

# 大鼠骨髓增生异常综合征基因治疗及其机制研究

冯宝章 雷健玲 林泽嬉

**摘要** **目的** 应用反基因 V-erbB 寡核苷酸(ODN)产品对大鼠骨髓增生异常综合征(MDS)动物模型进行基因治疗,观察其疗效和可能的毒性反应。**方法** 尾静脉注射或口服治疗。对 42 只动物应用不同给药方法和剂量进行治疗。(1)尾静脉注射给药,以常规剂量(D)0.56mg/kg 和 0.5 × D 两个剂量对 17 只大鼠 MDS 进行治疗。并以 8 只未经任何治疗的 MDS 为对照。在 2~3 个月的观察期,17 只大鼠 MDS 均有骨髓原始和早幼粒细胞百分比(%)的下降,其中,94.1% (16/17) 大鼠骨髓象恢复正常或接近正常;对照组 8 只 MDS,3 只从 RA 发展为 RAEB,4 只死于内脏出血,未见逆转为正常者。(2)口服用药 14 只动物,分别以 1 × D、0.5 × D 和 0.25 × D 3 种不同剂量。**结果** 仅 1 × D 有效,其余 2 种剂量均无效。(3)将反基因 V-erbB 寡核苷酸与 CpG 寡核苷酸联合应用,对 MDS、AEL 和 AML 进行尾静脉注射治疗,发现此 2 种寡核苷酸治疗,显效时间明显缩短。但上述方案仅对 MDS 和 AEL 有效,而对 AML 则无效。(4)疗效原理研究证明,反基因 V-erbB ODN 能抑制大鼠 MDS 中白血病的发展,而中心错配的反基因 V-erbB ODN 和正基因 V-erbB ODN 则不能。**结论** 在 0.56mg/kg 剂量下,此产品对大鼠 MDS,不论静脉注射或口服用药均有明显的疗效,且毒性不显。治疗恢复期间大鼠平均体重增加 98g 且生育能力完好,说明此产品具有临床应用价值;反基因 V-erbB ODN 通过形成巩固三链 DNA 结构,抑制内源性 V-erbB 表达和扩增,从而显示疗效。

**关键词** 大鼠 MDS 反基因 V-erbB ODN 基因治疗

**Gene Therapy for Rat Myelodysplastic Syndrome(MDS) and Its Principle.** Feng Baozhang, Lei Jianlin, Lin Zexi. Lab of V-erb Gene Therapy Com. LTD, Tianjin 300020, China

**Abstract Objective** To use antigene V-erbB ODN to treat rat MDS and to observe their therapeutic effect and possible toxicity. **Methods** The gene therapy was performed in 42 MDS rats with different doses(D) and methods of administration. **Results** 17 MDS rats were injected tail-intravenously with 1 × D and 0.5 × D (D = 0.56mg/(kg · d)), and 8 MDS rats were served as control. 1 to 3 months after gene therapy, the decrease of BM blast percentages was found in all treated MDS rats. Among them 94.1% (16/17) MDS rats recovered to normal or near-normal levels, while in control 3 RA developed into RAEB, and 4 MDS died of internal bleeding and none recovered. 14 MDS rats were administrated orally with 1 × D, 0.5 × D and 0.25 × D. The therapeutic effect was observed only in 1 × D group and none in others. The combination of V-erbB and CpG ODNs was used to treat MDS rats with tail-intravenously injection. The therapeutic effect was obtained in rat MDS and AEL but AML. Antigene V-erbB ODNs can inhibit development of leukemia in MDS, but their central mismatch ones and sense V-erbB ODNs did not. **Conclusion** The products had obvious therapeutic effect on rat MDS with 1 × D, regardless of ven-injection or orally administration, and did not show toxicity. During the period of observation, the bodyweight of treated MDS rats increased average 98 grams and their producibility was available. This indicated that the patent products were useful in clinic. The studies on mechanism of therapeutic effect indicated that antigene V-erbB ODNs inhibited endogenous V-erbB expression and amplification by formation of stable triplex DNA struction.

**Key words** Rat; MDS; Antigene; V-erbB; ODN; Gene therapy

我们以往曾应用禽类原始红细胞增多症(avian erythroblastosis)病毒癌基因 V-erbB 和 V-erbB + A 作探针,进行 Southern 印迹杂交,证明人类骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)和白血病以及大鼠 MDS 和红白血病具有相同的 C-erbB 重排/扩增<sup>[1-3]</sup>。应用 V-erbB PCR 和 V-erbB 寡核苷酸原位

杂交技术,均证明其结果具有发病学和诊断学意义,并为病例细胞遗传学检查以及随访结果所支持。从而,确定用反基因 V-erbB 寡核苷酸(oligodeoxynucleotides, ODNs)对大鼠 MDS 进行基因治疗研究。

我们设计并合成的反基因 V-erbB 寡核苷酸,经硫代磷酸修饰以便抵抗核酶的消化作用,使其达到细胞核内内源性 V-erbB 的靶位置,并形成三链牢固结合状态。从而实现对其复制和扩增的有效抑制。我们曾报道过应用反义 V-erbB 寡核苷酸对 5 只大鼠

MDS 进行基因治疗,取得初步但令人振奋的结果<sup>[4]</sup>。现通过对 42 只大鼠 MDS 不同剂量和不同给药途径的治疗,结果表明上述反基因 V - erbB 寡核苷酸能有效地的降低大鼠 MDS 骨髓原始和早幼粒细胞的百分比,现报道如下。

**材料与方法**

1. 动物模型:应用二甲基苯蒽(DMBA)诱发 Wistar 大鼠 MDS。所用剂量为 35mg/kg,每周 1 次,共计 3 次,3~4 个月后发生 MDS 或白血病,少数发生肉瘤。建模型的方法详见参考文献[3]。并证明它与人类 MDS 和白血病有相同的 C - erbB 重排/扩增以及 N - ras 点突变。大鼠 MDS 包括 RA、RAEB 和 RAEBT3 个亚型。难治性贫血(RA)可发展为原始和早幼粒细胞增多的 RA,即 RAEB 和转化中的 RAEB,即 RAEBT 和白血病(AL)。主要依据大鼠股骨骨髓原始和早幼粒细胞百分比来判断。采用大鼠 MDS 进行基因治疗研究,其突出优点是大鼠可以在活体情况下做治疗前后多次骨髓穿刺而不必杀死动物。这是小鼠模型做不到的。

2. 给药方法:(1)尾静脉注射:用 3% 巴比妥钠注射液 0.3~0.5ml 腹腔注射,将 MDS 大鼠麻醉以便做尾静脉注射。使用前用无菌生理盐水溶解上述寡核苷酸粉针剂备用。剂量(D)为 0.56mg/(kg·d)(1×D)或 0.28mg/(kg·d)(0.5×D)。连续给药 3 天为 1 个疗程。2~3 个月后做骨髓穿刺,检查骨髓象变化并观察疗效。观察和诊断指标参照人类 MDS 诊断和分类标准进行<sup>[4]</sup>。(2)口服给药:根据 MDS 大鼠日平均饮水量,将反基因 V - erbB 寡核苷酸溶解于自来水中供其饮用,并照常喂养。剂量为 0.56mg/(kg·d),连续饮用 3 天为 1 个疗程。观察和判断疗效标准同上。

**结 果**

1. 尾静脉注射给药治疗:以 1×D 和 0.5×D 两

个剂量治疗 17 只大鼠 MDS,并以 8 只大鼠 MDS 为空白对照。发现在 2~3 个月观察期内,17 只治疗鼠骨髓原始和早幼粒细胞百分比均有下降(表 1),原始和早幼粒细胞从平均 9.6% 下降到 3.6%(P<0.01)。其中 94.1%(16/17)骨髓象恢复正常或接近正常(表 2)。治疗观察期动物体重平均增加 98g,且生育能力完好。空白对照组 8 只 MDS 中,3 只从 RA 发展为 RAEB,4 只死于内脏出血,未见 MDS 逆转为正常者。

**表 1 基因治疗前后 MDS 大鼠骨髓形态观察**

MDS 大鼠	MDS 亚型	剂量	原始+早幼粒细胞百分比减少(范围)
97-B-0	RAEB	1×D	10.5(13.5~3.0)
B-1*	RAEB	1×D	14.0(15.0~1.0)
B-4	RAEB	1×D	5.0(11.0~6.0)
A-4	RAEB	1×D	5.0(17.0~12.0)
C-2	RAEB	1×D	4.0(9.0~5.0)
C-8	RAEB	1×D	4.0(8.0~4.5)
D-3	RAEB	1×D	7.0(13.0~6.0)
D-5	RAEB	1×D	7.0(9.5~2.5)
B-2	RAEB	1×D	2.5(7.0~4.5)
E-5	RAEB	1×D	3.0(6.5~3.0)
D-4	RAEB	1×D	4.0(6.5~2.5)
D-1	RAEB	1×D	7.5(9.5~2.0)
D-2	RAEB	1×D	8.5(11.5~3.0)
98-B-5	RA	1×D	4.0(5.0~1.0)**
B-1	RAEB	1×D	6.0(7.0~1.5)
98-C-3	RAEB	0.5×D	3.0(6.0~3.0)
B-2	RAEB	0.5×D	5.5(9.5~4.0)

\* 该大鼠观察期间死于炎症;\*\* 该大鼠发生肉瘤并转移到骨髓, A-4 大鼠基因治疗后原始+早幼粒细胞百分比没达到正常水平

**表 2 33 只大鼠 MDS 基因治疗方案和结果**

分组	方法	动物数(n)	剂量	原始+早幼粒细胞百分比减少	骨髓象正常	显效期
A	尾静脉注射	17	1×D	17/17	16/17	1~3 个月
	V - erbB	2	0.5×D	2/2	2/2	1~3 个月
B	口服用药	8	1×D	8/8	7/8	1~3 个月
		4	0.5×D	0/4	0	1~3 个月
		2	0.25×D	0/2	0	1~3 个月

A 组治疗后 8~12 个月未见 MDS 复发或发展为白血病

2. 口服给药治疗:以 1×D、0.5×D 和 0.25×D 3 种剂量分别对 14 只大鼠 MDS 进行治疗。在相同的观察期内,仅 1×D 剂量组 8 只 MDS 有效,其余 2 个剂量组均无效(图 1)。

3. 复方韦尔柏反基因寡核苷酸治疗:以上 2 种治疗均以单方韦尔柏(V - erbB)反基因寡核苷酸进行治疗。为了探讨免疫刺激剂即 CpG 寡核苷酸在治疗中的作用,我们将上述 2 种寡核苷酸联合应用,对 3

只大鼠进行治疗,其结果见表 3。从表 3 可见,联合应用治疗 MDS,显效时间明显缩短。复方对 MDS 和 AEL 有效,但对 AML 无效。

4. V - erbB 反基因寡核苷酸疗效原理探讨:(1)正基因和反基因 V - erbB 寡核苷酸对大鼠 MDS 骨髓的影响:上述 2 种 V - erbB 寡核苷酸对两只 MDS - RAEB 治疗结果见图 2。从图 2 可见,2 只大鼠 MDS - RAEB(即原始细胞增多型难治性贫血

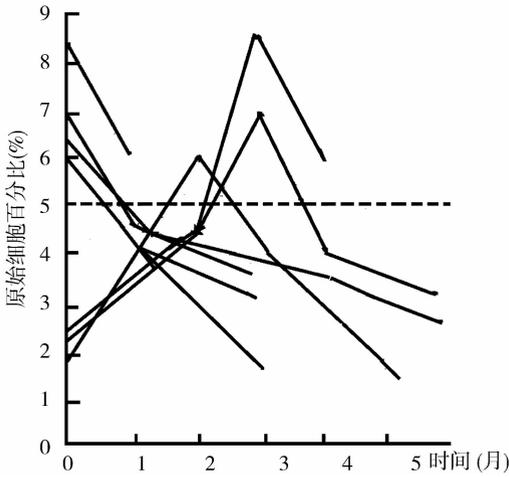


图1 大鼠 MDS 口服反基因 V - erbB 寡核苷酸治疗  
显示骨髓原始及早幼粒细胞百分比的下降

(RAEB),正反基因 V - erbB 寡核苷酸治疗后 2 个月内,它们骨髓原始细胞百分比均有下降。但此后,正基因寡核苷酸治疗者,原始细胞在 1 个月内快速增加到 20% 以上,达到急性白血病诊断水平(即 RAEBT),而反基因寡核苷酸治疗则不能。说明反基因寡核苷酸有抑制骨髓原始细胞增多的功能。(2)反基因 V - erbB 寡核苷酸(B<sub>1</sub>)及中心错配的反基因 V - erbB 寡核苷酸(M)对大鼠 MDS 骨髓影响:应用上述 2 种的反基因 V - erbB 寡核苷酸对 3 只大鼠 MDS 治疗结果见图 3。从图 3 可见,反基因 V - erbB 寡核苷酸治疗后,大鼠骨髓原始细胞快百分比快速下降(箭头所示)而中心错配者(M)与未治疗者(C)一样,骨髓原始细胞百分比继续增加,说明中心错配可以使本来有效的寡核苷酸(B<sub>1</sub>)失去作用,这是因为它与靶位置无法牢固结合的缘故。

表 3 复方韦尔柏注射液治疗结果

病鼠	诊断	给药后时间(天)	原始 + 早幼粒细胞百分比		给药方案
			给药前	给药后	
1	RAEB	10	14.5	1.5(G)	V - erbB + CpG
2	AEL	7	16.0	4.5(G)	V - erbB + CpG
3	AML		48.0	正常(E)	V - erbB + CpG
			25.5	37.0(G)	
			2.0	6.0(E)	

G = 粒系; E = 红系; RAEB: 原始细胞增多型 RA (难治性贫血); AEL: 急性红白血病、AML 急性髓细胞白血病。AEL 可发展为 AML

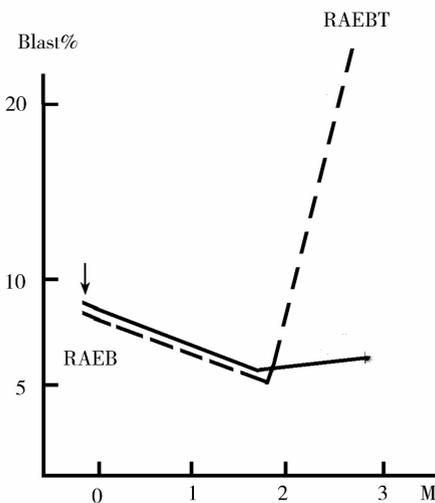


图 2 大鼠 MDS 尾静脉注射治疗

显示反基因和正基因 V - erbB 寡核苷酸不同的作用。  
虚线示正基因,实线示反基因治疗

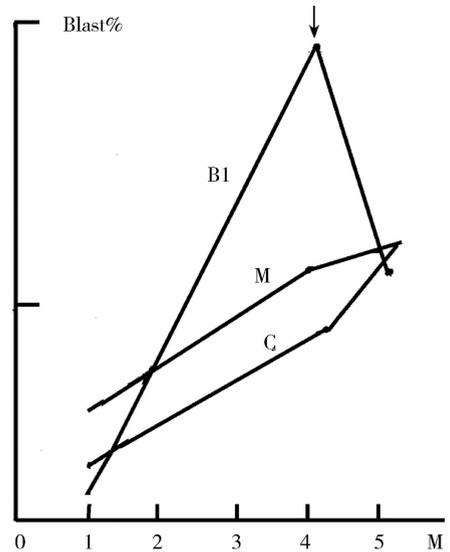


图 3 大鼠 MDS 尾静脉注射治疗

显示不同的寡核苷酸的不同作用, B<sub>1</sub> 为反基因 V - erbB, M 为中心错配的 B<sub>1</sub>, C 为空白对照组

### 讨 论

1. 我们发明的专利产品——韦尔柏(V - erbB)反基因寡核苷酸是在应用 V - erbB 正基因 ODN 中作探针,对 MDS 骨髓细胞涂片做原位杂交并证明其杂交信号具有诊断和发病学意义的基础上设计使用的。

反基因 V - erbB ODN 的对大鼠 MDS 的有肯定治疗作用,符合我们的设计理念,也符合内源性 V - erbB 基因的突变和扩增是白血病致病基因异常的结论<sup>[5-8]</sup>。(下转第 141 页)

现。鉴于上述这些具体情况,我们在教学过程中,安排受训者适当的涉猎困难气管插管技术。

7. 考核方法:培训结束后的考核内容涵盖气管插管前准备、开放上呼吸道手法、气管插管以及简易呼吸囊的使用方法等,同时结合一些理论知识的提问,而气管内插管操作统一在模拟人上进行,经考核,所有受训者得分均达80分以上。

### 三、培训所取得的成效

经过一系列的培训,目前我院部分临床科室如急诊科、重症监护科、呼吸内科等已经实现自主建立人工气道。其他科室对呼吸道管理都有不同程度的掌握,所有临床科室住院医师在临床心肺复苏时都能掌握手法开放上呼吸道,并同时使用简易呼吸囊进行人工通气,在等待麻醉科医师前来建立人工气道的的时间里,都能对患者进行有效通气,提高了抢救的成功率。

### 四、总结与体会

通过数年来的教学实践与思考,我们总结了一些经验体会。呼吸道管理是一项重要的临床技能培训,为提高教学质量,我们在教学过程中尽量做到:①承担教学的部门必须先对受训者的呼吸道管理水平做一个调研和评估,制定明确的教学计划,并通过医院行政部门规定实施,使教学覆盖面广;②目前大部分新毕业住院医师具有学历高、接受能力强的特点,在

教学中,无论是教学备课或是实战备课,都不只停留在肤浅的层面,做到和受训者有深入的互动计划,提高学员的学习兴趣;③教学期间注重“虚”、“实”结合,也就是把理论知识和实物或影像紧密联合在一起,在较短的时间里让学员进入学习状态,提高学习效率;④在技能培训的基础上进行观念的改造,在教学中,我们打破了呼吸道管理培训等于气管插管培训的常规思维,首先对学员强调“围插管期”物品准备、通畅上呼吸道、简易呼吸囊使用等方面的重要性;然后引入了麻醉科一些简单、实用的器械和使用技术,对传统技术做重要的补充;最后我们在学员熟练掌握该项技能的基础上,结合基本解剖知识,为学员培养新的建立人工气道的理念。

### 参考文献

- 1 庄心良,曾因明,陈伯鑫.现代麻醉学[M].3版,北京:人民卫生出版社,2003:906
- 2 曾志成.新编人体解剖学图谱[M].西安:世界图书出版西安公司,2004:92-93
- 3 曾令全,李小霞,魏安宁.用Glidescope视频喉镜辅助气管内插管教学[J].现代医药卫生,2007,23(17):2686-2687
- 4 凌宙贵,刘卫,汪春梅,等.经喉罩气管插管在临床抢救中的应用[J].中华实用诊断与治疗杂志,2009,23(1):206-207

(收稿:2009-11-03)

(修回:2009-12-29)

(上接第131页)

2. 反基因 V-erbB ODN 进入体内之后,必须达到靶位置并形成牢固的三链结合状态,才能起到抑制内源性 V-erbB 基因的转录和扩增的作用。我们对有中心错配的 V-erbB 反基因 ODN 的试验初步说明,如果这种结合不巩固或不结合,疗效就不可能发生。

3. 迄今为止,国内外大多数实验室都用逆病毒或腺病毒作载体,将正常基因导入体内的模式作基因治疗。它们均存在许多问题,且疗效并不理想。我们摒弃这些模式,采用反基因 ODN 技术进行白血病前期基因治疗取得满意结果,说明白血病前期致病基因单一,可能仅有内源性 V-erbB。我们相信我们的技术路线是对的,因为我们在阐明白血病等癌症病因、发病和癌变原理的同时开展上述基因治疗的。况且,我们的技术用于高发区食管癌早期治疗已取得满意结果,并受当地医患所欢迎<sup>[9]</sup>。

4. 近年来,国际上许多研究证明,表皮生长因子受体(EGFR)与肿瘤发生、发展、浸润、转移关系密切。针对 EGFR 的单克隆抗体和针对 EGFR-TK(酪氨酸激酶)的小分子抑制剂在肿瘤治疗中取得一定疗效。特别是它辅助放疗提高疗效并改善病人生存质量。内源性 V-erbB 即为 EGFR-TK 基因。我

们的 V-erbB 反基因 ODN 在动物模型和病人身上均取得满意疗效且毒性不明显,说明它可能有广泛的应用前景,特别是对早期癌症的基因治疗和预防具有独特的优势。相比之下,当今流行的肿瘤放疗化疗毒性太大,几乎不可能,也不应当应用于癌症早期。

### 参考文献

- 1 郝建萍,冯宝章.禽类原始红细胞增多症病毒(AEV-ES4)转化动物模型及其在人类红白血病研究中的意义,国外医学输血及血液学分册,1997,20(3):147-151
- 2 冯宝章,雷健玲,王海青,等.骨髓增生异常综合征(MDS)基因诊断和发病原理研究.中华肿瘤杂志,1995,17(增刊):159-161
- 3 冯宝章,赵堂富,王素钦,等.骨髓增生异常综合征(MDS)大鼠模型的建立及其鉴定.实验血液学杂志,1996,4(3):309-313
- 4 冯宝章,雷健玲,林泽嬉.大鼠骨髓增生异常综合征(MDS)基因治疗研究(初步报告).中国癌症研究进展,1998:171-175
- 5 冯宝章,郝建萍,刘敬忠,等.内源性逆病毒癌基因 V-erbB 突变与白血病发生,白血病·淋巴瘤,2003,12(2):79-82
- 6 冯宝章,雷健玲,杨崇礼,等.不同贫血病时 C-erbB<sub>1</sub> 胚系扩增与骨髓再生和白血病发生,白血病·淋巴瘤,2003,12(6):330-332
- 7 冯宝章,陈文杰.我国家族性白血病研究进展.白血病·淋巴瘤,2005,14(4):243-245
- 8 冯宝章,郝玉书.MDS骨髓细胞癌变的主要机制.白血病·淋巴瘤,2006,15(2):148-150
- 9 冯宝章,侯浚,李琰,等.高发区食管癌早期基因治疗和预防.肿瘤研究与临床,2008,20(2):106-111 (收稿:2009-11-19)

(修回:2009-12-15)