

含两类耐药基因逆转录病毒载体的构建及在人脐血 CD34⁺细胞中的表达

杨军^① 吴英^② 马平^① 赵艳华^① 由英^①S. E. Kane^③ 毛宁^② 章扬培^①

(^①军事医学科学院野战输血研究所, ^②军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; ^③Department of Cell and Tumor Biology, City of Hope National Medical Center, Duarte, CA 91010, USA)

摘要 将耐药谱截然不同的3种耐药基因(*mdr1*, *mgmt*, *dhfr*)两两组合, 以逆转录病毒介导在人脐血 CD34⁺细胞中表达, 增强了细胞对相应两种不同类型化疗药物的抗性, 使造血细胞受到多重保护, 为研究肿瘤化疗中如何更大程度地保护正常组织, 降低药物毒副作用, 提高治疗效果提供实验基础。

关键词 肿瘤化疗 逆转录病毒 耐药基因 脐血 CD34⁺细胞

如何保护机体正常组织、特别是造血系统, 降低化疗药物的毒副作用, 是恶性肿瘤化疗研究的一大难题。研究表明, 导入单个耐药基因, 可增强靶细胞对相应一种或一类药物的抗性, 而临床上常将不同类型的化疗药物联合使用。如果能够将耐药谱截然不同的几种耐药基因联合导入造血干/祖细胞中表达, 使机体造血组织受到多重保护, 对肿瘤治疗具有重要意义。在与肿瘤化疗关系密切的耐药基因中, 多药耐药基因(*mdr1*)主要针对天然来源的疏水性药物如秋水仙素(colchicine)、紫杉醇(taxol)、阿霉素、长春新碱等; 二氢叶酸还原酶基因(*dhfr*)则主要针对抗叶酸代谢类药物氨甲喋呤(MTX)及其衍生物等; O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶基因(*mgmt*)能特异性地针对亚硝脲类药物如 ACNU, BCNU 等^[1]。它们的耐药机理完全不同, 耐药谱也不互相交叉。我们将这3种耐药基因两两组合, 构建含两类不同耐药基因的逆转录病毒载体, 导入人脐血 CD34⁺细胞, 观察转导前后细胞对多种化疗药物耐药的变化, 以期为进一步丰富肿瘤化疗和基因治疗提供理论依据和实验基础。

1 材料与方法

(i) 细胞培养。单、双嗜性逆转录病毒包装细胞株 GP+E-86, GP+envAM12 由 Arthur Bank (Columbia University, NY) 赠送, 分别用含 HXM (15 μg/mL 次黄嘌呤, 250 μg/mL 黄嘌呤, 25 μg/mL 霉酚酸, Sigma)、HXM 加潮霉素 B (200 μg/mL, Sigma) 的 10% FCS-DMEM 常规培养。

(ii) 逆转录病毒载体构建及病毒包装。人 *mgmt* cDNA^[2]、人 Ser³¹ 突变型 *dhfr* cDNA^[3] 分别由 Karran (Imperial Cancer Research Fund, UK)、Bertino (Memorial Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, US) 赠送, 利用 PCR 方法在其 5' 和 3' 端各引入 *Sal* I 和 *Xho* I 酶切位点, 分别插入含有人 *mdr1* cDNA 的逆转录病毒载体 pHaMASV^[4] 的 SV40 启动子下游, 构建了3个含不同耐药基因组合 *mdr1*, *mdr1* 和 *mgmt* 以及 *mdr1* 和 *dhfr* 的逆转录病毒载体, 以 LipofectAMINE 介导的 DNA 转染方法导入 GP+E-86, GP+envAM12 细胞中, 用 60 ng/mL 秋水仙素(Serva)筛选单、双嗜性包装细胞克隆。采用“Ping-Pong”扩增^[5]方法提高病毒滴度, 并用 NIH/3T3 放大实验检测是否有野生型辅助病毒产生。

(iii) 人脐血 CD34⁺细胞分离及体外培养. 脐血取自协和医院妇产科健康产妇分娩的正常足月儿, 用淋巴细胞分离液 ($d = 1.077$) 分离单个核细胞, 以吸附单克隆抗体-磁珠分离系统(Mini MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Germany)纯化 CD34⁺ 细胞, 取样用流式细胞仪(FACS Calibur, BD)测定 CD34⁺ 细胞纯度. 脐血 CD34⁺ 细胞体外培养体系为含 15% 马血清, 1% BSA, 1×10^{-4} mol/L β -巯基乙醇, 2mmol/L L-谷氨酰胺, 10 ng/mL rhIL-3, 10 ng/mL rhIL-6, 10 ng/mL rhTPO(均购自 Peprotech), 50 ng/mL rhSCF(Amgen 赠送)及 10 ng/mL rhFLT3L (Genzyme)的 IMDM 完全培养基, CD34⁺ 细胞浓度为 1×10^4 /mL, 接种在 24 孔板中, 于 37℃, 5%CO₂, 饱和湿度条件下培养, 每周半量换液.

(iv) 含不同耐药基因组合的逆转录病毒转染人脐血 CD34⁺细胞. 脐血 CD34⁺细胞体外培养 24 h 后, 用 500 μ L 双嗜性病毒包装细胞培养上清转染, 在含有 4 μ g/mL 鱼精蛋白的上述液体培养体系中培养, 次日重复转染过程, 连续 4 次. 收集各病毒转染组脐血有核细胞, 用单克隆抗体 MRK-16(ImmunoTech)标记细胞表面 *mdr1* 基因表达产物 p 糖蛋白, 以 FACS 测定基因转导效率.

(v) 外源基因的整合与表达鉴定. 提取各病毒转染组脐血有核细胞基因组 DNA, 分别用 *mgmt*, *dhfr* 及 *mdr1* 基因的特异性引物进行 PCR 扩增, 鉴定原病毒整合情况. 提取细胞总 RNA, 用 RT-PCR 方法鉴定 3 种耐药基因的表达情况, 以肌动蛋白(actin)特异性引物(p1: GTG ACG AGG CCC AGA GCA AGA G, p2: ACG CAG CTC ATT GTA GAA GGT GTG G)扩增确定 RNA 模板可靠性, 同时以不含逆转录酶的反应体系作对照, 排除由于混入基因组 DNA 可能带来的假阳性扩增结果.

(vi) 造血祖细胞 CFC 测试. 在 24 孔培养板中接种 1×10^4 /mL 各病毒转染组脐血有核细胞, 测定集落形成能力, 培养体系为含 30% 马血清, 1% BSA, 1×10^{-4} mol/L β -巯基乙醇, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 10 ng/mL rhIL-3, 1U/mL hEPO(Toyobo), 10 ng/mL rhG-CSF(Amgen), 50 ng/mL rhSCF 及 10 ng/mL rhGM-CSF(Glaxo)的 IMDM, 0.5 mL/孔, 加入不同药物, 药物浓度分别为秋水仙素 10 ng/mL, taxol (paclitaxel, Faulding 赠送)10 ng/mL, ACNU(Sankyo) 5 μ g/mL, MTX(Sigma) 5×10^{-8} mol/L, 于 37℃, 5%CO₂, 饱和湿度条件下培养 14 d, 计数集落总数为造血集落形成细胞(CFC)数.

2 结果

2.1 含不同耐药基因组合的

逆转录病毒包装

经 DNA 转染、病毒包装及“Ping-Pong”扩增后, 获得 3 种逆转录病毒(如图 1), 分别含有 *mdr1*(HaMASV), *mdr1* 和 *mgmt* (HaMASV*mgmt*) 以及 *mdr1* 和 *dhfr* (HaMASV*dhfr*)等不同组合的耐药基因, 其中 *mdr1* 表达由 Harvey 鼠肉瘤病

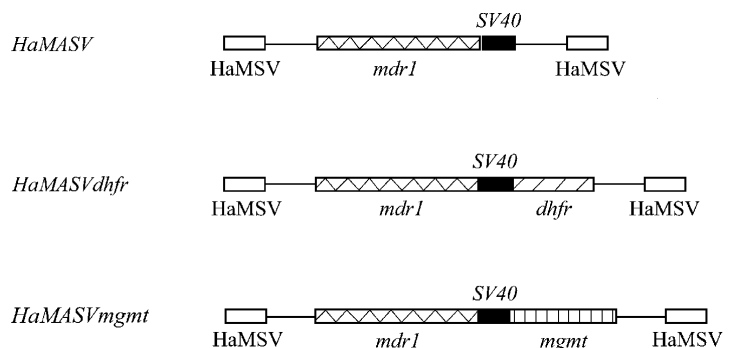


图 1 含不同耐药基因组合的逆转录病毒示意图

毒(HaMSV)上游 LTR 调控, *mgmt* 和 *dhfr* 表达分别受 SV40 启动子调控, 病毒滴度约为 5×10^4 CFU/mL, 经检测均无辅助病毒产生.

2.2 人脐血 CD34⁺细胞分离、体外培养及逆转录病毒转染

采用 Miltenyi 公司 Mini MACS 系统可快速、高效地从人脐血中分离纯化 CD34⁺细胞, 经 FACS 检测, 其纯度为 90%以上(图略), 得率为 0.4~0.6%. 联合使用 rhIL-3, rhIL-6, rhSCF, rhTPO, rhFLT3L 等细胞因子进行体外培养, 一周内脐血有核细胞总数由 1×10^4 增加到 $(5.6 \pm 0.2) \times 10^5$ ($n = 3$), 晚期造血祖细胞 CFC 集落总数由 353.3 ± 30.6 增加到 473.3 ± 40.4 ($n = 3, P < 0.05$). 在该培养条件下, 脐血 CD34⁺细胞经各组病毒上清连续转染 4 次, 于第 1 周培养结束后收取细胞, 分别记为 *mdr1* 组、*mdr1/mgmt* 组和 *mdr1/dhfr* 组, 以空包装细胞上清转染组作为空白对照.

2.3 FACS 分析基因转导效率

用 FACS 分析各病毒转染组脐血有核细胞表面的 *mdr1* 基因表达产物 p 糖蛋白, 测定基因转导效率, 结果表明转导细胞 *mdr1* 表达水平升高, 测得基因转导效率为 7%~20%左右(如图 2 及表 1).

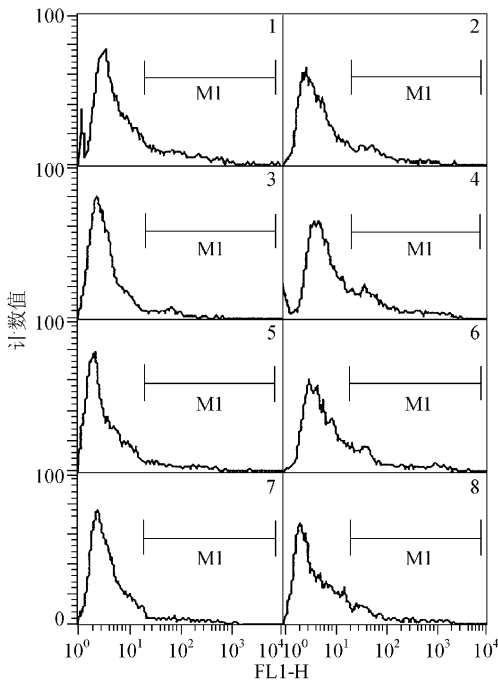


图 2 FACS 测定基因转导效率

1,2——对照组, 3,4——*mdr1* 组, 5,6——*mdr1/mgmt* 组, 7,8——*mdr1/dhfr* 组. 各组左侧图形, 即 1, 3, 5, 7 为相应未加一抗之阴性对照

表 1 FACS 测定基因转导效率

标记		百分率	平均值
1	All	100.00	5.58
	M1	10.81	64.21
2	All	100.00	5.04
	M1	11.45	46.86
3	All	100.00	3.14
	M1	2.85	49.17
4	All	100.00	9.27
	M1	22.74	63.59
5	All	100.00	3.21
	M1	3.89	67.86
6	All	100.00	7.04
	M1	16.08	55.33
7	All	100.00	3.71
	M1	3.38	69.28
8	All	100.00	4.55
	M1	10.78	52.21

2.4 病毒转染细胞中外源基因检测

提取各病毒转染组细胞基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 分别检测到相应耐药基因的存在(图略), 表明以逆转录病毒为介导, 各个耐药基因已联合导入脐血有核细胞中. 提取细胞总 RNA, 以 RT-PCR 检测细胞中外源基因表达情况(如图 3), 所有样品中均检测到 *actin* mRNA (≈ 120 bp), 表明所提取的细胞总 RNA 模板的完整性; 3 个病毒转染组均检测到 *mdr1* mRNA (≈ 415 bp), 转导 *mdr1/mgmt* 以及 *mdr1/dhfr* 的细胞分别检测到 *mgmt* mRNA (≈ 670 bp)和 *dhfr* mRNA (≈ 600 bp), 表明联合导入的多种耐药基因已在脐血有核细胞中成功表达.

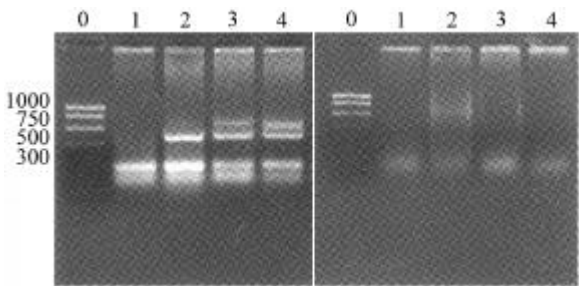


图 3 RT-PCR 鉴定外源基因表达

0——DNA marker, 1——对照组, 2——*mdr1* 组, 3——*mdr1/mgmt* 组, 4——*mdr1/dhfr* 组. 右侧电泳图为相应未加逆转录酶的阴性对照

2.5 病毒转染细胞体外祖细胞耐药集落(CFC)测试

我们采用属于 *mdr1* 耐药谱的药物秋水仙素和紫杉醇、*mgmt* 耐药谱的药物 ACNU 以及 *dhfr* 耐药谱的药物 MTX, 检测了基因转导前后造血祖细胞对药物耐受能力的变化(如图 4). 结果表明多种耐药基因已联合导入脐血造血祖细胞中, 并使细胞对相应类型药物的抗性显著增强, 对秋水仙素、紫杉醇、ACNU 和 MTX 的抗性集落百分数较对照组分别增加了约 2.4~4.7, 7.9~13.2, 7.2 及 10.2 倍 ($P < 0.05$); 导入两种耐药基因的细胞对相应两类药物的抗性都得到了增强, 证明两类不同耐药基因的表达可拓宽细胞的耐药谱, 使造血细胞受到双重保护.

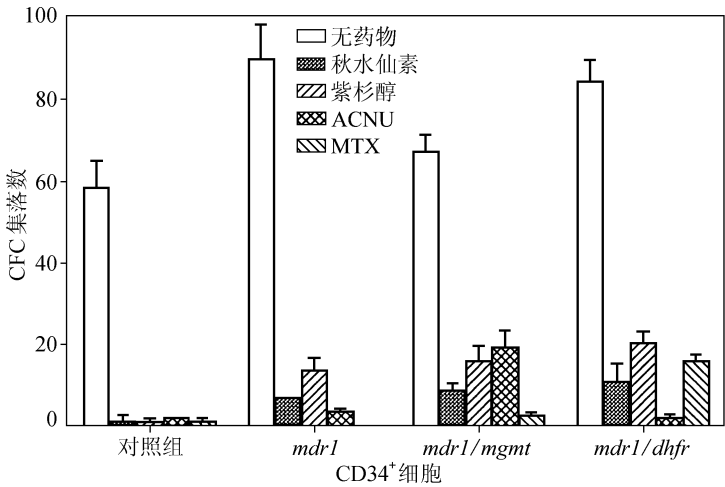


图 4 病毒转染的脐血 CD34⁺细胞 CFC 耐药测试

3 讨论

现已公认, 人早期造血干/祖细胞存在于 CD34⁺亚群中, 而 CD34⁺亚群在外周血和骨髓中的含量仅有 0.01%~1%, 在脐血中也只占 0.1%左右, 由于各种实体瘤细胞表面不表达 CD34 抗原, 因此 CD34⁺细胞是造血干/祖细胞基因转移及体内移植最安全的靶细胞. 脐血来源丰富, 收集方法简便, 其中含有高浓度的造血干细胞及各系祖细胞、基质细胞与造血因子, 增殖能力旺盛, 最适合于造血干/祖细胞基因转移的研究.

目前, 关于逆转录病毒介导单个耐药基因导入人 CD34⁺细胞的研究已有很多, 如 *dhfr* 基因导入脐血 CD34⁺细胞^[6]、*mgmt* 基因导入人外周血 CD34⁺细胞^[7]、*mdr1* 基因导入骨髓 CD34⁺

细胞^[8]等, I期临床实验结果初步显示, 以逆转录病毒介导入 *mdr1* 基因转移的恶性肿瘤基因治疗方案是安全、可行的^[9], 提高了转导细胞对相应一种或一类化疗药物的抗性, 但迄今尚未见到将多个耐药基因联合导入人 CD34⁺细胞的有关报道. 我们的初步研究成果表明, 将两种耐药基因联合导入人的造血细胞, 可增加细胞对两种不同类型化疗药物的抗性, 为临床肿瘤化疗过程中如何更大程度地保护正常组织提供了新思路. 但同时也应注意到, 由于 *mdr1* cDNA 片断较大(≈ 4.1 kb), 加之双基因插入, 使逆转录病毒包装效率下降, 病毒滴度偏低, 导致基因转导效率不高, 通过优化载体结构及病毒转染方式等, 可以在某种程度上改善这种状况. 实际上, 人类造血干/祖细胞基因治疗的最大障碍就在于基因转导效率低, 文献报道的体内移植后最高转导效率仅为 5%左右, 将耐药基因、特别是多种耐药基因联合导入造血干/祖细胞, 有可能使基因转导细胞通过体内药物筛选得到富集, 从而突破基因转导效率的瓶颈, 开拓耐药基因在肿瘤基因治疗研究中的新应用.

致谢 本工作为国家“八六三”高科技发展计划重点项目基金(批准号: BH-03-05-01)资助项目.

参 考 文 献

- 1 杨 军, 陈建敏, 章扬培. O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶基因表达提高肿瘤细胞的烷化抗性. 科学通报, 1996, 41(3): 253~255
- 2 Rydberg B, Spurr N, Karran P. cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase cDNA expression in *Escherichia coli* and gene expression in human cells. J Biol Chem, 1990, 265: 9563~9569
- 3 Li M, Banerjee D, Zhao S C, et al. Development of a retroviral construct containing a human mutated dihydrofolate reductase cDNA for hematopoietic stem cell transduction. Blood, 1994, 83: 3403~3408
- 4 Metz M Z, Best D M, Kane S E. Harvey murine sarcoma virus/MDR1 retroviral vectors: Efficient virus production and foreign gene transduction using MDR1 as a selectable marker. Virology, 1995, 208: 634~643
- 5 Bodine D M, McDonagh K T, Brandt S J, et al. Development of a high-titer retrovirus producer cell line capable of gene transfer into rhesus monkey hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:3738~3742
- 6 Flasshove M, Banerjee D, Leonard J P, et al. Retroviral transduction of human CD34⁺ umbilical cord blood progenitor cells with a mutated dihydrofolate reductase cDNA. Human Gene Ther, 1998, 9: 63~71
- 7 Reese J S, Koc O N, Lee K M, et al. Retroviral transduction of a mutant methylguanine DNA methyltransferase gene into human CD34 cells confers resistance to O⁶-benzylguanine plus 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:14088~14093
- 8 Ward M, Richardson C, Pioli P, et al. Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene in human CD34⁺ cells. Blood, 1994, 84:1408~1414
- 9 Hesdorffer C, Ayello J, Ward M, et al. Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. J Clin Oncol, 1998, 16(1): 165~172

(1999-07-01 收稿, 1999-11-08 收修改稿)