

研究简报

人白细胞介素-2 基因在人骨肉瘤细胞系内表达

郑 强 范清宇 殷剑宁 惠宏襄

(第四军医大学唐都医院, 西安 710038)

摘要 从 pHIG53 质粒内切下人白细胞介素-2 (IL-2) cDNA 基因, 并经中间质粒 pSP72 转换成与 pDOR-neo 载体相匹配的酶切位点, 然后将 IL-2 cDNA 定向连接入 pDOR-neo 载体, 构建成功人 IL-2 逆转录病毒载体, 经脂质体导入人骨肉瘤细胞系 Ma 中, 经 G418 筛选后测转基因肿瘤细胞培养上清中 IL-2 表达量, 每 1×10^5 细胞 24 h IL-2 表达量为 50~800 U, 为骨肉瘤的基因治疗创造条件。

关键词 白细胞介素-2, 基因治疗, 逆转录病毒载体

白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 是 T 细胞及 T 细胞系分泌的一种多功能免疫活性调节因子, 动物实验及临床均表明全身或局部应用 IL-2 可产生抗肿瘤作用^[1~5]。但治疗量的 IL-2 浓度往往会产生严重的毒副作用, 因而限制了 IL-2 抗肿瘤活性的充分发挥。转基因技术和逆转录病毒载体的产生为 IL-2 的临床应用带来了新希望。我室将人 IL-2 cDNA 基因插入逆转录病毒载体 pDOR-neo 内, 构建了 IL-2 cDNA 真核表达载体, 并把 IL-2 cDNA 导入人源性骨肉瘤细胞系 Ma 中且获得表达。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

pHIG53 质粒、pSP-72 质粒、pDOR-neo 载体和大肠杆菌 HB101 均由第四军医大学分子生物研究所惠赠; 人骨肉瘤细胞系 Ma 和 IL-2 依赖细胞系 CTLL, 由第四军医大学免疫教研室惠赠; G418 和 Lipfectin 均购自 GIBCO 公司; 蛋白酶 K 购自 Promega 公司。

1.2 人白细胞介素-2 逆转录病毒载体构建

1.2.1 质粒提取和纯化均参照文献 [6] 进行。

1.2.2 IL-2 cDNA 制备: 在灭菌 0.5 ml

Eppendorf 管内加入 pHIG53 质粒 5 μ g, Pvu II、Pst I 各 1 μ l, $10 \times$ Pvu II 缓冲液 2 μ l, 灭菌三蒸水 16 μ l, 37℃ 水浴 1.5 h。0.8% 凝胶电泳鉴定后电泳回收 IL-2 cDNA 片段。因所切下 IL-2 cDNA 片段酶切位点与 pDOR-neo 载体的多克隆位点不匹配, 故首先将其连接入中间载体 pSP-72 转换成相匹配的酶切位点。

1.2.3 连接: 首先用 Pvu II、Pst I 双切并回收线性化的 pSP-72, 酶切回收条件均同上。然后取 IL-2 cDNA 和线性化 pSP-72 等摩尔混匀后加 T4 连接酶缓冲液 1 μ l, 10 mmol/L ATP 1 μ l, 用灭菌三蒸水调整至 10 μ l, 混匀后加入 T4 连接酶 1 U, 15℃ 过夜。

1.2.4 制备转化感受态细菌 HB101, 转化感受态细胞均参照文献 [7] 进行。

1.2.5 pSP-IL-2 载体的鉴定: 随机挑选菌落, 接种于 10 ml 含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃ 振荡 8 h, 提取质粒后用 Pst I、Pvu II 重新酶切鉴定。

1.2.6 pDOR-IL-2 逆转录病毒制备和鉴定: 用 Xho I、BamH I 重新切下并回收 IL-2 cDNA 片段, 同时用 BamH I、Sal I 双切 pDOR-neo 载体, 回收大片段与上述 IL-2 基因

连接, 其中酶切、回收、连接和转化方法均同上. 为在转染细胞中鉴定 pDOR-IL-2 载体, 我们设计 IL-2 cDNA 的一对引物, 上游引物 P1: ATGTACAGGATGCAA; P2: TTATCAAGTTAGTGT. 在三个 0.5 ml Eppendorf 管内加入 pHIG53、pDOR-IL-2 及转染后细胞抽提的 DNA 各 0.1 μ g, 引物 1 和引物 2 各 30 pmol, $4 \times$ dNTP 各 200 μ mol, $10 \times$ Taq 聚合酶缓冲液 5 μ l, 灭菌三蒸水加至 50 μ l, 100°C 水浴变性 5 min, 加入 Taq 酶 1.5 U, 反应体积为 50 μ l, 最后加入 30 μ l 液体石蜡, PCR 反应条件: 94°C 40 s, 55°C 50 s, 72°C 1 min, 进行 35 个循环, 最后 72°C 延伸 5 min, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定.

1.3 细胞培养及基因转染

人骨肉瘤细胞系 Ma 37°C 、5% CO_2 条件下培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 细胞生长至对数期时更换新鲜培养基, 12 h 后以 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种于 6 孔板, 培养 24 h. 将 2 μ g pDOR-IL-2、10 μ l 脂质体 (lipofectin) 分别溶于 100 μ l 无血清培养基, 两溶液缓慢混匀, 室温放置 15 min, 加入 1.8 ml 无血清培养基, 混匀后加入上述培养的细胞内, 培养于 37°C 、5% CO_2 培养箱中, 6 h 后更换为 4 ml 含 20% 血清培养基, 继续培养 48 h 后, 用胰酶消化后以 1:5 接种于含 600 mg/L G418 的培养基内, 阳性者为 Ma/IL-2 细胞. 同法转染空载体 pDOR-neo 及未转基因的 Ma 细胞作为对照.

1.4 阳性克隆内 IL-2 cDNA 检测

分别收集 Ma 细胞、转染空载体的 Ma 细胞以及 Ma/IL-2 细胞, 按参考文献 [8] 分别提取三种细胞的 DNA. 各取 DNA 约 0.1 μ g, IL-2 cDNA 上、下游引物各 50 pmol, 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min, 共 30 循环, 最后 72°C 延伸 5 min, 电泳鉴定.

1.5 IL-2 生物学活性的检测

用 IL-2 依赖细胞株 CTLL, MTT 法测定 IL-2 的生物学活性^[9].

2 结 果

2.1 IL-2 cDNA 和 pDOR-neo 载体的制备

pHIG53 经 Pst I、Pvu II 双切下约 0.9 kb 大小的基因片段, 包含有全部的 IL-2 cDNA 基因 (图 1). 经中间质粒 pSP-72 转换酶切位点后, 用 Xho I、BamH I 重新切下包含 IL-2 cDNA 的基因片段 (图 2). pDOR-neo 载体经 BamH I、Sal I 双切后, 0.80% 凝胶电泳显示

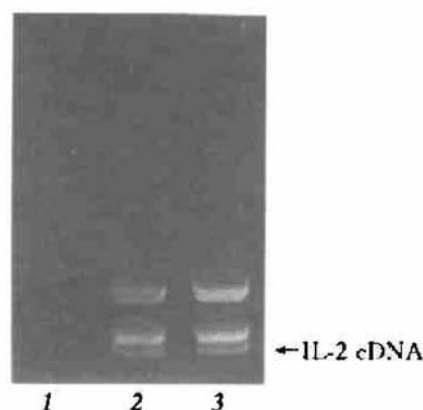


图 1 IL-2 cDNA 片段

1: λ DNA/Hind III 标准; 2 和 3: pHIG53/Pst I + Pvu II.

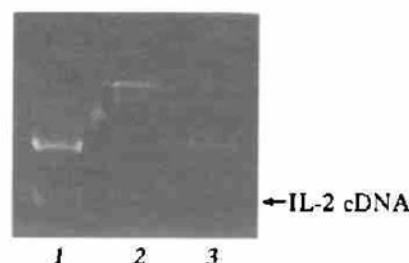


图 2 pSP-IL-2 的限制酶分析

1: pSP-IL-2/Xho I + BamH I; 2: λ DNA/Hind III 标准; 3: pSP-IL-2/Pst I + Pvu II.

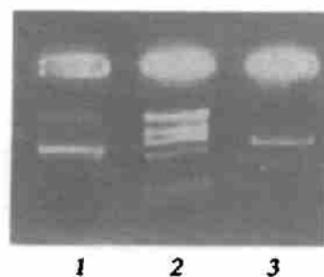


图 3 pDOR-neo 的限制酶分析

1: pDOR-neo; 2: λ DNA/Hind III 标准; 3: pDOR-neo/BamH I + Sal I.

其大小约为 6.5 kb (图 3), 符合 pDOR-neo 物理图谱。

2.2 pDOR-IL-2 载体鉴定

从转化感受态细菌中提取质粒, 分别扩增 pHIG53、pDOR-IL-2 质粒内的 IL-2 cDNA, 经 1.5% 凝胶电泳结果, 两质粒均扩出约 475 bp IL-2 cDNA, 符合设计大小, 证明已将 IL-2 cDNA 连接入 pDOR-IL-2 载体上 (图 4)。

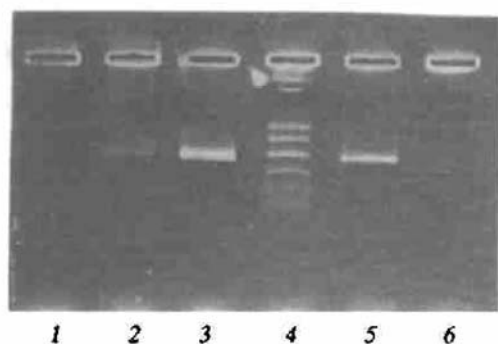


图 4 pDOR-IL-2 的鉴定

1: Ma; 2: pHIG53; 3: pDOR-IL-2;
4: PCR 标准: 1000、750、500、300、
150 和 50; 5: Ma/IL-2; 6: Ma/pDOR。

2.3 G418 选择转染成功的细胞克隆

600 mg/L G418 选择 3 d 后, 培养细胞中开始出现大量死亡细胞, 7 d 存活细胞基本稳定, 为表达 neo 基因的转染细胞。此后见存活细胞生长, 逐渐形成“细胞岛”(图 5)。存活

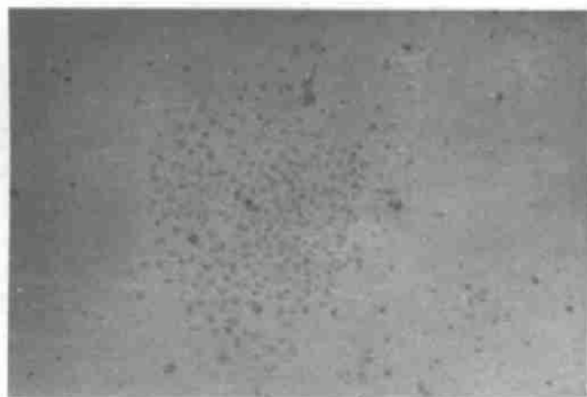


图 5 转基因后培养 7 天阳性细胞增殖形成“细胞岛”

细胞呈圆形, 多边形, 与转基因前的细胞形态相比稍增大, 且细胞增殖率稍有下降。对照 Ma 细胞经 400 mg/L G418 选择培养 4 d 全部

死亡。

2.4 IL-2 基因的检测及其表达

分别用 IL-2 cDNA 引物扩增 Ma、Ma/IL-2 和 Ma/pDOR 细胞 DNA, 我们发现仅 Ma/IL-2 扩出阳性带, 其余两株细胞均未扩出 (图 4)。转基因后两周, 间隔 1 d 测定 Ma/IL-2 细胞培养上清中 IL-2 活性, 每 24 h 10^5 细胞分泌 IL-2 细胞为 50~800 U/ml, Ma 细胞及转染空载体的 Ma 细胞培养上清均测不到 IL-2 活性。

3 讨 论

1990 年 Rosenberg 等^[10]把逆转录病毒载体转入人体细胞内, 进行了较长时间多项指标的观察, 证明逆转录病毒载体不但可把外源基因带入体细胞, 使之整合到染色体上并得到长时间表达, 而且是安全的, 这一研究使人类基因治疗成为可能。目前在诸多的基因转染技术中, 逆转录病毒载体介导的基因转染是最常见、最有效的。我室从 pHIG53 质粒内切下 IL-2 cDNA, 因酶切位点与 pDOR-neo 的多克隆位点不匹配, 故通过中间质粒 pSP-72 转换成与 pDOR-neo 相匹配的酶切位, 然后定向连接入 pDOR-neo 内, 通过 PCR 证实已将 IL-2 cDNA 装入逆转录病毒载体内, 构建成功真核表达载体, 并把 IL-2 cDNA 转染到人骨肉瘤细胞系 Ma 中, G418 选择阳性克隆, PCR 证实 Ma/IL-2 基因组中含有 IL-2 cDNA 片段。转基因后阳性克隆培养上清中可测到 IL-2 活性, 表明人 IL-2 cDNA 已整合入人骨肉瘤细胞系 Ma 并获得表达。

IL-2 在肿瘤防治和研究中的作用日益受到重视, 全身或局部应用 IL-2 对多种肿瘤具有明显的治疗作用^[1-5], 但全身应用达有效剂量时, 常引起严重的毒副作用, 如毛细血管渗漏综合症; 局部应用时, 因其体内半衰期短, 需反复用药, 因而限制了 IL-2 的临床应用。转基因技术为 IL-2 的应用开辟了新的途径, 把 IL-2 cDNA 转入体细胞内, 使在靶组织中持续分泌少量 IL-2 即可诱导明显的治疗

效果. 把 IL-2 cDNA 转入肿瘤细胞制成转基因瘤苗, 可诱导肿瘤特异性细胞毒 T 淋巴细胞的活性, 增强 NK、LAK 细胞活性、诱导细胞因子如 TNF、IFN 等的分泌, 从而产生抗肿瘤效应^[4]. 上述作用尤其在清除术后残留癌细胞, 预防由其所引起的肿瘤复发、转移方面有重要临床应用价值.

骨肉瘤恶性程度高, 手术可切除局部绝大部分瘤细胞, 但对于残留的瘤细胞尚缺乏有效治疗手段. 转基因技术, 一方面可通过转入各种细胞因子, 通过增强机体免疫调节, 来杀伤残留细胞; 另一方面通过用转基因瘤细胞作为瘤苗来预防骨肉瘤术后复发. 我科调查骨肉瘤患者手术前后血清 IL-2 水平发现术后 IL-2 水平明显高于术前, 而且 IL-2 水平高者, 存活时间长 (待发表), 因此, IL-2 可作为骨肉瘤术后的辅助治疗手段. 我室把 IL-2 cDNA 转入人骨肉瘤细胞并获得表达, 目前正在进行高表达株筛选和转基因后瘤细胞生物活性变化研究, 并准备将 pDOR-IL-2 转染人外周淋巴细胞, 为骨肉瘤基因治疗创造条件.

参 考 文 献

- 1 Rosenberg S A, Lotze M T, Muul L M *et al.* New Engl J Med, 1987; **316**: 889
- 2 Rosenberg S A, Anderson W F, Blaese M *et al.* Annals of Surgery, 1993, **218** (4): 455
- 3 Foa R, Guarini A, Gansbacher B. Br J Cancer, 1992; **66**: 992
- 4 Rees R C, Writrout R H. Immunol Today, 1990; **11**: 36
- 5 Whiteside T L, Letessier E, Hirabayashi H *et al.* Cancer Res, 1993; **53**: 5654
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁等译, 分子

克隆实验指南, 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 19~23

- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁等译, 分子克隆实验指南, 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 55~56
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁等译, 分子克隆实验指南, 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 464~465
- 9 杨贵贞, 宋 迅, 田志刚等, 免疫生物工程纲要与技术. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1991: 47~48
- 10 Rosenberg S A, Aebersold P, Cornetta K *et al.* New Engl J Med, 1990; **323**: 570

Expression of Human IL-2 cDNA in the Human Osteosarcoma Cell Line. Zheng Qiang, Fan Qingyu, Yin Jianning, Hui Hongxiang (Department of Orthopedics, Tang Du Hospital of the 4th Military Medical University, Xi'an 710038, China).

Abstract The human IL-2 cDNA was cleaved from pHIG53 and inserted in the intermediate vector pSP-72 which has the restriction sites compatible with clone site of the expression vector pDOR-neo, then IL-2 cDNA was directionally inserted into the retroviral vector pDOR-neo to construct a eukaryotic expression vector. The vector was transfected into human osteosarcoma cell line by lipofectin. The IL-2 was bioassayed in the culture of tumor cell after selection of G418. The production of IL-2 was 50~800 U per 1×10^5 cells every 24 h, which makes it possible to carry out osteosarcoma gene therapy.

Key words interleukin-2, gene therapy, retroviral vector

人癌胚抗原单链抗体基因的构建和筛选

章美云 孔 健

(卫生部北京生物制品研究所, 北京 100024)

摘要 从分泌抗癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 单抗的杂交瘤细胞株 C50 中提取总 RNA,