

# 增殖选择性腺病毒体外净化造血干细胞的研究\*

100071 北京 军事医学科学院附属 307医院乳腺癌内科  
战淑珺<sup>1</sup>, 吴世凯, 宋三泰, 林晨<sup>1</sup>, 张雪燕<sup>1</sup>, 江泽飞, 胡放<sup>2</sup>

**【摘要】**目的:探讨增殖选择性腺病毒 H101对造血干细胞体外净化的效果。方法:通过集落形成法、MTT比色法,观察 H101对乳腺癌细胞及造血干细胞增殖的影响。应用 RT-PCR 检测 CK-19mRNA 表达,并结合肿瘤细胞集落形成法,建立 H101净化效果的评价体系。在此基础上,评价 H101模拟体外净化乳腺癌细胞和造血干细胞混合物的效果。结果:H101对乳腺癌细胞有显著的杀伤效应,在 0~400MOI 感染滴度范围内,存在明确的剂量效应关系,但 H101对造血干细胞毒性较小,感染滴度达 800MOI 时对细胞增殖能力仍无明显影响。建立了 RT-PCR 及肿瘤细胞集落形成两种评价净化效率的方法,瘤细胞检测敏感度均可达 6 个对数级。模拟净化试验中, H101在感染滴度 200MOI 混合培养体积 1ml 混合培养时间 2 小时,可以达到 5 个对数级的乳腺癌细胞清除率,而对造血干细胞功能影响很小。结论:增殖选择性腺病毒可靶向净化造血干细胞中混有的乳腺癌细胞,为乳腺癌患者自体造血干细胞移植物的体外净化提供了新途径。

**【关键词】** 增殖选择性腺病毒; 乳腺癌; 造血干细胞; 体外净化

中图分类号: R730.231<sup>+</sup>3 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2006)04-0254-05

## In vitro purging the contaminating breast cancer cells from hematopoietic stem cell grafts with reduplication-selective recombinant adenovirus

ZHAN Shu-jun, WU Shi-kai, SONG San-tai, LN Chen, ZHANG Xue-yan, JIANG Ze-fei, HU Fang Department of Breast Cancer, Affiliated Hospital of the Academy of Military Medical Science Beijing 100071, China

**【Abstract】 Objective:** In vitro, to develop a new method for purging the tumor cells from hematopoietic stem cell (HSC) products by using a reduplication-selective recombinant adenovirus H101. **Methods:** The cytopathic effects of H101 on breast cancer cell MDA-MB-231 and HSC were detected by MTT colorimetry and colony-forming unit (CFU). An evaluating system to appraise the purging effect of H101 was set up by CFU-T and RT-PCR amplification of human cytokeratin-19 specific sequence. Finally, in vitro simulating clinical purging procedure, we observed the efficiency of the above mentioned purging method. **Results:** Proliferative activity of MDA-MB-231 decreased with the increasing dose of H101 in the range of 0~400MOI. The clonogenic potential of the HSC was rarely affected by H101 even at 800MOI. A sensitive evaluating system was built up, by which 6 lg level contamination of MDA-MB-231 in HSC was detected with RT-PCR and CFU-T. Following these studies, in vitro simulating purging procedure under optimal conditions, H101 induced 5 lg level elimination of contaminating MDA-MB-231, while had little effect on the clonogenic forming potential of HSC. **Conclusion:** Co-incubation with H101 potentially provides a highly effective method for purging in vitro breast cancer cells from grafts prior to autologous transplantation.

**【Key Words】** Reduplication-selective recombinant adenovirus; Breast cancer; Hematopoietic stem cell; Purging in vitro

化疗药物剂量强度是影响乳腺癌化疗疗效的重要因素,但高剂量化疗联合自体造血干细胞移植(HDC+AH-SCT)治疗乳腺癌的地位目前尚未确立。最新的多中心随机对照研究结果显示, HDC+AH-

SCT较常规化疗可显著提高患者的无病生存期和总生存期<sup>[1]</sup>,这提示 HDC+AH-SCT治疗乳腺癌仍值得进一步探讨。乳腺癌患者的骨髓侵犯是影响自体移植疗效的重要因素,净化去除自体移植中混有的

\* 基金项目:全军“十五”攻关课题(01QQ47)

1 100021 中国医学科学院肿瘤医院国家分子肿瘤实验室

2 200001 上海三维生物技术有限公司

肿瘤细胞,可望进一步提高患者的移植效果。造血干细胞与乳腺癌细胞表面腺病毒受体存在巨大差异,使腺病毒介导的基因治疗靶向净化成为可能,为体外净化提供了新思路<sup>[2,3]</sup>。近年增殖选择性腺病毒突出的抗肿瘤活性,引起人们的广泛关注<sup>[4,5]</sup>,应用这类病毒选择性净化自体移植体,自然成为该领域的研究方向。目前已研发成功的增殖选择性腺病毒有美国 ONYX 公司的 ONYX-015,以及中国上海三维生物技术有限公司的 H101。本实验选择 H101 进行体外模拟净化造血干细胞的相关研究,现将研究结果报告如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 (1)细胞及培养基:MDA-MB-231 乳腺癌细胞购自中国医学科学院基础所细胞库;外周血单核细胞(PBMNC)来自军事医学科学院附属医院血库;造血干细胞粒-单核细胞集落形成(CFU-GM)培养基为美国 Stem Cell 公司产品。(2)病毒药物:携带荧光蛋白的复制缺陷腺病毒(Ad-GFP)由军事医学科学院全军重点实验血液学实验室王澜博士后提供;H101 由上海三维生物技术公司提供。(3)RT-PCR 相关材料:RNA 提取试剂盒、反转录及 PCR 一步法试剂盒均为美国 Promega 公司产品。(4)引物设计:CK-19 上下游引物序列分别为:5'-ACA GCC ACT ACT ACA CGA CCA T-3', 5'-GAG TG TGT CTT CCA AGG CAG CT-3', 预期扩增片段长度 592bp。同时以 GAPDH 为内参照,以此判断 RNA 是否降解,扩增片段为 390bp。均由上海博亚生物工程公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 评价 H101 对乳腺癌细胞、造血干细胞的杀伤效应 (1)MTT 法评价 H101 对 MDA-MB-231 细胞的杀伤效应:选取状态良好的对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,以每孔  $7 \times 10^3$  细胞接种于 96 孔板,24 小时后,吸尽培养液,每孔加 100 $\mu$ l 无血清培养液。H101 及对照 Ad-GFP 分别以 0、12.5、25、50、100、200、400 MOI 滴度转染细胞,各滴度均设 3 孔平行对照。37 $^{\circ}$ C 晃动混匀培养 2 小时,补加含血清培养液,置孵箱继续培养 96 小时,行常规方法 MTT 检测<sup>[6]</sup>,计算不同感染滴度细胞存活率;绘制剂量-细胞抑制率曲线,计算半数抑制药物剂量(IC<sub>50</sub>)。细胞存活率(%) = (加药细胞 OD 值 - 空白细胞 OD 值) / (对照细胞 OD 值 - 空白细胞 OD

值)  $\times 100\%$ 。(2)肿瘤细胞集落形成(CFU-T)法评价 H101 对 MDA-MB-231 细胞的杀伤效应:取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,每 60mm 皿中接种 1 000 个细胞,培养 24 小时后,吸尽培养液,每皿加 200 $\mu$ l 无血清培养液,分别以 0、12.5、25、50、100、200、400 MOI 滴度转染 H101、Ad-GFP,各滴度均设 3 皿平行对照。晃动混匀培养 2 小时后补加含血清培养液,继续培养。7~14 天出现肉眼可见集落时,终止培养, PBS 轻洗, 0.2% 结晶紫染色 15 分钟,清水冲洗后干燥,显微镜下计数大于 50 个细胞的集落数。(3)粒-单核细胞集落形成单位(CFU-GM)法评价 H101 对造血干细胞增殖的影响:新鲜分离的 PBMNC 细胞,经流式细胞仪计数 CD34<sup>+</sup> 细胞数后,以每孔 2 000 个 CD34<sup>+</sup> 细胞接种于 24 孔板,加 200 $\mu$ l DMEM,分别接受 0、100、200、400、600、800、1 000、1 600 MOI 的 H101、Ad-GFP 转染,各滴度均设 3 孔平行对照。37 $^{\circ}$ C 混匀晃动培养 2 小时,加入半固体 CFU-GM 培养液,混匀后继续孵箱培养,其余同方法(2)。

1.2.2 建立 H101 净化效率的评价体系 (1)RT-PCR 检测 CK-19 mRNA 表达法净化评价体系的建立:消化、计数 MDA-MB-231 细胞,计算每毫升悬液所含细胞数,并进行共 6 个浓度的倍比稀释。将已知浓度的细胞悬液各与  $1 \times 10^7$  个 PBMNC 混合,使最终混合比例分别为  $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 。以 Promega RNAgents Total RNA Isolation System 试剂盒,分别提取上述样本 RNA。使用 Promega Access RT-PCR System 试剂盒,反应体系 50 $\mu$ l,参照试剂盒说明行一步法 CK-19 mRNA RT-PCR 扩增,同时每组体系均设立 GAPDH 为内参照。反应条件如下:48 $^{\circ}$ C 45min, 94 $^{\circ}$ C 2min,进入 PCR 循环,94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 68 $^{\circ}$ C 2min,共 40 个循环,68 $^{\circ}$ C 7min 延长,4 $^{\circ}$ C 保存。取反应产物 5 $\mu$ l,常规行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。凝胶成像系统观察:如在 390bp 处出现清晰条带者可证实 RNA 无降解和反应体系适当。如反应产物在 592bp 处出现清晰条带者为待测标本 CK-19 mRNA 阳性,无此条带者为阴性。(2)CFU-T 法净化评价体系的建立:选取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,计数,并倍比稀释。每 35mm 皿中各加入  $1 \times 10^7$  个 PBMNC 为本底,再分别加入以下 4 个浓度梯度的 MDA-MB-231 细胞:  $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、1 个。每浓度梯度均设 3 个平行对照。补足 DMEM 培养,余下方法同 1.2.1(2)。

1.2.3 H101模拟体外净化造血干细胞与乳腺癌细胞混合物 把 MDA-MB-231 细胞与 PBMNC 以 1:100 比例混合 (1 × 10<sup>5</sup> 个 MDA-MB-231 细胞混入 1 × 10<sup>7</sup> 个 PBMNC), 以 MDA-MB-231 细胞为转染目标细胞, H101、Ad-GFP 分别以 0、25、50、100、200、400、800 MOI 滴度, 转染混合培养细胞。病毒-细胞混合培养体积为 1 ml, 混合培养时间为 2 小时。之后分别行 CFU-T 和 RT-PCR 实验, 以优化最佳病毒感染滴度, 并评价净化效率。同时行造血干细胞 CFU-GM 检测, 评价对干细胞增殖能力的影响。

1.3 统计学方法 采用 SAS 统计软件包处理, 文中的数据以均数  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用重复测量设计资料的方差分析进行统计学处理。组间相比较以  $P < 0.05$  表示有明显差异。

## 2 结果

### 2.1 H101对乳腺癌细胞及造血干细胞杀伤作用

2.1.1 对乳腺癌细胞杀伤作用 H101 对 MDA-MB-231 细胞有显著杀伤作用, 且呈明显的剂量-效应关系。统计结果显示, H101 各感染滴度下对 MDA-MB-231 细胞活力抑制率与 Ad-GFP 相比, 均差异显著 ( $P < 0.05$ )。MTT 比色法 96 小时检测, H101 对 MDA-MB-231 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 25 MOI。CFU-T 法体外培养 14 天, H101 的 IC<sub>50</sub> 为 2.1 MOI。参见图 1、图 2。

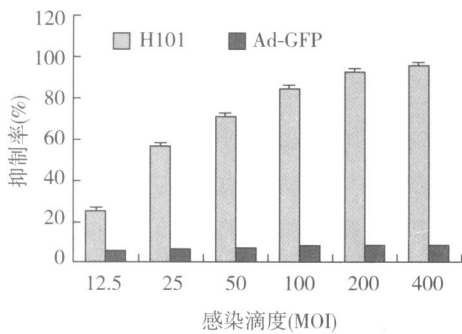


图 1 H101对 MDA-MB-231 细胞的杀伤效应 (96 小时 MTT 比色法)

2.1.2 对造血干细胞功能的影响 H101 在 800 MOI 感染滴度时对造血干细胞 CFU-GM 形成能力无明显影响, 与对照 Ad-GFP 组相似, 两组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 当感染滴度 1 000 MOI 时, 则明显抑制 CFU-GM 形成能力, 与对照 Ad-GFP 组差异显著 ( $P < 0.05$ )。参见图 3。

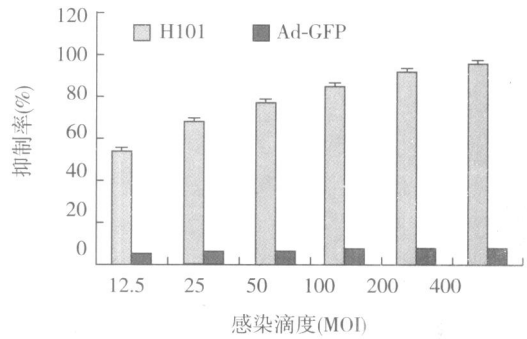


图 2 H101 对 MDA-MB-231 细胞的杀伤效应 (CFU-T 法)

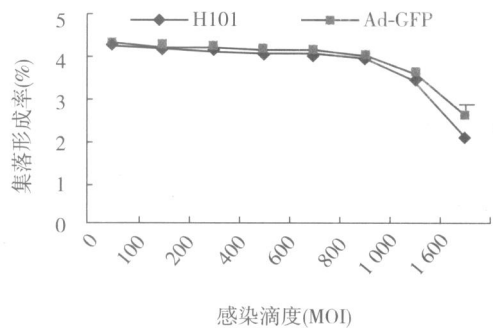


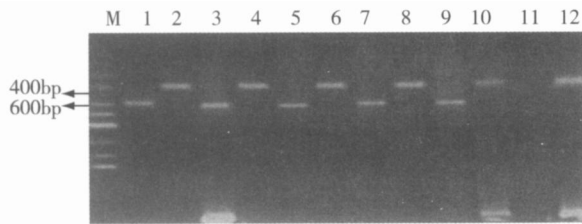
图 3 H101对造血干细胞 CFU-GM 形成的影响

### 2.2 净化效果评价体系建立

2.2.1 RT-PCR 检测 CK-19 mRNA 的表达 提取各样本 RNA 后, 分光光度计检测 OD 值, 确定各样本 A260/A280 > 1.8, 表明提取 RNA 纯度高, 排除 RNA 酶污染可能。进一步行 RT-PCR 实验发现, 在内参照均良好扩增的情况下, MDA-MB-231 细胞与 PBMNC 系列倍比稀释的 6 个数量级细胞密度中, CK-19 mRNA 阳性分析的最低级别为 1 × 10<sup>6</sup>, 即每 10<sup>7</sup> 个 PBMNC 细胞中混有 10 个乳腺癌细胞便可检出, 而 1 × 10<sup>7</sup> 组未能检出 CK-19 的表达。证明 RT-PCR 技术可达到 6 个对数级的检出率, 敏感度较高。参见图 4。

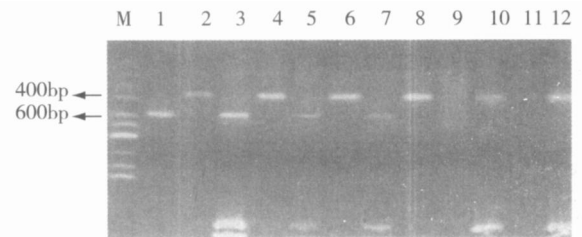
2.2.2 集落形成敏感度实验 结果显示, 每 10<sup>7</sup> 个 PBMNC 中, 混有 10<sup>1</sup> 个 MDA-MB-231 细胞即可观察到集落形成; 但混有 1 个 MDA-MB-231 细胞时未能形成集落, 该实验的敏感度亦可达 6 个对数级。参见图 5。

2.3 H101 模拟体外净化造血干细胞与乳腺癌细胞混合物 由 2.2.1 可知, 该 PCR 体系检测敏感度为 6 个对数级, 故在内参照正常扩增前提下, 每 10<sup>7</sup> 个



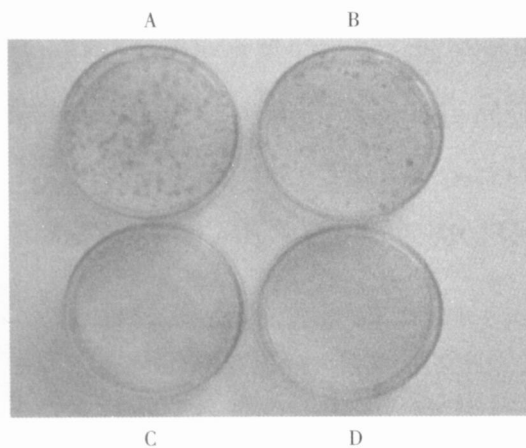
lineM marker; line1、3、5、7、9、11:各浓度梯度 MDA-MB-231 细胞 CK-19mRNA 表达 (MDA-MB-231 与 PBMNC 的混合梯度依次为  $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ ); line2、4、6、8、10、12:各浓度梯度相应内参照 GAPDH 的表达

图 4 RT-PCR 法检测 MDA-MB-231 细胞 CK-19mRNA 表达



lineM marker; line1、3、5、7、9、11: H101 感染滴度分别为 25、50、100、200、400、800MO I 时 MDA-MB-231 细胞 CK-19mRNA 表达; line2、4、6、8、10、12:各感染滴度相应内参照 GAPDH 的表达

图 6 RT-PCR 法检测模拟净化后 CK-19mRNA 表达



MDA-MB-231 细胞与 PBMNC 细胞的混合比例分别为: A:  $10^3 \times 10^7$ ; B:  $10^2 \times 10^7$ ; C:  $10^1 \times 10^7$ ; D:  $1 \times 10^7$

图 5 MDA-MB-231 细胞不同比例的集落形成敏感度实验结果

PBMNC 细胞中混有  $10^5$  个 MDA-MB-231 细胞的 CK-19mRNA 扩增应为阳性表达。但行 H101 模拟净化后发现, H101 感染滴度分别为 25、50、100MO I 时, CK-19mRNA 有强度渐弱的扩增; 而感染滴度 200MO I 为阴性表达。表明在感染滴度 200MO I 混合培养体积 1ml 混合培养时间 2 小时, H101 可以达到 5 个对数级的肿瘤细胞清除率 (参见图 6)。MDA-MB-231 细胞集落形成亦有相似结果, 而 H101 感染滴度达 800MO I 时, 造血干细胞 CFU-GM 形成能力仍未受明显影响。

### 3 讨论

HDC 联合 AH SCT 在乳腺癌综合治疗中的地位至今尚未确立, 自体造血干细胞移植中混有的肿瘤细胞回输可能是影响疗效的重要因素之一。已有

的资料显示, 虽然磁性细胞分离 (MACS) 技术可达 2 ~ 5 个对数级的肿瘤细胞净化效率, 但少量残留的肿瘤细胞仍可能导致疾病复发<sup>[7]</sup>。因此很有必要寻求更高效低毒的自体移植净化方法。造血干细胞与恶性肿瘤细胞表面腺病毒受体的天然差异, 使腺病毒介导的基因治疗靶向净化成为可能, 又为自体造血干细胞体外净化提供了新的切入点<sup>[3]</sup>。

基因工程改造的 EB 片段缺失的增殖选择性腺病毒, 能够特异性地在 p53 基因失活或突变的癌细胞中复制、包装及释放, 最终导致癌细胞裂解。受染癌细胞裂解后释放出的病毒, 可继续感染、裂解新的肿瘤细胞, 从而达到对肿瘤连续杀伤作用, 而该病毒在正常组织细胞中不能有效复制, 因而基本无损伤作用<sup>[8]</sup>。这种选择性杀伤启发我们尝试用其进行自体造血干细胞净化。

理想的净化方法应该对肿瘤细胞选择性杀伤, 而对造血干细胞相对安全低毒。本实验 MTT 比色法显示, H101 对 MDA-MB-231 细胞有显著杀伤作用, 在感染滴度 0 ~ 400MO I 范围内, 存在明确的剂量-效应关系, 其  $IC_{50}$  为 25MO I。CFU-T 实验验证的杀伤效应与 MTT 结果相一致。已完成的 H101 临床试验, 也为上述实验结果提供了临床支持<sup>[5]</sup>。同时我们发现 H101 在感染滴度 800MO I 时, 对造血干细胞 CFU-GM 形成能力无明显影响, 这为 H101 净化自体移植物的临床应用提供了有力支持。

良好的评价体系的建立是科学评价净化效果的关键。由于造血干细胞体外净化后残余的肿瘤细胞数量相对较少, 故需要较为敏感的检测方法。RT-PCR 无论是敏感性还是特异性均优于以往的方法, 与免疫化学法相比, 敏感性一般可增加 10 ~ 100 倍<sup>[9]</sup>。在标志物选择方面, 以上皮细胞角蛋白 CK-

19最为常用。由于乳腺癌源于上皮组织,具有上皮性抗原,而外周血正常细胞为间叶组织,不表达该抗原。如果在外周血中检测到仅在上皮源性细胞中表达的基因产物,再结合阳性细胞所具备的恶性特征,则可以判定肿瘤细胞的存在。本实验中,RT-PCR检测敏感度可达6个对数级,与国外报道结果一致<sup>[10,11]</sup>。肿瘤细胞集落形成法虽然是一种传统方法,但可观察到细胞的增殖状态,因此可作为RT-PCR的必要补充。本实验结果显示每10<sup>7</sup>个PBMNC中,混有10个肿瘤细胞即可检出,敏感度也可达6个对数级,不逊于RT-PCR方法。

明确了H101对乳腺癌细胞的高效杀伤及对造血干细胞的低毒后,我们进一步通过模拟净化方法,检验H101对乳腺癌细胞及造血干细胞混合物的净化效果。实验中采用了本课题组已优化的H101净化参数:最佳混合培养体积1ml,混合培养时间2小时。结果显示,感染滴度200MOI时,H101至少可以达到5个对数级的肿瘤细胞清除率,其净化效率与目前应用最广泛的MACS技术相近<sup>[7]</sup>。由于干细胞CFU-GM法显示,只有H101感染滴度高达1000MOI时,才会影响其集落形成能力,所以本实验优化的针对乳腺癌细胞的200MOI感染滴度,对造血干细胞而言,相对感染滴度还不到2MOI,因此对干细胞增殖能力无明显影响。本研究虽然选择乳腺癌作为研究目标肿瘤,但由于肺癌、头颈部肿瘤、多发性骨髓瘤等多数肿瘤细胞表面也存在丰富腺病毒受体<sup>[3]</sup>,因此该净化方法对这些肿瘤自体移植物的体外净化也有着潜在的价值。

体外实验研究结果初步证实H101对造血干细胞中混有的乳腺癌细胞有肯定的净化效果,且在理想净化条件下对造血干细胞毒性很小。其与目前临床广泛采用的MACS技术的比较,是我们下一步主要研究目标。该净化方法的建立很可能部分取代或作为MACS技术的重要补充。

**参考文献**

[ 1 ] Nitz UA, Mohmann S, Fischer J, et al Comparison of rapidly

cycled tandem high-dose chemotherapy plus peripheral-blood stem-cell support versus dose-dense conventional chemotherapy for adjuvant treatment of high-risk breast cancer: results of a multicentre phase trial [ J ]. Lancet, 2005, 366 (9501): 1935 - 1944.

[ 2 ] Seth P, Brinkmann U, Schwartz GN, et al Adenovirus-mediated gene transfer to human breast cancer cells: an approach for cancer gene therapy and bone marrow purging [ J ]. Cancer Res, 1996, 56(6): 1346 - 1351.

[ 3 ] 吴世凯,林 晨,宋三泰. 自体造血干细胞体外净化研究的新进展 [ J ]. 中华肿瘤学杂志, 2005, 27(2), 65 - 68.

[ 4 ] Reid TR, Freeman S, Post L, et al Effects of Onyx-015 among metastatic colorectal cancer patients that have failed prior treatment with 5-FU/leucovorin [ J ]. Cancer Gene Ther, 2005, 12 (8): 673 - 681.

[ 5 ] 夏忠军,常 建,张 力,等. 基因工程腺病毒 H101 瘤内注射联合化疗治疗头颈部及食管鳞癌的 期临床研究 [ J ]. 癌症, 2004, 23(12): 1666 - 1670.

[ 6 ] 司徒镇强,吴军正主编. 细胞培养 [ M ]. 第 1 版. 西安:世界图书出版公司, 2005, 4.

[ 7 ] Stewart AK, Vescio R, Schiller G, et al Purging of autologous peripheral-blood stem cells using CD34 selection does not improve overall or progressive-free survival after high-dose chemotherapy for multiple myeloma: results of a multicenter randomized controlled trial [ J ]. J Clin Oncol, 2001, 19(17): 3771 - 3779.

[ 8 ] Bischoff JR, Kim DH, Williams A, et al An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [ J ]. Science, 1996, 274(5286): 373 - 376.

[ 9 ] Schoenfeld A, Knuger KH, Gomm J, et al. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19 [ J ]. Eur J Cancer, 1997, 33(6) : 854 - 861.

[ 10 ] Ge MJ, Wu QC, Wang M, et al Detection of disseminated lung cancer cells in regional lymph nodes by assay of CK19 reverse transcriptase polymerase chain reaction and its clinical significance [ J ]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005 , 131(10): 662 - 668.

[ 11 ] Felton T, Harris GC, Pinder SE, et al Identification of carcinoma cells in peripheral blood samples of patients with advanced breast carcinoma using RT-PCR amplification of CK7 and MUC1 [ J ]. Breast, 2004, 13(1) : 35 - 41.

收稿日期: 2006 - 01 - 10; 修回日期: 2006 - 04 - 09

