

## 参 考 文 献

- 1 Hong F T. Charge transfer across pigmented bilayer lipid membrane and its interfaces. *Photochem Photobio*, 1976, **24** (2): 155~ 189
- 2 Hong F T. Molecular sensors based on the photoelectric effect of bacteriorhodopsin: origin of differential responsivity. *Mater Sci Eng*, 1997, **C5** (2): 61~ 79
- 3 王放金, 胡坤生, 鲁 涛, 等. 铜/封口膜/酰化紫膜 LB 膜/氧化铜锡型菌紫质光电池的光电特性. *生物物理学报*, 1996, **12** (2): 335~ 338  
Wang A J, Hu K S, Lu T, *et al.* *Acta Biophys Sinica*, 1996, **112** (2): 335~ 338

**Studies on the Functional Block Diagram of the System of the Photoelectric Response of Bacteriorhodopsin Membrane.** YANG Jiar-Hua,

QIAN Xia ( *Department of Physics, Capital Normal University, Beijing 100037, China* ).

**Abstract** The system of the photoelectric response of Bacteriorhodopsin membrane ( SPRBM ) is an important system for molecular-electric research. Based on the Hong's concept of chemical capacitance, a functional block diagram model of SPRBM was developed. It consists of C-capacitance and its current source; N-capacitance and its current source; proton transfer channel and back channel . By using this model , a pulse response function and potential distribution of the " Fe/ Br/ Gel/ Cu " photo-cell and its equivalent circuit were derived.

**Key words** bacteriorhodopsin, membrane, model, photoelectric response

## CD 自杀基因系统对 T 淋巴细胞作用的实验研究\*

宋艳斌<sup>1)</sup> 伍志坚 尹 芳 马文丽 杨光彩 伍柏松 徐 铃

( 第一军医大学生物化学与分子生物学教研室, 广州 510515 )

**摘要** 去除供者骨髓中的 T 淋巴细胞可有效防止移植物抗宿主病 (GVHD) 的发生. 用含大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶 (EG-CD) 基因的高滴度逆转录病毒 ( $1.5 \times 10^5$  CFU/ml) 感染小鼠 T 淋巴细胞, G418 筛选, 获得稳定表达 CD 基因的 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞. 经 PCR 和 RT-PCR 方法检测证明 CD 基因已成功导入 T 淋巴细胞中并有效表达. 分别用不同浓度的 5-FCyt 作用于 T/ pCD<sub>2</sub> 及 T 淋巴细胞, 光镜下观察不同时间细胞数目变化及 MTT 法检测细胞活性. 结果表明, 5-FCyt 浓度大于  $1 \mu\text{mol/L}$  时, 即对 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞有显著的杀伤作用, 而对正常 T 淋巴细胞基本无毒性, 且 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞在加入药物后生存时间 (3~ 5 d) 明显短于未转染的 T 淋巴细胞 (大于 14 d).

**关键词** CD 基因, 5-氟胞嘧啶, T 淋巴细胞, 逆转录病毒, 基因治疗

**学科分类号** Q789

异体骨髓移植是治愈白血病及某些实体肿瘤的有效手段, 但其并发症——移植物抗宿主病 (GVHD) 是影响移植成功的主要障碍. 而供者骨髓中的 T 淋巴细胞在 GVHD 的发生过程中又起着主要的作用. 国外已有报道将单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 (HSV-tk) 导入 T 淋巴细胞, 抗病毒药丙氧鸟苷 (ganciclovir, GCV) 可以特异地抑制 tk 基因修饰的 T 淋巴细胞活性<sup>[1,2]</sup>. 本研究将另一种自杀基因胞嘧啶脱氨酶基因 (CD) 通过逆转录病毒 pCD<sub>2</sub> 导入小鼠 T 淋巴细胞, 筛选获得稳定表达的克隆细胞, 对无毒性的药物 5-氟胞嘧啶 (5-FCyt) 高度敏感, 并被特异杀伤. 本研究结果有望为 GVHD 的基因治疗开辟一条新的途径.

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 试剂:** 限制性内切酶 *Hind* III, *Bam*HI, *Eco*RI 为 Promega 产品, *Stu*I, *Nhe*I 为 NEW ENGLAND BioLabs 产品. T4 DNA 连接酶, pBR322/*Hinf*I DNA 分子质量标准为 GIBCO/BRL 公司产品. Taq DNA 聚合酶, PCR 缓冲液, dNTP

\* 国家自然科学基金资助项目 (39600066).

<sup>1)</sup> 通讯联系人.

Tel: (020) 85148361, E-mail: rabs@263.net

收稿日期: 1999-09-07, 修回日期: 2000-02-22

为 Promega 产品. 脂质体转染剂 Lipofectin、RPMI1640、DMEM、G418、Hepes, 胎牛血清及淋巴细胞分离液为 GIBCO/BRL 产品. IL-2 为 R&D 公司产品. 5-氟胞嘧啶 (5-FCyt)、PHA、Polybrene 为 Sigma 产品. mRNA 提取试剂盒及 cDNA 逆转录试剂盒为 Boehringer Mannheim 产品.

**1.1.2 质粒:** 含 CD 基因的质粒 pCD<sub>2</sub> 由 Blaese 教授惠赠.

**1.1.3 细胞:** PA317 细胞由组织胚胎学教研室提供, NIH3T3 细胞由防原教研室提供, T 淋巴细胞取自小鼠脾脏.

**1.1.4 细胞培养液:** 淋巴细胞培养液 R20 为 RPMI1640 加 20% 胎牛血清, PA317 和 NIH3T3 细胞培养液为 DMEM 加 10% 胎牛血清.

**1.1.5 CD 基因的 PCR 引物:** 由中国科学院上海生物化学研究所 DNA 合成室合成. 5' 端引物: 5'-GATCTGCAAATCGTCGCCTT-3', 3' 端引物: 5'-TTTTTCAGCAAGCGGAACAGG-3'.

## 1.2 方法

**1.2.1 T 淋巴细胞的培养:** T 淋巴细胞在 R20 培养液中培养, 加入 PHA 10 mg/L; IL-2 2 µg/L. 在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下孵育 3 d 后, 停止加入 PHA.

**1.2.2 逆转录病毒的包装和病毒滴度的测定:** 用 Lipofectin 介导的基因转移方法将 pCD<sub>2</sub> 转染入 PA317 细胞, 经 G418 筛选获得稳定表达株, 细胞培养上清含重组逆转录病毒颗粒. 按文献 [3] 方法用 NIH3T3 细胞测定病毒上清滴度.

**1.2.3 逆转录病毒介导的 CD 基因转移及筛选:** 在 24 孔板中每孔接种  $2 \times 10^5$  病毒滴度最高的 PA317/pCD<sub>2</sub> 细胞, 培养 24 h 后, 移去培养液, 每孔接种  $2 \times 10^5$  T 淋巴细胞, 加入 R20 培养液及 IL-2 (2 µg/L), polybrene 至终浓度 4 mg/L, 37℃ 培养 24 h 后, 将 T 淋巴细胞移入另一 24 孔板中, 每孔加入 G418 800 mg/L 选择培养, 每 2~3 天换液一次, 筛选 10~14 d, 即可获得具有 G418 抗性的 T 淋巴细胞 (命名为 G418<sup>r</sup> T/ pCD<sub>2</sub>).

**1.2.4 转染的 T 淋巴细胞中 CD 基因整合及表达的检测:** 分别取 T 和 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞各  $5 \times 10^5$ , 按文献 [4] 方法抽提基因组 DNA 作为模板, 用 CD 基因 5' 端引物和 3' 端引物进行 PCR; 分别取 T 和 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞各  $5 \times 10^5$ , 用 mRNA 提取试剂盒提取 mRNA, 再用 cDNA 逆转录试剂盒一步法进行 RT-PCR, 以 pCD<sub>2</sub> 的 PCR 产物作为阳性对照.

**1.2.5 5-FCyt 对转染的 T 淋巴细胞的体外杀伤作用:**

a. 不同剂量 5-FCyt 对 G418<sup>r</sup> T/ pCD<sub>2</sub> 细胞的杀伤作用: 在 96 孔板中分别接种 T 和 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞, 每孔加入  $2 \times 10^4$  个细胞. 培养 12 h 后, 加入含不同浓度 5-FCyt (0.01~100 µmol/L) 的 R20 培养液, 每一浓度设 3 个复孔, 以 T 淋巴细胞为对照. 培养 48 h 后, 用 MTT 法检测细胞存活率: 每孔加入 20 µl MTT 溶液 (5 mg/L), 37℃ 孵育 3 h, 小心吸去每孔培养液, 加 150 µl DMSO, 在微型振荡器振荡 20 min, 用全自动酶标仪 (E-96) 测定各孔 A 值. 测定波长为 570 nm, 参考波长为 630 nm. 酶标仪所示值为 A<sub>570</sub> 减去 A<sub>630</sub> 的值. 细胞存活率为用各孔的 A 值除以相应的对照孔的 A 值所得的百分率.

b. 不同时间下 5-FCyt 对 G418<sup>r</sup> T/ pCD<sub>2</sub> 细胞的杀伤作用: 在 24 孔板中分别接种 T 和 T/ pCD<sub>2</sub> 各 12 孔, 每孔加入  $5 \times 10^4$  个细胞. 培养 12 h 后, 每种细胞中分别在 6 孔加入含 5-FCyt 20 µmol/L 的 R20 培养液 1 ml, 另 6 孔加不含 5-FCyt 的培养液为对照. 从 0 时开始, 每隔 24 h, 对加 5-FCyt 的细胞及相应未加 5-FCyt 的细胞分别进行台盼蓝细胞计数, 加 5-FCyt 的细胞数占相应不加 5-FCyt 的细胞数的百分率作为该时间点的存活率.

## 2 结 果

### 2.1 重组逆转录病毒包装和滴度测定结果

重组逆转录病毒载体需经过包装细胞进行包装, 才能形成具有感染能力的重组病毒颗粒. 用脂质体 lipofectin 将 pCD<sub>2</sub> DNA 导入包装细胞 PA317 中, 经 G418 筛选 10 d 后, 形成了数十个具有 G418 抗性的细胞克隆. 而未转导的 PA317 细胞, 在相同浓度 G418 的作用下, 5 d 内全部死亡. 选择 6 个细胞克隆, 用胰酶消化形成克隆的 PA317 细胞, 扩增培养, 称为产病毒细胞 (vector producing cell, VPC). 该细胞的培养液中即含有具有一次性感染能力的病毒颗粒, 称这种含有病毒的细胞培养液为病毒上清. 按材料和方法中所述方法收集 pCD<sub>2</sub> 病毒上清, 测定其病毒滴度, 见表 1. 选取病毒滴度最高的 VPC 细胞 (克隆 4,  $1.5 \times 10^5$  CFU/ml) 用于对 T 淋巴细胞的体外转染实验. 将 VPC 细胞 (G418<sup>r</sup> PA317/pCD<sub>2</sub>) 冻存备用.

表 1 细胞克隆病毒滴度

| 细胞克隆数 | 病毒滴度/ $10^5 \text{CFO} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
|-------|----------------------------------------------|
| 1     | 0.6                                          |
| 2     | 0.1                                          |
| 3     | 1.2                                          |
| 4     | 1.5                                          |
| 5     | 0.3                                          |
| 6     | 0.8                                          |

## 2.2 转染的 T 淋巴细胞中 CD 基因整合及其表达的检测

**2.2.1 PCR 检测转染细胞中的 CD 基因片段:** 用 CD 基因特异性的引物 P1、P2, 对 T 淋巴细胞和 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞的 DNA 进行 PCR 扩增, 结果见图 1. 可见未转染的 T 淋巴细胞 DNA 的扩增结果为阴性, 而 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞 DNA 扩增出一条略大于 300 bp 的片段, 与预期的 330 bp 大小相符. 表明用 pCD<sub>2</sub> 病毒上清转染 T 淋巴细胞是成功的.

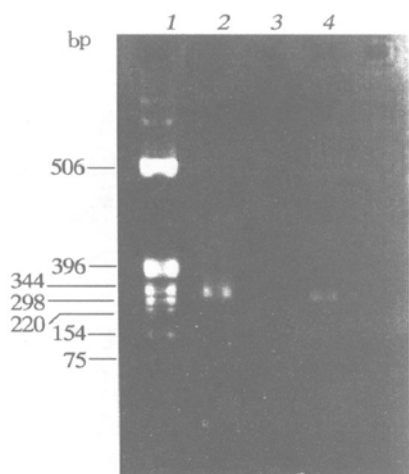


图 1 PCR 扩增 CD 基因的结果

1: pBR322DNA/HinfI 分子质量标准; 2: pCD<sub>2</sub> 质粒 DNA; 3: T 淋巴细胞 DNA; 4: T/ pCD<sub>2</sub> 细胞 DNA.

**2.2.2 转染细胞中 CD 基因表达的检测:** 用 mRNA 提取试剂盒提取出 T 淋巴细胞和 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞的 mRNA 后, 用 cDNA 逆转录试剂盒进行 RT-PCR, 结果见图 2. 可见未转染的 T 淋巴细胞 mRNA 的扩增结果为阴性, 而 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞的 mRNA 扩增出一条略大于 300 bp 的片段, 与预期的 330 bp 大小相符. 表明 CD 基因在淋巴细胞中进行了表达.

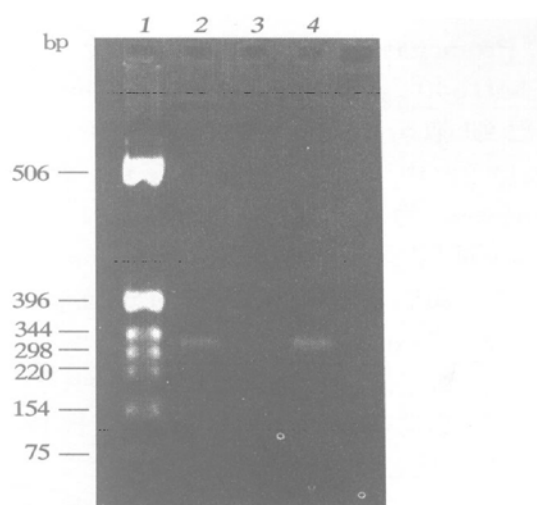
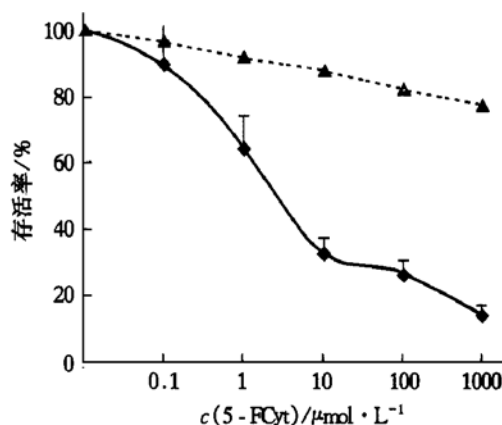


图 2 CD 基因 mRNA 的 RT-PCR 结果

1: pBR322DNA/HinfI 分子质量标准; 2: pCD<sub>2</sub> 质粒 DNA; 3: T 淋巴细胞 cDNA; 4: T/ pCD<sub>2</sub> 细胞 cDNA.

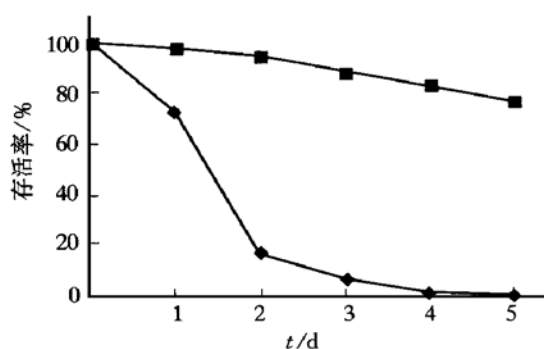
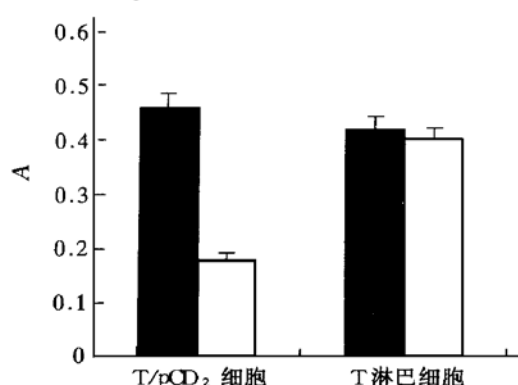
## 2.3 5-FCyt 对转染的 T 淋巴细胞的体外杀伤作用

**2.3.1 不同剂量 5-FCyt 对 G418<sup>r</sup> T/ pCD<sub>2</sub> 细胞的杀伤作用:** 用 MTT 比色法检测不同浓度的 5-FCyt 作用 48 h, 对 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞存活的影响, 结果见图 3. 可见浓度大于 1  $\mu\text{mol/L}$  的 5-FCyt 即对 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞有明显的杀伤作用, 这种杀伤作用随 5-FCyt 浓度增大而加强, 对未转染的 T 淋巴细胞则无明显作用.

图 3 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞对 5-FCyt 的剂量效应曲线

◆—◆: T/ pCD<sub>2</sub> 细胞; ▲—▲: T 淋巴细胞.

**2.3.2 不同时间下 5-FCyt 对 G418<sup>r</sup> T/ pCD<sub>2</sub> 细胞的杀伤作用:** 图 4 显示在 20  $\mu\text{mol/L}$  5-FCyt 作用下在各时间点的细胞存活率. 对于 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞, 在 5-FCyt 作用 48 h 即有明显的杀伤效应, 5 d 后细胞全部死亡; 而对于 T 淋巴细胞则无明显影响. 图 5 同样证实了上述结果.

图4 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞对 5-FCyt 的时间效应曲线◆—◆: T/ pCD<sub>2</sub> 细胞; ■—■: T 淋巴细胞.图5 5-FCyt 对 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞的杀伤作用 (48 h)■: 5-FCyt (-); □: 5-FCyt (+), 20 μmol·L<sup>-1</sup>.

### 3 讨 论

异体骨髓移植已发展成为治疗白血病及某些实体肿瘤的有效手段。但是, 骨髓移植后的严重并发症——移植物抗宿主病 (graft versus host disease, GVHD) 在目前仍具有相当高的发病率和死亡率。现已证明在 GVHD 中起主要作用的是供髓中的免疫活性细胞即成熟的 T 淋巴细胞<sup>[5]</sup>, GVHD 的严重程度与 T 淋巴细胞输入量密切相关<sup>[6]</sup>。基因治疗是目前医学研究领域中的前沿课题, 其中有一类“自杀基因 (suicide gene)”治疗方案<sup>[7,8]</sup>占有重要地位。其基本原理是向细胞内导入一种药物敏感基因, 其表达产物可使无毒的药物前体转变成细胞毒性药物, 从而达到对细胞的杀伤作用。

Tiberghien 等<sup>[9,10]</sup>将一种自杀基因——单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 (HSV-tk) 导入 T 淋巴细胞, 抗病毒药丙氧鸟苷 (GCV) 可以特异性地抑制 tk 基因修饰的 T 淋巴细胞活性。但是, 由于 allo-BMT 患者中约 50% 会发生巨细胞病毒 (CMV) 感染<sup>[11]</sup>, 而大剂量 GCV 与免疫球蛋白联用已成为骨

髓移植受者感染 CMV 的常规预防与治疗措施<sup>[12]</sup>, 因此, 采用 HSV-tk/GCV 控制供者 T 淋巴细胞活性, 必然限制了 GCV 在抗病毒中的应用, 因为一旦使用 GCV, 不论 GVHD 是否发生, 供者的 T 淋巴细胞都将被去除, 这与保持 T 淋巴细胞优点的初衷相违背。

胞嘧啶脱氨酶 (CD) 基因来源于大肠杆菌, 胞嘧啶脱氨酶是大肠杆菌代谢通路中的一种酶, 它能将无毒性的抗真菌药物 5-氟胞嘧啶 (5-FCyt) 转化为细胞毒性的 5-氟尿嘧啶 (5-FUra), 而哺乳动物细胞不含胞嘧啶脱氨酶, 不能将 5-FCyt 代谢为 5-FUra。5-FCyt 在高度抗微生物活性的浓度下对哺乳动物细胞无毒性, 但 5-FUra 对哺乳动物具有细胞毒性, 并广泛作为抗肿瘤化疗药物应用。5-FUra 被细胞代谢为 5-氟-2-脱氧尿嘧啶核苷酸, 后者抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶, 阻断脱氧尿嘧啶核苷酸转变为脱氧胸腺嘧啶核苷酸, 从而抑制 DNA 的合成。此外, 它还掺入 RNA, 通过阻止尿嘧啶和乳清酸掺入 RNA 而起到抑制 RNA 合成的作用。

我们的实验结果表明转导了 CD 基因的 T 淋巴细胞对 5-FCyt 有较高的敏感性, 5-FCyt 浓度大于 1 μmol/L 时, 即对 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞有显著的杀伤作用, 而对正常 T 淋巴细胞无毒性, 且 T/ pCD<sub>2</sub> 细胞在加入药物后生存时间 (3~5 d) 明显短于未转染的 T 淋巴细胞 (大于 14 d)。

本研究采用了 CD/5-FCyt 自杀基因系统控制 T 淋巴细胞活性。5-FCyt 作为一种抗真菌药在临床上并非常用, 而且可被其他多种抗真菌药替代, 因此 CD/5-FCyt 自杀基因系统在控制供者 T 淋巴细胞活性上不会受到限制, 必将优于 HSV-tk/GCV 系统。

我们在细胞水平证明了 CD/5-FCyt 自杀基因系统可有效地杀伤 T 淋巴细胞。同时我们正在建立异体骨髓移植的小鼠实验模型, 以进一步在动物试验中验证这一系统的可行性。

### 参 考 文 献

- 1 Tiberghien P, Reynolds C W, Keller J, *et al.* Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase transduced primary T lymphocytes: an approach for specific *in vivo* donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? *Blood*, 1994, **84** (4): 1333~1341
- 2 Tiberghien P. Use of suicide genes in gene therapy. *J Leu Bio*, 1994, **56** (2): 203~209
- 3 Kotani H, Newton P B 3rd, Zhang S, *et al.* Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy.

- Hum Gene Ther, 1994, 5: 19~ 28
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 9. 16~ 9. 19
  - 5 James L M, Ferrara H, Joachin D. Graft-versus-host disease. N Engl J Med, 1991, 324 (10): 667~ 674
  - 6 Kernan N A, Collins N H, Juliano L, *et al.* Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. Blood, 1986, 68 (3): 770~ 773
  - 7 Anderson W F. Gene therapy for cancer [editorial]. Hum Gene Ther, 1994, 5 (1): 1~ 2
  - 8 Moolten F L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. Cancer Res, 1986, 46: 5276~ 5281
  - 9 Tiberghien P. "Suicide" gene for the control of graft-versus host disease. Curr Opin Hematol, 1998, 5 (6): 478~ 482
  - 10 Verzeletti S, Bonini C, Marktel S, *et al.* Herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer for controlled graft-versus host disease and graft-versus-leukemia: clinical follow-up and improved new vectors. Hum Gene Ther, 1998, 9 (15): 2243~ 2251
  - 11 Ljungman P, De Bock R, Cordonnier C, *et al.* Practices for cytomegalovirus diagnosis, prophylaxis and treatment in allogeneic bone marrow transplant recipients: a report from the working party for infectious diseases of the eBMT. Bone Marrow Transplant, 1993, 12 (4): 399~ 403
  - 12 Winston D J, Gale R P. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection and disease after bone marrow transplantation in the 1990s. Bone Marrow Transplant, 1991, 8 (1): 7~ 11

**Experimental Study of Cytotoxic Effect of CD/5-FCyt on T-lymphocyte.** SONG Yan-Bin, WU Zhi-Jian, YIN Fang, MA Wen-Li, YANG Guang-Cai,

WU Bo-Song, XU Qian ( *Department of Biochemistry, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China* ).

**Abstract** T-lymphocyte depletion of the marrow graft can prevent graft versus-host disease (GVHD) effectively. T-lymphocytes of mice were transfected with high-titer ( $1.5 \times 10^5$  CFU/ml) retrovirus supernatant, and by selection with G418 positive cell clones (T/pCD<sub>2</sub>) were obtained. PCR and RT-PCR showed that CD gene was transferred into the T-lymphocyte and expressed successfully. T-lymphocyte and T/pCD<sub>2</sub> cells were exposed to different doses of 5-FCyt for various hours, and were then observed under light microscope and the viability of these cells was determined by MTT colorimetric cell proliferation assay. The results showed that retrovirus mediated CD gene transferred to T/ pCD<sub>2</sub> cells could confer them high sensitivity to 5-FCyt, and T/ pCD<sub>2</sub> cells exposed to 5-FCyt ( $> 1 \mu\text{mol/L}$ ) can be killed. But 5-FCyt was not harmful to normal T-lymphocyte cells. The survival time of T/ pCD<sub>2</sub> cells in the presence of 5-FCyt (3~ 5 d) was significantly shorter than that of T-lymphocyte ( $> 14$  d).

**Key words** CD gene, 5-fluorocytosine, T-lymphocyte, retrovirus, gene therapy

## DNA 末端定量及其应用的研究\*

彭黎明<sup>1)</sup> 江 虹

( 华西医科大学附属第一医院医检专业, 成都 610041 )

J. J. LIU C. J. BRADLEY

( Department of Pathology, University of Melbourne Austin Hospital, Herdberg, VIC 3084, Australia )

**摘要** 为定量 DNA 断裂末端评价 DNA 的降解程度, 以饱和标记 (TdT) 法定量 DNA 末端最大标记量 ( $L_{\max}$ ); 并用流式细胞分析 (FCA)、原位 DNA 末端标记 (TUNEL) 和琼脂糖电泳检测或标记 DNA 降解片段。结果发现: a. TdT 法最低检测限 5 ng DNA, 线性范围为 5~ 5 000 ng, 较检测 DNA 降解片段的琼脂糖电泳敏感 200 倍以上; b. 地塞米松 (DEX) 诱导淋巴瘤 (Raji) 细胞凋亡产生的  $L_{\max}$  呈 DEX 剂量与诱导时间依赖性增加; c. 自发

\* 国家自然科学基金资助项目 (39870296). <sup>1)</sup> 通讯联系人。

Tel: (028) 5422608, E-mail: penglim@mcw.cums.cn 收稿日期: 1999-08-02, 修回日期: 2000-01-02