNC 对长春新碱的耐受效应 以上 3 组每组再分成 5 组,按 0.08, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量加长春新碱,于体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 72 h。培养结束前 6 h,加  $^3\text{H-TdR}$   $1 \mu\text{Ci}/\text{孔}$ ,用细胞收集器收集细胞于纤维滤纸上,自然干燥,液闪仪测值。

1.2.9 导入 MDR1 的 CBNC 的粒-单系祖细胞集落形成单位(GM-CFU)培养 在含 rhIL-3, rhIL-6, rhSCF, rhGM-CSF 的质量分数 0.9% 甲基纤维素 IDEM 体系中加入转基因单个核细胞  $1 \times 10^7$  /mL,在不同质量浓度柔红霉素环境中培养 2 周,记数含 50 个细胞以上的集落数<sup>[3]</sup>。

1.2.10 统计学分析 采用 *t* 检验进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 导入 MDR1 基因的 CBNC 对长春新碱的耐受效应

把转染 1 次和转染 2 次 MDR1 基因的 CBNC 对长春新碱的耐受性分别进行比较,结果见表 1。从表 1 可以看出,转染 MDR1 基因的 CBNC 对低剂量和高剂量的长春新碱的耐受性均比未转染的 CBNC 好,统计学上有显著差异( $P < 0.01$ )。转染 2 次的 CBNC 在化疗药物质量浓度低( $< 1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ )时,其耐受性与转染 1 次的 CBNC 在统计学上没有差别( $P > 0.05$ ),但当药物质量浓度达到  $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上时,转染 2 次的 CBNC 耐受化疗药物的能力高于转染 1 次的 CBNC,其中  $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  组有明显差异( $P < 0.01$ )。

### 2.2 导入 MDR1 的 CBNC 的粒-单系祖细胞集落形成单位(GM-CFU)培养

导入 MDR1 的 CBNC 在含柔红霉素的半固体培养基中形成 GM-CFU 能力见表 2。

表 1 转染 1 次和转染 2 次 MDR1 基因的 CBNC 对长春新碱的耐受性(CPM,  $x \pm s$ )

Tab. 1 Repellency of CBNC of MDR1 transferred once or twice against vincristine

剂量/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	例数	对照组	转染 1 次	<i>P</i> 1 值	转染 2 次	<i>P</i> 2 值	<i>P</i> 3 值
0.08	8	1397.00 $\pm$ 253.62	2956.25 $\pm$ 215.73	$< 0.01$	2794.25 $\pm$ 669.13	$< 0.01$	$> 0.05$
0.50	7	1029.00 $\pm$ 186.28	2298.20 $\pm$ 438.66	$< 0.01$	2276.04 $\pm$ 211.91	$< 0.01$	$> 0.05$
1.00	7	1016.40 $\pm$ 202.88	2721.60 $\pm$ 209.30	$< 0.01$	2774.00 $\pm$ 569.55	$< 0.01$	$> 0.05$
1.50	7	523.60 $\pm$ 176.99	1511.60 $\pm$ 209.30	$< 0.01$	2362.20 $\pm$ 189.08	$< 0.01$	$< 0.01$
2.00	7	604.12 $\pm$ 143.91	1482.20 $\pm$ 315.01	$< 0.01$	1979.40 $\pm$ 362.73	$< 0.01$	$> 0.05$

注: *P*1 值是实验组 1 与同剂量对照组相比较; *P*2 值是实验组 2 与同剂量对照组相比较; *P*3 值是实验组 1 和实验组 2 相比较。  
万方数据

表2 导入MDR1的CBNC在含柔红霉素的培养体系中形成GM-CFU的能力( $x \pm s, n=6$ )

Tab.2 Capability of GM-CFU formed by CBNC of MDR1 transferred in daunorubicin culture system

柔红霉素质量浓度/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	GM-CFU(克隆 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 单个核细胞)		P 值
	导入 MDR1 细胞	对照细胞	
0	2249.12 $\pm$ 201.81	2468.24 $\pm$ 209.22	>0.05
0.40	1563.35 $\pm$ 361.87	947.16 $\pm$ 12.61	<0.01
0.80	1268.07 $\pm$ 116.28	763.82 $\pm$ 11.46	<0.01
1.20	368.49 $\pm$ 10.11	0	<0.01

### 3 讨论

恶性肿瘤化疗过程中,化疗药对正常细胞尤其对骨髓细胞的损伤使得化疗方案不能如期实施,从而影响肿瘤化疗的效果。目前,临床使用造血生长因子来缩短化疗后粒细胞的减少持续时间,以及用成分输血等支持疗法来度过化疗后的骨髓抑制期,但不能预防化疗导致的骨髓抑制,反复化疗还可能导致骨髓正常造血细胞储备量的减少,导致骨髓造血功能衰竭。本研究采用腺病毒载体介导的多药耐药(MDR1)基因转染脐血有核细胞方法,以增强其对化疗药物的耐受性,可望在克服肿瘤化疗过程中对骨髓细胞损伤和提高化疗疗效方面发挥一定作用。本研究拟探索一种方法,可以直接抵抗抗肿瘤药物的细胞毒作用,就是在治疗过程中,既加大化疗药物的剂量,又不损伤造血细胞,从而提高化疗效果。

脐血由于来源广泛、采集方便、造血干细胞含量丰富、免疫源性弱等优点,近年来倍受国内外研究者的重视,已被成功用来代替骨髓治疗多种血液

病和遗传性疾病<sup>[4~6]</sup>,同时也被用于恶性肿瘤放疗、化疗后的辅助治疗<sup>[7]</sup>,取得了较好的效果。由于它的诸多优点,近年来也被用作基因治疗的靶细胞。本实验用脐血有核细胞作为靶细胞,使用腺病毒载体将MDR1基因转染其中,达到抵抗化疗药物的作用。从实验结果可以看出,转染MDR1基因的脐血有核细胞对化疗药物长春新碱有明显的抵抗性( $P < 0.01$ ,见表1)。转基因细胞在无柔红霉素环境中形成GM-CFU的能力与对照细胞相近,在含柔红霉素的半固体培养基中形成GM-CFU能力显著高于对照细胞( $P < 0.01$ )。实验结果可以初步证明,使用腺病毒载体将MDR1基因转染到脐血有核细胞,可以有效的抵抗化疗药物对其损伤,如果应用于临床,将会对肿瘤化疗疗效的提高起到一定的作用。

目前,作为基因治疗的常用载体,腺病毒载体具有很多优点<sup>[8]</sup>:(1)安全性好。经临床和实验证实,无致病和致癌作用,不会引起癌基因激活;(2)宿主范围广,可以感染分裂期和非分裂期细胞;(3)病毒滴度高;(4)装载容量大。由于其病毒产量高,可以感染静止期和分裂期的细胞的特点,使之应用起来比较方便,在实际操作中,不必使用造血因子来诱导细胞进入分裂状态即可进行转染,节省了因使用造血因子带来的费用,且从本实验的结果可以看出,转染后的耐药效果比较好。

基因治疗成功主要在于选择合适的载体及适当的靶细胞。腺病毒载体由于以上优点近年来成为基因治疗应用比较广泛的载体,而脐带血由于其本身的特点也成为基因治疗靶细胞选择的重点。相信随着分子生物学技术的不断发展和腺病毒载体研究的不断完善,以及脐带血特性研究的不断深入,最终会为人类肿瘤的治疗带来希望。

### 参考文献:

- [1] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [2] 刘玉侠, 夏凤琴, 石虹, 等. LiCl 对脐血有核细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响[J]. 实用肿瘤学杂志, 1998, 12(1): 15-17.
- [3] 徐有恒, 王绮如. 造血生理学和造血细胞检测技术[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997. 257.
- [4] Gluckman E, Broxmeyer H E, Auerbach A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord from an HLA-identical sibling[J]. *N Engl J Med*, 1989, 321: 1174-1178.
- [5] Wanger J E, Kernan N A, Steinbach M, et al. Allogeneic sibling cord blood transplantation in forty-four children with malignant and non-malignant disease[J]. *Lancet*, 1995, 346: 219-223.
- [6] Vilmer E, Stekers G, Rahimy C. HLA-mismatched cord blood transplantation in a patient with advanced leukemia[J]. *Transplantation*, 1992, 53: 1155-1161.
- [7] 苏毅, 王毅, 赵碧, 等. 脐血输注对恶性肿瘤化疗后血象的影响及作用机理探讨[J]. 中国输血杂志, 1996, 9(1): 9-11.
- [8] 程金科, 林晨, 吴昊. 腺病毒载体的应用及进展[J]. 国外医学分子生物学分册, 1996, 18(4): 145-148.

(责任编辑: 杨勇)