基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0142-03

pIL-12 质粒 DNA 对细粒棘球蚴感染小鼠脾细胞凋亡的影响

张长碧,李文桂,朱佑明,王 鸿
(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 pIL-12 质粒 DNA 免疫对细粒棘球蚴感染小鼠脾细胞凋亡的影响。方法:将 pIL-12 质粒 DNA 肌肉注射免疫 BALB/C 鼠,免疫后 8 周用 Eg 原头节进行攻击感染,感染后 18 周剖杀小鼠,计算减蚴率;取脾并分离脾细胞,用 ConA 刺激培养脾细胞,流式细胞仪检测脾细胞的凋亡发生率,同时设有 BCG 和 PBS 对照。结果:pIL-12 质粒 DNA 免疫组的减蚴率为 44.85%,脾细胞凋亡发生率明显低于 PBS 对照组。结论:pIL-12 质粒 DNA 可抑制细粒棘球蚴感染小鼠的脾细胞凋亡。

【关键词】细粒棘球绦虫;pIL-12 质粒 DNA;凋亡
【中国图书分类法分类号】R383.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-20

Effects of pIL-12 plasmid DNA on apoptosis of splenocytes in mice infected with hydatid cyst of Echinococcus granulosus

ZHANG Chang-bi, et al
(*Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of pIL-12 plasmid DNA on apoptosis of splenocytes in mice infected with protoscoleces of hydatid cyst of E.granulosus (Eg). *Methods*: BALB/c mice were intramuscularly vaccinated by pIL-12 plasmid DNA, then challenged with Eg protoscoleces on 8 w of vaccination and killed on 18W of infection to count rate of reduced hydatid cyst weight.The spleen was gathered to separate splenocytes, splenocytes then were cultured by stimulation with ConA, and apoptotic rate of splenocytes were measured by FACsort.BCG and PBS were served as control. *Results*: In the group of pIL-12 plasmid DNA immunization, the rate of reduced hydatid cyst weight was 44.85%; apoptotic rate of splenocytes in the pIL-12 plasmid DNA group was lower than that in the PBS control. *Conclusion*: pIL-12 plasmid DNA may inhibit apoptosis of splenocytes in mice infected with hydatid cyst of Echinococcus granulosus.

【Key words】 Echinococcus granulosus; pIL-12 plasmid DNA; Apoptosis

白细胞介素 12(Interleukin 12,IL-12)是由单核细胞、树突状细胞、Th1 细胞、正常 B 细胞和转化的 B 细胞等产生的一种异型二聚体蛋白。IL-12 与细胞受体结合后,诱导 STAT4 酪氨酸磷酸化而转移到核内,作为反式作用因子结合于特异的基因位点内的增强子,促进基因转录和表达。IL-12 可诱导 Th0 细胞分化为 Th1 型细胞,诱导活化的 T 细胞和 NK 细胞增生并产生高水平的 IFN-γ 和 IL-2,诱导小鼠产生高水平的 IgG2a、IgG2b 和 IgG3,增强 NK 细胞的细胞毒作用并促进 LAK 和 CTL 细胞生成[1-6]。人们发现 pIL-12 质粒免疫后对日本血吸虫和肝癌细胞具有一定的杀伤作用[7,8]。

囊型包虫病(Cystic echinococcosis,CE)是由细粒棘球绦虫(Eg)的续绦期幼虫寄生在人体肝、肺等脏器引起的一种严重危害人类健康的人畜共患寄生虫病。本研究采用的 pIL-12 质粒是含有小鼠 IL-12 基因的真核表达载体,可表达小鼠 IL-12,含有氨苄青霉素抗性基因。用 pIL-12 质粒 DNA 免疫小鼠,Eg 原头节攻击后观察其诱导的细胞凋亡,从而为研究该质粒的保护性免疫机制提供有价值的材料。

作者介绍:张长碧(1967-),女,护师,
研究方向:病原微生物的分子免疫学研究。
通讯作者:李文桂,男,研究员,E-mail:li_wengui@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金项目(30801052,30671835,30500423 和 30200239)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

39 只雌性 BALB/c 小鼠,12~14 周龄,平均体重 20~25 g,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2 细粒棘球蚴

由本所用沙鼠传代模型保存。

1.3 主要试剂

pIL-12 质粒 DNA 由重庆医科大学微生物教研室骆旭东博士惠赠。UNIQ-10 柱式质粒小量和大量抽提试剂盒购自上海生工公司。ConA 购自 Sigma 公司。Annexin V-FITC 试剂盒(LHK 601-100)购自深圳晶美生物工程有限公司。TUNEL 试

剂盒购自 Boehringer Mannheim(Germany)公司。

1.4 pIL-12 质粒 DNA 的制备

将 pIL-12 质粒 DNA 转化 Top10 感受态细胞，用 LB-Amp 平板筛选，然后 LB 液体培养基小量培养，用 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒进行抽提，1.2%琼脂糖凝胶电泳对产物鉴定，最后用 LB 液体培养基大量培养，用 UNIQ-10 柱式质粒大量抽提试剂盒提取质粒，测定其浓度。

1.5 动物分组及免疫

39 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组，每组 13 只。第 1 组为 pIL-12 质粒 DNA 肌肉注射组：在注射 pIL-12 质粒前 24 h，在后腿股四头肌注射 0.5%的盐酸布比卡因 50 μl，然后在同一点注射接种 50 μg/ml pIL-12 质粒 DNA 100 μl，每 2 周 1 次，共 3 次；第 2 组为 BCG 皮下注射对照组：将 5×10^6CFU 的 BCG 皮下注射 1 次；第 3 组为 PBS 皮下注射对照：将 100 μl PBS 皮下注射 1 次。至实验结束时，由于小鼠互相撕咬和长时间饲养等原因，各组均有 5 只死亡。

1.6 攻击感染

pIL-12 质粒 DNA 注射 8 周后用 50 个细粒棘球蚴的原头节腹腔内注射进行攻击。

1.7 计算减蚴率

攻击感染后 18 周剖杀各组小鼠，切开小鼠腹部，仔细分离细粒棘球蚴组织，称重，计算减蚴率。其公式为减蚴率(%) = (1- 免疫组检获细粒棘球蚴重量 / 对照组检获细粒棘球蚴重量) × 100%。

1.8 脾细胞制备

攻击感染后 18 周剖杀各组小鼠，75%酒精消毒，无菌取脾脏，匀浆，200 目尼龙网过滤；灭菌双蒸水溶解红细胞后，用含 10%灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞浓度为 5×10^6 个 /ml，加入青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 U/ml；经台盼蓝染色试验发现脾细胞存活率为 93%～97%。

1.9 脾细胞培养

将分离的小鼠脾细胞加入 24 孔细胞培养板，每个标本设 2 孔，分别加入原液、10 μg/ml ConA 各 1 ml，37℃ 5% CO_2 培养 12～16 h。

1.10 用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法（Terminal deoxynucleotidyl transeferase-mediated dUTP nick end labeling；TUNEL）检测大鼠脾细胞凋亡。

将细胞培养液吸至 1.5 ml EP 管，2 000 r/min 离心 10 min，调细胞浓度为 1×10^7 个 /ml，吸 100 μl 于 0.5 ml EP 管，加 100 μl 4%多聚甲醛固定，室温 30 min；2 000 r/min 离心 10 min，加 100 μl 0.1% triton X-100 冰浴 2 min，PBS 洗 2 次；加 50 μl TUNEL 反应液 37℃ 60 min，用 1 ml 含 5 μg/ml PI 和 0.1% RNaseA 的 PBS 悬浮细胞，置室温 30 min；上机测试，用 CellQuest 软件分析细胞凋亡。

1.11 用 Annexin V-FITC 染色法检测小鼠脾细胞凋亡

收集培养 12～16 h 的 5×10^6 个 /ml 脾细胞，用 4℃预冷的 PBS 洗细胞两次，2 500 r/min 离心 5 min；用 250 μl 结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为 1×10^6 个 /ml；取 100 μl 的细胞悬浮液加入 5 ml 流式细胞管中，加入 Annexin V-FITC 5 μl 和 20 μg/ml 碘化丙锭溶液 10 μl；混匀后室温避光孵育 15 min；在反应管中加 400 μl PBS，用流式细胞仪（美国 Becton-Dickinson 公司）记录 FITC 标记的凋亡细胞在波长为 495 nm 紫外光激发下产生 525 nm 的绿色荧光以及 PI 标记的凋亡细胞和坏死细胞在波长为 340 nm 的紫外光激发下产生 620 nm 的红色荧光，用 cellQuest 软件分析细胞凋亡。

1.12 统计学处理

各免疫组小鼠检测指标采用 SPSS11.0 软件进行分析，计量资料采用 t 检验（$\bar{x}\pm s$），检测结果采用方差分析，组间两两比较用 SNK 法。

2 结 果

2.1 pIL-12 质粒 DNA 的制备

用 UNIQ-10 柱式质粒大量抽提试剂盒提取质粒，经纯化得到无内毒素的 pIL-12 质粒 DNA 约 154 μg，其 OD_{260} 值为 1.205，OD_{260}/OD_{280} 值为 1.84，核酸定量仪测定其浓度为 60.5 μg/ml，将其配成 50 μg/ml。



1. DNA marker；2，3. pIL-12 质粒 DNA

图 1 pIL-12 质粒 DNA 的鉴定

2.2 减蚴率计算

pIL-12 质粒 DNA 注射组的减蚴率与 PBS 对照组相比，差别有显著意义（$P<0.05$）；BCG 皮下注射组的减蚴率与 PBS 对照组相比，差别无显著意义（$P>0.05$，表 1）。

2.3 TUNEL 染色法检测小鼠脾细胞凋亡

当不用任何刺激物时，pIL-12 质粒 DNA 免疫组小鼠的脾细胞凋亡发生率与 BCG 和 PBS 对照组相比明显降低（$P<0.05$）；当用 ConA 刺激时，各免疫组的脾细胞凋亡发生率类似不用刺激物的结果，每个 ConA 刺激组凋亡发生率显著高于相应的原液组（$P<0.01$）。BCG 皮下注射组的脾细胞凋亡发生率与 PBS 对照组相比无显著差别（$P>0.05$，表 2）。

2.4 Annexin-V 染色法检测小鼠脾细胞凋亡

当不用任何刺激物时，pIL-12 质粒 DNA 免疫

组小鼠的脾细胞凋亡发生率与 PBS 对照组相比明显降低($P<0.05$)；当用 ConA 刺激时，各免疫组的脾细胞凋亡发生率类似不用刺激物的结果，每个 ConA 刺激组凋亡发生率显著高于相应的原液组 ($P<0.01$)。BCG 皮下注射组的脾细胞凋亡发生率与 PBS 对照组相比，差别无显著意义($P>0.05$，表 3)。

表 1 pIL-12 质粒 DNA 免疫和原头节攻击后小鼠减蚴率检测

组别	鼠数	棘球蚴重量($\bar{x} \pm s$)	减蚴率(%)
pIL-12 免疫组	8	$3.0 \pm 1.87^{*}$	44.85
BCG 对照组	8	4.10 ± 1.50	24.63
PBS 对照组	8	5.44 ± 2.85	-

与 PBS 对照组相比，$^{*}P<0.05$

表 2 TUNEL 染色法检测 pIL-12 质粒 DNA 免疫，原头节攻击后小鼠脾细胞凋亡

组别	鼠数	脾细胞凋亡率	
		原液	ConA 刺激
pIL-12 免疫组	8	$0.016\,7 \pm 0.006\,0^{*\triangle}$	$0.020\,9 \pm 0.012\,1^{*\triangle}$
BCG 对照组	8	$0.025\,7 \pm 0.008\,6$	$0.030\,3 \pm 0.011\,6$
PBS 对照组	8	$0.029\,9 \pm 0.011\,3$	$0.039\,2 \pm 0.016\,0$

与 PBS 对照组相比，$^{*}P<0.05$；与 BCG 对照组相比，$^{\triangle}P<0.05$

表 3 Annexin-V 染色法检测 pIL-12 质粒 DNA 免疫，原头节攻击后小鼠脾细胞凋亡

组别	鼠数	脾细胞凋亡率	
		原液	ConA 刺激
pIL-12 免疫组	8	$0.166\,8 \pm 0.014\,4^{*\triangle}$	$0.209\,6 \pm 0.023\,0^{*\triangle}$
BCG 对照组	8	$0.181\,0 \pm 0.016\,5$	$0.285\,9 \pm 0.011\,3$
PBS 对照组	8	$0.191\,1 \pm 0.015\,7$	$0.306\,3 \pm 0.023\,0$

与 PBS 对照组相比，$^{*}P<0.05$；与 BCG 对照组相比，$^{\triangle}P<0.05$

3 讨 论

Emery 等[9]用 IL-12 治疗感染泡球蚴病的小鼠 2 周发现 68.75%鼠体内泡球蚴发育受到抑制，治疗后 10 周发现 37.5%鼠体内泡球蚴死亡。本文用 pIL-12 质粒 DNA 肌肉注射免疫小鼠后，可诱导 45.77%的减蚴率，提示 pIL-12 质粒 DNA 对细粒棘球蚴具有一定的杀伤作用。

李富荣等[10]将正常 BALB/c 鼠脾 CD_4^+T 淋巴细胞用 EmAg 刺激培养 16 h 后，用 TUNEL 染色法检测其凋亡发生率为 0.92%，而小鼠感染泡球蚴 12 周和 25 周时凋亡发生率为 4.29%和 34.72%。本文发现小鼠感染 Eg 原头节 18 周时，用 TUNEL 染色法检测脾细胞凋亡发生率为 2.99%~3.92%，用 Annexin V-FITC 染色法检测脾细胞凋亡发生率为 19.11%~30.63%，类似上述结果，提示 Eg 原头节感染可诱导小鼠脾细胞发生凋亡。

Kremer 等[11]证实 BCG 接种可抑制人外周血单核细胞发生凋亡。本文发现 BCG 皮下注射组小鼠脾细胞凋亡发生率轻微低于感染对照组，表明 BCG 免疫对 Eg 原头节感染鼠脾细胞凋亡具有一定的抑制作用。

Estaguier 等[12]发现 IL-12 可抑制艾滋病患者 CD_4^+T 细胞发生凋亡。本文发现 pIL-12 质粒 DNA 免疫和原头节攻击后用 TUNEL 染色法检测脾细胞凋亡发生率为 1.67%~2.09%，用 Annexin V-FITC 染色法检测脾细胞凋亡发生率为 16.68%~20.96%，提示 pIL-12 质粒 DNA 免疫可抑制 Eg 原头节感染鼠脾细胞发生凋亡，推测 pIL-12 质粒 DNA 免疫小鼠后可激活体内的免疫细胞，促进其分泌免疫效应分子，这些免疫细胞与免疫效应分子互相促进和互相调节，抑制 Eg 原头节感染鼠脾细胞发生凋亡，使小鼠脾细胞数目相对增加，从而加强小鼠抗 Eg 原头节感染的保护性免疫反应[13]。

参 考 文 献

[1] Yoshimoto T, Kojima K, Funakoshi T, et al. Molecular cloning and characterization of murine IL-12 genes [J]. J Immunol, 1996, 153(3):

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0145-03

人 REGγ cDNA 克隆及其稳定转染细胞株的建立

田 甜,王小毅,李 凡,任国胜
(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建真核表达重组体 PcDNA3.1-REGγ 的稳定转染细胞株,为进一步深入研究 REGγ 的功能奠定基础。方法:提取 MCF-7 细胞的总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 获取全长 REGγ cDNA,经限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ酶切后与 PcDNA3.1 连接构建重组体,再经内切酶酶切及 DNA 序列分析鉴定重组体构建正确。以 Lipofectamine2000 将重组体导入 HBL-100 细胞,由 G418 筛选出稳定转染细胞株。结果:经免疫细胞化学和 RT-PCR 检测并证实稳定转染细胞株中有 REGγ 的高表达。结论:真核表达重组体 PcDNA3.1-REGγ 构建成功,并经抗生素筛选获得了稳定高表达 REGγ 的细胞株,为进一步研究 REGγ 的功能奠定了基础。

【关键词】REGγ;cDNA 克隆;转染
【中国图书分类法分类号】R329 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-16

Cloning of human REGγ cDNA and construction of the stable transfective cell line

TIAN Tian, et al
(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the stable transfective cell line with the eukaryotic expression vector for human REGγ cDNA to laid the foundation for further study of the function of REGγ. *Methods*: REGγ cDNA was obtained by RT-PCR of total RNA extracted from the human breast cancer cell MCF-7, and it was digested by the restriction endonuclease *EcoR* Ⅰ and *EcoR* Ⅴ before connection with PcDNA3.1.The recombination with forward insert were slelected by restriction endonuclease digestion and confirmed correct by sequencing and then transfected into HBL-100 cell by using lipofectamine2000.The stable transfected cell line was selected in medium containing antibiotic(G418). *Results*: The result of immunocytochemistry and RT-PCR of total RNA

作者介绍:田 甜(1973-),男,主治医师,博士,研究方向:乳腺癌的发病机制。
通讯作者:任国胜,男,教授,E-mail:rgs726@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:30670811)。

1082-1088.
[2] Visconti R.Importance of the MKK6/P38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity[J]. Blood,2000,96(5):1844-1852.
[3] Gately MK,Desai BB,Wolitzky AG,et al. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)[J]. J Immunol,1991,147(3):874-882.
[4] Germann T,Bongartz M, Dlugonska H, et al. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a,IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo [J]. Eur J Immunol, 1995,25(3):823-829.
[5] Murray HW,Hariprashad J. Interleukin 12 is effective against an established systematic intercellular infections: experimental visceral leishmaniasis[J]. J Exp Med,1995,181(1):387-391.
[6] Trinchieri G. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specitic adaptive immunity [J]. Annu Rev Immunol,1995,13 (1): 251-276.
[7] Wynn TA,Cheever AW,Jankovic D,et al. An IL-12-based Vaccination method for Preventing fibrosis induced by Schistosome infection[J].Nature,1995,376(6541):594-596.
[8] 李宝金,殷晓煜,吕明德,等.IL-12 基因修饰树突状细胞体外诱导免疫杀伤肝癌细胞[J]. 中华外科杂志,2004,42(5):315-316.
[9] Emery I,Leclerc C,Sengphommachanh K, et al. In vivo treatment with recombinant IL-12 protects C57BL/6j mice against secondary alveolar echinococcoris[J]. Parasite Immmunol,1998,20(2):81-91.
[10] 李富荣,石佑恩,史大中,等.泡球蚴感染过程中宿主 CD4⁺T 细胞凋亡和凋亡相关基因转录水平的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2003,19(4):59-65.
[11] Kremer L,Estaquier J,Brandt E, et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection prevents apoptosis of resting human monocytes[J]. Eur J Immunol,1997,27(9):2450-2456.
[12] Estaquier J,Idziorek T,Zou WP,et al. T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin-12 on activation-induced and CD95(FAC/APO-1)-mediated apoptosis of CD_4^+T cells from human immunodeficiency virus-infected persons [J]. J Exp Med, 1995,182(5):1759-1767.
[13] 杨 梅,李文桂.多房棘球绦虫重组 BCG-EmII/3 疫苗对小鼠脾细胞凋亡的影响[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(8):796-798.

(责任编辑:关蕴良)