

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.32.001

## 表达 hCD4 和 hCCR5 基因的骨髓间充质干细胞模型的建立\*

李雅婧<sup>1,2</sup>, 诸葛福艳<sup>3</sup>, 梁娟<sup>2</sup>, 何金洋<sup>4</sup>, 谭宁<sup>5</sup>, 曾常春<sup>1,2,△</sup>

(1. 广东医科大学附属龙华中心医院, 深圳 518110; 2. 桂林医学院生物技术学院, 桂林 541004;

3. 中山大学生命科学院, 广州 510275; 4. 广州中医药大学热带医学研究所, 广州 510405;

5. 桂林医学院广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室, 桂林 541004)

**[摘要]** **目的** 研制一种能够表达 hCD4 和 hCCR5 基因的骨髓间充质干细胞(MSCs)模型,以应用于 I 型人类免疫缺陷病毒(HIV-1)研究。**方法** 构建 PLA. ExBi. P/puro-CMV-CD4-IRES-CCR 慢病毒载体,按最佳感染复数转染 MSCs,荧光定量 PCR 检测 hCD4 和 hCCR5 的 mRNA 的表达,免疫印迹法检测 MSCs 中 hCD4 和 hCCR5 蛋白的表达,免疫荧光法检测 hCD4 和 hCCR5 荧光的表达;将建立的 MSCs 细胞进行 HIV-1 感染后,PCR 检测 HIV RNA 的表达。**结果** MSCs 经转染慢病毒载体后,hCD4 和 CCR5 mRNA 凝胶电泳可见 193 bp 和 75 bp 的阳性条带,mRNA 的 qRT-PCR 检测可见其表达升高( $P < 0.01$ );Western blot 检测可见  $55.0 \times 10^3$  (hCD4)和  $40.6 \times 10^3$  (hCCR5)的阳性条带;免疫荧光成像可见存在 CD4 和 CCR5 的荧光表达,而空载慢病毒载体呈阴性。转染后 MSCs 细胞感染 HIV-1 后在培养细胞与上清液中 HIV-1 RNA 均显著升高( $P < 0.05$ )。**结论** 成功建立了高效表达 hCD4/CCR5 蛋白的骨髓间充质干细胞模型,具备对 HIV-1 易感的特性,可应用于 HIV 的发病机制、抗病毒、疫苗开发等研究。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞;HIV-1;细胞模型;hCD4/CCR5;基因表达**[中图分类号]** R-331;R373.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)32-4465-04

## Establishment of a mesenchymal stem cells model stably expressing hCD4 and hCCR5\*

Li Yajing<sup>1,2</sup>, Zhu Ge Fuyan<sup>3</sup>, Liang Juan<sup>2</sup>, He Jinyang<sup>4</sup>, Tan Ning<sup>5</sup>, Zeng Changchun<sup>1,2,△</sup>

(1. Affiliated Longhua Central hospital, Guangdong Medical University, Shenzhen, Guangdong 518110, China;

2. School of Biomedical Technology, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004, China; 3. School of Life Sciences,

Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China; 4. Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of

Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 5. Guangxi Key Laboratory of Molecular Medicine in

Liver Injury and Repair, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a kind of mesenchymal stem cells(MSCs) model that could express hCD4 and hCCR5 to study the field of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1). **Methods** Lentiviral vectors containing the genes of hCD4 and hCCR5 under the transcriptional control of cytomegalovirus promoter were designed. MSCs were transfected by the lentiviral vectors at optimum multiplicity of infection. Transduction efficiencies of hCD4 and hCCR5 in MSCs were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction(RT-PCR), Western blot, and immunofluorescence staining. Subsequently, the transfected human MSCs were infected with HIV-1, and the expression of HIV RNA in the MSCs was detected by RT-PCR. **Results** The MSCs model containing hCD4 and hCCR5 and supporting normal HIV-1 infection was constructed. qRT-PCR showed that MSCs upon infection with lentiviral vectors were highly expressed in hCD4 and CCR5 mRNA sequences( $P < 0.01$ ). Western blot detection showed the positive bands of  $55.0 \times 10^3$  (hCD4) and  $40.6 \times 10^3$  (hCCR5). The results of immunofluorescence staining revealed that hCD4 and CCR5 were expressed on the surface of MSCs. Such results were not found in cells infected with empty lentiviral vectors. And the susceptibility of the hCD4/CCR5 transgenic MSCs to the HIV-1 was further indicated by the detection of HIV-1 RNA in the culture supernatants and cell lysates( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The MSCs model that could highly express hCD4 and hCCR5 was established to support normal HIV-1 infection, which can be used to investigate the development of new therapies and vaccines against HIV.

**[Key words]** mesenchymal stem cells; HIV-1; cell model; human CD4 and CCR5; gene expression

I 型人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV-1)选择性地侵袭人体 CD4<sup>+</sup>细胞,少数 HIV-1 分离株可以感染 CD4<sup>+</sup>T 细胞白血病细胞系,如 CEM、Jurkat、Hut78 细胞等<sup>[1]</sup>。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种来源于中胚层的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞<sup>[2]</sup>;易于分离、培养、扩增及外源基因的转导和表达,且在体外培养的过程中始终保持多向分化的潜能,遗传性能相当稳定<sup>[3]</sup>。此外,转基因 MSCs 可以持续产生多种治疗

作用的蛋白质,对免疫缺陷疾病有潜在治疗作用<sup>[4]</sup>。本研究通过慢病毒载体在 MSCs 细胞膜上加载 hCD4 和 hCCR5 分子,建立一种新的 HIV-1 易感的细胞模型,有利于促进 HIV 的发病机制、抗病毒及基因治疗研究。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix、Gateway® LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix 购自 Invitrogen 公司, QIAquick Gel Extraction Kit 购自 QIAGEN 公司,质粒

小提试剂盒购自 TIANGEN 公司,包装质粒混合物(ViraPowerTMPackaging Mix)购自美国 Invitrogen 公司,标记有 PE 的抗体(CD14、CD29、CD34、CD44、CD45、CD73、CD166)均购自 BD Biosciences 公司;RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购自于 Takara 公司。Maker 为 Thermo 公司产品,CD4 一抗为 Abcam 公司产品,CCR5 一抗为 Novus 公司产品,二抗为中杉金桥公司产品,发光液为 Thermo 公司产品。

## 1.2 方法

### 1.2.1 质粒构建与慢病毒包装

应用 Gateway 技术,将外源基因片段 CMV-CD4-IRES-CCR5-Pgk-Puro 导入慢病毒表达载体 PLV. ExBi. P 中,形成重组慢病毒质粒。制备慢病毒包装载体,将构建的重组慢病毒质粒、pHelper 1 和 pHelper 2 的辅助质粒共转染 293T 细胞,产生假性病毒并进行测定,空载慢病毒作为转染对照。

### 1.2.2 细胞培养与转染

MSCs 购自 Cyagen Bioscience Inc.。分离、纯化 MSCs,置于含 10% 胎牛血清(FBS)、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 DMEM/F12 的培养基中,5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 常规培养。转染慢病毒后 MSCs 鉴定:检测 MSCs 诱导成骨、成脂能力。当细胞融合率达到 50% 左右时,根据最佳感染复数(MOI)加入慢病毒表达载体的培养基 2 mL,聚凝胺浓度为 8  $\mu$ g/mL,以空载慢病毒表达载体进行对照。

### 1.2.3 MSCs 中 hCD4 和 hCCR5 mRNA 的 qRT-PCR 检测

收集第 7、10、14 天的细胞,Trizol 法提取总 RNA。参照试剂说明书进行逆转录合成 cDNA,以逆转录所得到的 cDNA 为模板进行 RT-PCR。实验过程设计空白细胞、转染空载体细胞为阴性对照、以 GAPDH 作为内参对照。引物序列为:CD4(上游引物:5'-TGC CTC AGT ATG CTG GCT CT-3';下游引物:5'-GAG ACC TTT GCC TCC TTG TTC-3');CCR5(上游引物:5'-GCT GGT CAT CCT CAT CCT GAT AA-3',下游引物:5'-ATG GCC AGG TTG AGC AGG TA-3')和 GAPDH(上游引物:5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3',下游引物:5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3')。ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪进行检测,反应程序为:95  $^{\circ}$ C 1 min;94  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环。

### 1.2.4 MSCs 中 hCD4 和 hCCR5 蛋白的 Western blot 检测

提取 MSCs 的细胞总蛋白,配制 10% 的聚丙烯酰胺凝胶、上样、电泳、转膜、染膜、裁膜、脱脂牛奶封膜 1 h,一抗孵育 4  $^{\circ}$ C 过夜、TBST 洗涤一抗 5 次(每次 20 min)、脱脂牛奶封闭 30 min、二抗孵育 1 h、TBST 洗涤二抗 5 次(每次 5 min)、发光成像。

### 1.2.5 MSCs 中 hCD4 和 hCCR5 的免疫荧光法检测

细胞生长融合再次达到 70% 左右时,用预温的 1  $\times$  PBS 洗 3 次,每次 5 min;4% 的甲醛室温固定 20~30 min;1  $\times$  PBS 洗 3 次,每次 5 min;4% BSA 室温封闭 30 min;加 1% BSA 稀释的一抗放在湿盒里,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;1  $\times$  PBS 洗 3 次,每次 5 min;加 1% BSA 稀释的二抗抗光孵育 30 min;1  $\times$  PBS 洗 3 次,每次 5 min;激光共聚焦显微镜下观察。

### 1.2.6 MSCs 的 HIV-1 感染及 qRT-PCR 检测

当 MSCs 细胞融合率达到 50% 左右时,进行 HIV-1 感染。于感染后 2、4、6、8、10 d 分别留取培养细胞及其上清液备检。采用探针法和核苷酸胶体染料法 qRT-PCR 法分别检测上清液中及细胞内 HIV-1 RNA 水平。引物序列为:HIV-1(上游引物:STT TTA RYC CAG AAG TAA TAC CCA TGT T;下游引物:GCA GCY TCY TCA TTG ATG GT);探针序列为:FAM- ACT

ATG TCC ACC TGC CAT TAA GCC CGA GA-TAMRA。

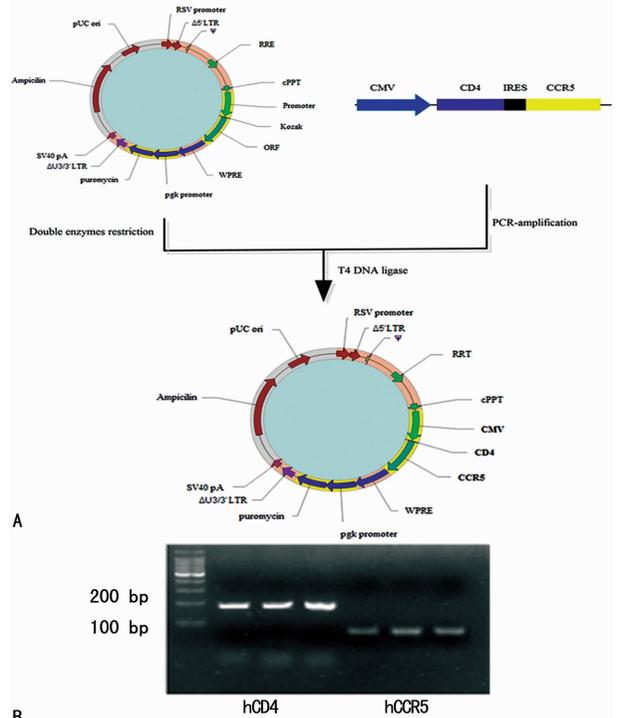
### 1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组之间比较用独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

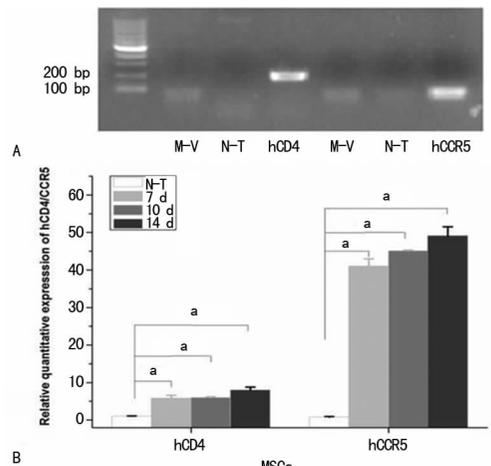
### 2.1 慢病毒载体的构建结果

通过 Gateway 技术,将外源基因片段 CMV-CD4-IRES-CCR5 导入慢病毒表达载体中,构建的示意图及其鉴定见图 1。CMV 为启动 hCD4 基因表达的启动子;IRES 序列连接 hCD4 和 hCCR5 基因,并为 hCCR5 的启动子;Puro 为抗性基因,Pgk 为其启动子(图 1A)。在 100 及 200 bp 的下侧各见一条阳性条带,与引物设计的目的片段 hCD4 和 hCCR5 的理论大小 193 bp 和 75 bp 相对应,表明为 hCD4 和 hCCR5 的阳性克隆(图 1B)。



A: hCD4/CCR5 慢病毒包装载体结构示意图;B: 琼脂凝胶电泳结果,Marker 为 500 bp

图 1 hCD4/CCR5 慢病毒载体结构及鉴定结果



A: 凝胶电泳结果;B: qRT-PCR 结果;\*,  $P < 0.01$

图 2 MSCs 中 hCD4/CCR5 mRNA 水平的 qRT-PCR 检测结果

**2.2 hCD4/CCR5 的 mRNA 表达结果** 转染后 MSCs 的 hCD4 和 hCCR5 mRNA 琼脂糖凝胶电泳检测与 qRT-PCR 结果见图 2。于 100 及 200 bp 标准带下侧各有 1 条阳性条带,与 hCD4 和 CCR5 理论大小 193 bp 和 75 bp 相对应,而空载组 (M-V) 和未感染组 (N-T) 未见该阳性条带 (图 2A); MSCs 慢病毒转染后第 7、10、14 天的 qRT-PCR 结果显示,与 N-T 组相比, hCD4 和 hCCR5 的 mRNA 表达均升高 ( $P < 0.01$ ), 见图 2B。

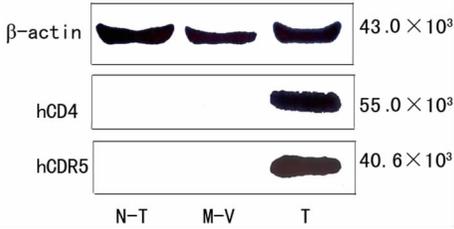
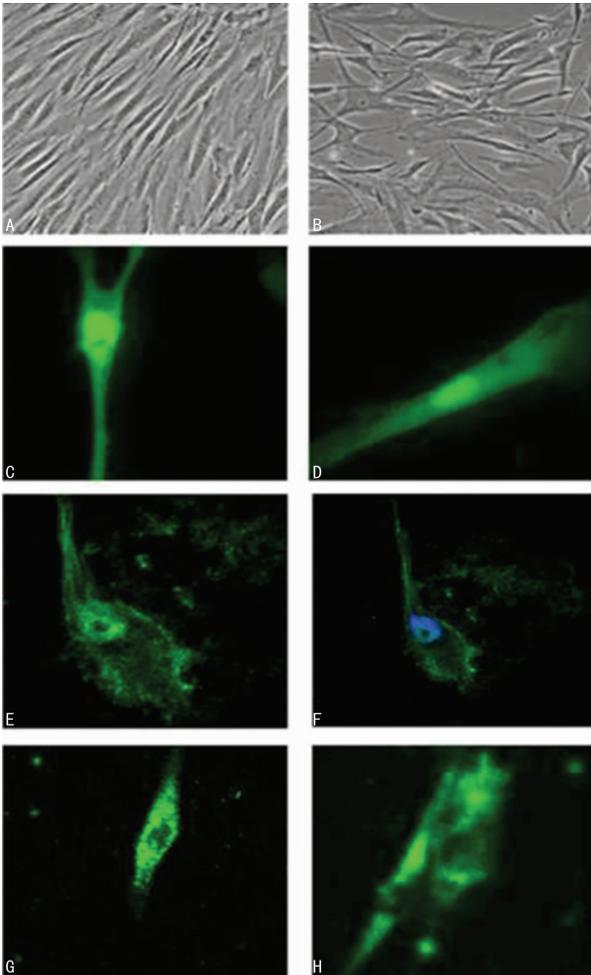


图 3 MSCs 中 hCD4/CCR5 蛋白的 Western blot 检测结果



A、B: 空白对照组 MSCs 细胞形态的显微成像结果; C、D: MSCs 感染空载病毒后的荧光结果; E、F: MSCs 转染慢病毒后 hCD4 分子的荧光显微成像结果; G、H: 转染后 hCCR5 分子的荧光成像结果

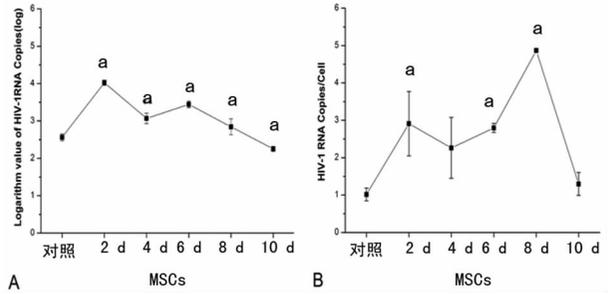
图 4 MSCs 中 hCD4/CCR5 的免疫荧光法检测结果 ( $\times 400$ )

**2.3 hCD4/CCR5 蛋白的表达结果** 提取 MSCs 的总蛋白,以  $\beta$ -actin 为内参, hCD4 和 hCCR5 蛋白的 Western blot 检测结果见图 3。转染后 MSCs 组 (T) 可见与 CD4 和 CCR5 蛋白已知大小 (分别为  $55.0 \times 10^3$  和  $40.6 \times 10^3$ ) 相符合的阳性条带, 表明

MSCs 中存在 CD4 和 CCR5 蛋白的表达; 而在空载组 (M-V) 和未感染组 (N-T) 中, 未见该条带的表达。

**2.4 hCD4/CCR5 的荧光表达结果** hCD4/CCR5 的免疫荧光显微成像结果见图 4。MSCs 转染慢病毒后, 在细胞核和细胞膜上可见 CD4 分子的荧光表达; 在细胞核和细胞膜上可见 CCR5 分子的荧光表达。

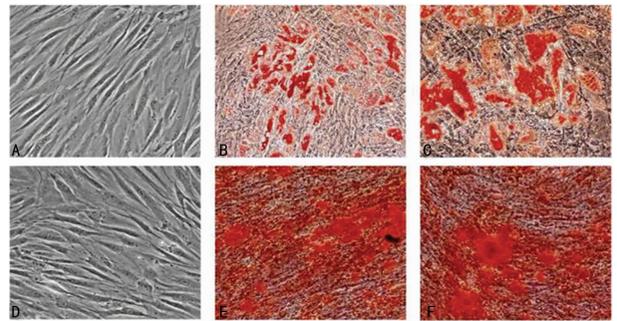
**2.5 MSCs 细胞感染 HIV-1 后 HIV-1 RNA 的表达结果** 转染后 MSCs 细胞进行 HIV-1 感染, 培养细胞及上清液的 HIV-1 RNA 检测结果见图 5。培上清液的 HIV-1 RNA 在第 2、4、6、8 天升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 5A。MSCs 细胞内的 HIV-1 RNA 在第 2、6、8 天升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 5B。



A: 上清液的 HIV-1 RNA 表达水平; B: 细胞内的 HIV-1 RNA 表达水平; a:  $P < 0.05$

图 5 MSCs 感染 HIV-1 后上清液与细胞内 HIV-1 RNA 结果

**2.6 MSCs 诱导成脂、成骨能力的检测结果** 成脂诱导后, 随着诱导时间的延长, 含脂滴细胞逐渐增多细胞体积逐渐增大, 由原来的长梭形变为圆形或多角形 (图 6B)。诱导 14 d 后, 脂肪细胞中含大小不等的脂滴, 脂滴被染成橙红色 (图 6C)。成骨诱导后 1 周, 大约 80% 以上的 MSCs 形态不规则, 成为多角形, 细胞基质中出现钙化斑 (图 6E); 2~3 周时, 成骨诱导组细胞基质形成多层小结结构, 钙化物形成明显, 并形成钙化结节 (图 6F)。图 6A、D 则作为空白对照。



A、D: 空白对照; B: 圆形或多角形含脂滴细胞; C: 脂滴被染成橙红色; E: 细胞基质中出现钙化斑; F: 形成钙化结节

图 6 MSCs 诱导成脂、成骨能力的检测结果 ( $\times 400$ )

### 3 讨论

MSCs 作为基因治疗的潜在工具得到很大的关注<sup>[5-6]</sup>。对动物移植的大量研究发现, MSCs 具有多项分化潜能, 能够分化为成骨细胞<sup>[7]</sup>、软骨细胞<sup>[8]</sup>、心肌细胞<sup>[9]</sup>、神经细胞<sup>[10]</sup>、上皮细胞<sup>[11]</sup>、以及造血细胞<sup>[12]</sup>。更重要的是, MSCs 可以导入外源基因, 并保持转基因在体内有效且持续的长期表达<sup>[13]</sup>。近年来在抗 HIV 感染的各类研究中, 基因治疗有着快速的发

展<sup>[14]</sup>。慢病毒载体介导的 MSCs 不仅是一个新的 HIV-1 易感的细胞模型,而且在传染病的基因治疗方面,MSCs 基因疗法也是一个新的亮点。

慢病毒载体作为一种有效且多用途的基因转移工具,与其他逆转录病毒相比,不但能转导分裂细胞,而且能转导非分裂细胞且能保持持久的转基因表达。基于 HIV-1 的慢病毒载体,在转导效率和转导方式上都优于其他逆转录病毒,是目前应用研究最广泛的载体。hCD4 分子是一种膜分子,主要表达于辅助 T(Th)细胞,也是 HIV-1 入侵细胞的主要受体<sup>[15]</sup>;hCCR5,作为 G 蛋白偶联因子超家族(GPCR)成员的细胞膜蛋白,是细胞内  $\beta$  趋化因子(RANTES、MIP-1 $\alpha$  和 MIP-1 $\beta$ )的受体,亦是 HIV-1 入侵机体细胞的主要辅助受体之一<sup>[16]</sup>。部分 HIV 人类细胞模型是通过加载 hCD4 和 hCCR5 建立的,例如 TZM-bl 细胞系<sup>[17]</sup>,是一种基于稳定表达 CD4 和 CCR5 基因的人宫颈癌 HeLa 细胞,广泛应用于 HIV-1 感染的研究。本实验设计的慢病毒载体是在 CMV 启动子的转录控制下含有 hCD4 和 hCCR5 基因的慢病毒。

培养的 MSCs 细胞,根据空载慢病毒载体获得的最佳 MOI 结果进行慢病毒载体感染。经转染后,琼脂糖凝胶电泳结果表明,hCD4 和 hCCR5 的条带与理论大小一致,而 qRT-PCR 结果更进一步说明可以阳性表达 hCD4 和 hCCR5 mRNA,并且随天数具有增加的趋势。提取 MSCs 的蛋白质进行了 Western blot 检测,实验结果显示 MSCs 中有 hCD4 和 hCCR5 蛋白的表达。免疫荧光的结果进一步显示 hCD4 和 hCCR5 可以在 MSCs 的细胞膜上表达。经鉴定成功转染慢病毒后的 MSCs 仍具有干细胞特性,此细胞模型是可稳定表达外源基因且正常传代的细胞株。简而言之,本实验中应用慢病毒载体,成功地将 hCD4 和 hCCR5 导入于 MSCs 细胞并实现了高效表达。

本研究中所制备的高效表达 hCD4/hCCR5 的 MSCs 细胞,主要是应用于 HIV-1 易感细胞模型研究。HIV-1 主要侵犯人体的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞和巨噬细胞,其感染过程包括病毒的吸附、侵入、逆转录、基因组的整合、表达及释放等过程<sup>[18]</sup>。转染慢病毒后的 MSCs 细胞,可以高效地表达 hCD4 和 hCCR5 蛋白,也就是说具备了 HIV-1 感染的受体与辅助受体,为 HIV-1 的入侵感染准备了基本条件。通过 HIV-1 对研制的 MSCs 细胞的感染验证,qRT-PCR 检测结果显示其培养上清液和细胞裂解液中均可以检测到 HIV-1 RNA,这证实 HIV-1 可感染本研制的 MSCs 细胞,并且 HIV-1 在细胞内能整合和实现病毒完整的复制。

综上所述,本研究通过慢病毒载体成功且高效地将 CD4 和 CCR5 基因转入 MSCs 中,并证实这种转基因的 MSCs 可以支持 HIV-1 的有效入胞、整合和复制。一种新的可以稳定表达 hCD4/CCR5 的细胞模型成功建立,作为 HIV-1 的宿主细胞,这种细胞模型对 HIV/AIDS 的发病机制及治疗的进一步研究有很大的帮助。

#### 参考文献

[1] Wang SF, Tsao CH, Lin YT, et al. Galectin-3 promotes HIV-1 budding via association with Alix and Gag p6[J]. *Glycobiology*, 2014, 24(11):1022-1035.

[2] 唐文洁,李玛琳,洪岸.间充质干细胞的特性与分化诱导

研究进展[J]. *中国科学(生命科学)*, 2006, 36(6):486-492.

[3] Ryu CH, Park KY, Hou Y, et al. Gene therapy of multiple sclerosis using interferon beta-secreting human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Biomed Res Int*, 2013; 696738.

[4] Jang YK, Kim M, Lee YH, et al. Optimization of the therapeutic efficacy of human umbilical cord blood-mesenchymal stromal cells in an NSG mouse xenograft model of graft-versus-host disease[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(3):298-308.

[5] Mcginley L, McMahon J, Strappe P, et al. Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells & enhanced survival in an in vitro model of ischaemia[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2011, 2(2):12.

[6] Bak XY, Lam DH, Yang JY, et al. Human embryonic stem Cell-Derived mesenchymal stem cells as cellular delivery vehicles for prodrug gene therapy of glioblastoma[J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(11):1365-1377.

[7] Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive Nature and function of mesenchymal stem cells[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(2):126-131.

[8] Brisby H, Papadimitriou N, Brantsing CA, et al. The presence of local mesenchymal progenitor cells in human degenerated intervertebral discs and possibilities to influence these in vitro: a descriptive study in humans[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(5):804-814.

[9] Li Q, Qi LJ, Guo ZK, et al. CD73<sup>+</sup> adipose-derived mesenchymal stem cells possess higher potential to differentiate into cardiomyocytes in vitro[J]. *J Mol Histol*, 2013, 44(4):411-422.

[10] Moussavou G, Kwak DH, Lim MU, et al. Role of gangliosides in the differentiation of human mesenchymal-derived stem cells into osteoblasts and neuronal cells[J]. *BMB Rep*, 2013, 46(11):527-532.

[11] Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(14):8407-8411.

[12] Harris DM, Hazan-Haley I, Coombes KA, et al. Transformation of human mesenchymal cells and skin fibroblasts into hematopoietic cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6):e21250.

[13] Bartholomew A, Patil S, Mackay A, et al. Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo[J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(12):1527-1541.

[14] Allam O, Samarani S, Ahmad A. Mesenchymal stem cell therapy in HIV-infected HAART-treated nonimmune responders restores immune competence[J]. *AIDS*, 2013, 27(8):1349-1352.

耐药的作用。说明斑马鱼中的肿瘤药物耐药性与 *abcb4* 基因有关,而人类该耐药机制主要是由 *abcb1* 基因发挥作用,故本实验证实斑马鱼 *abcb4* 基因与人的 *abcb1* 基因具有较高的同源性,且斑马鱼的 *abcb4* 基因表达水平的变化和同源基因在人细胞上研究一致。介于人类耐药相关基因 *abcb1* 在肿瘤多药耐药中的重要性,由此推测斑马鱼中 *abcb4* 基因表达变化与多药耐药相关联。因此,本文通过对斑马鱼 *abcb4* 基因的研究,为多药耐药转基因斑马鱼模型建立以及抗肿瘤药物在斑马鱼模型进行多药耐药性筛选奠定了重要实验基础。因此,可以选择 *abcb4* 为靶基因进行操作,建立斑马鱼肿瘤多药耐药模型开展相关研究工作。另外,通过研究发现吉非替尼不仅不易引起耐药,反而对易引起耐药的药物有逆转耐药的作用,因此在以后的临床用药中,可以考虑用吉非替尼和易耐药的抗肿瘤药物联合应用于相关的临床治疗,这样可以提高治疗效果。同时,用斑马鱼构建肿瘤多药耐药模型,为以后新药临床前的耐药性筛选及临床用药中药物耐药性的评价提供筛药模型。提示临床用药时,对于易耐药的药物采用像吉非替尼这样逆转耐药的药物联合运用,提高临床疗效。

由于抗肿瘤药物种类繁多,且发生机制复杂。除吉非替尼、吉非替尼和阿霉素的混合液外,还需要选用更多不易耐药的抗肿瘤药物及吉非替尼和更多的易耐药的药物联合运用进行验证,从而检测耐药相关的基因、蛋白和相关的信号通路,以期进一步了解 *abcb4* 基因在斑马鱼多药耐药中的相关影响。

#### 参考文献

- [1] Locher KP. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(6):487-493.
- [2] Chen Z, Shi T, Zhang L, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette(ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade [J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1):153-164.
- [3] Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, et al. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(2):147-156.
- [4] Holland IB. ABC transporters, mechanisms and biology: an overview [J]. *Essays Biochem*, 2011, 50(1):1-17.
- [5] Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 455(1):152-162.
- [6] Fletcher JI, Williams RT, Henderson MJ, et al. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology [J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 26:1-9.
- [7] Schumacher T, Krohn M, Hofrichter J, et al. ABC transporters B1, C1 and G2 differentially regulate neuroregeneration in mice [J]. *PloS one*, 2012, 7(4):e35613.
- [8] 孙琮杰,何志旭,舒莉萍,等.阿霉素对模式生物斑马鱼中 *abcb4* 基因表达的影响 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(1):7-13.
- [9] Hirose T, Fujita K, Kusumoto S, et al. Association of pharmacokinetics and pharmacogenomics with safety and efficacy of gefitinib in patients with EGFR mutation positive advanced non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2016, 93:69-76.
- [10] Leggas M, Panetta JC, Zhuang Y, et al. Gefitinib modulates the function of multiple ATP-binding cassette transporters in vivo [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9):4802-4807.
- [11] Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CR, et al. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade [J]. *Drug Resist Updat*, 2015, 18:1-17.
- [12] Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(5):353-367.
- [13] MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(10):721-731.
- [14] Fischer S, Klüver N, Burkhardt-Medicke K, et al. *Abcb4* acts as multixenobiotic transporter and active barrier against chemical uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *BMC Biol*, 2013, 11(1):1-16.
- [15] Kiehl S, Herkt SC, Richter AM, et al. ABCB4 is frequently epigenetically silenced in human cancers and inhibits tumor growth [J]. *Sci Rep*, 2014, 4:6899.
- [16] Lu X, Long Y, Sun R, et al. Zebrafish *Abcb4* is a potential efflux transporter of microcystin-LR [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2015, 167:35-42.
- [17] Platt EJ, Bilaska M, Kozak SL, et al. Evidence that ecotropic murine leukemia virus contamination in TZM-bl cells does not affect the outcome of neutralizing antibody assays with human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Virol*, 2009, 83(16):8289-8292.
- [18] Sieg SF, Bazdar DA, Lederman MM. S-phase entry leads to cell death in circulating T cells from HIV-infected persons [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(6):1382-1387.

(收稿日期:2017-04-19 修回日期:2017-06-17)

(上接第 4468 页)

- [15] Yu CR, Kim SH, Mahdi RM, et al. SOCS3 deletion in T lymphocytes suppresses development of chronic ocular inflammation via upregulation of CTLA-4 and expansion of regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2013, 191(10):5036-5043.
- [16] Shahin K, Sartor M, Hart DN, et al. Alterations in chemokine receptor CCR5 expression on blood dendritic cells correlate with acute Graft-Versus-Host disease [J]. *Transplantation*, 2013, 96(8):753-762.

(收稿日期:2017-04-18 修回日期:2017-06-16)