

文章编号: 1007-7847(1999)01-0036-06

# 用5-Fu治疗MT/p210<sup>bcr-abl</sup> 转基因小鼠的研究\*

陈汉春<sup>1</sup>, 安德鲁·皮尔斯<sup>2</sup>, 托尼·威顿<sup>2</sup>

(1. 湖南医科大学 分子生物学研究中心, 中国湖南 长沙 410078;

2. 曼彻斯特科技大学 生物分子科学系, M60, 1QD, 英国)

**摘要:**以5-氟脲嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)腹腔注射治疗了12只携有金属硫蛋白(Metallothionein, MT)启动子和增强子序列、bcr-abl cDNA(p210)序列及SV40剪切和Poly(A)信号序列的转基因慢粒白血病(chronic myeloid leukemia, CML) MT/p210<sup>bcr-abl</sup>小鼠,于治疗的第5d及第10d从不同脏器提取总RNA、DNA及蛋白质,分别进行PCR分析、RT-PCR检测被转移基因的表达水平及免疫沉淀法分析p210<sup>bcr-abl</sup>转基因产物的激酶活性。结果表明,被转移基因在脾脏和骨髓中表达水平较高,胸腺和肾脏中呈低水平表达。5-Fu活体治疗10d后,被转移基因的表达水平及其表达产物的激酶活性均被明显抑制。

**关键词:** bcr-abl; 白血病; 转基因鼠小; 5-氟脲嘧啶(5-Fu); 基因表达

中图分类号: R733·7, Q75 文献标识码: A

## Study on the Treatment of MT/p210<sup>bcr-abl</sup> Transgenic Mice *in vivo* by 5-fluorouracil

CHEN Han-chun<sup>1</sup>, Andrew PIERCE<sup>2</sup>, Tony WHETTON<sup>2</sup>

(1. Research Center of Molecular Biology, Hunan Medical University, Changsha 410078, Hunan, China;

2. Department of Biomolecular Sciences, UMIST, Manchester, M60, 1QD, UK)

**Abstract:** 12 CML (chronic myeloid leukemia) transgenic mice carrying metallothionein (MT) promoter/enhancer, bcr-abl (p210) cDNA and SV40 splicing/poly(A) signal sequences were treated by intraperitoneal injection of 5-Fu (5-fluorouracil). DNA, total RNA and protein were isolated and purified from different organs of the mice after the 5-Fu-treatment for 5 days and 10 days respectively. The transgene and its expression in the

\* 收稿日期: 1998-07-16; 修回日期: 1998-12-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39570805)

作者简介: 陈汉春(1957-), 男, 副教授, 硕士, 发表论文 12 篇, Tel. (0731) 4474411-2547(O), 2238173(H); Andrew Pierce, 男, 讲师, 博士; Tony Whetton, 男, 教授, 博士。

© 1994-2011 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

different tissues examined were detected by PCR and RT-PCR analysis, and the kinase activity of the transgene product (p210) in spleen was investigated by immunoprecipitation assay. The results showed that the expression levels of transgene in spleen and bone marrow were higher than those in thymus and kidney of the transgenic mice, the transgene expression and autophosphorylation activity of transgene product (p210) were significantly inhibited by 5-Fu treatment *in vivo* for 10 days.

**Key words:** bcr-abl; leukemia; transgenic mouse; 5-fluorouracil (5-Fu); gene expression

CML 是由 bcr-abl 基因重排所致的一种造血干细胞恶性疾病, 90% 以上患者具有明显的畸变染色体, 系由正常 9 号染色体上的细胞癌基因 c-abl 断裂易位, 与 22 号染色体的断点簇区 (breakpoint cluster region, bcr) 嵌合形成 t(9; 22), 即费城染色体 (Ph<sup>①</sup>)。这种易位融合形成新的嵌合基因- bcr-abl 基因并转录生成一变异的嵌合  $8.5 \times 10^3$  b (10<sup>3</sup> b, 旧称 kb) mRNA, 后者翻译产生一种具强酪氨酸蛋白激酶活性的融合蛋白质- p210 蛋白质。该蛋白质既可自身磷酸化又可使其他信号转导分子磷酸化而异常激活 Ras 信号转导途径, 从而阻碍细胞分化及凋亡, 导致细胞无限制生长<sup>[1]</sup>。5-Fu 是一种用于治疗多种恶性肿瘤的有效抗癌剂, 其主要作用在于抑制 DNA 复制或损伤 DNA, 已成为目前治疗乳腺癌等恶性肿瘤的首选化疗药物之一<sup>[2]</sup>。本研究即采用 5-Fu 对 MT/p210<sup>bcr-abl</sup>转基因小鼠进行活体治疗, 以探讨其对 bcr-abl 基因表达的影响, 并评价 5-Fu 对 CML 的治疗效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

MT/p210<sup>bcr-abl</sup>转基因小鼠, 系由 Honda H 等构建的 C57BL/6XDBA 2 小鼠<sup>[3]</sup>; 5-Fu、无 RNA 酶的 DNA 酶及蛋白 A 为 Sigma 公司产品; Trizol 试剂为 GIBCO/BRL 公司产品; Titan 一步化 RT-PCR 试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品; c-abl (AB3) 单克隆抗体及兔抗鼠 IgG 为 Oncogene Science 公司产品;  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP 为 Amersham 公司产品。PCR 及 RT-PCR 引物序列为: bcr 有义引物- 5⑦ATT CGCTG ACCATCAATAAG-3⑦ abl 反义引物- 5⑦GGCGTGATGTAGTTGCTTGG-3⑦ SV 40 有义引物- 5⑦CGCTTTGGTCCCGGATCTTT-3⑦ SV 40 反义引物- 5⑦TCATCACTAGATGGCATTTC-3⑦均由 Pharmacia Biotech 公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MT/p210<sup>bcr-abl</sup>转基因小鼠所携 bcr-abl 基因的 PCR 分析

耳垂穿孔法获取 MT/p210<sup>bcr-abl</sup>转基因小鼠组织约 200 mg 加于 20  $\mu$ L 消化缓冲液 (50 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0, 20 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS 和 20 g/L 蛋白酶 K), 55  $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 加蒸馏水 180  $\mu$ L, 混匀后沸水浴 5 min。取其中 1  $\mu$ L 作为 DNA 模板, 以 bcr-abl 引物、经 Taq DNA 聚合酶催化进行 DNA PCR 扩增。加入 DNA 模板、引物及 dNTP 后于 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冷至 54  $^{\circ}$ C 时加入 Taq DNA 聚合酶, 总反应体系为 50  $\mu$ L。PCR 程序为 95  $^{\circ}$ C、30 s, 54  $^{\circ}$ C、45 s, 72  $^{\circ}$ C、1 min, 35 个循环后于 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以 2.5% 琼脂糖凝胶电泳及溴乙啶染色分析 PCR 产物。

### 1.2.2 5-Fu 处理 MT/p210<sup>bc<sub>r</sub>-abl</sup>阳性小鼠

以生理盐水配制 1.25 g/L 的 5-Fu 注射液, 向 8 周龄 MT/p210<sup>bc<sub>r</sub>-abl</sup> 阳性小鼠腹腔注射 150 μg/kg. 共处理 12 只, 雌、雄鼠各 6 只, 处理后常规饲养.

### 1.2.3 总 RNA、DNA 及蛋白质提取

分别于 5-Fu 处理后 5 d 和 10 d 处死小鼠, 采用未经 5-Fu 处理的 MT/p210<sup>bc<sub>r</sub>-abl</sup> 阳性小鼠作对照. 取骨髓、肾脏、脾脏和胸腺, 加于 1 mL Trizol 试剂中. 冰浴条件下将除骨髓以外的其他 3 种组织匀浆, 按公司推荐方法分别提取和纯化总 RNA、DNA 和蛋白质, 其中总 RNA 样品再以无 RNA 酶的 DNA 酶消化 DNA, 再抽提、纯化, 以分光光度法测定各样品中 RNA、DNA 及蛋白质含量.

### 1.2.4 PCR 及 RT-PCR 分析

取各被检组织 DNA 1 μg, 以 Taq DNA 聚合酶催化, 按照方法 1 中 PCR 程序, 在 50 μL 反应体系中, 经 bcr-abl 引物延伸扩增 bcr-abl 基因组 DNA, 扩增片段长度为 372 bp; 同样取各被检组织 DNA 1 μg, 按同样方法经 SV 40 引物对的延伸扩增 SV40 基因组 DNA, 扩增片段长度为 244 bp. 准确取各被检组织总 RNA 1 μg, 按公司推荐方法, 在 50 μL 反应体系中, 加入 SV 40 反义引物, 于 60 °C 加热 2 min 后, 加入 RT-PCR Titan 混合酶, 于 49 °C、30 min 逆转录 SV40 mRNA 为 cDNA. 于 94 °C、2 min 变性后, 进行 PCR 扩增. 程序为 94 °C、30 s, 49 °C、40 s, 68 °C、40 s, 35 个循环后于 68 °C 延伸 5 min, 扩增片段长度为 174 bp. 取 10 μL 经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 及 RT-PCR 产物.

### 1.2.5 MT/p210<sup>bc<sub>r</sub>-abl</sup>转基因产物的激酶活性检测

分别取 5-Fu 处理 5 d, 10 d 及未经 5-Fu 处理的 MT/p210<sup>bc<sub>r</sub>-abl</sup> 阳性小鼠脾脏蛋白质 400 μg, 按照 Honda H 等<sup>[3]</sup>报道的方法, 分析 bcr-abl 基因表达产物-p210 蛋白质的自身磷酸化活性.

## 2 结果

### 2.1 MT/p210<sup>bc<sub>r</sub>-abl</sup>转基因小鼠遗传频率分析

被转移的 bcr-abl 基因 PCR 分析表明, 442 只 bcr-abl 阳性小鼠的后代中, 检测到 bcr-abl 阳性小鼠 298 只, 总阳性率为 67.4%. 其中 236 只雄鼠中 bcr-abl 阳性小鼠 118 只, 占 50%; 206 只雌鼠中 bcr-abl 阳性小鼠 180 只, 占 87.4%. 雌鼠群中 bcr-abl 阳性率约为雄鼠的 1.3 倍.

### 2.2 MT/p210<sup>bc<sub>r</sub>-abl</sup>转基因小鼠被转移基因表达的组织分布(见图 1)

图 1 表明, 在雌鼠或雄鼠骨髓中分别经 PCR 扩增出 bcr-abl 基因组 DNA 片段(Lane 1, 372 bp) 和 SV 40 基因组 DNA 区带(Lane 2, 244 bp); 来源于 4 种被检组织(骨髓、肾、脾、胸腺)的 DNA 样品均显示 bcr-abl PCR 阳性. SV 40 mRNA RT-PCR 扩增显示, 在被分析的 6 只 MT/p210<sup>bc<sub>r</sub>-abl</sup> 阳性小鼠(雌、雄鼠各 3 只)的 4 种被检组织中, 均为脾脏组织中被转移基因的 mRNA 扩增信号最强(Lane 5 和 Lane 9).

### 2.3 5-Fu 对 MT/p210<sup>bc<sub>r</sub>-abl</sup>转基因小鼠被转移基因表达的影响(见图 2)

SV40 mRNA 扩增(图 2)表明, 5-Fu 处理 5 d 对脾组织中被转移基因表达影响较小(Lane 6), 但 10 d 后其被转移基因表达之 mRNA 的 RT-PCR 扩增信号明显减弱(Lane 4).

共检测 6 只经 5-Fu 处理 5 d 的小鼠(雌、雄鼠各 3 只)和 6 只经 5-Fu 处理 10 d 的小鼠(雌、雄鼠各 3 只),结果均与图 2 所示一致。



图 1 MT/p210<sup>bc<sup>r</sup>-abl</sup>转基因小鼠不同组织中被转移基因的 PCR 及 RT-PCR 扩增图谱

M.  $\Phi$ X174/Hinc DNA 分子量标准物

1. ber-abl DNA PCR 产物(372 bp, 雌鼠)
2. SV40 DNA PCR 产物(244 bp, 雄鼠)
- 3、4、5、6. 分别为骨髓、肾、脾、胸腺组织中 SV40 mRNA RT-PCR 产物(174 bp, 雌鼠)
- 7、8、9、10. 分别为骨髓、肾、脾、胸腺组织中 SV40 mRNA RT-PCR 产物(174 bp, 雄鼠)

Fig. 1 Tissue distribution of the transgene and transgene expression in MT/p210<sup>bc<sup>r</sup>-abl</sup> transgenic mice

M.  $\Phi$ X174/Hinc DNA molecular weight markers

1. ber-abl DNA PCR product (372 bp, female mouse)
2. SV40 DNA PCR product (244 bp, male mouse)
- 3, 4, 5, 6. SV40 mRNA RT-PCR product (174 bp) of bone marrow, kidney, spleen, thymus respectively (female mice)
- 7, 8, 9, 10. SV40 mRNA RT-PCR product (174 bp) of bone marrow, kidney, spleen, thymus respectively (male mice)

图 2 5-Fu 对 MT/p210<sup>bc<sup>r</sup>-abl</sup>转基因小鼠脾组织中被转移基因表达的影响

M.  $\Phi$ X174/Hinc DNA 分子量标准物

1. ber-abl DNA PCR 产物(372 bp)
2. SV40 DNA PCR 产物(244 bp)
3. 非转基因同类鼠 ber-abl DNA PCR 检测
4. 5-Fu 处理 10 d, SV40 mRNA RT-PCR 产物(174 bp)
5. 未经 5-Fu 处理, SV40 mRNA RT-PCR 产物(174 bp)
6. 5-Fu 处理 5 d, SV40 mRNA RT-PCR 产物(174 bp)

Fig. 2 The transgene expression in spleen of MT/p210<sup>bc<sup>r</sup>-abl</sup> transgenic mice after 5-Fu treatment

M.  $\Phi$ X174/Hinc DNA molecular weight markers

1. ber-abl DNA PCR product (372 bp)
2. SV40 DNA PCR product (244 bp)
3. ber-abl DNA PCR analysis of nontransgenic mouse
4. SV40 mRNA RT-PCR product (174 bp) of the transgenic mouse treated with 5-Fu for 10 days
5. Ditto, without 5-Fu treatment
6. Ditto, treated with 5-Fu for 5 days

## 2. 4 MT/p210<sup>bc<sup>r</sup>-abl</sup>转基因产物- p210 蛋白质自身磷酸化分析(见图 3)

如图 3 所示,在 MT/p210<sup>bc<sup>r</sup>-abl</sup>转基因小鼠脾脏组织中检测到了具较强自身磷酸化活性的 p210 蛋白质。5-Fu 处理 5 d 对 p210 蛋白质的产生及自身磷酸化作用影响较小(Lane 2),但经 5-Fu 处理 10 d 则 p210 蛋白质自身磷酸化信号明显减弱(Lane 3)。分别分析了经 5-Fu 处理 5 d 及 10 d 的 MT/p210<sup>bc<sup>r</sup>-abl</sup>阳性小鼠各 6 只(雌、雄鼠各 3 只),结果均与图 3 所示一致。

### 3 讨论

CML 的经典治疗方法主要有骨髓移植、羟基脲及/或干扰素治疗<sup>[4]</sup>, 近年来, 有人尝试采用多种化疗药物与细胞因子联合治疗 CML<sup>[5]</sup>. 评价 CML 各种治疗方案的效果在于 Ph<sup>+</sup>染色体的消失或 bcr-abl 基因表达受抑制的程度<sup>[6]</sup>. 由于 CML 细胞呈现较强的抗药性, 探寻新的治疗药物或方案及进一步研究其分子作用机制对 CML 治疗具有指导性意义. 5-Fu 已被常规用于临床抗癌治疗, 但用于白血病治疗尚处于研究阶段. 分子药理学研究表明, 5-Fu 抑制胸苷酸合成酶活性, 阻碍 dTTP 合成, 导致细胞内 dNTP 池失衡而干扰 DNA 合成. 对鼠红白血病细胞 (MELC) 的研究证实, 5-Fu 主要通过上述途径作用于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期和早期 S 期而引起细胞循环紊乱<sup>[7]</sup>. 采用 5-Fu 与细胞因子培养 CML 患者骨髓细胞, 可使祖细胞中 Ph<sup>+</sup>阴性细胞所占比例大大增加<sup>[8]</sup>.

Jazwiec B 等研究表明, Ph<sup>+</sup>阴性的 CD34<sup>+</sup> 细胞比 Ph<sup>+</sup>阳性的 CD34<sup>+</sup> 细胞更能抵抗 5-Fu 的损伤效应<sup>[9]</sup>, 似乎说明 5-Fu 具有一定的选择性杀伤 CML 细胞的能力.

由于 CML 具特征性的 Ph<sup>+</sup>染色体, 它已成为研究白血病及其他恶性肿瘤的分子病因及分子治疗机制的理想模型. 该研究所采用的 MT/p210<sup>bcr-abl</sup> 转基因小鼠模型, 由于整合了全长的 bcr-abl cDNA 序列, 而使转基因小鼠细胞中 bcr-abl 基因组 DNA 和 mRNA 的扩增片段大小无差异, 但在 SV40 poly(A) 信号序列中含有 70 bp 的剪切序列, 故转基因小鼠细胞中 SV40 基因组 DNA 扩增的片段较其相应 mRNA 扩增片段大 70 bp, 分别为 244 bp 和 174 bp. 利用这一特征可鉴定 RT-PCR 产物是否由其 mRNA 扩增而产生. 分析该转基因小鼠的被转移基因遗传频率表明, 似乎 CML 更易遗传至或更多发生于雌性个体, 在人类这类疾病发生的性别差异也是值得研究的课题. 本研究观察到被转移基因在脾脏中呈高水平表达, 这可能是由于脾脏为一重要的造血系统器官, 与白血病的发生、发展关系甚密. 5-Fu 主要作用于转录水平而抑制 bcr-abl 基因表达或直接抑制恶性细胞的增殖, 但其对 bcr-abl mRNA 及 p210 蛋白质的产生的抑制效应, 在经 5-Fu 处理 10 d 才较明显, 这充分证实恶性细胞具有较强的抗药性和生存优势. 因为活体系统中各种因素的相互影响十分复杂, 5-Fu 可通过其直接的细胞毒性作用、也可能伴有机体免疫系统的协同作用而抑制 CML 细胞生长或抑制 p210 蛋白质的产生<sup>[10]</sup>, 阻断 p210 蛋白质介导的、无控制性信号转导途径, 从而使造血干细胞或祖细胞正常增殖和分化. 其确切的分子作用机制尚有待进一步探讨.

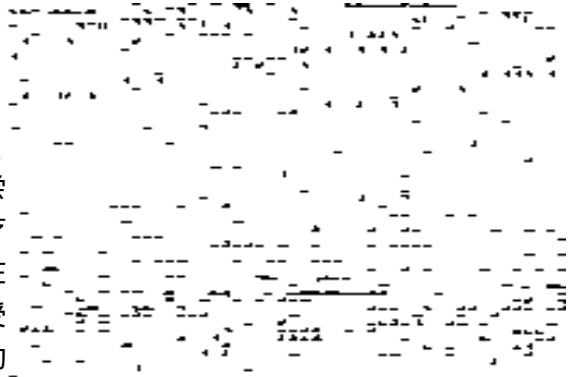


图 3 5-Fu 对 MT/p210<sup>bcr-abl</sup> 转基因小鼠脾组织中转基因产物自身磷酸化活性的影响

- 1, 4. 未经 5-Fu 处理
2. 经 5-Fu 处理 5 d
3. 经 5-Fu 处理 10 d

Fig. 3 Autophosphorylation activity of transgene product in spleen of MT/p210<sup>bcr-abl</sup> transgenic mice after 5-Fu treatment

- 1, 4. without 5-Fu treatment
2. treated with 5-Fu for 5 days
3. treated with 5-Fu for 10 days

## 参考文献:

- [ 1 ] HIRAI H. Molecular diagnosis of human leukemias [ J ] . Asian Med J, 1996, 39( 10 ): 521-527.
- [ 2 ] YOSHIDA M, FUJIOKA A, NAKANO K, *et al.* Antitumor activity of menogaril alone, and in combination against human mammary cancer models in mice and rats [ J ] . Anticancer Res, 1996, 16 ( 3A ): 1155-1159.
- [ 3 ] HONDA H, FUJII T, TAKATOKU M, *et al.* Expression of p210<sup>bcr-abl</sup> by metallothionein promoter induced T  $\alpha$ -cell leukemia in transgenic mice [ J ] . Blood, 1995, 85( 10 ): 2853-2861.
- [ 4 ] URABE A. Chemotherapy for chronic myelogenous leukemia [ J ] . Asian med J, 1996, 39( 10 ): 528-534.
- [ 5 ] MARTINELLI G, TESTONI N, ZUFFA E, *et al.* FLANG(fludarabine+ cytosine arabinoside+ non-vantone+ G-CSF) induces partial remission in lymphoid blast transformation of Ph<sup>+</sup> chronic myelogenous leukaemia[J]. Leuk Lymphoma, 1996, 22( 1-2 ): 173-176.
- [ 6 ] CORTES J E, TALPAZ M, KANTARJIAN H. Chronic myelogenous leukemia: a review [ J ] . Am J Med, 1996, 100( 5 ): 555-570.
- [ 7 ] ELSTEIN K H, MOLE M L, SETZER R W, *et al.* Nucleoside-mediated mitigation of 5-fluorouracil-induced toxicity in synchronized murine erythroleukemic cells [ J ] . Toxicol Appl Pharmacol, 1997, 146( 1 ): 29-39.
- [ 8 ] MAHON F X, PIGEONNIER LAGARDE V, CHAHINE H, *et al.* Ex vivo cytokine expansion of peripheral blood 5-fluorouracil-treated CD34<sup>+</sup> positive chronic myeloid leukemia cells increase the selection of Ph<sup>-</sup> negative cells [ J ] . Br J Haematol. 1997, 98( 2 ): 467-473.
- [ 9 ] JAZWIEC B, MAHON FX, PIGNEUX A, *et al.* 5-Fluorouracil-resistant CD34<sup>+</sup> cell population from peripheral blood of CML patients contains BCR-ABL-negative progenitor cells [ J ] . Exp Hematol, 1995, 23( 14 ): 1509-1514.
- [ 10 ] WATANABE T, ITOH S. Synergistic effects of *Actinobacillus suis* cells in combination with 5-fluorouracil on mice bearing murine L 1210 leukemia cells [ J ] . Cancer Immunol Immunother, 1997, 44 ( 4 ): 216-220.

## 简讯

## 《生命科学研究》被批准为国家科技部 中国科技论文统计源期刊

经国家科技部中国科技信息所批准,《生命科学研究》杂志从 1999 年起列入国家科技部中国科技论文统计源期刊。现将中国科技信息所信息分析中心的贺信部分内容摘录如下:

《生命科学研究》主编先生:

中华人民共和国科学技术部委托中国科技信息所完成的“中国科技论文统计与分析”工作已进行了十年,十年来,统计结果的发布,已在国内外产生了较大的影响,统计结果也为政府决策部门和各科技管理部门提供了客观的定量评估依据。

由于我们的论文统计结果要能反映我国科学研究的基本状况和水平,所以对国内论文统计源的选择只能是反映科研成果的全国性的学术类和科技类的重要期刊,一些指导类、检索类和译报类的期刊,虽属于某学科的“核心期刊”,但不属于我们的收录范围。根据我们多年来制定的期刊选取原则和综合评定,贵刊从 1999 年(用刊为 1998 年)列入国家科技部中国科技论文统计源期刊,在此,向贵刊表示祝贺!