

本文所采用的载体 pBV221 是含有 P_{LPR} 启动子的一种温度诱导型表达载体, 所建立的 MK 工程菌, 与含有 lac、tac 启动子需昂贵且有毒性 IPTG 诱导的工程菌相比, 大量生产具有更大的优越性。MK 的蛋白纯化及活性检测工作将另文发表。

致谢 感谢王永立先生提供的引物与 Pharmacia 公司为本实验提供的 T7 测序试剂盒。

参 考 文 献

- 1 Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T. cDNA clone and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in midgestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, **151** (3): 1312~1318
- 2 Jun-ichiro T, Uehara K, Kadomatsu K *et al.* A new family of heparin-binding factors; strong conservation of Midkine (MK) sequences between the human and the mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **176** (5): 792~797
- 3 Tomomura M, Kadoatsu K, Nakamoto M *et al.* A retinoic acid responsive gene, MK, produces a secreted protein with heparin binding activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **171** (2): 603~609
- 4 Kadomatsu K, Huang R P, Suganuma T *et al.* A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis. *J Cell Biol*, 1990, **110** (3): 607~616
- 5 Maruta H, Bartlett P F, Nurcombe V *et al.* Midkine

(MK), a retinoic acid (RA) -inducible gene product; produced in *E. coli*, acts on neuronal and HL 60 leukemia cells. *Growth Factors*, 1993, **8** (2): 119~134

- 6 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社. 1993. 55~56

Construction of a High Level Expression Vector of Midkine and Its Expression in *E. coli*.

XUE Yong-tao, HUANG Wei-jin, SHI Bin, CHEN Bin-fu, JU Gong (*Institute of Neurosciences, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*).

Abstract A newly identified gene MK, specifies for a heparin binding factor, is transiently expressed in the midgestation period of embryogenesis and in the early stages of embryonal carcinoma cell differentiation. In late embryos and the adult, MK gene is expressed only in the kidney. MK plays decisive roles not only in growth regulation but also in regulation of cell differentiation. The encoding sequence of mature peptide of MK was obtained by RT-PCR from human fetal kidney and was cloned into pBV221, after transferring into *E. coli*. A highly expressed vector of MK was constructed.

Key words Midkine, gene, clone, expression

I-A^k 基因克隆转导及对肿瘤细胞成瘤的影响

丁广治 田 军 刘元林 章扬培 毛 宁

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 采用 RT-PCR 方法合成小鼠 MHC II 类分子 I-A^k 基因 α 和 β 链 cDNA, 插入逆转录病毒载体 pLSXN, 构建 I-A^k α 和 I-A^k β 表达载体, 采用脂质体介导的重组质粒转移方法将 I-A^k α 和 I-A^k β 基因导入 EL4 小鼠淋巴瘤细胞和 P815 小鼠肥大细胞瘤细胞, 经流式细胞仪检测在细胞表面有 I-A^k 表达。将以上两种细胞注射到同源小鼠 C57BL/6 (H-2^d) 皮下, 观察到肿瘤产生后又消退, 证明在肿瘤细胞中单独导入同种异型 MHC II 类分子基因也能激活肿瘤的细胞免疫, 为进一步开展肿瘤的基因治疗奠定了基础。

关键词 MHC II, 肿瘤, 基因转移

学科分类号 Q78

主要组织相容性复合体 (MHC) 由三类分子组成, I 类分布在所有有核细胞表面, 负责内源性抗原, 如肿瘤抗原和病毒抗原的加工和提呈, 激活瘤特异性 CD8⁺ 的 CTL 细胞. II 类主要分布于抗原提呈细胞, 如巨噬细胞、内皮细胞、B 细胞和激活的 T 细胞表面, 负责外源性抗原, 如细菌蛋白质的加工与提呈, 激活特异性 CD4⁺ 的 Th 细胞, 分泌 IL-2, 以激活特异性 CTL. 研究表明大多数肿瘤细胞的 I 类分子表达很低或不表达, 不能有效地提呈肿瘤抗原, 激活 CTL 对肿瘤细胞的杀伤. 为增强机体对肿瘤细胞的杀伤, Rosenberg^[1] 曾经将 I 类 K^b 分子基因导入同种异型 A/J 小鼠的纤维肉瘤 Sal 细胞 (K^kD^b), 注射到小鼠体内, 发现并不能抑制转基因肿瘤细胞的生长, 但将 I 类分子 D^d 基因或 II 类分子 A^k 基因导入细胞, 却发现在小鼠体内不成瘤. Chen^[2] 采用逆转录病毒载体将 I 类 K^k, II 类 A^k 基因导入不表达 MHC 的 K1735 黑色素瘤细胞, 用 C3H (K^kA^k) 鼠进行体内实验, 发现只有同时导入两种基因才能抑制肿瘤的生长. June^[3] 认为 T 细胞的激活需要 Ag-MHC 和 B7 两种信号. 为观察 II 类分子在体内对肿瘤细胞生长的抑制作用, 我们采用 RT-PCR 方法获得 A^k-cDNA, 插入 pLSXN 逆转录病毒载体, 导入小鼠淋巴瘤 EL4 和肥大细胞瘤 P815 细胞, 注射到 C57BL/6 和 DBA/2 同源小鼠体内发现能抑制肿瘤生长.

1 材料与方法

1.1 材料

基因克隆和测序采用 pUC18 质粒和 *E. coli* HB101 菌株. 基因转导采用 pLSXN 逆转录病毒载体. EL4 为小鼠淋巴瘤细胞, H-2^b 型, 来源于 C57BL/6 纯系小鼠; P815 为小鼠肥大细胞瘤细胞, H-2^d 型, 来源于 DBA/2 纯系小鼠. 以上载体, 菌株和细胞株均由本实验室保存. C57BL/6 小鼠购自军事医学科学院动物中心, C3H 及 DBA/2 小鼠购自药品检定所动物繁育场. 脂质体 Lipofectamine

为 Gibco/BRL 公司产品, 单克隆抗体 IgG1 (鼠) 为 Immunotech 公司产品, 单克隆抗体 Anti-Ia FITC Conjugate 为 Sigma 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 逆转录表达载体的构建: 将 C3H 小鼠 (6~8 周龄) 脱颈椎处死, 取脾脏匀浆, 采用异硫氰酸胍法提取总 RNA. 加入反转录酶 AMV 和 Oligo dT 合成 cDNA 的负链. 再以负链 cDNA 为模板, 加入正、反向引物和 Taq DNA 聚合酶扩增, 分别合成 A^k 基因的 α 链和 β 链的 cDNA. 经 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 插入逆转录病毒载体 pLSXN, 分别构建 pLSXN-A^k α 和 pLSXN-A^k β 重组载体, 转化大肠杆菌 HB101, 在含 Amp 的 LB 平板筛选重组菌落, 提取质粒, 酶切和 DNA 序列鉴定.

1.2.2 脂质体介导的 DNA 转染: 按 Gibco/BRL 公司试剂盒提供的方法, 将逆转录病毒表达载体 pLSXN-A^k α 和 pLSXN-A^k β 与 Lipofectamine 混合, 加入悬浮于无血清培养液的细胞中, 培养 48 h 后, 加入 10% 小牛血清, 继续培养 48 h, 再加入 G418 筛选, 待形成克隆后进行扩大培养.

1.2.3 流式细胞仪检测: 将细胞悬浮在 PBS 中, 加入 Anti-A^k FITC, 4℃ 结合 30 min; 离心收集细胞, 以 PBS 洗涤, 1% 的多聚甲醛固定; 用 BD 公司的 FACSscan 检测. 对照加非特异的小鼠 IgG1 FITC.

1.2.4 动物实验: 6~9 周龄 C57BL/6 和 DBA/2 小鼠, 每组 5~8 只, 分别皮下注射基因转导的 EL4 细胞. 剂量为 1×10^6 个/只, 和 P815 细胞 1×10^5 个/只. 接种后一周开始测量肿瘤体积.

2 结果

2.1 A^k 基因在细胞表面表达的检测

结果见图 1. 转基因的肿瘤细胞荧光强度增加 3~5 倍, 表明 A^k 基因在细胞表面表达.

2.2 小鼠体内成瘤性观察

结果见图 2. 图 2 中肿瘤体积为 7 只小鼠肿瘤体积的平均值. 可以看出 EL4 和 P815 两

种肿瘤细胞，无论导入或不导入 A^k 基因，注射后 1~2 周在小鼠体内都形成肿瘤。但是导入 A^k 基因的肿瘤细胞，在小鼠体内生长缓慢，1~2 周后肿瘤体积开始缩小，3~4 周后则完全消退。而导入空载体 pLSXN 和未导入基因的肿瘤细胞，在小鼠体内却持续生长。

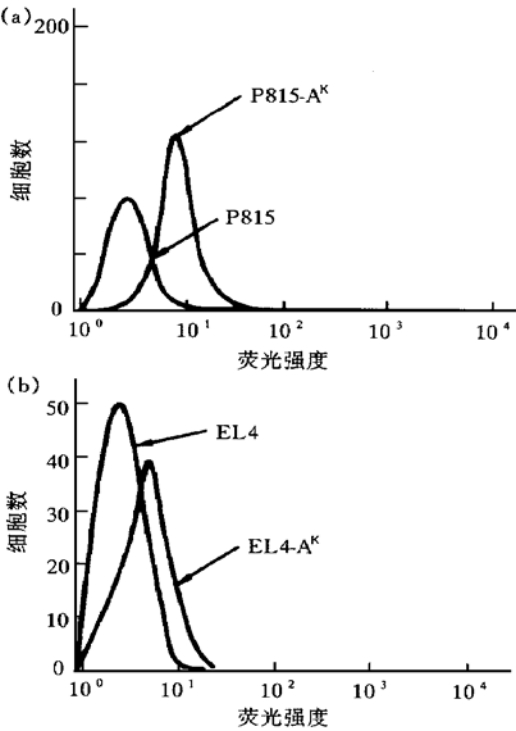


图 1 流式细胞仪检测结果

(a) P815 检测结果; (b) EL4 检测结果. 横坐标代表与 Anti- A^k -FITC 结合的荧光强度.

肿瘤发生率见表 1 和表 2. EL4 在小鼠体内生长速度比 P815 慢, 注射剂量分别为 10^6 个/只和 10^5 个/只. 注射后 4 周, 统计肿瘤的发生率. 导入 A^k 基因的 P815 细胞, 每组 7 只小鼠, 产生的肿瘤全部消退, 对照组肿瘤持续生长; 导入 A^k 基因的 EL4 细胞组, 7 只小鼠中只有 1 只肿瘤未退, 但此小鼠生长状况良好.

表 1 EL4 细胞导入 A^k 基因, 在 C57BL/6 小鼠体内成瘤性观察

细胞系	接种细胞数	肿瘤发生率
EL4	10^6	7/7
EL4 pLSXN	10^6	7/7
EL4 pLXN- A^k	10^6	1/7

注: 接种肿瘤细胞 4 周后结果.

表 2 P815 细胞导入 A^k 基因, 在 DBA/2 小鼠体内成瘤性观察

细胞系	接种细胞数	肿瘤发生率
P815	10^5	7/7
P815 pLSXN	10^5	7/7
P815 pLXN- A^k	10^5	0/7

注: 接种肿瘤细胞 4 周后结果.

3 讨 论

为研究 MHC 转基因对肿瘤细胞成瘤性的影响, 我们采用异硫氰酸胍法, 由 C3H 小鼠脾脏提取总 RNA; 通过 RT-PCR 获得 I- A^k 基因 cDNA; 经酶切和 DNA 序列分析鉴定^[4,5]; 插入逆转录病毒表达载体 pLSXN; 用脂质体介导将重组质粒导入肿瘤细胞 EL4 和 P815; 用流式细胞仪检测在肿瘤细胞表面有 A^k 基因表达; 再分别注射到同源小鼠 C57BL/6 和 DBA/2 皮下. 发现注射导入 A^k 基因的肿瘤细胞后, 2~3 周内也产生肿瘤, 但肿瘤生长速度缓慢, 且在 3~4 周后消退; 而注射未导入 A^k 基因肿瘤细胞的对照组, 肿瘤产生后, 持续生长. 这一现象表明, 导入 A^k 基因的肿瘤

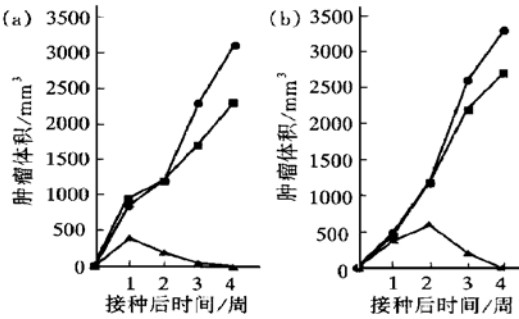


图 2 EL4 和 P815 在小鼠体内生长曲线

(a) EL4 生长曲线. ●—●: EL4, ■—■: EL4 pLSXN, ▲—▲: EL4 A^k . (b) P815 生长曲线. ●—●: P815, ■—■: P815 pLSXN, ▲—▲: P815 A^k .

细胞能代替抗原提呈细胞, 激活特异性 Th 和 CTL 细胞对肿瘤细胞的杀伤. 在 小鼠体内, T 细胞的激活一般需 3 天多时间, 才表现出对肿瘤细胞的杀伤. 待杀伤速度大于生长速度, 肿瘤逐渐消退. 消退时间的长短可能取决于肿瘤的生长速度与杀伤速度之比.

Chen 曾将 II 类分子的 A^k 基因与 I 类分子的 K^k 基因导入不表达 MHC 的 K1735 黑色素瘤细胞, 注射到同源小鼠 C3H 体内进行实验. 他认为单独导入 A^k 基因不但不能激活 CTL 对肿瘤的杀伤, 而且还会刺激肿瘤的生长; 只有同时导入 K^k 和 A^k 两种基因才能起到杀伤肿瘤的作用. 我们将 A^k 基因导入不表达 II 类分子的 EL4 淋巴瘤细胞和 P815 肥大细胞瘤细胞, 再注射到它们的同源小鼠 C57BL/6 和 DBA/2 皮下, 发现在注射部位形成肿瘤后又自发消退. 说明单独导入 II 类分子基因也可激活 CTL 对肿瘤细胞的杀伤. 但我们采用的是异型 A^k 基因的导入, 证明异型基因的导入也能激活 CTL 对肿瘤的杀伤.

目前普遍认为, T 细胞的激活需要在抗原提呈细胞表面表达 MHC II 类分子和 B7 两种信号, 只表达 B7 并不能激活 T 细胞; 只表达 II 类分子反而会引起 T 细胞凋亡. 我们采用的 EL4 和 P815 肿瘤细胞并非抗原提呈细胞, 既不表达 II 类分子, 也不表达 B7 分子; 单独导入 II 类分子基因却能激发 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤, 这一现象是否与导入的是异型 II 类分子基因有关, 尚待进一步证实.

参 考 文 献

- 1 Rosenberg S O, Roby C, Clements V K *et al.* Tumor specific immunity can be enhanced by transfection of tumor cells with syngeneic MHC-Class II genes or allogeneic MHC-Class I genes. *Int J Cancer*, 1991, **6** (Suppl): 61~ 68
- 2 Chen P W, Ananthaswamy H N. Rejection of K1735 murine melanoma in syngeneic hosts requires expression of MHC class I antigens and class II antigens or IL-2. *J Immunol*, 1993, **151** (1): 244~ 255
- 3 June C H, Bluestone J A, Nadler L M *et al.* The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today*, 1994, **15** (7):

321~ 331

- 4 Bishop G A, McMillan M S, Houghton G *et al.* Signaling to a B-Cell clone by E^k , but not A^k , does not reflect alteration of A^k genes. *Immunogenetics*, 1988, **28** (3): 184~ 192
- 5 Estess P, Begovich A B, Koo M *et al.* Sequence analysis and Structure-function correlations of murine q, k, u, s, and f haplotype I -A_B cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83** (11): 3594~ 3598

MHC class II I -A_{qβ}^k Gene Transfer and the Influence on Tumor Growth . DING Guang-zhi, TIAN Jun, LIU Yuan-lin, ZHANG Yang-pei, MAO Ning (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract In order to search the influence of I -A_{qβ}^k gene transfer on the growth of the transferred mouse tumor cells *in vivo*, the α and β chain cDNA were synthesized, and inserted into a retroviral vector, to construct two I -A^k expressing recombinant plasmids pLSXN-A_q^k and pLSXN-A_β^k. By means of a liposome-mediated gene transfer procedure, these two recombinant plasmids together were introduced into mouse lymphoma EL4 cells and mastocytoma P815 cells. The expression of the I -A_{qβ}^k protein on the surface of the transduced tumor cells was tested by FACS using Anti-A^k-FITC. Afterwards these tumor cells were injected subcutaneously into autologous mice C57BL/6 (H-2^b) and DBA/2 (H-2^d) respectively. It was observed that tumors developed at the beginning within the mouse bodies, and disappeared after a few weeks with injection. While the nontransferred tumor cells grew continuously. These results show that the tumor immune response can be stimulated by the tumor cells transferred with allogeneic MHC class II gene, in the absence of B7 co-stimulatory signals.

Key words MHC II, tumor, gene transfer