

# DHFR-CD双耐药基因增强转基因小鼠对大剂量化疗毒性的抵御能力

路平, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚

路平, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科 辽宁省沈阳市 110001

赵实诚, 美国纽约 Memorial Sloan-Kettering 癌症中心 10021

路平, 男, 1964-02-13 生, 安徽省萧县人, 汉族. 1998 年中国医科大学博士, 副教授, 主要从事消化道肿瘤的诊治研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30471678

项目负责人: 路平, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科. lupingp1999@163.com

收稿日期: 2004-11-12 接受日期: 2004-11-29

## Protection against toxicity of high dose chemotherapy in mice transfected with double-mutant dihydrofolate reductase-cytidine deaminase gene

Ping Lu, Fen Jin, Buo Chen, Fan Yao, Shu-Bao Wang, Jun-Qing Chen, Hui-Mian Xu, Shi-Cheng Zhao

Ping Lu, Fen Jin, Buo Chen, Fan Yao, Shu-Bao Wang, Jun-Qing Chen, Hui-Mian Xu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Shi-Cheng Zhao, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, New York, New York 10021, U.S.A

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30471678

Correspondence to: Dr. Ping Lu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, 155 Nanjing Beijie, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. Lupingp1999@163.com  
Received: 2004-11-12 Accepted: 2004-11-29

### Abstract

**AIM:** To explore the feasibility of transferring dihydrofolate reductase- (DHFR) gene and cytidine deaminase (CD) fusion gene into mouse bone marrow (BM) cells to induce resistance to high dose methotrexate (MTX) and cytosine arabinoside (Ara-C), and to improve the tolerance of myelosuppression following combination chemotherapy.

**METHODS:** Human double-mutant DHFR-CD fusion gene was transferred into mouse BM cells by retroviral vector Granulocyte-macrophage colony-forming unit (CFU-GM) assay was performed for retrovirally infected and drug treated mouse BM cells. DNA was extracted from mouse BM, and the expression of drug resistant genes was examined by PCR.

**RESULTS:** Drug resistant colonies were formed by donor mouse BM cells co-cultured with the retrovirus producing cells, as well as the BM cells from recipient mice transplanted with the fusion gene transfected BM cells (CFU-

GM of donor mice was 14%,  $\chi^2 = 42.55$ ,  $P < 0.01$ ; CFU-GM of recipient mice was 20%,  $\chi^2 = 44.26$ ,  $P < 0.01$ ). The drug resistance to both MTX and Ara-C was also increased in the recipient mice. The survival rate of gene transferred mice was significantly higher compared with the control mice  $\chi^2 = 7.42$ ,  $P < 0.01$ . Expression of the DHFR-CD fusion gene in the transfected mice was confirmed by PCR.

**CONCLUSION:** Double drug resistant genes can be integrated and expressed in mouse bone marrow cells; furthermore, they can increase the drug resistance to MTX and Ara-C.

**Key Words:** Dihydrofolate reductase; Cytidine deaminase; Gene therapy

Lu P, Jin F, Chen B, Yao F, Wang SB, Chen JQ, Xu HM, Zhao SC. Protection against toxicity of high dose chemotherapy in mice transfected with double-mutant dihydrofolate reductase-cytidine deaminase gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):464-467

### 摘要

**目的:** 探讨将人双突变的二氢叶酸还原酶基因(DHFR)和胞苷脱氨基酶基因(CD)同时导入小鼠骨髓细胞中, 观察小鼠对大剂量氨甲喋呤(MTX)和阿糖胞苷(Ara-C)的耐受性, 研究骨髓耐受联合化疗的可行性。

**方法:** 以反转录病毒为载体, 将人双突变的二氢叶酸还原酶基因(DHFR)和胞苷脱氨基酶基因(CD)通过共培养转染入小鼠骨髓干细胞, 观察共培养后的骨髓细胞及受体小鼠骨髓移植后经药物处理后的骨髓细胞耐 MTX 及 Ara-C CFU-GM 生成情况; 转基因小鼠骨髓细胞提取的 DNA, 用 PCR 检测转基因小鼠骨髓细胞耐药基因的表达; 观察转基因小鼠经大剂量 MTX 和 Ara-C 化疗后血象、体质量及生存率的变化。

**结果:** 骨髓移植前共培养后供体的骨髓细胞和骨髓移植后受体含有耐药基因(SFG-F/S-CD)的骨髓细胞均有耐药克隆的形成(14%, 20%;  $\chi^2$  分别为 42.55, 44.26;  $P < 0.01$ ), 并明显增加了对 MTX 和 Ara-C 的耐受; 与对照组比较含双耐药基因组动物经大剂量化疗后, 生存率明显提高( $\chi^2 = 7.42$ ,  $P < 0.01$ ), 血象逐渐恢复正常; 转基因小鼠骨髓细胞经 PCR 检测, 显示有 F/S-CD 基因条带; 耐药基因转染后小鼠骨髓对 MTX 和 Ara-C 的耐受明显增加。

**结论:** 双耐药基因可以进入小鼠骨髓细胞并且获得共表达, 提高了造血细胞对 MTX 和 Ara-C 的耐药性。

**关键词:** 二氢叶酸还原酶基因; 胞苷脱氨基酶基因; 基因疗法

路平, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚. DHFR-CD 双耐药基因增强转基因小鼠对大剂量化疗毒性的抵御能力. 世界华人消化杂志 2005;13(4):464-467

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/464.asp>

## 0 引言

骨髓抑制限制了化疗药物的应用, 使之难以达到治愈或抑制肿瘤生长的剂量. 如何提高骨髓等正常细胞对化疗药物的耐受性, 减少化疗的毒副作用, 成为肿瘤化疗研究的焦点<sup>[1]</sup>. 我们将双突变的人二氢叶酸还原酶基因(dihydrofolate reductase, DHFR)和胞苷脱氨基酶基因(cytidineaminase, CD)同时导入小鼠骨髓细胞中, 观察小鼠对大剂量甲氨喋呤(methotrexate, MTX)和阿糖胞苷(cytosine arabinoside, Ara-C)的耐受性, 结果如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 含耐药基因的反转录病毒载体 SFG-CD(含人突变的胞嘧啶脱氨酶 mCD), SFG-F/S-NeoR(含双突变“Phe22-Ser31”的二氢叶酸还原酶 dmDHFR 和耐新霉素基因 NeoR), SFG-F/S-CD(含双突变的二氢叶酸还原酶 dmDHFR 与胞嘧啶脱氨酶), 转染入病毒产生细胞(amphotropic packaging cell, GP-Am12, 简称 Am12), 分别构成 AM12-SFG-F/S-CD, 简称为 SFG-F/S-CD(图1). 以上载体及细胞系由赵实诚教授提供. BALB/c ♂ 小鼠 8-10 周龄, 行 5-FU 尾静脉注射(150 mg/kg), 该药可杀伤成熟粒细胞而不影响造血祖细胞, 注射 4 d 后取其股骨、胫骨的骨髓细胞  $(2-5) \times 10^7$ , 制成单细胞悬液. 计数骨髓有核细胞总数, 使骨髓有核细胞和转基因之病毒产生细胞按 1:1 的比例, 置于含 200 mL/L 小牛血清和 10 g/L 谷氨酰胺, 100 g/L WEHI 条件培养液中, 分两组(SFG-F/S-CD, Am12)在 37°C 50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下共培养 48 h. 含耐药基因病毒产生细胞系在共培养前 2 h 照射 1.5 Gy. 共培养后收集骨髓细胞, 制成细胞悬液(在 PBS 平衡液中作为骨髓移植及 CFU-GM 培养用). 受体小鼠在骨髓移植前均经 8 Gy 致死量照射, 以完全破坏其自身造血功能, 观察被输入的造血细胞在体内增生及血液的耐药情况. 小鼠根据体质量随机分为两组: A 组转染 SFG-F/S-CD; B 组阴性对照组, 被输入的骨髓细胞仅与 AM12 共培养不含耐药基因. 每只小鼠根据其组别, 在致死量照射后 12 h 尾静脉注射  $2 \times 10^6$  骨髓细胞. 骨髓移植后 4 wk 每只小鼠 ip MTX(20 mg/kg) 和 Ara-C(30 mg/kg) 连续 4 d. 期中及注射后(25 d, 30 d, 35 d, 40 d 及 45 d) 观察血

象、体质量及生存率的变化。

**1.2 方法** 为了解造血干细胞同含耐药基因的病毒产生细胞共培养后, 在小鼠体外体内的基因表达和耐药 CFU-GM 生成情况(检测共培养后的骨髓细胞行体外实验, 受体小鼠骨髓移植和药物处理 45 d 后取骨髓细胞行体内实验). 培养分为两组: A 组加 MTX 及 Ara-C, Ara-C 与 MTX 的终浓度分别为 20 nmol/L 及 500 nmol/L; B 组为对照组, 不加药物. 每组共 6 mL 培养液含骨髓细胞  $3 \times 10^6$ , 平分为 3 个平皿进行培养, 培养液为 IMDM, 含 10 g/L 甲基纤维素, 100 mL/L 胎牛血清, 150 g/L WEHI 条件培养液(小鼠造血增生因子), 10 g/L 碳酸氢钠, 10 g/L 丙酮酸钠, 10 g/L 必需与非必需氨基酸, 5 g/L 多种维生素及 10 万单位/L 青链霉素等, 胎牛血清在加入混合培养液前经用 1 mg/L 胸苷酸磷酸 37°C 1 h 处理, 以减少细胞外磷酸腺苷水平以至减少集落本底的产生. 培养皿置含 50 mL/L CO<sub>2</sub> 37°C 培养箱 7-10 d 后计数集落, 进行结果分析. 取经基因转染及药物处理后小鼠骨髓细胞, 按饱和氯化钠法提取 DNA. 50 μL 的 PCR 反应体系终浓度为 0.125 mmol/L dNTPs. 两种引物 0.5 μmol/L, 0.05 MU/L Taq DNA 聚合酶, 模板 DNA 150 ng. PCR 扩增条件是: 94°C 变性 10 min, 94°C 变性 1 min, 58°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 共 40 循环之后 72°C 延伸 10 min. PCR 产物在 0.8 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳, 照像分析. 检测该试验耐药基因 SFG-F/S-CD 的引物序列两端设计为: 5' -ACTTT GAAAGTGACACGTTT-3' 5' -GCCAACTCTCTCATGACTTG C-3' 扩增结果分别为 498 bp.

**统计学处理** 生存分析应用 Log Rank 检验(SPSS10.0 统计软件), 计数资料行  $\chi^2$  检验, 计量资料经 *t* 检验.

## 2 结果

**2.1 小鼠骨髓对 MTX 和 Ara-C 的耐受性** 小鼠注射 MTX 和 Ara-C 后, 转染耐药基因的动物与对照相比, 动物存活率明显提高、体质量、白细胞和血小板恢复较快.

**2.1.1 转染耐药基因后 F/S-CD 组小鼠在大剂量 MTX 和 Ara-C 处理后 45 d 存活率达 67% (4/6), 对照组无存活, 经 Log Rank 检验 (SPSS10.0 统计软件)  $\chi^2=7.42$ ,  $P<0.01$ . 小鼠注射 MTX 和 Ara-C 后, 体质量、白细胞和血小板均开始下降, F/S-CD 组小鼠血象、体质量下降幅度较小而恢复较快, 45 d 体质量、白细胞和血小板均恢复正常(图 2-4).**

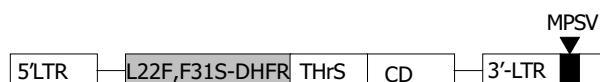


图1 SFG-F/S-CD 反转录病毒载体的构建。

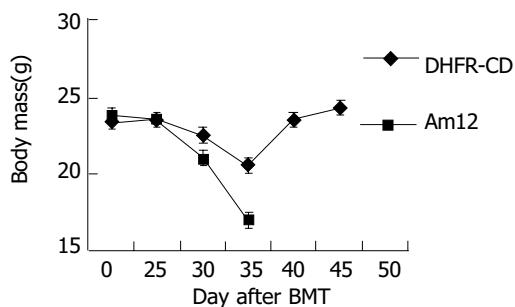


图2 两组动物药物处理后体质量变化情况. 药物处理后 Am12 组与 F/S-CD 组体质量比较: 30 d,  $t = 3.82$ ,  $P < 0.01$ ; 35 d,  $t = 5.92$ ,  $P < 0.001$ .

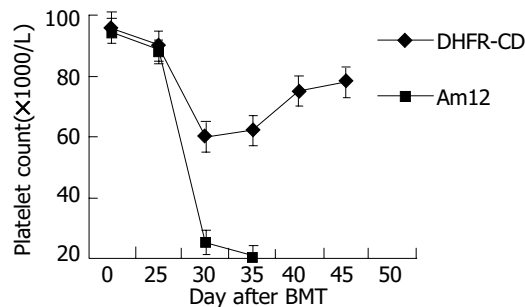


图4 各组动物药物处理后血小板变化情况. 药物处理后 Am12 组与 F/S-CD 组血小板比较: 30 d,  $t = 19.56$ ,  $P < 0.001$ ; 35 d,  $t = 27.71$ ,  $P < 0.001$ .

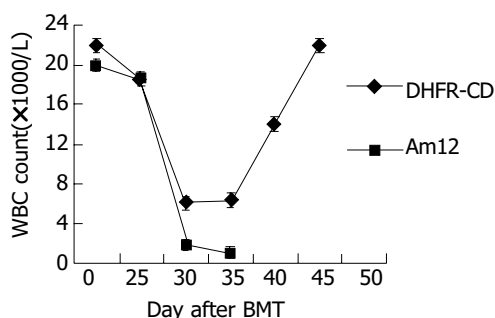


图3 各组动物药物处理后白细胞变化情况. 药物处理后 Am12 组与 F/S-CD 组 WBC 比较: 30 d,  $t = 130.64$ ,  $P < 0.001$ ; 35 d,  $t = 168.56$ ,  $P < 0.001$ .

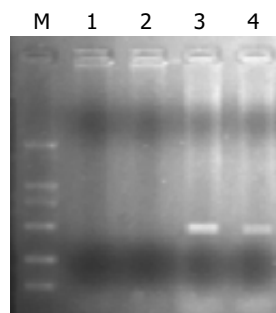


图5 小鼠骨髓细胞 DNA PCR 产物琼脂糖电泳结果. M: Marker DL2000; 1, 2: 对照组; 3, 4: 转染耐药基因 DHFR-CD 组显示 498 bp 条带.

2.2 转染基因在小鼠骨髓细胞中的表达 骨髓移植前供体的骨髓细胞和骨髓移植后受体的骨髓细胞含有耐药基因组均有耐药克隆的形成(表1). 骨髓移植前对照组注射终浓度为 20 nmol/L 和 500 nmol/L 的 MTX 和 Ara-C 后, 对两种药物的耐药克隆分别为 9% 和 0, 含双耐药基因 F/S-CD 组为 56% 和 22%; 若两药同时加入两组耐药克隆分别为 0 和 14%, 说明无耐药基因对两种药物的加入无耐药性, 而具有双耐药基因组则有一定程度的耐受性. 骨髓移植及化疗药物筛选后转染耐药基因组耐药克隆形成略有增加, 对照组分别为 7% 和 0, F/S-CD 组为 60% 和 26%; 两药同时加入两组耐药克隆分别为 0 和 20%. 转基因小鼠骨髓细胞提取的 DNA, 经 PCR 检测, 显示有 F/S-CD 基因条带, 说明动物耐药基因转染已得到分子生物学表达(图 5).

表1 小鼠骨髓细胞骨髓移植前后耐药克隆形成(CFU-GM)

分组	总克隆数		耐 Ara-C+MTX 克隆	
	骨髓移植前	骨髓移植后	骨髓移植前(体外)	骨髓移植后(体内)
AM12	278	230	0	0
F/S-CD	318	281	45(14%) <sup>b</sup>	56(20%) <sup>d</sup>

$\chi^2 = 42.55$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs AM12;  $\chi^2 = 44.26$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs AM12.

### 3 讨论

如何提高骨髓造血细胞对化疗的耐受性, 一直是近

年来人们所关注的焦点. 多药耐药基因(multiple drug resistance, MDR) 是人们最早关注的肿瘤药物耐药基因<sup>[2]</sup>. 应用多药耐药基因(MDR1) 转染保护骨髓造血细胞的基因治疗项目已进入临床试验阶段. 一些化疗药物耐药基因, 在体外及小鼠研究中证实对正常细胞具有化疗保护作用<sup>[3]</sup>. 理想的耐药基因应具备以下条件<sup>[4]</sup>: (1) 提供多种药物耐药而非单一药物; (2) 无免疫原性; (3) 治疗基因片段较小; (4) 该耐药基因耐特异药不宜毒性过大, 如一些学者认为 MGMT 和 ALDH 基因作用的烷化剂等化疗药物毒性过大<sup>[5]</sup>; (5) 基因转染无突变及癌变产生. 近年来的实验研究证实, 二氢叶酸还原酶基因(dihydrofolate reductase, DHFR)<sup>[6-7]</sup> 及胞苷脱氨酶基因(cytidine deaminase, CD)<sup>[8]</sup> 基本具备上述条件.

骨髓造血干细胞具有自我更新及定向分化的能力而成为基因治疗的理想靶细胞<sup>[9]</sup>. 耐药基因转导入正常造血干细胞是肿瘤基因治疗的一种策略. 逆转录病毒载体能实现在基因组内插入整合, 而成为造血干细胞基因导入的首选载体. 目前近 70% 的临床基因治疗试验均由逆转录病毒介导, 本实验用逆转录病毒转染小鼠骨髓细胞耐药克隆达 20%.

双耐药基因导入造血干细胞为消除联合化疗导致的骨髓抑制提供了可能性, 较单耐药基因的转导更有意义. 我们用逆转录病毒载体将双耐药基因转导深入到动物实验水平, 进一步研究了 dmDHFR-CD 耐药基因转染后对小鼠造血功能的保护作用. 结果表明转

基因小鼠骨髓对 MTX 和 Ara-C 的耐受明显增加, 实验组血象逐渐恢复, 而对照组造血则被抑制; 实验组小鼠体质量和生存期明显高于对照组. PCR 分析, 转导后的小鼠骨髓细胞具有双耐药基因表达. 本研究证实逆转录病毒载体确能将两个外源耐药基因导入小鼠造血干细胞并同时表达产生药物抗性, 为进一步的耐药基因保护治疗动物实验打下了基础, 为临床超剂量化疗以求最大限度杀伤肿瘤细胞并能多次重复化疗提供了一个较好的动物模型, 可能为提高肿瘤的有关化疗疗效提供有用的参考资料. 但如何选择更合适或更多的耐药基因联合转导, 耐药基因导入造血干细胞后是否能长期稳定表达, 以及对靶细胞的生理功能有何影响等问题均有待于进一步的研究.

#### 4 参考文献

- 1 Takebe N, Zhao SC, Ural AU, Johnson MR, Banerjee D, Diasio RB, Bertino JR. Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34<sup>+</sup>-enriched peripheral blood progenitor cells. *Cancer Gene Ther* 2001;8:966-973
- 2 Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, Gottesman M, Pastan I, Cline A, Nienhuis AW. Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science* 1992;257:99-103
- 3 Capioux GM, Budak-Alpdogan T, Takebe N, Mayer-Kuckuk P, Banerjee D, Maley F, Bertino JR. Retroviral transduction of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase fusion gene into murine marrow cells confers resistance to both methotrexate and 5-fluorouracil. *Hum Gene Ther* 2003;14:435-446
- 4 Eliopoulos N, Al-Khaldi A, Beausejour CM, Momparler RL, Momparler LF, Galipeau J. Human cytidine deaminase as an ex vivo drug selectable marker in gene-modified primary bone marrow stromal cells. *Gene Ther* 2002;9:452-462
- 5 Beausejour CM, Eliopoulos N, Momparler L, Le NL, Momparler RL. Selection of drug-resistant transduced cells with cytosine nucleoside analogs using the human cytidine deaminase gene. *Cancer Gene Ther* 2001;8:669-676
- 6 Asai S, Miyachi H, Kobayashi H, Takemura Y, Ando Y. Large diversity in transport-mediated methotrexate resistance in human leukemia cell line CCRF-CEM established in a high concentration of leucovorin. *Cancer Sci* 2003;94:210-214
- 7 Banerjee D, Mayer-Kuckuk P, Capioux G, Budak-Alpdogan T, Gorlick R, Bertino JR. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim Biophys Acta* 2002;1587:164-173
- 8 Sweeney CL, Frandsen JL, Verfaillie CM, McIvor RS. Trimetrexate inhibits progression of the murine 32Dp210 model of chronic myeloid leukemia in animals expressing drug-resistant dihydrofolate reductase. *Cancer Res* 2003;63:1304-1310
- 9 张艳丽, 杨克恭, 陈松森. 造血干细胞基因治疗研究进展. *生命的化学* 2002;22:253-544

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

### 世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003 年版): 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 地区分布数 26, 机构数 138, 国际论文比 0.03, 基金论文比 0.27. 2002 年度各学科影响因子较高的 3 种期刊排名: 世界华人消化杂志影响因子 1.926, 临床医学排名第 2 位. 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊排名: 世界华人消化杂志总被引频次 4151, 排名第 1 位. 世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004 年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊, 2001 年度第一届中国百种杰出学术期刊, 2003 年度中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 从 2005 年开始, 世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊, 大 16 开, 160 页, 每月 1, 15 日出版, 24 元/期, 全年 24 期, 邮发代号 82-262, 北京报刊发行局发行. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)