论著

文章编号:1000-5404(2007)24-2330-03

pIRES2-FL-IL-3 转染协同促进脐血干细胞增殖的研究

张 勇[1],张林生[1],郭朝华[2],张红宾[1],董世武[2] (第三军医大学:[1]西南医院血液科;[2]军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察真核共表达质粒载体 pIRES2-FL-IL-3 转染对脐血干细胞增殖的影响及目的蛋白 IL-3 和 FL(Flt3 ligand)的表达变化。**方法** 分为4组:空白对照组(对照组)、pIRES2-IL-3 组(IL-3 组)、pIRES2-FL 组(FL 组)和 pIRES2-FL-IL-3 组(共表达组)。通过台盼蓝染色及 MTT 法检测 pIRES2-FL-IL-3 转染(共表达组)对脐血干细胞细胞存活率及增殖的影响,RT-PCR 技术、Western blot 技术检测脐血干细胞 FL 和 IL-3 的 mRNA 水平和蛋白表达。**结果** 共表达组细胞存活率无显著变化($P>0.05$),MTT 法检测细胞增殖显著高于对照组,共表达组 IL-3 及 FL mRNA 水平和蛋白均显著高于对照组,并且高于 IL-3 组和 FL 组。真核共表达质粒载体 pIRES2-FL-IL-3 转染脐血干细胞后细胞存活率无显著变化($P>0.05$),**结论** 脐血干细胞增殖显著增强,目的蛋白能得到有效表达。

关键词: 白介素3;Flt3 配体;真核表达;增殖

中图法分类号: R329.24;R392.11 **文献标识码:** A

pIRES2-FL-IL-3 transfection promotes proliferation of cord blood stem cells

ZHANG Yong[1], ZHANG Lin-sheng[1], GUO Chao-hua[2], ZHANG Hong-bin[1], DOND Shi-wu[2] ([1]Department of Hematology, Southwest Hospital, [2]State Key Labortory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the proliferation of cord blood stem cells and detect their mRNA and protein levels of FL and IL-3 after transfection of plasmid vector pIRES2-FL-IL-3. **Methods** The cell survival rate and proliferation of the cord blood stem cells were observed by dye staining and MTT methods after transfected by plasmid vector pIRES2-IL-3, pIRES2-FL or pIRES2-FL-IL-3. The mRNA and protein levels of FL and IL-3 were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** No statistical difference on cell survival rate of cord blood stem cells was observed between those transfected by plasmid vector pIRES2-FL-IL-3 and their corresponding controls. The cell proliferation of cord blood stem cells transfected by pIRES2-FL-IL-3 was higher than those transfected by pIRES2-IL-3 or pIRES2-FL. The mRNA and protein levels of FL and IL-3 in the cord blood stem cells transfected by pIRES2-FL-IL-3 were higher than those in the normal cord blood stem cells, and those transfected pIRES2-IL-3 group or pIRES2-FL respectively. **Conclusion** The transfection of pIRES2-FL-IL-3 to the cord blood stem cells does not influence the cell survival rate but accelerates their proliferation. FL and IL-3 co-expression displays synergic effect on the proliferation of cord blood stem cells.

Key words: IL-3; Flt3 ligand; eukaryotic expression; proliferation

白细胞介素-3(interleukin-3, IL-3)又称多系集落刺激因子(multiple colony stimulating factor, multi-CSF),是一种广谱的具有刺激造血细胞增殖和分化作用的细胞因子[1]。FL(Flt3 ligand)在重建造血和免疫中也扮演着重要角色,是一种重要的造血生长因子[2]。IL-3 和 FL 刺激造血功能的的作用靶点不同,存在协同作用。我们在成功构建真核共表达质粒载体 pIRES2-FL-IL-3 基础上,观察 pIRES2-FL-IL-3 转染对脐血干细胞增殖的影响及目的蛋白 IL-3 和 FL 的表达,为研究 IL-3 和 FL 共表达作为对急性放射损伤造血和免疫功能的手段提供体外实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

pIRES2-IL-3、pIRES2-FL 和 pIRES2-FL-IL-3 载体为本课题组构建,脂质体 DOTAP 购于德国 Roche 公司,IMDM 培养基为美国 HyClone 公司产品,PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司,

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(30200071)
Supported by the Project for Young Scholars of the National Natural Science Foundation of China (30200071)

作者简介: 张 勇(1967-),男,四川省武胜县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事白血病的诊断与治疗方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)68754129,E-mail:brave_zhang@hotmail.com

收稿日期: 2007-03-29;**修回日期:** 2007-06-18

PCR 引物由上海博亚公司合成,MTT 购自美国 Sigma 公司。

1.2　方法

1.2.1　脐血干细胞的分离与纯化　　无菌采取正常足月顺产男性新生儿脐血(本院提供),肝素抗凝,经 Ficoll 淋巴细胞分离液(密度 1.077 g/ml)分离单个核细胞,以含有 10% FCS 的 IMDM 洗涤 2 次,重悬于 300 μl PBS-0.5%、BSA-2 mmol/L EDTA 溶液中,用 mini-MACS 免疫磁珠分选系统阳性选择 $CD34^+$ 细胞。分别加入 100 μl 封闭液和抗 CD34 单抗,混匀,4 ℃放置 15 min。10 ml 缓冲液离心洗涤后,加入 100 μl 羊抗鼠 IgG 免疫磁珠,4 ℃放置 15 min。用上述方法洗涤后重悬于 1 ml 缓冲液中,滴加置于磁场的分离柱中,使细胞悬液自然流出。用缓冲液洗柱 4 次,0.5 ml/次。将分离柱移出磁场,加入 1 ml 缓冲液,用分离柱针芯将 $CD34^+$ 细胞推出即可用于实验。前期实验表明,纯化后脐血细胞 $CD34^+$ 细胞百分率从 0.6%～9.1%(3.2% ±0.5%)上升为 46.4%～95.6%(79.4% ±5.2%)。脐血干细胞的培养方法按本室常规操作进行。

1.2.2　基因转染　　根据转染条件的不同,分为 pIRES2-FL-IL-3 组(共表达组)、pIRES2-IL-3 组(IL-3 组)、pIRES2-FL 组(FL 组)和空白对照组(对照组)。取指数生长期脐血 $CD34^+$ 细胞,当其生长密度至 60%～80% 时转染。5 μl 质粒 DNA + 20 μl 转染缓冲液与 15 μl DOTAP + 35 μl 转染缓冲液混合,室温下轻轻混匀,1 200 r/min 离心 30 s,静置 15 min,将之缓慢配入含 10% 胎牛血清的 IMDM 中;将培养瓶中培养液吸弃,0.01 mol/L PBS 洗涤 1 次,最后用含有转染体系的培养液混悬,加入培养瓶中,37 ℃、5% CO_2 培养箱温育 24 h,之后换液。将 G418 按 800 μg/ml 浓度加入培养瓶中筛选约 1 个月,将筛选后的细胞扩增备用。将普通盖玻片泡酸、洗净、烘干后,放入直径为 6 cm 的培养皿中,^{60}Co γ 射线常规照射消毒。经转染、筛选、扩增之细胞从培养瓶中收集后,以约 1×10^5/ml 的浓度,接种于培养皿中,24 h 后取培养液和细胞用于相关检测。

1.3　细胞存活率的鉴定

用台盼蓝染色法测定各组细胞存活率,随机选取 5 个视野观察,相差显微镜下计数存活细胞数,计算存活率。

1.4　FL 及 IL-3 的检测

1.4.1　RT-PCR 检测 FL 及 IL-3 mRNA 水平

1.4.1.1　细胞总 RNA 提取　　美国 Invitrogen 公司的一步法。

1.4.1.2　引物的设计与合成　　应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物如下,IL-3:P1:5′-TGTTTCCACTCCGTCCAT-3′;P2:5′-CCA-AAGCAGGGCTCTTAC-3′(Tm53 ℃;30 循环;585 bp);FL:P1:5′-CTGGAGCCCAACAACCTATC-3′;P2:5′-TCTG-GACGAAGC-GAAGACA-3′(Tm57 ℃;27 循环;353 bp)。

1.4.1.3　RT-PCR　　采用两步法进行逆转录扩增。反转录:42 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min,1 个循环。PCR:94 ℃预变性 4 min;紧随多个循环,每一循环 94 ℃变性 30 s,复性 45 s,72 ℃延伸 1 min,最后 72 ℃延伸 10 min 补齐末端。以目的条带灰度值代表 mRNA 水平进行分析。

1.4.2　Western blot 检测 FL 及 IL-3 蛋白水平　　提取细胞蛋白,用 Lowry 法测定蛋白质含量,SDS-PAGE 电泳后,蛋白转印。膜置于 1∶800 倍 TBS 稀释的 IL-3 一抗(美国 Sigma)及 1∶500 倍 TBS 稀释的 FL 一抗(美国 Sigma)中 4 ℃过夜,再分别与用 TBS 以 1∶300 倍稀释的两种相应的二抗(兔抗人)37 ℃作用 1 h,接着与用 TBS 1∶500 倍稀释的辣根酶链亲合素三抗 37 ℃作用 1 h,最后用 DAB 显色,将显色清晰条带的 PVDF 膜置 Gel Doc2000 凝胶扫描系统上分析,以样本扫描值/对照扫描值的比值进行统计分析。

1.5　MTT 比色法检测细胞增殖

将处理 24 h 后的各组细胞接种于 96 孔板,每组 6 个孔,细胞生长 1、3、5 d 后每孔加入 MTT 20 μl(5 g/L)继续培养 4 h,加入 DMSO,测定波长 490 nm,酶标仪上测光密度值[$D(490)$]。

1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　细胞存活率测定结果

转染 24 h 后各组及空白对照组细胞存活率分别为(93.2 ±2.4)%、(93.7 ±2.1)%、(94.1 ±2.1)% 和(93.3 ±2.4)%,组间细胞存活率无显著区别($P>0.05$)。

2.3　MTT 法检测细胞增殖结果

共表达组 3 d 和 5 d 细胞增殖[$D(490)$]显著高于其余各组,见表 1($P<0.05$)。

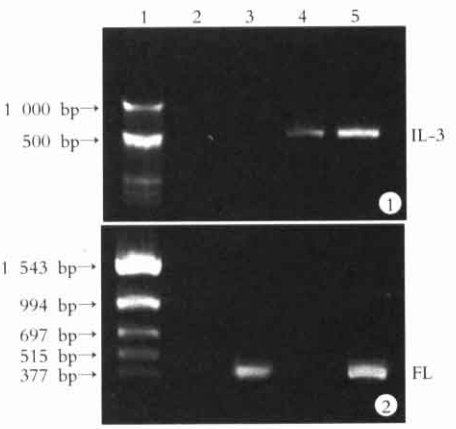
表 1　脐血干细胞增殖活性的 MTT 检测结果($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	3 d	5 d
对照组	0.265 ±0.025	0.454 ±0.041	0.612 ±0.052
IL-3 组	0.269 ±0.024	0.547 ±0.051[a]	0.724 ±0.064[a]
FL 组	0.271 ±0.025	0.554 ±0.050[a]	0.732 ±0.061[a]
共表达组	0.281 ±0.027	0.654 ±0.061[bc]	0.854 ±0.074[bc]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,与 IL-3 组比较

2.2　FL 及 IL-3 mRNA 水平检测结果

转染 24 h 后 IL-3 组 IL-3 mRNA 灰度值(0.582 ±0.045)($n=6$)显著高于对照组(0.051 ±0.012),FL 组 FL mRNA(0.693 ±0.054)灰度值高于对照组(0.038 ±0.010),共表达组 IL-3(0.845 ±0.061)和 FL mRNA 灰度值(0.912 ±0.064)均高于对照组,并且高于 IL-3 组和 FL 组。见图 1、2。



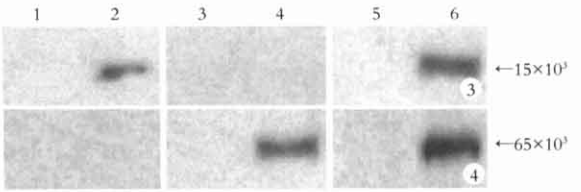
1:标准;2:对照组;3:FL 组;4:IL-3 组;5:共表达组

图 1　脐血干细胞 IL-3 mRNA 水平 RT-PCR 检测结果

图 2　脐血干细胞 FL mRNA 水平 RT-PCR 检测结果

2.3　FL 及 IL-3 蛋白表达检测结果

转染 24 h 后 IL-3 组 IL-3 蛋白灰度值高于对照组,FL 组 FL 蛋白灰度值高于对照组,共表达组 IL-3 和 FL 蛋白灰度值均高于对照组,样本扫描值/对照扫描值分别为(12.31 ±1.12)、(14.34 ±1.23)($n=6$),显著高于 IL-3 组[(6.31 ±0.49),$P<0.01$]和 FL 组[(8.14 ±0.65),$P<0.01$]。见图 3、4。



1,3,5：对照组；2：IL-3 组；4：FL 组；6：共表达组

图3 IL-3 蛋白检测结果

图4 FL 蛋白检测结果

3 讨论

造血生长因子（FL、SCF、Epo、Tpo、G-CSF、GM-CSF、IL-1、IL-3、IL-6、IL-12 等）在重建造血和免疫中扮演着重要角色，多种造血生长因子的组合应用能增强这种效能。

FL 是 fms 样酪氨酸激酶受体 3（Flt3）的配体，FL 主要由造血微环境中的骨髓成纤维细胞、髓系造血细胞和 T 细胞、B 细胞系等多种细胞产生，能有效激活酪氨酸激酶活性受体，刺激骨髓以及血液中祖细胞的生长，和其他造血细胞生长因子及白细胞介素一起能发挥强大的协同作用[3]。与其他造血生长因子不同的是，FL 除了有促进造血功能外，还有增强免疫的效能，它对树突状细胞、自然杀伤细胞及细胞毒 T 淋巴细胞有刺激效应，它可以扩增 $CD8\alpha^+$ 的树突状细胞，并降低异基因骨髓移植急性 GVHD 的发生率[4]，同时有证据表明 FL 还可扩增 DC_1 和 DC_2，导致Ⅰ型 T 细胞的扩增，从而增强细胞免疫功能[5]。

大量实验及临床研究证明，IL-3 确是一种广谱的、具有刺激造血细胞增殖和分化作用的细胞因子，在治疗骨髓衰竭、自身骨髓移植和放疗后粒细胞减少及放射病等方面均有较好疗效。IL-3 的缺乏将导致造血干细胞走向凋亡[6]，反之，IL-3 在 FL 或 SCF 存在下，能够有效扩增有核细胞总数，因此，探索 FL 及 IL-3 转染脐血干细胞移植治疗急性放射复合伤具有重要价值。

近年来，对造血生长因子扩增脐血 $CD34^+$ 细胞，国内外都进行了大量研究。王存邦等[7]以携带 GFP 和 Neo 基因的逆录病毒载体 GCGPXSN 实施基因转染，用流式细胞仪测定转移效率，48、96 h 后证明脐血 $CD34^+$ 细胞的基因转移效率高于骨髓。Shields 等[8]以逆转染病毒为载体将 IL-6、SCF、G-CSF、GM-CSF、MK-GDF 转染到各怀孕期的脐血 $CD34^+$ 细胞，证明怀孕中期的 $CD34^+$ 细胞有较高的转化效能。Fan 等[9]以腺病毒为载体，将 Tpo、KL、FL 转导入无血清培养 5 周的骨髓及脐血 $CD34^+$ 细胞中，转化率约 10%，转化的细胞具有灌输植入多系重建 NOD/SCID 小鼠的能力。Campain 等[10]将逆转录病毒介导的基因分别转入经 SCF、IL-3、IL-6、G-CSF 体外扩增的源于外周血、骨髓、脐血的 $CD34^+$ 细胞中，转化效能范围在 5% ~45%，培养 6 d 的脐血比 0 d 的转化效能高 3 ~5 倍，且细胞的生存能力并不降低。

本课题的目的是通过给 $CD34^+$ 细胞联合转染 FL 和 IL-3，使脐血干细胞本身表达造血调控因子 FL 和 IL-3，观察转染对细胞存活率变化及对增殖的影响。结果显示共表达组转染 24 h 细胞存活率无显著变化，MTT 法检测转染后 24 h 继续培养 3 d 和 5 d 时细胞增殖显著高于对照组，结合共表达组转染后 24 h IL-3 和 FL mRNA 灰度值均高于对照组，并且高于 IL-3 组和 FL 组，共表达组 IL-3 和 FL 蛋白灰度值均高于对照组，样本扫描值/对照扫描值分别显著高于 IL-3 组和 FL 组，表明共表达组 IL-3 和 FL 蛋白水平及 mRNA 水平高于 IL-3 组和 FL 组，说明转染后 2 种蛋白的表达对共表达组细胞增殖增强有显著影响，这为今后应用 FL 及 IL-3 联合转染脐血 $CD34^+$ 细胞，达到进行辐射后 SCID 小鼠造血和免疫功能的重建奠定了基础。

参考文献：

[1] Trakatelli M, Toungouz M, Blocklet D, *et al*. A new dendritic cell vaccine generated with interleukin-3 and interferon-beta induces $CD8^+$ T cell responses against NA17-A2 tumor peptide in melanoma patients [J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(4): 469 -474.

[2] Ljung T, Back R, Hellstrom-Lindberg E. Hypochromic red blood cells in low-risk myelodysplastic syndromes: effects of treatment with hemopoietic growth factors [J]. Haematologica, 2004, 89(12): 1446 -1453.

[3] Rossi B, Zanolin E, Vincenzi C, *et al*. Effect of addition of FLT-3 ligand and megakaryocyte growth and development factor on hemopoietic cells in serum-free conditions[J]. Stem Cells Dev, 2004, 13(4): 362 -371.

[4] Ayala E, Greene J, Sandin R, *et al*. Valganciclovir is safe and effective as pre-emptive therapy for CMV infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 37(9): 851 -856.

[5] Davis I D, Chen Q, Morris L, *et al*. Blood dendritic cells generated with Flt3 ligand and CD40 ligand prime CD8 + T cells efficiently in cancer patients[J]. J Immunother, 2006, 29(5): 499 -511.

[6] Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, *et al*. The lipocalin 24p3, which is an essential molecule in IL-3 withdrawal-induced apoptosis, is not involved in the G-CSF withdrawal-induced apoptosis [J]. Eur J Haematol, 2003, 71(6): 412 -417.

[7] 王存邦，达万明，欧英贤，等. 应用流式细胞仪测定不同来源 $CD34^+$ 细胞基因转移效率的实验研究[J]. 西北国防医学杂志，2000，21(2)：118 -120.

[8] Shields L E, Kiem H P, Andrews R G. Highly efficient gene transfer into preterm CD34 hematopoietic progenitor cells[J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 183(3): 732 -737.

[9] Fan X, Brun A, Segren S, *et al*. Efficient adenoviral vector transduction of human hematopoietic SCID-repopulating and long-term culture-initiating cells[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(9): 1313 -1327.

[10] Campain J A, Terrell K L, Tomczak J A, *et al*. Comparison of retroviral-mediated gene transfer into cultured human CD34 + hematopoietic progenitor cells derived from peripheral blood, bone marrow, and fetal umbilical cord blood [J]. Boil Blood Marrow Transplant, 1997, 3(5): 273 -281.

（编辑 汪勤俭）