论著

文章编号:1000-5404(2009)10-0914-04

人颗粒溶素活性肽和小鼠白细胞介素-12基因真核穿梭共表达质粒的构建与真核表达

张 黎[1],王瑜伟[2],何永林[2],帖儒修[2] (重庆医科大学:[1]附属第一医院眼科,[2]基础医学院免疫学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 构建含分枝杆菌复制子Orim,可分泌表达人颗粒溶素相对分子质量为9 000的活性肽与小鼠白细胞介素-12(mIL-12)的真核穿梭共表达质粒,并检测其蛋白表达。**方法** 以含有颗粒溶素cDNA序列的质粒为模板,通过PCR扩增获得相对分子质量为9 000的颗粒溶素活性肽基因片段后,定向插入真核表达载体pBudCE4.1中,获得重组表达质粒pBudCE4.1-S9K,经双酶切及插入片段测序对质粒进行鉴定。同时,将mIL-12亚克隆入pBudCE4.1另一多克隆位点,构建真核共表达质粒pBudCE41-S9K/mIL-12。然后,将分支杆菌复制子Orim亚克隆入真核共表达质粒pBudCE4.1-S9K/mIL-12,形成穿梭共表达质粒。采用RT-PCR、免疫细胞化学法,检测颗粒溶素活性肽在RAW264.7细胞的瞬时表达与分泌。ELISA检测mIL-12的表达。**结果** 酶切、PCR及测序鉴定证实,颗粒溶素活性肽基因插入片段正确;RT-PCR和免疫细胞化学检测表明其可以在细胞中瞬时表达;ELISA检测细胞培养上清有mIL-12表达。**结论** 成功构建穿梭共表达质粒pBM9,并能体外表达。

关键词: 颗粒溶素;白细胞介素12;真核表达

中图法分类号: R392-33;R392.13;R394.3 **文献标识码:** A

Eukaryotic expression and identification of recombinant shuttle plasmid for co-expression of human granulysin active peptide and murine IL-12

ZHANG Li[1], WANG Yu-wei[2], HE Yong-lin[2], TIE Ru-xiu[2] ([1]Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, [2]Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct an eukaryotic co-expression plasmid pBM9 carrying human granulysin active peptide and murine IL-12 and determine its expression. **Methods** The primer pairs including granulysin leader peptide DNA sequence were designed to amplify granulysin from the plasmid pZM03 carrying granulysin gene by polymerase chain reaction (PCR). PCR product was directly cloned into an eukaryotic co-expression plasmid pBudCE4.1 to construct plasmid pBudCE4.1-S9K. pBudCE4.1-S9K plasmid was identified by DNA sequencing. Murine IL-12 gene was subcloned into pBudCE4.1-S9K to construct eukaryotic co-expression plasmid pBudCE4.1-S9K/mIL-12. Mycobacteria replicon Orim from plasmid pZM03 was subcloned into *Not* Ⅰ site of pBudCE4.1-S9K/mIL-12 to construct eukaryotic co-expression shuttle plasmid pBM9. pBM9 was tansfected into RAW264.7 cells. RT-PCR was used to detect the mRNA expressions of granulysin and IL-12. The protein expression of them were observed by immunocytochemical method and ELISA respectively. **Results** RT-PCR identified the expressions of granulysin and mIL-12 in transfected cells and culture supernatant. Immunocytochemical method and ELISA verified the protein expressions. **Conclusion** The recombinant shuttle plasmid pBM9 is successfully constructed and expressed *in vitro*, which laid a foundation of gene therapy for tumors with granulysin and mIL-12.

Key words: granulysin; interleukin-12; eukaryotic expression

恶性肿瘤是严重危害人类的疾病之一。传统的治疗方法包括放疗、化疗和手术治疗,因其局限性促使人们寻找新的抗肿瘤治疗方法。肿瘤的基因治疗已成为目前抗肿瘤研究的热点之一。颗粒溶素(granulysin, GLS)是由人自然杀伤细胞(human natural killer cells, NK)和激活的细胞毒性T细胞(activated cytolytic T lymphocytes, CTL)表达的一种具有广谱杀伤病原生物和肿瘤细胞裂解活性的肽类分子,包含相对分子质量为15 000的前体和相对分子质量为9 000的活性肽

基金项目:国家自然科学基金(304000375)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (304000375)

作者简介:张 黎,女,四川省蓬安县人,博士,讲师,主要从事眼科学疾病方面的研究。电话:(023)66539848, E-mail: cqzl2005@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-11-28;修回日期:2009-02-23

2 种形式[1]。在肿瘤患者,特别是进展期肿瘤其分泌量大大低于正常人群[2]。白细胞介素-12(IL-12)是一种功能强大的 Th1 型细胞免疫反应增强剂,外源给予 IL-12 可产生 Th2 免疫状态向 Th1 型免疫状态的逆转,目前已成功应用于肿瘤等多种疾病的免疫治疗效果。本研究旨在构建含分枝杆菌复制子 Orim,可分泌表达人 GLS 相对分子质量为 9 000 的活性肽与小鼠 IL-12(mIL-12)的真核穿梭共表达质粒,旨在为后续的以分枝杆菌为载体的肿瘤免疫基因治疗研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

E. coli Top10 为本室自藏,多启动子真核共表达质粒 pBudCE4.1 购自 Invitrogen 公司,小鼠 RAW264.7 巨噬细胞株购自第三军医大学药理学教研室,含 mIL-12 基因和 Orim 基因的质粒 pZM02、pZM03 由本实验室伊正君等构建[3]。RPMI 1640 培养基干粉、Hanks 液购自美国 Gibco 公司,新生小牛血清购自杭州四季青公司,胰蛋白酶购自 Amresco 公司,质粒小量抽提试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、小量胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司,逆转录试剂盒(Ver. 3.0)、DNA 分子标准品(DL 2000)、DNA 分子标准品(DL 15 000)、高保真 Probest-*Taq* 酶、高效 *Ex-Taq* 酶、各种限制性核酸内切酶购自大连宝生物技术有限公司,Zeocin 抗生素、真核转染试剂 Lipofectamin™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司,兔抗人 GLS(H130)抗体为美国 Santa Cruz 公司产品,小鼠 IL-12 P70 ELISA 试剂盒购自美国 Biosource 公司,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、浓缩型 DAB 试剂盒、即用型 SABC 免疫细胞化学试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司,保真 *Taq*-plus 酶、高保真 pfu 酶、超纯 UniQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒、MMLV 第 1 链 cDNA 合成试剂盒购自上海生物工程技术有限公司。

1.2　方法

1.2.1　pBudCE4.1-S9K 质粒的构建　　登录 GenBank 查找 granulysin 编码序列(NM_006433),结合 Stenger 等[4]提供的相对分子质量为 9000 活性肽的基因片段(222 bp),将 GLS 相对分子质量 15 000 前体分子基因的分泌肽 45 bp 与相对分子质量为 9 000 活性片段的 cDNA 的 N 端 23 bp(共 68 bp)设计为引物 P1:5′-ATGGCTACCTGGGCCCTCCTGCTCCTTGCAGCCATGCTCCTGGGCGGCCGTGACTACAGGACCTGTCT-3′。再根据带分泌肽的相对分子质量为 9 000 GLS 的 cDNA 序列(共 267 bp)设计引物 P2、P3 分别含有 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ酶切位点。引物 P2:5′-ATAAGCTTACCATGGCTACCTGGGCCCTCCTGC-3′,引物长度 33 bp,插入 *Hind*Ⅲ酶切位点 AAGCTT,同时添加 ACC,使 ATG 位于 ACCATGG 的 KOZAK 序列中(有利于真核细胞蛋白翻译起始);引物 P3:5′-AGGGATCCTCACCTGAGGTCCTCACAGATCTGCTGG-3′,引物长度 36 bp,插入 *Bam*H Ⅰ酶切位点 GGATCC 和终止密码对应序列。以 pZM03 为模板,PCR 扩增含分泌肽的相对分子质量为 9 000 GLS 基因片段,扩增反应体系:10×buffer 5 μl,2.5×dNTP 8 μl,P1、P2 各 0.5 μl,P3 1 μl,Probest DNA 聚合酶 0.5 μl,DNA 模板 1 μl,灭菌去离子水 33.5 μl,共 50 μl;扩增条件:94 ℃3 min;94 ℃30 s,61 ℃30 s,72 ℃1 min,共 30 个循环;72 ℃5 min。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。用 PCR 产物回收试剂盒对 PCR 产物进行回收。用 *Hind* Ⅲ/*Bam*H Ⅰ双酶切 PCR 产物,并用相应的酶消化载体质粒 pBudCE4.1,回收目的 DNA 片段。

根据 TaKaRa 连接试剂盒说明操作,将分泌相对分子质量为 9 000 GLS 活性片段基因定向克隆进载体质粒 pBudCE4.1 中,构建含分泌肽基因片段的重组相对分子质量为 9 000 GLS 真核表达质粒 pBudCE4.1-S9K。将重组质粒转化感受态大肠杆菌 *E. coli* Top 10,然后在含 40 μg/ml Zeocin 抗生素的低盐 LB 培养基进行筛选。提取重组质粒用于鉴定。抽提重组质粒行 PCR 和酶切鉴定,将经双酶切鉴定的重组质粒送博亚生物技术公司测序鉴定。

1.2.2　pBudCE4.1-S9K/mIL-12 共表达质粒的构建　　分别用 *Not* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ消化质粒 pZM02、pBudCE4.1-S9K,胶回收 pBudCE4.1-S9K 酶切载体大片段和 pZM02 酶切的 mIL-12 基因小片段。用 TaKaRa 公司的连接试剂盒进行连接,操作按说明书进行,构建 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 共表达质粒。将重组质粒转化感受态大肠杆菌 *E. coli* Top 10,然后在含 Zeocin 抗生素的低盐 LB 培养基进行筛选。抽提重组质粒行 mIL-12 的 PCR、双酶切鉴定。

1.2.3　pBudCE4.1-S9K/mIL-12 穿梭共表达质粒的构建　　用 *Nhe* Ⅰ分别消化质粒 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 和 pZM03,胶回收 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 酶切载体大片段和 pZM03 酶切的 Orim 基因小片段。用 TaKaRa 公司的连接试剂盒进行连接,操作按说明书进行,构建 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 穿梭共表达质粒。抽提重组质粒行 Orim 基因的 PCR、酶切鉴定,将鉴定正确的质粒命名为 pBM9。

1.2.4　细胞转染　　将 RAW264.7 细胞接种于含 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,待生长至 80% 汇合,用 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 质粒进行转染,同时以 pBudCE4.1 空质粒和未转染细胞作为对照。转染试剂为阳离子脂质体 Lipofectamine™ 2000,具体方法参照转染试剂说明书进行。

1.2.5　RT-PCR 行 GLS 基因及小鼠单链 IL-12 基因转录水平检测　　采用超纯 UniQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒、MMLV 第 1 链 cDNA 合成试剂盒分别于转染 24 h 收集实验孔及空质粒对照孔细胞提取总 RNA 进行逆转录。以各自的 cDNA 为模板,分别以 GLS 与 mIL-12 的特异引物进行 PCR 扩增。具体操作按照试剂盒说明进行。

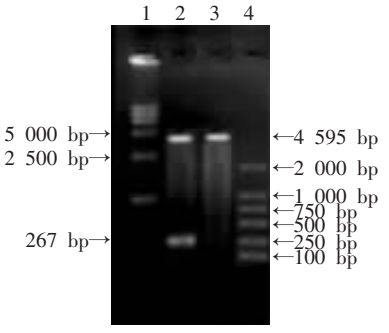
1.2.6　免疫细胞化学法检测 GLS 蛋白分子表达　　具体操作按 SABC 免疫细胞化学试剂盒说明进行,盐酸酒精分化,脱水,透明,封片,观察,摄像保存。

1.2.7　ELISA 定量检测 IL-12 的分泌　　收集 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 质粒转染的各细胞培养孔上清,以空质粒 pBudCE4.1 转染组细胞培养上清作为对照,按照小鼠 IL-12 ELISA 检测试剂盒说明进行测定,计算细胞因子的浓度。

2 结果

2.1 GLS 活性肽目的基因的 PCR 扩增与 pBudCE4.1-S9K 鉴定

以 P1、P2、P3 为引物 PCR 扩增得含分泌肽的 GLS 基因 cDNA 约 267 bp 大小的特异条带。pBudCE4.1-S9K 用 *Hind* Ⅲ 和 *Bam*HⅠ双酶切可切下约 267 bp 的片段(图 1)。pBudCE4.1-S9K 测序结果表明基因未发生突变,基因序列与 GenBank(NM_006433)报道完全一致。

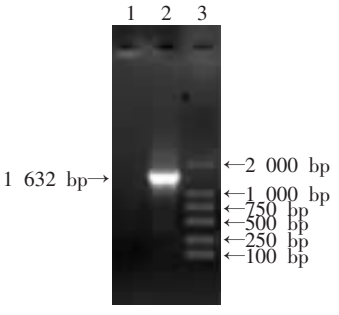


1:DNA 标准(DL 15000); 2: pBudCE4.1-S9K 以 *Hind* Ⅲ 和 *Bam*HⅠ双酶切结果; 3:pBudCE4.1-S9K 以 *Hind* Ⅲ 单酶切结果; 4: DNA 标准(DL 2000)

图 1 pBudCE4.1-S9K 的酶切鉴定

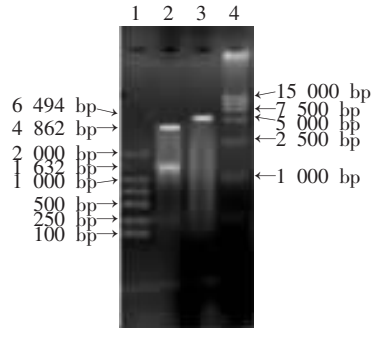
2.2 mIL-12 基因的鉴定

重组 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 质粒用特异性引物进行 PCR 扩增,可扩增出大小约 1 632 bp 的片段(图 2)。采用 *Kpn* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切可切出相同大小的片段(图 3)。



1:阴性对照; 2: mIL-12; 3:DNA 标准(DL 2000)

图 2 mIL-12 的 PCR 扩增

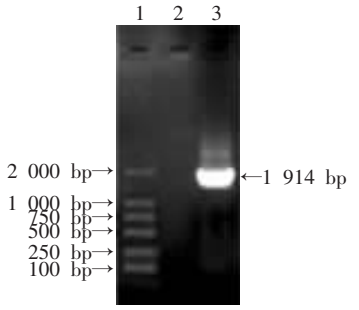


1:DNA 标准(DL 2000); 2:pBudCE4.1-S9K/mIL-12 以 *Kpn* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切结果; 3:pBudCE4.1-S9K/mIL-12 以 *Kpn* Ⅰ 单酶切结果; 4:DNA 标准(DL 15000)

图 3 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 的酶切鉴定

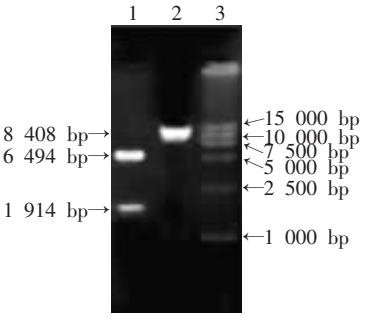
2.3 Orim 基因的鉴定

重组 pBM9 质粒用特异性引物进行 PCR 扩增,可扩增出大小约 1 914 bp 的片段(图 4)。采用 *Not* Ⅰ 酶切可切出相同大小的片段(图 5)。



1:DNA 标准(DL 2000);2:阴性对照; 3:Orim PCR 结果

图 4 分枝杆菌复制子 Orim 基因的扩增

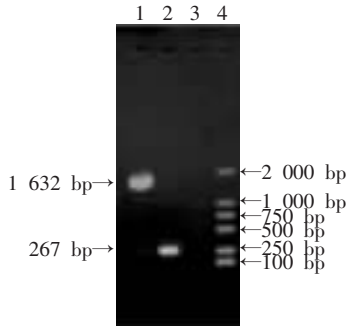


1:pBM9 以 *Not* Ⅰ 酶切结果;2:pBM9 以 *Kpn* Ⅰ 酶切结果; 3:DNA 标准(DL 15000)

图 5 pBM9 的酶切鉴定

2.4 重组 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 质粒转染细胞结果

转染的细胞 24 h 后提取总 RNA,用随机引物进行逆转录,特异性引物 PCR 扩增出 GLS 与 mIL-12 相应大小的片段(图 6)。免疫细胞化学法可观察到转染细胞内黄染;未转染组和空质粒转染组无黄染颗粒,细胞蓝染(图 7)。

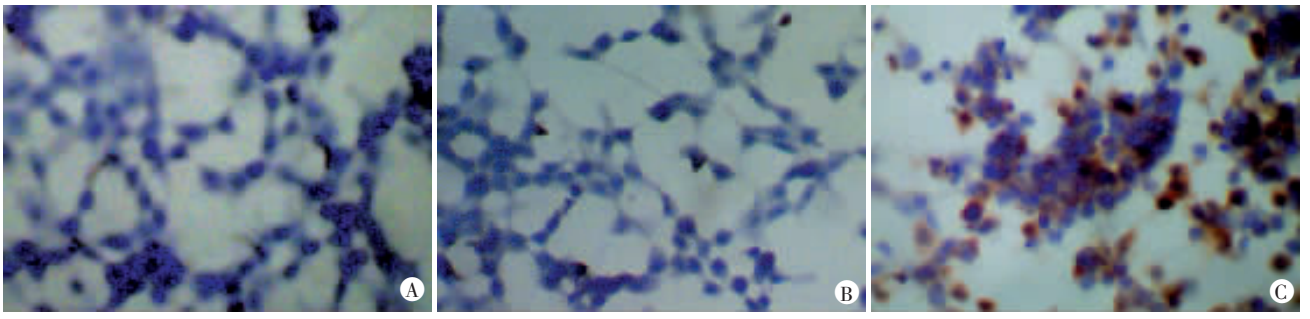


1: mIL-12; 2:相对分子质量为 9 000 的 GLS; 3:阴性对照; 4: DNA 标准(DL 2000)

图 6 质粒转染 RAW264.7 细胞的 RT-PCR 鉴定结果

2.5 细胞培养上清中的表达产物检测

取 48 h 的细胞培养上清,用 ELISA 试剂盒检测到 mIL-12 表达,pBudCE4.1 空质粒转染组和未转染正常细胞培养上清中的 IL-12 值在检测下限以外;pBudCE4.1-S9K/mIL-12 质粒转染组细胞培养上清中的 IL-12 值为(68.23 ± 1.62) pg/ml,表明 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 质粒携带的小鼠单链 IL-12 基因在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中得到了成功表达。



A:未转染的细胞; B:空质粒转染的细胞; C:共表达质粒转染的细胞

图 7　GLS 表达的免疫细胞化学结果　(SABC ×250)

3　讨论

GLS 是近年新发现由 NK、CTL 细胞产生的一种具有抗菌、抗肿瘤作用的免疫效应分子,广泛参与抵抗胞内病原感染和诱导肿瘤细胞凋亡。正常机体有一定的 GLS 分泌,其水平与机体的细胞免疫状态直接相关,现已把它作为一个反映机体细胞免疫状态的新指标[1]。而在肿瘤患者,尤其是进展期肿瘤 GLS 的水平大大降低[5]。GLS 分子有 2 种形式, 相对分子质量为 15 000 前体形式和相对分子质量为 9 000 活性肽形式。在天然状况下,成熟的 GLS(相对分子质量为 9 000)随着 NK、CTL 细胞的胞内颗粒通过穿孔素的作用和其他抗肿瘤分子一起进入肿瘤细胞诱导凋亡而发挥抗肿瘤目的。用重组的相对分子质量为 9 000 GLS 体外作用于多种肿瘤细胞同样具有诱导凋亡作用[6],这提示相对分子质量为 9 000 活性形式的 GLS 无论是在肿瘤细胞内外均可诱导细胞凋亡。其诱导肿瘤细胞的凋亡机制主要与细胞膜上鞘磷脂/神经酰胺的比例失调、半胱天冬酶的活化、线粒体损伤及胞内 Ca^{2+} 浓度密切相关[7-9]。

IL-12 是一种重要的细胞免疫调节因子,它通过活化免疫细胞、促进其他细胞因子的分泌发挥抗肿瘤作用。在一个已建立 Th2 型免疫反应的感染动物中,外源给予 IL-12 仍能诱导出一个独立的与新免疫原相关的 Th1 型免疫反应。在与多种抗原成分共呈递时, IL-12 能够统一机体的免疫反应模式向 Th1 型极化。

本实验通过构建相对分子质量为 9 000 GLS 活性形式与 mIL-12 真核共表达质粒,用于肿瘤的基因治疗,再加上相对分子质量为 15 000 的分泌肽基因片段,使相对分子质量为 9 000 GLS 进行分泌表达,扩大了治疗效应。分泌的 GLS 在较低的浓度即可使局部的 NK、$CD4^+$T、$CD8^+$T、巨噬细胞增加,活化单核巨噬细胞分泌多种细胞因子,故构建分泌型的相对分子质量为 9 000 GLS 有利于趋化功能的发挥。质粒 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 基因经酶切与测序鉴定,结果与 GenBank 公布的序列完全一致。通过 RT-PCR 与免疫细胞化学检测,证实重组质粒能在 RAW264.7 中表达。ELISA 结果显示,在转染 pBudCE4.1-S9K/IL-12 质粒的细胞培养上清中有 IL-12 表达。

我们将该分枝杆菌属复制子 Orim 克隆入 pBudCE4.1-S9K/mIL-12 质粒的 *Nhe* Ⅰ位点中,构成穿梭共表达质粒 pBM9。该质粒同时具有大肠杆菌属复制子 OriE 和分枝杆菌属复制子 Orim,可以在大肠杆菌和分枝杆菌中复制和穿梭。该质粒的成功构建,为选择分枝杆菌为载体将颗粒溶素基因与 mIL-12 运送、表达以治疗肿瘤、结核等疾病奠定了基础。

参考文献:

[1] Hanson D A, Kaspor A A, Poulain F R, *et al*. Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule [J]. Mol Immunol, 1999, 36(7): 413-422.

[2] Ogawa K, Takamori Y, Suzuki K, *et al*. Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity [J]. Eur J Immunol, 2003, 33(7): 1925-1933.

[3] 伊正君,朱道银,陈　全,等. 人颗粒溶素与小鼠单链 IL-12 真核共表达质粒的构建及其在 RAW264.7 细胞中的表达[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(11): 936-939.

[4] Stenger S, Hanson D A, Teitelbaum R, *et al*. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin[J]. Science, 1998, 282(5386): 121-125.

[5] Kishi A, Takamori Y, Ogawa K, *et al*. Differential expression of granulysin and perforin by NK cells in cancer patients and correlation of impaired granulysin expression with progression of cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2002, 50(11): 604-614.

[6] Pena S V, Hanson D A, Carr B A, *et al*. Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins [J]. J Immunol, 1997, 158(6): 2680-2688.

[7] Okada S, Li Q, Whitin J C, *et al*. Intracellular mediators of granulysin-induced cell death[J]. J Immunol, 2003,171(5): 2556-2562.

[8] Deng A, Chen S, Li Q, *et al*, Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator[J]. J Immunol, 2005, 174(9): 5243-5248.

[9] Pardo J, Perez-Galan P, Gamen S, *et al*. A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis[J]. J Immunol, 2001, 167(3): 1222-1229.

(编辑　栾　嘉)