

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0082-03

腺相关病毒载体介导外源基因导入人外周血干细胞的研究

胡舜英, 冯 茹, 杨 艺, 李黎波, 周淑芸(第一军医大学附属南方医院血液病研究室, 广州 510515)

[摘 要] **目的:** 观察腺相关病毒载体介导外源基因导入人外周血干细胞的转染效率及表达。**方法:** 本文采用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体介导的基因转移方法, 将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因和人多药耐药基因(multi-drug resistance, MDR1)导入人外周造血干/祖细胞, 并对转染效率和转基因造血细胞的耐药性进行了初步研究。**结果:** rAAV/GFP感染CD34阳性细胞后, 在荧光显微镜下观察, 约30%细胞中可见绿色荧光。将rAAV/MDR1重组病毒感染CD34阳性细胞, 经PCR和MTT法证实, 导入MDR1基因的CD34阳性细胞对秋水仙素的耐药性与未导入MDR1基因的细胞有明显差异。**结论:** 腺相关病毒载体能有效地将外源基因导入外周血CD34阳性细胞, 并可在其中有效地表达。

[关键词] 腺相关病毒; MDR1; GFP; 基因转染; 造血细胞

[中图分类号] Q786; R73-36 [文献标识码] A

Transferring Novel Gene into Human Hematopoietic Cells by Adeno-Associated Virus

HU Shun-ying, FENG Ru, YANG Yi, LI Li-bo, ZHOU Shu-yun (Hematology Department of Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of MDR1 and GFP in the human hematopoietic cells mediated by adeno-associated virus. **Methods:** The GFP gene was transferred into the human hematopoietic cells by AAV vectors and created strong visible fluorescence by purely molecular biological means. Using adeno-associated virus vectors, we have transferred human mdr-1 gene into human hematopoietic cells and investigated the drug resistance of human hematopoietic cells modified with mdr-1 gene. PCR analysis confirmed that mdr1 cDNA had been successfully transferred into the human hematopoietic cells. An assay of MTT proved that the human hematopoietic cells modified by mdr1 gene had resistance to colchicine. **Results:** It was about 30% of the hematopoietic cells that expressed the green fluorescent proteins. The resistance of hematopoietic cells was increased parently when the cells were infected by the crude virus stocks. **Conclusion:** It is conducted that the AAV vector could successfully transfer the foreign gene into the human hematopoietic cells. The cells modified with mdr1 gene have increased the resistance to drugs.

[Key words] adeno-associated virus; human mdr1 gene; green fluorescent proteins; gene transfer; human hematopoietic cells

* 在基因治疗中, 具有自我复制、自我更新及分化能力的造血干细胞是重要的靶细胞之一, 但存在的主要障碍是如何将外源基因导入处于静止状态的造血干细胞中。而在为人类疾病基因治疗提供一种安全、有效的载体的研究中, 腺相关病毒载体日益受到重视^[1]。本研究将rAAV/GFP(病毒所赠)感染CD34阳性细胞, 在荧光显微镜下观察, 初步检测了rAAV感染CD34阳性细胞的效率, 约30%细胞中可见绿色荧光。将rAAV/MDR1重组病毒感染CD34阳性细胞, 经PCR和

MTT法证实, 经AAV载体介导, 可将MDR1基因导入CD34阳性细胞, 转基因细胞对秋水仙素耐药性比未转基因细胞有明显增强。

1 材料与方 法

* [基金项目] 国家自然科学基金(39270826)资助

[作者简介] 胡舜英(1971-), 女, 安徽黄山人, 硕士, 主要从事肿瘤生物治疗的研究, 现为空军广州医院主治医师。

1.1 病毒、质粒、细胞、试剂来源

1.1.1 载体(AAV), 辅助质粒(Ad8), 辅助病毒(Ad5)和重组绿色荧光蛋白病毒(rAAV/GFP)由中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验赠送。

1.1.2 PSFMDR1 质粒, 由军事医学科学院放射医学研究所实验血液学研究室赠送。

1.1.3 人外周血单个核细胞(第一军医大学南方医院血液病研究室提供)来源于集落刺激因子动员后的健康供者或患者。

1.1.4 主要试剂

PCR 引物(上海生工公司合成), 细胞因子 SCF、IL-3、IL-6(DAKO 公司), 单抗(BD 公司), MiliMac3 试剂盒(Miltenyi Biotec 公司)。

1.2 重组 MDR1 腺相关病毒(rAAV/MDR1)的构建^[2]。

1.3 人外周血 CD34 阳性细胞的纯化及体外培养体系

采用 MiniMACS(试剂盒)免疫磁性分离法纯化外周血单个核细胞, 得到纯度较高的 CD34 阳性细胞。其体外培养体系中包括 DMEM、CD34($10^3 \sim 10^5/\text{ml}$)、胎牛血清(10%~15%)、IL-3(10 ng/ml)、IL-6(50 ng/ml)、SCF(100 ng/ml)。

1.4 rAAV/GFP 重组病毒感染 CD34 阳性祖细胞。

纯化后的 CD34 阳性细胞在体外培养 24 h, 将 rAAV/GFP 重组病毒感染外周血干祖细胞, 继续培养 48 h, 在荧光显微镜下观察 GFP 在 CD34 阳性细胞中的表达。

1.5 rAAV/MDR1 重组病毒感染 CD34 阳性祖细胞及 PCR 检测

纯化后的 CD34 阳性细胞在体外培养 24 h, 将 rAAV/MDR1 重组病毒与 CD34 阳性细胞继续共培养 24 h, 提取细胞 DNA, 进行 PCR 检测。反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共 30 个循环。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.6 rAAV/MDR1 重组病毒感染 CD34 阳性祖细胞及秋水仙素加压培养

纯化后的 CD34 阳性细胞在体外培养 24 h, 将 rAAV/MDR1, rAAV/GFP 重组病毒分别与 CD34 阳性细胞继续共培养 24 h, 用秋水仙素加压培养(秋水仙素浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)至第 4 天, 用 MTT 法检测细胞活力。

2 结果

2.1 GFP 在 CD34 阳性细胞中的表达

rAAV/GFP 重组病毒与外周血干祖细胞共培养 48

h 后, 在荧光显微镜下观察, 约在 20%~30% 的细胞中, 可见绿色荧光(见图 1)。

图 1 GFP 在 CD34 阳性细胞中的表达

Fig. 1 GFP expression in CD34⁺ cells($\times 40$)

2.2 PCR 检测 CD34 阳性细胞中的 MDR1 基因

扩增片段为 167 bp, 与预期大小相符(见图 2)。

图 2 MDR1 酶切鉴定

Fig. 2 PCR analysis of *mdr1* cDNA in CD34⁺ cells infected with extract of 293 cells, which had been transfected with rAAV/MDR1

1: DNA molecular marker; 2: PCR product without infection
3: PCR product with infection

2.3 MTT 法检测秋水仙素加压培养后的转基因及未转基因 CD34 阳性细胞活性

运用 SPSS 统计软件, 对 3 组(各 9 例)的光密度值进行统计分析, 结果如下: 未转基因组的光密度值($\bar{x} \pm s$)为 0.402 ± 0.020 , rAAV/GFP 组为 0.401 ± 0.026 , rAAV/MDR1 组者则为 0.469 ± 0.062 。

上述 3 组数据进行方差齐性检验, $P = 0.017$, 说明方差不齐。根据方差不齐的两两比较, 采用 TAMHANE/ST2 法进行方差分析, 未转基因组与 rAAV/GFP 组比较 $P > 0.05$, 说明 2 组 OD 值有无明显差异, 未转基因组、rAAV/GFP 组分别与 rAAV/MDR1 组比较, $P <$

0.05,说明上述两两之间 OD 值有差异。提示转 MDR1 基因的 CD34 阳性细胞对秋水仙素的耐药性比未转基因组及转 GFP 基因的 CD34 阳性细胞对秋水仙素的耐药性强。

3 讨论

在一些肿瘤的化疗过程中,化疗药物对骨髓的抑制作用严重影响了疾病的治疗效果。目前临床常使用造血因子来缩短化疗后粒细胞持续减少时间以及成分输血及其他的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。多药耐药基因(MDR1)编码的 P-170 糖蛋白在造血组织中低表达^[3]。人类造血干/祖细胞中的 MDR1 基因表达水平不足以对抗化疗药物引起的造血功能抑制。如将 MDR1 基因转移到人造血干/祖细胞中表达,则可直接抵抗抗肿瘤药物的细胞毒性作用,不仅可以加大化疗剂量,而且可以增加化疗次数,缩短化疗周期,从而提高化疗效果。

逆转录病毒转染动物骨髓造血细胞已获得成功,但因为有增殖能力的干祖细胞多处于非分裂期,导致转染效率较低^[4]。在灵长类动物中,只有 1%~3% 的干细胞对逆转录病毒介导的基因转移敏感。腺相关病毒宿主范围广,可以感染分裂期和非分裂期细胞。Goodman 等构建了 rAAV-βgal 载体,感染造血干/祖细胞。结果发现 60%~70% 的细胞中可检测到 βgal 的表达^[5],说明 rAAV 可以高效地将外源基因导入原始造血细胞,并长期稳定地表达。因此我们设想以 AAV 为载体,将 MDR1 基因导入造血干祖细胞,使被转移的细胞具有 MDR 特征,从而为解决化疗所致的造血功能抑制提供实验依据。

细胞表面 CD34 抗原是目前公认的一个造血干祖细胞标志^[6],利用免疫磁珠(MACS)或流式细胞仪分离出 CD34 阳性细胞及其亚群可得到较纯的造血干/祖细胞。我们在研究中采用的是经细胞因子动员后的外周血,用 MiniMACS 试剂盒进行免疫磁性分离,纯度在 80%~98% 之间。

本实验检测了 rAAV/GFP 重组病毒感染 CD34 阳性细胞 48 h 后的转染效率。在荧光显微镜下观察,有绿色荧光蛋白表达的细胞阳性率为 30%,低于其他作者所报道的阳性率^[5],但仍高于逆转录病毒的转染效率(3%)^[4]。说明 AAV 用于介导造血干祖细胞的基因治疗,优于其他病毒载体^[7],

将重组 rAAV/MDR1 病毒感染 CD34 阳性细胞,

PCR 证实了 AAV 载体可将 MDR1 cDNA 导入 CD34 阳性细胞。用秋水仙素加压培养 4 d,MTT 法检测细胞活力^[8],结果说明转入 MDR1 基因后,CD34 阳性细胞对秋水仙素的耐药性有一定提高,但仍不够满意。可能原因是 MDR1 cDNA 较长,rAAV/MDR1 重组质粒中的外源基因长度已接近 AAV 所能接受的长度,导致重组病毒滴度低,另外,目前重组病毒的制备及造血干/祖细胞的体外培养体系仍不够完善等问题也影响了感染效率的提高。

总之,本实验结果提示腺相关病毒载体可将 MDR1 基因成功导入外周血干/祖细胞,并使其耐药性有一定提高,初步探讨了以 AAV 为载体,造血干祖细胞为靶细胞的基因转导模式的可行性及安全性^[9]。

[参考文献]

[1] Ping WU, Phillips M, John B. Adeno-associated virus vector mediated transgene intergration into neurons and other nondividing cells targets[J]. J Virol, 1998: 5919- 5926.

[2] 胡舜英,冯茹,李梁,等.腺相关病毒与人多药耐药基因重组载体的构建及在 NIH3T3 细胞中的表达[J].中国生物化学与分子生物学报,2000,16(3):326-329.

[3] Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells[J]. Cell, 1991, 66: 85.

[4] Hanania EG, Deisseroth AB. Serial transplantation shows that early hematopoietic precursor cells are transduced by mdr-1 retroviral vector in a mouse model[J]. Cancer Gene Ther, 1994, 1: 21.

[5] Goodman S, Xiao X, Dohanue RE, et al. Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into hematopoietic progenitor cells[J]. Blood, 1994, 1492-1500.

[6] Miraglia S, Godfrey W, Yin AH. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: Isolation, characterization and molecular cloning[J]. Blood, 1997, 90: 5013.

[7] Devereus S, Corney C, Macdonald C. Feasibility of multi-drug resistance (MDR-1) gene transfer in patients undergoing high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation for lymphoma [J]. Gene Ther, 1998, 5: 403-408.

[8] Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, et al. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990: 7160- 7164.

[9] Kotin RM, Simiscalo M, Samulski RJ. Site specific integration by adeno-associated virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87 (6): 2211.

[收稿日期] 2001-11-19 [修回日期] 2002-01-17