基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0257-03

小鼠单链白细胞介素 -12 重组卡介苗的构建与表达

张 黎[1],王瑜伟[2],何永林[3],李 娜[2],王 爽[2],帖儒修[3]
(1. 重庆医科大学附属第一医院眼科;2. 重庆医科大学基础医学院免疫学教研室;3. 重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建携带小鼠白细胞介素 -12 基因的重组卡介苗(Bacille calmette-guerin,BCG),并鉴定该重组菌向真核细胞递呈质粒的能力。方法:以分子生物学方法构建携带小鼠 IL-12 基因和分支杆菌复制子 OriM 的真核穿梭共表达质粒 pBM12,以电转化的方式将 pBM12 质粒转入 BCG 构建重组 BCG,抽提质粒进行 PCR 鉴定重组菌;将重组菌感染巨噬细胞,通过 RT-PCR 了解重组菌向真核细胞递呈质粒的能力。结果:电转化方式可将 pBM12 导入 BCG,抽提质粒鉴定出与 mIL-12 基因相符的目的条带。以该重组 BCG 感染小鼠巨噬细胞,96 h 后用 RT-PCR 法也扩增出 1 632 bp 左右的基因条带。结论:成功构建含 pBM12 的重组 BCG。该重组 BCG 能向小鼠巨噬细胞递呈携带基因。

【关键词】白细胞介素 12;重组卡介苗;真核表达
【中国图书分类法分类号】R378.91 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-07

Construction and expression of recombinant bacille calmette-guerin carrying murine interleukin-12

ZHANG Li, et al
(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct recombinant bacille calmette-guerin (BCG) carrying murine interleukin-12 (mIL-12) genes, and to identify the ability of recombinant BCG for submitting plasmids to eukaryotic cells. *Methods*: Co-expression shuttle plasmid of pBM12, including mIL-12 gene and mycobacterial replicon of Orim, was built using molecular biological approach.The pBM12 was transfected to BCG competence by electroporation to construct recombinant BCG. The plasmid of recombinant BCG was extracted for PCR identification. The ability of submitting plasmids to eukaryotic cells was determined by RT-PCR. *Results*: The plasmid pBM12 may be transduced into BCG with electroporation. The specific bands for mIL-12 of the recombinant BCG were detected by PCR. The specific bands for 1632 bp mIL-12 were amplified from transfected macrophages after 96 hours byRT-PCR. *Conclusion*:The recombinant BCG carrying pBM12 was constructed successfully. The recombinant BCG can submit the carried genes to mice macrophages.

【Key words】Granulysin;Interleukin-12;Recombinant BCG;Eukaryotic expression

结核病(Tuberculosis,TB)位居单一病原体引起死亡的严重传染病之首,目前全球感染者占总人口的三分之一,其患病率和死亡率居高不下[1]。我国自 2005 年 3 月起,结核病首次取代狂犬病成为传染病中第一杀手。卡介苗(Bacille calmette-guerin,BCG)用于预防结核病已有 80 多年的历史,但其免疫效果不一,它对婴幼儿粟粒性结核和结核性脑炎有较好的免疫效果,但对成人肺结核的免疫效果较差[2];同一株 BCG 在不同人群中产生的保护效果在 0~80%不等。综上所述,研究开发新药和疫苗等仍然非常重要。结核病的感染、发病与治疗过程中,宿主本身的免疫素质和免疫状态是决定预后转归的重要因素[3]。Th1 型免疫应答在抗结核分枝杆菌感染过程中有重要的保护作用。IL-12 是重要的免疫调节分子,主要诱导Th1 型细胞免疫应答。本研究构建携带 IL-12 基因的真核穿梭表达质粒 pBM12, 将该穿梭质粒电转到 BCG,制备pBM12 重组 BCG,为进一步观察该治疗性疫苗预防及治疗结核奠定实验基础。

作者介绍:张 黎(1973-),女,讲师,博士,
研究方向:小儿眼科。

基金项目:国家自然科学基金项目(304000375)。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌株及质粒

E.coli Top10、BCG(丹麦株)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pZMO2,pZMO3 由本实验室伊正君等构建[4]。

1.2 主要试剂

RPMI1640 培养基干粉、Hank's 液购自美国 Gibco 公司;Middlebrook7H9、Middlebrook7H10 培养基干粉、Middlebrook OADC Enrichment 购自重庆惠利试剂中心(美国 Difco 公司产品);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 Marker DL2000、DNA Marker DL15000、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 公司产品;保真 Taq-plus 酶、高保真 pfu 酶、超纯 UniQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒、MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自上海生物工程技术有限公司。

1.3 pBM12 质粒的构建

分别用 *Not* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ消化质粒 pZM02、pBudCE4.1,胶回收 pBudCE4.1 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,构建携带 mIL-12 基因的质粒 pBudCE4.1-mIL-12。将重组质粒转化感受态大肠杆菌 *E.coli* Topl0,然后在含 Zeocin 抗生素的低盐 LB 培养基进行筛选。mIL-12 基因(1632 bp)的引物序列:IL1:5'-TGAATTCGCGGCCGCATATGGGTCCTCAGAAGCTAAC-3';IL2:5'-GATAAGCTTGGTACCGGATCCTCAGGCGGAGCTCAGAT-3'。抽提重组质粒行 mIL-12 的 PCR、双酶切鉴定。

用 *Nhe* Ⅰ分别消化质粒 pBudCE4.1-mIL-12 和 pZM03,胶回收 pBudCE4.1- 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,构建穿梭表达质粒 pBM12。将重组质粒转化感受态大肠杆菌 *E.coli* Topl0,然后在含 Zeocin 抗生素的低盐 LB 培养基进行筛选。根据 OriM 的编码序列设计 P1、P2 引物,分别含有 *BamH* Ⅰ、*Nhe* Ⅰ和 *Nhe* Ⅰ、*Hind* Ⅲ酶切位点。P1 的序列为 5'-TGGATCCGCTAGCTAAAGCCAGGT-GAGCCCACCAGCTC-3',P2 的序列为 5'-GCGAAGCTTGC-TAGCGCACTACAACGGAGTTCGCCACGT-3'。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 pBM12。

1.4 pBM12 重组 BCG 的构建

将对数生长期的 BCG 菌株以预冷的 100 ml/L 甘油去离子水洗涤 3~4 次,4℃,4 000 rpm 离心,用 10%的甘油去离子水重悬,取 180 μl 菌液加入 20 μl 纯化的 pBM12 质粒,轻轻混匀,冰浴 10 min,转入预冷的 2 mm 电转杯中,电转化仪(Bio-Rad ECM630),电转仪条件设置为"指数衰减波,2 500 V"电击 1 次,迅速加入 600 μl Middlebrook 7H9 液体培养基。37℃孵育过夜后涂布到含 Zeocin 40 μg/ml 的 Middlebrook 7H10 固体平板上,37℃孵育 14 d 后挑取阳性菌落增菌后抽提质粒,同时取 1 ml 菌液,离心弃上清,沉淀加入 500 μl 三蒸水,100℃热裂解 8 min,取上清 2 μl 或质粒抽提物 1 μl 为模板,分别作 mIL-12 和 OriM 的 PCR 扩增。

1.5 pBM12 重组 BCG 稳定性及基因递呈能力鉴定

将鉴定的重组菌传代 5~10 代后再次以 PCR 法进行鉴定,以观察重组质粒的稳定性。将重组 BCG 在含 Zeocin 40 mg/L 的 Middlebrook 7H9 液体培养基中培养,增菌,以完全 RPMI1640 培养液重新调整细菌浓度为 2×10^9CFU/L 数量级备用。完全 RPMI1640 培养液培养 RAW264.7 细胞,观察细胞贴壁后,每孔加 200 μl 细菌悬液,置细胞培养箱中 37℃ 5%CO_2 孵育 4 h 后,以预温的不含血清的 RPMI1640 培养液洗涤培养板 3 次,去除未被巨噬细胞吞噬的细菌后加入卡那霉素,使其终浓度为 100 μg/ml,置孵箱中 4 h。4 h 后换成完全 1640 培养基,此后每隔 12 h 以 37℃预温的含 PMA 100 nmol/L、卡那霉素 30 μg/ml 的完全 1640 培养基换液。采用超纯 UniQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒、MMLV 第一链cDNA 合成试剂盒分别于细菌感染 96 h 收集实验孔(重组 BCG)及对照孔(BCG)细胞,提取总 RNA 进行逆转录。以各自的 cDNA 为模板,以 mIL-12 的特异引物进行 PCR 扩增。RT-PCR 检测 mIL-12 的表达。

2 结 果

2.1 mIL-12 基因的鉴定

重组 pBudCE4.1- 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。采用 *Kpn* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切可切出相同大小的片段(图略)。

2.2 OriM 基因的鉴定

重组 pBM12 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(图略)。采用 *Nhe* Ⅰ酶切可切出相同大小的片段(图 1)。

2.3 重组 BCG 的筛选鉴定

电转化后的 BCG 在含 Zeocin 抗生素的 Middlebrook 7H10 固体培养基长出菌落,而对照平板涂布无质粒转染的感受态 BCG 无菌落生长。将转化质粒 pBM12 的 BCG 命名为 pBM12 重组 BCG。重组菌能抽出质粒,用小鼠 IL-12 的特异性引物扩增,出现相应的目的条带(图 2)。

2.4 重组 BCG 的稳定性鉴定

将重组 BCG 在含 Zeocin 抗生素的 Middlebrook 7H10 固体培养基连续培养 10 代，仍见大量的菌落生长。最后一次抽提质粒进行 PCR 鉴定，结果与转染前的质粒完全一致(图略)，证明该重组 BCG 能稳定携带质粒。

2.5 重组 BCG 向真核细胞递呈质粒能力鉴定

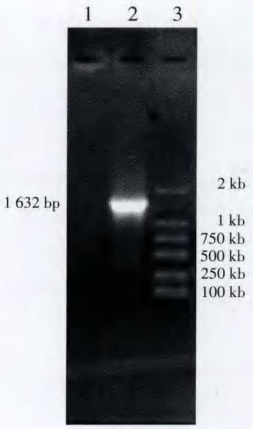
以重组 BCG 感染 RAW264.7 细胞后进行抗酸染色观察，可见红色的抗酸菌在巨噬细胞胞浆中富集，巨噬细胞核呈蓝色，在细胞间隙中只有极少量散在重组 BCG 的存在(图 3)。

重组 BCG 感染 RAW264.7 细胞 96 h 后，在细胞浆中检测到 IL-12 目标基因的表达(图 4)。



1. pBM12 以 *Nhe* Ⅰ酶切；2. pBM12 以 *Kpn* Ⅰ酶切；3. DNA 分子标准

图 1 pBM12 以 *Nhe* Ⅰ或 *Kpn* Ⅰ酶切



1. BCG PCR 结果；2. pBM12 重组 BCG PCR 结果；3. DNA 分子标准

图 2 重组 BCG 的 PCR 鉴定

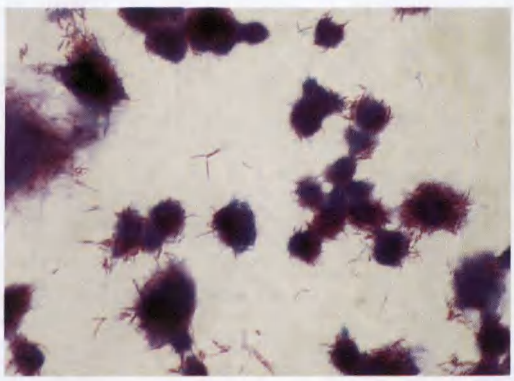
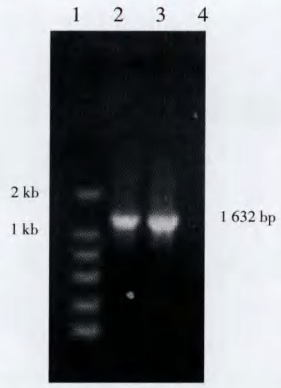


图 3 重组 BCG 感染 RAW264.7 cells 12 h 后(×1 000)



1. DNA 分子标准；2. 重组 BCG 感染组；3. pBudCE4.1- mIL-12 质粒(阳性对照)；4. BCG 感染组(阴性对照)

图 4 RAW264.7 感染重组 BCG 96 h 时 RT-PCR 结果

3 讨 论

对结核病免疫机制的研究发现，以 IFN-γ、特异性 CTL 产生为特征的 Th1 型免疫反应在抗结核免疫过程中起重要作用。在活动性结核病人体内 Th1 型免疫应答水平降低，细胞免疫应答倾向 Th2，IFN-γ 减少，IL-4 产生增加[5]。当上述 Th1 免疫应答过程中任何因素缺陷，包括 IL-12、IFN-γ、TNF-α 或氮氧化物不足，均可导致结核肉芽肿形成不典型，缺乏抵抗力而导致结核病进展。因此在结核病的感染、发病与治疗过程中，宿主本身的免疫素质和免疫状态是决定预后转归的重要因素[3]。

IL-12 是一种功能强大的 Th1 型免疫反应诱导剂，外源给予 IL-12 可产生 Th2 免疫状态向 Th1 型免疫状态的逆转。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[6,7]。

BCG 是目前用于预防结核病的疫苗。BCG 具有的安全性、良好的免疫佐剂作用、生产费用低等特性使其成为最有吸引力的传递外源性基因的载体。近年来，许多学者尝试将 BCG 或重组 BCG用于胞内感染性疾病和某些肿瘤的治疗，如 Shigehara 等[8]用 BCG 治疗结核性附睾炎；Eto 等[9]用 BCG 治疗膀胱癌都取得良好效果。本实验成功构建携带 IL-12 的重组 BCG，一方面 BCG 可作为有机体载体向机体靶向递送 IL-12 真核表达质粒，利用 IL-12 的表达激发宿主针对结核杆菌的非特异性细胞免疫，发挥作

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0260-05

特发性血小板减少性紫癜患儿骨髓 MSC TGF-β1 和 HGF 的表达及对免疫的调节作用的研究

吴 艳,于 洁,张 磊,罗 庆,肖剑文,刘筱梅,宪 莹,戴碧涛,徐酉华,苏庸春
(重庆医科大学附属儿童医院血液科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究特发性血小板减少性紫癜(Idiopathic thrombocytopenic purpura ,ITP)患儿骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSC)体外的免疫抑制能力。方法:采集 ITP 患儿和对照儿童的骨髓标本,分离、培养和扩增 MSC,观察细胞形态及增殖能力,计数分析骨髓 MSC 成纤维细胞集落形成单位(Colony forming unit-fibroblast,CFU-F);采用混合淋巴细胞反应检测骨髓 MSC 体外对淋巴细胞的免疫抑制能力;采用 RT-PCR 和 ELISA 方法检测骨髓 MSC 细胞内转化生长因子-β1 (Transforming growth factor-β1,TGF-β1)和肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor,HGF)mRNA 的表达水平和细胞培养上清中因子的浓度。结果:(1)ITP 患儿的骨髓 MSC 呈典型的成纤维样细胞形态,CFU-F 计数(21.29 ± 5.25)与对照组骨髓 MSC 的 CFU-F 计数(22.33 ± 5.33)无显著差异($P>0.05$);(2)ITP 患儿骨髓 MSC 免疫抑制率[(74.93 ± 8.01)%]与对照组骨髓 MSC 免疫抑制率[(76.42 ± 8.80)%]比较无显著性差异($P>0.05$);(3)ITP 患儿骨髓 MSC 细胞内 TGF-β1、HGF mRNA 的表达水平与对照组比较均无显著性差($P>0.05$);(4)ITP 患儿骨髓 MSC 培养上清中 TGF-β1 的浓度[(617.88 ± 81.89)pg/ml]与对照组骨髓 MSC 培养上清中 TGF-β1 的浓度[(632.40 ± 126.90)pg/ml]比较无显著性差异($P>0.05$);ITP 患儿骨髓 MSC 培养上清中 HGF 浓度[(520.20 ± 30.67)pg/ml]与对照组骨髓 MSC 培养上清中 HGF 的浓度[(521.56 ± 36.72)pg/ml]比较无显著性差异($P>0.05$)。结论:ITP 患儿骨髓 MSC TGF-β1 和 HGF 的表达水平及免疫抑制能力与对照组比较无显著性差异。

【关键词】特发性血小板减少性紫癜;间充质干细胞;免疫抑制;转化生长因子-β1;肝细胞生长因子
【中国图书分类法分类号】R556.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-08

作者介绍:吴 艳(1982-),女,硕士,
研究方向:儿童血液系统疾病(现工作于重庆市妇幼保健院儿科)。
通讯作者:于 洁,女,教授, E-mail:yujie167@yahoo.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100095)。

用;另一方面利用该重组疫苗中BCG与结核分枝杆菌具有共同属特异性抗原可激发宿主针对结核杆菌的属特异性细胞免疫,而两者共同作用使机体的免疫状态以Th1细胞免疫为主,有利于清除体内的结核杆菌。重组BCG对结核病的免疫治疗作用避开了化疗药物的耐药形成问题,这给结核病的治疗带来了光明的前景。

参 考 文 献

[1] Dye C,Williams B G,Espinal M A,et al. Erasing the World's Slow Stain: Strategies to Beat Multidrug-Resistant Tuberculosis[J]. Science, 2002,295(5562):2042-2046.

[2] Leander G,Peter S,Sven B,et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin[J]. J Clin Invest,2005,115(9): 2472-2479.

[3] Ottenhoff T H,Verreck F A,Lichtenauer Kaligis E G,et al. Genetics, cytokines and human infectious disease: Lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae[J]. Nature Genetics,2002,32(1): 97-105.

[4] 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.

[5] Flynn J L,Chan J. Immunology of tuberculosis[J]. Annu Rev Immunol, 2001,19:93-129.

[6] Pollock K G,McNeil K S. The Leishmania mexicana cysteine protease,CPB2.8,induces potent Th2 responses[J]. J Immunol,2003,170 (4): 1746-1751.

[7] Seder R A, Hill Adrian V S. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity[J]. Nature,2000,406: 793-798.

[8] Shigehara K,Kobori Y,Amano T,et al. Bilateral tuberculous epididymitis after intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy[J]. Hinyokiyo,2005,51(120):839-842.

[9] Eto M,Koga H,Noma H,et al. Importance of urinary interleukin-18 in intravesical immunotherapy with bacillus calmette-guerin for superficial bladder tumors[J]. Urol Int Urol,2005,75(2):114-118.

(责任编辑:冉明会)