

[文章编号] 1007-385X(2003)02-0084-04

YCD 基因修饰对小鼠 P388 白血病的体内治疗作用研究

江千里¹, 王健民¹, 温丽敏¹, 张雨生², 江 汕³, 胡晓霞¹, 周 虹¹(1. 第二军医大学附属长海医院血液科, 上海 200433; 2. 沈阳军区总医院血液科, 沈阳 110015; 3. 南京医科大学病理教研室, 南京 210029)

[摘要] 目的: 以 P388/DBA 小鼠白血病模型, 探讨新型自杀基因 YCD 的体内治疗作用。方法: 用逆转录病毒载体将 YCD 基因导入, 筛选 P388-YCD-eGFP 细胞克隆, 以 P388-eGFP 和野生型(wt)P388 细胞为对照。(1) 3 组细胞腹腔接种给 DBA 小鼠($n=5$), 5×10^6 /只(下同), 观察致病性;(2) 3 组细胞腹腔接种给 DBA 小鼠($n=5$), 分别以 5-FC 治疗 2 周, 观察疗效;(3) 2 组 $\times 5$ 只小鼠腹腔接种 P388-YCD-eGFP, 5-FC $5 \mu\text{mol/L} \cdot \text{d}^{-1} \times 2 \text{d}$ 或 PBS 治疗, 根据小鼠存活时间推算杀伤效率。以流式细胞仪、冰冻切片和 HE 切片检测各脏器中白血病细胞的分布和变化。结果: 基因导入对细胞的生物学特性影响不显著; 5-FC 治疗 2 周, YCD 组小鼠存活(17.8 ± 1.89) d, 而 eGFP 组和 wtP388 组分别存活(7.8 ± 1.10) d 和(7.7 ± 1.15) d ($P < 0.05$); 5-FC 治疗 2 d 的杀伤率达 99.6%。结论: YCD 转基因细胞在体内可被 5-FC 有效杀灭, 该系统具有应用前景。

[关键词] 酵母菌胞嘧啶脱氨酶; 基因治疗; 白血病; 绿色荧光蛋白; P388

[中图分类号] R733; Q78 **[文献标识号]** A

Therapeutic Effect of YCD Suicide Gene-Modified Murine P388 Leukemia *in vivo*

JIANG Qian-li¹, WANG Jian-min¹, WEN Li-min¹, ZHANG Yu-sheng², JIANG Shan³, HU Xiao-xia¹, ZHOU Hong¹(1. Department of Hematology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Hematology, Shenyang General Hospital, Shenyang 110015, China; 3. Department of Pathology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore therapeutic effect of a novel yeast cytosine deaminase (YCD) suicide gene *in vivo* on P388/DBA murine leukemia model. **Methods:** P388-YCD-eGFP clone was selected after retrovirus transduction by limiting dilution, P388-eGFP and wild type (wt) P388 were used as control. (1) Tumorigenesis study: DBA mice were inoculated with P388-YCD-eGFP, P388-eGFP or wt P388, 5×10^6 /each *i. p.* ($n=5$). (2) 5-FC therapy study: After inoculation with P388-YCD-eGFP, P388-eGFP and wt P388 respectively ($n=5$), each mouse was given 5-FC with a dose of $5 \mu\text{mol/d} \times 2 \text{w}$. (3) 5-FC killing effect study: 2 groups ($n=5$) of mice inoculated with P388-YCD-eGFP were treated with 5-FC $\times 2 \text{d}$ or PBS. **Results:** Mice in YCD, eGFP and wtP388 group developed leukemia and survived for (8 ± 1.0) d, (7.6 ± 0.89) d and (7.8 ± 1.64) d ($P > 0.05$), respectively. After 5-FC-2w-treatment, mice in YCD group survived (17.8 ± 1.89) d ($P < 0.05$) vs (7.8 ± 1.10) d (eGFP) and (7.7 ± 1.15) d (wtP388) group, respectively. Mice of YCD group with 5-FC-2 d-treatment survived for (13.3 ± 2.36) d, while PBS group (8.0 ± 1.15) d. Flow cytometry and pathological examinations suggested mice of in YCD group died of leukemia relapse. **Conclusion:** YCD/5-FC is an efficient suicide gene system *in vivo*.

[Key words] yeast cytosine deaminase; gene therapy; leukemia; green fluorescence protein; P388

* 酵母菌胞嘧啶脱氨酶(yeast cytosine deaminase, YCD)是本室克隆自酿酒酵母的一种新型自杀基因, 其转化 5-氟胞嘧啶(5-FC)的能力较细菌的胞嘧啶脱氨酶(bacterial cytosine deaminase, BCD)要强^[1]。为了探讨 YCD/5-FC 系统在体内的作用, 我们用逆转录病毒

[基金项目] 国家自然科学基金(30172347)和上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养计划(98 BR029)资助

[作者简介] 江千里(1974-), 男, 江苏南京人, 博士, 主要从事基因免疫治疗、造血干细胞移植和干细胞研究。

E-mail: jiangql@yahoo.com

[通讯作者] 王健民, E-mail: jmwang@medmail.com.cn

(retrovirus, RV)载体将 YCD 基因导入 P388 小鼠白血病细胞,细胞经腹腔接种给 DBA 小鼠并用 5-FC 进行治疗,发现疗效显著。

1 材料与方法

1.1 试剂、细胞及动物

DMEM 培养液购自 Gibco BRL 公司。新生牛血清(NBS)购自杭州四季青公司。聚凝胺(Polybrene)购自 Sigma 公司。RV 载体 MSCV-eGFP 及包装细胞 Phoenix-E 由美国匹兹堡大学程涛教授惠赠。MSCV-YCD-IRES-EGFP 由本室张雨生博士后构建。小鼠 T 淋巴细胞白血病细胞株 P388 和 NIH3T3 细胞由本室冻存。DBA 小鼠购自中科院上海实验动物中心,6~8 周,雌性,饲养于无特殊病原体(specific pathogen free, SPF)环境。

1.2 细胞培养^[2]

如非特殊说明,细胞在 37℃,5% CO₂,100% 饱和湿度条件下,培养于 10% NBS 的 DMEM 中。

1.3 逆转录病毒的制备

以磷酸钙沉淀法^[3]将 MSCV-YCD-IRES-EGFP 和 MSCV-eGFP 质粒导入 Phoenix-E 包装细胞,制备病毒上清,并以批量快速病毒滴度测定法(LaSRT)测定病毒滴度^[4]。

1.4 基因的导入和荧光单克隆的挑选

采用离心感染法:将 2×10^4 个 p388 细胞接种于 24 孔板中,加入含 Polybrene 终浓度为 8 μg/ml 的病毒上清 2 ml,细胞移入 CO₂ 孵箱培养前以 32℃,2 300 r/min × 30 min 离心感染(美国 IEC 公司,IEC Thermo Centra GP8R),培养 12 h 后更换为 10% NBS 的 DMEM 培养液培养,12 h 后重复感染 1 次。感染 48 h 后以荧光倒置显微镜(Olympus IX70)和流式细胞仪(BD 公司,FACS Cabilum)检测 eGFP⁺ 细胞比例。有限稀释法获得荧光单克隆:P388-YCD-eGFP 和 P388-eGFP。

1.5 转基因细胞的形态、增殖曲线及荧光表达稳定性的研究^[2]

观察细胞形态。P388-YCD-eGFP, P388-eGFP 和野生型(wt)P388 细胞以 MTT 法测定细胞的增殖曲线。长期培养后测定细胞的 eGFP⁺ 率。

1.6 5-FC 诱导细胞自杀效应的体外研究

将 P388-YCD-eGFP 和 P388 细胞以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中,分别加入终浓度为 0~1 000 μmol/L 的 5-FC,培养 48 h 后以 MTT 法检测。

1.7 各组 P388 细胞致病性的研究

DBA 小鼠,随机编号并分为 3 组,每组 5 只。对数生长期的 P388-YCD-eGFP, P388-eGFP 及 wtP388 细胞

以 5×10^6 细胞/只,分别接种于 YCD, eGFP 及 wtP388 组小鼠腹腔^[5]。

1.8 5-FC 治疗各组白血病模型的研究

DBA 小鼠,随机编号并分为 3 组,每组 5 只。P388-YCD-eGFP, P388-eGFP 及 wtP388 细胞以 5×10^6 细胞/只,接种于 YCD 组、eGFP 组和 P388 组小鼠腹腔,接种当天计为第 0 天,第 1 天开始,分别腹腔每只小鼠给药 5-FC $5 \mu\text{mol} \cdot \text{d}^{-1}$,2 周后停止治疗。

1.9 5-FC 对转 YCD 基因细胞的杀伤效率研究

DBA 小鼠随机编号并分成 2 组,每组 5 只,腹腔接种 P388-YCD-eGFP 细胞, 5×10^6 细胞/只,接种当天计为第 0 天,第 1,2 天时,分别经腹腔注射 5-FC $5 \mu\text{mol}$ 或 PBS。每日观察小鼠存活等。根据公式 $\lg X$ 细胞数 = (22.14 - y 存活天数)/2.05 计算残存细胞数^[5]。

$$\text{杀伤效率}\% = (1 - \text{残留的细胞数}/\text{接种的细胞数}) \times 100\%$$

1.10 各组织中肿瘤细胞的比例

无菌收集腹水,摘除眼球收集外周血。脱臼处死小鼠后,切取肝、脾、胸腺、脑等组织,采集四肢的骨髓。以上标本分为 3~4 份,分别用于:①制备单细胞悬液:肝、脾、胸腺等组织在 200 目不锈钢网上研磨;脑组织经 1% 胰酶 + 0.02% EDTA 于 37℃ 消化 30 min;骨髓、外周血和(血性)腹水用氯化铵溶液裂解红细胞^[6];以上细胞悬液直接以荧光显微镜观察或以流式细胞仪检测 eGFP⁺ 细胞;②冰冻切片:组织切成小块置于冻存管中,投入液氮备用;③常规切片:保存于 10% 甲醛溶液备用。

1.11 统计学方法

经第二军医大学统计教研室 SPSS 统计软件之 *t* 检验和方差分析。

2 结果

2.1 逆转录病毒的滴度测定

NIH3T3 细胞测定病毒滴度为 $(4.5 \pm 3.4) \times 10^6$ cfu/ml。

2.2 转基因 P388 细胞的荧光表达

获得的 P388-eGFP 单克隆, eGFP⁺ 率 99.2%, 体外传代 3 个月后 eGFP⁺ 率仍有 95.2%。

2.3 细胞形态和增殖的比较

转基因后 P388 细胞形态无明显改变。P388-YCD-eGFP, P388-eGFP 与 P388 细胞增殖曲线差异不明显($P > 0.05$)。

2.4 5-FC 诱导细胞自杀效应的体外研究

5-FC 可以特异性诱导转 YCD 基因细胞自杀,对未转基因细胞作用不明显(见图 1)。

2.5 各组 P388 细胞致病性的研究

YCD, eGFP 和 P388 各组死亡时间无明显差异, 死亡小鼠死亡时均有大量腹水(见表 1)。

2.6 YCD/5-FC 系统治疗各组白血病模型的研究

YCD 组小鼠死亡时无腹水, eGFP 组和 P388 组小鼠死亡时均有大量腹水(见表 2)。

2.7 5-FC 对转 YCD 基因细胞的杀伤效率研究

对照组小鼠的存活时间为(8.0 ± 1.15) d。5-FC 治疗组存活时间为(13.3 ± 2.36) d, 推算残存活细胞数 2.05×10^4 , 即 5-FC 杀伤率 99.6%。5-FC 治疗组小鼠死亡时有大量腹水, 各脏器中可见较多肿瘤细胞。

2.8 各组织中肿瘤细胞的比例

YCD 组和 eGFP 组小鼠各脏器中的 eGFP⁺ 细胞浸润情况(见表 3)。

图 1 5-FC 对 YCD 基因修饰的 P388 的特异性杀伤作用

Fig. 1 Effect of 5-FC to P388-YCD and P388

表 1 P388-YCD-eGFP, P388-eGFP 和 wtP388 细胞对小鼠致病性的研究

Tab. 1 Tumorigenicity of P388-YCD-eGFP, P388-eGFP and wtP388

Groups	n	Time of survival	Weight		Abdomen circumference	
			Before exp	After exp	Before exp	After exp
YCD	5	8 ± 1.0 [△]	18.5 ± 1.15 [△]	20.7 ± 0.98 ^{△,*}	7.5 ± 0.5 [△]	9.0 ± 0.5 ^{△,*}
eGFP	5	7.6 ± 0.89 [△]	19.0 ± 1.3 [△]	23.5 ± 2.55 ^{△,*}	7.5 ± 0.5 [△]	9.0 ± 0.5 ^{△,*}
P388	5	7.8 ± 1.64	19.0 ± 1.13	21.4 ± 1.71	7.3 ± 0.8	8.6 ± 0.3

△P > 0.05, compared with P388 group; *P < 0.05, compared with before exp. Exp: Experiment

表 2 5-FC 治疗 P388-YCD-eGFP, P388-eGFP 和 wtP388 各组荷瘤小鼠的研究

Tab. 2 5-FC treatment to P388-YCD-eGFP, P388-eGFP and wtP388 leukemia model

Groups	n	Time of survival	Weight		Abdomen circumference	
			Before therapy	After therapy	Before therapy	After therapy
YCD	5	17.8 ± 1.89 [▲]	19.5 ± 0.81 [△]	20.6 ± 0.94 ^{▲,*}	8.0 ± 0.0 [△]	8.10 ± 0.25 ^{▲,*}
eGFP	5	7.8 ± 1.10 [△]	18.8 ± 1.13 [△]	21.4 ± 1.14 ^{△,■}	7.5 ± 0.45 [△]	9.0 ± 0.45 ^{△,■}
P388	5	7.7 ± 1.15	19.3 ± 0.93	21.7 ± 1.16	7.3 ± 0.58	9.0 ± 0.5

△P > 0.05, compared with P388 group; ▲P < 0.05, compared with P388 group; *P < 0.05, compared with before therapy;

■P > 0.05, compared with before therapy.

3 讨论

与依赖旁观者效应的肿瘤细胞自杀基因治疗方案不同, 自杀基因修饰供者 T 细胞防治移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)采用 *ex vivo* 策略, 细胞先在体外导入基因再回输体内, 因此体内杀伤效果是判定自杀基因体系优劣的关键, 而并不强调旁观者效应。本文主要探讨了 YCD/5-FC 系统的体内杀伤效果, 进而应用于自杀基因修饰 T 细胞防治 GVHD 的研究^[7]。

研究发现, YCD 和 eGFP 基因的修饰对 P388 白血病细胞的生物学特性无明显影响。体外培养 48 h 对 P388-YCD 细胞完全杀伤剂量是 25 μmol/L。如果不考虑体内代谢的影响, 本实验中使用的 5-FC 体内剂量相当于该剂量的 10 倍(以小鼠平均 20 g, 即 20 ml 计算), 约 32 mg/kg——即使更高剂量的 5-FC 治疗对小鼠也是安全的^[1]。实验取得十分明显的疗效。但 5-FC 的治疗未能完全清除转基因细胞, 治疗组小鼠死亡时脏器内发现较多肿瘤细胞。

表3 5-FC 治疗后 YCD 和 eGFP 组小鼠各脏器中的 eGFP⁺ 细胞比例
Tab. 3 eGFP⁺ cells in organs examined by FACS and frozen section (n = 3)

Tissues name	FACS		Frozen section	
	YCD	eGFP	YCD	eGFP
Ascitic fluid	ND	96.1 ± 2.4	ND	+++
BM	8.9 ± 6.7 [▲]	20.6 ± 14.2	++	+++
liver	1.9 ± 1.4 [▲]	18.8 ± 8.6	+	++
spleen	3.8 ± 5.6 [▲]	14.5 ± 11.6	+	++
thymus	11.4 ± 5.3 [△]	25.8 ± 10.2	++	+++
PB	1.9 ± 1.4 [▲]	11.6 ± 6.68	±	++
Brain	<0.5%	<0.5%	-	+
Lung	ND	ND	±	+
Kidney	ND	ND	-	+
Gut	ND	ND	+	++
Heart	ND	ND	±	±

△P > 0.05, ▲P < 0.05, compared with eGFP group. Negative: -. Positive: ± (<1/HP, 400 ×); + (1~4/HP); ++ (5~10/HP); +++ (≥10/HP). ND: Not detectable.

即使接种 10 个 P388 细胞, DBA 小鼠也会在 20 余天发病致死, 小鼠的存活时间和体内的肿瘤数具有良好的相关性, 因此可以根据小鼠的存活时间推算治疗后体内残存的肿瘤细胞^[5]。由于①转基因和随后筛选的过程无法保证每个接种的细胞均表达自杀基因; ②体内复杂的体液环境也无法保证 5-FC 能随时随处达到足够杀伤细胞的浓度; ③5-FC 的代谢产物 5-氟尿嘧啶(5-FU)发挥杀伤作用依赖细胞周期, 因此无法保证杀死所有接种的细胞, 残存少量的细胞即会导致肿瘤复发和小鼠死亡。经 2 d 的 5-FC 治疗, 小鼠存活可达 (13.3 ± 2.36) d, 推算对 P388-YCD 的杀伤率达 99.6%。延长 5-FC 的治疗时间达 2 周, 小鼠存活时间可达 (17.8 ± 1.89) d。一般认为, 如果杀伤率达到 90% 以上, 由 T 细胞介导的 GVHD 就可以得到有效控制^[7]。YCD 体系可以满足这一要求。

建立高效的基因导入方法是实验成功的另一个关键。本中心已建立了一系列针对人和小鼠 T 细胞等的高效基因导入方法。离心感染是一种较简便的方法, 基因导入率比常规静止法要高。逆转录病毒包装细胞 ΦNX-E 是瞬时病毒生产系统, 导入 RV 质粒后, 可以短期收获高滴度的病毒。本载体中的多顺反子(internal ribosome entrysite, IRES) 可使 YCD 基因和 eGFP 基因均衡表达。因此, 可以通过观察荧光细胞方便地了解肿瘤细胞数量和分布的变化, 较 HE 切片敏感。

本研究证实, YCD 转基因细胞在体内可被有效杀灭。本研究为 YCD 自杀基因的进一步应用打下了坚实的基础。

[参考文献]

- [1] 张雨生, 王健民, 周虹, 等. 酵母菌胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶(YCD/5-FC)自杀基因治疗系统对 K562B 白血病细胞杀伤作用的体内实验[J]. 中华血液学杂志, 2002, 23(4): 173-175.
- [2] 司徒镇强, 吴军正主编. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1996: 90-175.
- [3] 李永明, 赵玉琪, 著. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 84-87.
- [4] 江千里, 王健民, 等. 批量快速测定法测定标志基因为 GFP 的重组病毒滴度[J]. 第二军医大学学报, 2002(9): 1034-1035.
- [5] 史剑慧, 许小平, 程文英, 等. 小鼠微小残留白血病模型的建立. 复旦学报(医学版). 2002, 29(5): 383-386.
- [6] 蔡文琴, 王伯云, 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 四川科学技术出版社, 1994, 204-207.
- [7] Munshi NC, Govindarajan R, Drake R, et al. Thymidine Kinase (TK) gene-transduced human lymphocytes can be highly purified, remain fully functional, and are killed efficiently with ganciclovir [J]. Blood, 1997, 89(4): 1334-1340.

[收稿日期] 2003-01-16

[修回日期] 2003-04-20