维普资讯 http://www.cqvip.com

第23卷 第1期 重庆医科大学学报 Vol.23 No.1
1998 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1998

人IL－4重组逆转录病毒载体的构建及在人肿瘤细胞中的表达*

儿科学院免疫室 赵晓东** 李成荣
杨锡强 蒋丽萍

提 要 利用多聚酶链反应(PCR)方法，从PCD－hIL－4质粒中扩增得到人白细胞介素4(hIL－4)的cDNA。DNA序列测定证实此片段包含完整的IL－4开放阅读框架。应用DNA重组技术，将此cDNA重组于逆转录病毒载体LXSN。用脂质体转染法将此重组质粒导入病毒包装细胞PA317，得到滴度为2.5×10^5CFU/ml的感染性病毒。病毒感染人白血病细胞株HL－60、K562及Burkit淋巴瘤细胞株Raji，使之表达并分泌IL－4。逆转录PCR(RT－PCR)法证实hIL－4 cDNA可在上述肿瘤细胞中持续转录。ELISA法证实病肿瘤细胞分泌IL－4水平可高达300Pg/10^6细胞.24小时。本研究为进一步探讨转IL－4基因用于血液系统恶性肿瘤免疫治疗的价值提供了基础。

关键词 IL－4; 基因转移; 基因表达
中图分类号: R733.7; R733.4

IL－4主要由TH_2细胞产生，是一种具有多种生物学功能的调节细胞因子。已证实其既可提高肿瘤细胞的免疫原性[1]，亦可直接抑制某些肿瘤细胞生长，因而有较广阔的临床应用前景。本文采用逆转录病毒载体(Retroviral vector)将hIL—4 cDNA导入白血病及淋巴瘤细胞株，测定其转录与分泌IL—4水平，为进一步研究转入IL—4基因对肿瘤细胞体外生物学特性及体内免疫原性的影响提供基础。

1 材料与方法

1.1 目的基因 载体及宿主菌 以含hIL—4 cDNA全序列的质粒PCD—hIL—4(购自ATcc,USA)为模板，通过PCR反应扩增hIL—4 cDNA片段。其引物为:

sense 5′AACTCGAGTTAATGGGTTCTCACCTCCCAA3′;Anti—sense 5′ AGGGATCCTATTCAGCTCGAACACTTTGA 3′。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳回收并纯化.用双脱氧链终止法直接进行手工全序列测定。逆转录病毒载体LXSN长5.9kb(Dr.Miuer赠送，USA)，内含5'LTR及SV40启动序列，宿主菌Mc1061由本室保存

1.2 工具酶及主要化学试剂 内切酶、T4连接酶、Taq酶及逆转录酶购自Promega;dNTP、Polybrene、RPMI 1640、DMEM、G418 购自GIBCO;新一代脂质体转染试剂Dosper 购自Boehringer Mannheim。

1.3 细胞株 病毒包装细胞株PA317及感染性病毒滴度鉴定细胞株NIH 3T3 TK⁻购自第三军医大学分子生物室;Raji、k562、HL—60为本室常规传代培养。

1.4 重组逆转录病毒载体的构建 碱裂解法抽提质粒、酶切、连接、鉴定及细菌转化等步骤均按Sambrook等介绍的方法操作[2]。其具体方法为:用平端内切酶HpaI消化载体，抽提纯化后与PCR反应扩增回收得到的hIL—4 cDNA片段连接。连接产物转化感受态Mc1061菌，挑取抗性细菌克隆快速抽提质粒，酶切鉴定。

1.5 脂质体介导基因转染 将成功构建的LxsN—hIL—4 cDNA重组体转入PA317细胞株。转染方法按试剂说明书操作。

1.6 感染性病毒获得、滴度鉴定肿瘤细胞株感染 均按文献[3]的标准方法操作。

1.7 hIL—4 cDNA有肿瘤细胞中的转录 按常规方抽提G418抗性肿瘤克隆总RNA，用RT—PCR法定性检测IL—4 mRNA表达。

1.8 肿瘤细胞分泌IL—4水平测定 选取抗性肿瘤细胞克隆，调细胞浓度至1×10^6/ml，取1ml加入24孔培板，37°C，5% CO_2及95%湿度条件下培养24h，无菌收集上清液，用ELISA 双抗体夹心法检测IL—4水平。试剂盒购自Genzyme公司。

2 结果

2.1 hIL—4 cDNA片段获得及其序列测定 hIL—4 cDNA全序列通过PCR反应从PCD—hIL—4质粒扩增得到，扩增产物长484bp。

* 本文受国家自然科学基金资助 编号 39470733
** 男，1970－05出生，博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

图1 hIL—4 cDNA 序列测序部分结果

经DNA全序列测定证实其包含完整的IL—4开放阅读框架(Open reading frame,ORF)且无突变发生。(图1为IL—4 全序列cDNA片段部分测序结果)

2.2 **重组逆转录病毒载体构建** 重组逆转录病毒载体LXSN/hIL—4构建过程如图2所示。EcoR I消化重组逆转录病毒载体后，电泳图上可出现367 bp片段，而sacI消化该重组体只出现单一片段，证实正向插入IL—4 cDNA的重组逆转录病毒载体构建成功。(图3)

2.3 **感染性病毒滴度鉴定** 往G148筛选，共获得18株IL—4基因转染的PA317克隆。用NIH3T3TK-细胞集落形成法鉴定PA317细胞培养上清液中感染性病毒滴度为2.0×10^4～2.5×10^5 CFU/ml.

2.4 **转染hIL—4 cDNA前后肿瘤细胞株体外培养生长物性** 转染hIL—4 cDNA后K562、Raji及HL—60三种肿瘤细胞光镜下均无明显形态学差异，生长良好。

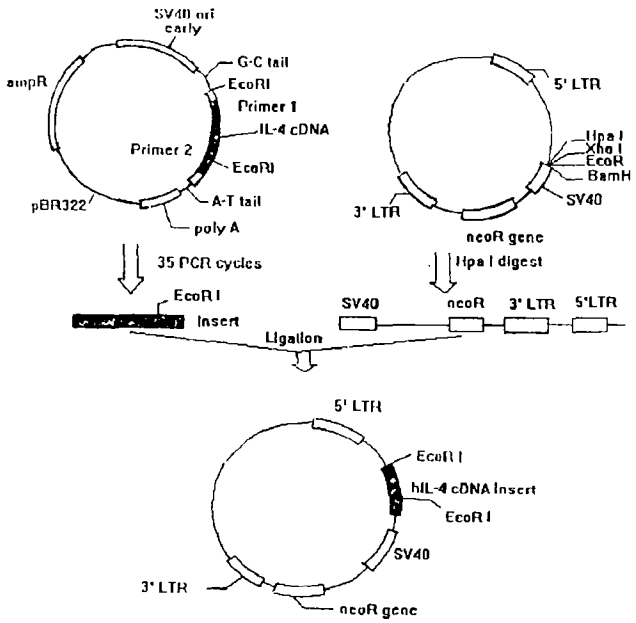


图2 hIL－4重组逆转录病毒载体构建示意图

2.5 **hIL—4 cDNA在肿瘤细胞中的转录** (图4.5)在转入IL—4基因第3、20、30天用RT—PCR法定性检测hIL—4 cDNA在HL—60、K562及Raji细胞中转录。发现仅转入载体及野生型肿瘤细胞并无IL—4 mRNA转录而转入hIL—4基因的肿瘤细胞中三次均检出IL—4 mRNA.上述细胞中β－

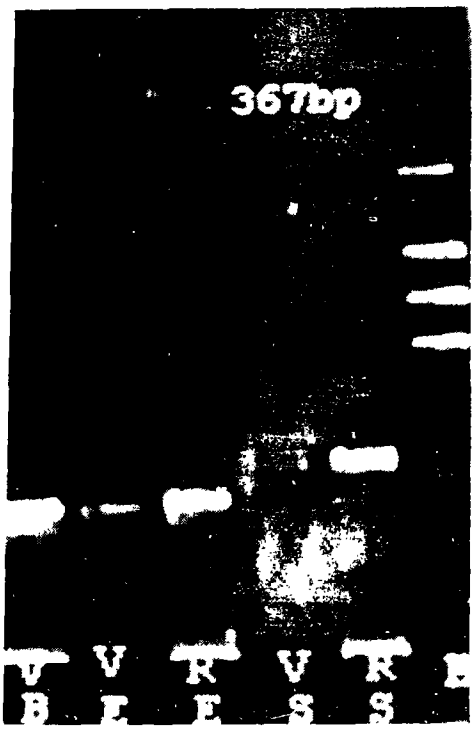


图3 重组IL—4逆转录病毒载体酶切鉴定图谱
M:ϕx174 marker v: vector R:Recombinant
S:SacI digested E:EcoRI digested B: BamHI digested

维普资讯 http://www.cqvip.com

actin水平无明显差异。

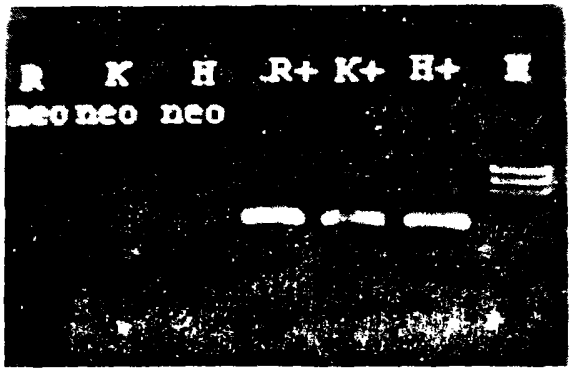


图4 RT－PCR法检测hIL－4 mRNA表达

M:φx174 marker H'、K'、R':分别为hIL—4 cDNA转染的HL—60、K562及Raji细胞株

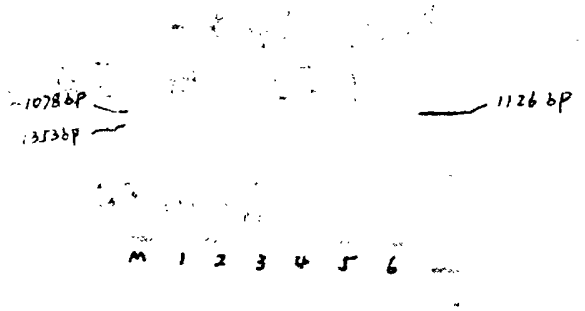


图5 肿瘤细胞β－actin转录水平

1、2、3: hIL—4 cDNA转染的HL－60、K562及Raji细胞株

4、5、6 仅用载体转染的HL－60、K562及Raji细胞株

2.6 肿瘤细胞分泌IL—4水平 导入hIL—4 cDNA后，HL－60、K562、及Raji细胞分泌IL—4的最高水平分别达300.10pg/10^6细胞，24h、246.6pg/10^6细胞·24h和266pg/10^6细胞·24h.而相应的野生型及仅导入载体的肿瘤细胞则不分泌hIL－4。

3 讨论

近年研究证实IL－4具有较明确的抗肿瘤作用。重组IL－4不仅在体外抑制急性B淋巴细胞性白血病及非何杰金淋巴瘤细胞生长[4,5]，亦可延长B系幼淋细胞白血病SCID小鼠模型的生存期[6]，提示IL－4具有用于治疗血液系统恶性肿瘤的前景·

由于静脉或皮下使用重组IL－4有诸多缺点，因而有人采用基因转移方法将鼠IL－4 cDNA导入小鼠肾癌、乳腺癌及浆细胞瘤并获得抗肿瘤增殖效果[7,8]，国内亦有将鼠IL－4基因导入小鼠实体瘤细胞的极道[1]。本文则采用逆转录病毒载体首次将人IL－4 cDNA导入人白血病及淋巴瘤细胞，旨在建立观察IL－4抗肿瘤机制的体外研究模型，并为制备经人IL－4基因修饰的肿瘤疫苗提供理论基础。

在构建重组逆转录病毒载体时，由于插入序列5′及3′侧翼序列常影响在真核细胞中的表达水平与时间，故我们丢弃了其5′及3′侧翼序列而仅转移其完整的ORF。将PCD－hIL－4质粒的ORF完整切下且与本文使用载体多克隆位点相匹配的内切酶难以找到，因而有极道用EcoRV及BamHI消化该质粒得到0.6kb片段，再用人工合成接头的方法补齐该片段5′端缺失的起始密码ATG及编码N端四个氨基酸残基的碱基，从而获得完整的ORF序列[9]。本文则采用PCR法直接从PCD－hIL－4质粒中扩增出IL－4的ORF，PCR产物直接测序结果经与Genbank序列比较无突变发生，且导入肿瘤细胞后可持续转录并高水平表达，表明使用该法设计目的基因既十分简便，也比较可靠。

参考文献

1.于益芝，曹雪涛，徐志工，等.中国免疫学杂志 1995;11(1):26
2.Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et sl. Molecular cloning:a laboratory manual.2nd Edit Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
3.Miller AD, Rosman GJ. Bio Techniques 1989;7(9):980
4.Manabe A, Smith EC, Kumagai MA, et al. Blood 1994;83(7):1731
5.Defrance T, Fluckiger AC, Rossi JF, et al. blood 1992;79(4):990
6.Mitchell P Clutterbuck RD, Powles RL, et al. Blood 1996;87(11):4797
7.tepper RL, et al, cell 1989;57:503
8.Belliveau JF, et al. Science 1991;254:716
9.曹雪涛，于益芝，徐志工，等.中华微生物学和免疫学杂志 1995;2:53

(收稿日期 1997－06－18)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Retroviral vector－mediated expression of human interleukin—4 gene in human tumor cells

Zhao Xiaodong, et al
Department of Immunology, College of Pediatrics

Human interleukin－4 complementory DNA (hIL－cDNA) was amplified from a hIL－4 cDNA－positive plasmid .PCD－hIL－4 by PCR. Sequence analysis showed no mutation occured and the open reading frame was included in the fragment. Human hIL－4 cDNA was inserted into polylinker site of retroviral vector, LXSN to construct recombinant retroviral vector LXSN／hIL－4, in which the transcription of hIL－4 cDNA drived by 5′LTR promoter. The recombinant retrovirus was pakaged in PA317 cell line and used to infect human HL－60, k 562 and Raji cell line in presence of 4μg/ml polybrene. retrotranscriptimal PCR analysis showed hIL－4 cDNA was trancripted in modified tumor cells and the maxmium of IL－4 level secreted by modified tumor cells obtained 300pg/10^6cell－24h.The results suggested that hIL－4 cDNA could be expressed efficiently under the control of vector′s promoter.

KEY WORDS Interleukin－4; Gene transfer; Gene expression

膀胱肿瘤，移行细胞癌，nm23－H1基因 基因表达

4－8

nm23－H_1、C－erbB$_2$蛋白质在膀胱移行细胞癌中的表达*

癌基因，抑癌基因 ②

R737.1402

成都市第一人民医院 秦 方**
基础医学院病理生理教研室 段积华

提 要 采用免疫组织化学S－P法，对61例膀胱移行细胞癌中的肿瘤转移抑制基因nm23－H_1、癌基因C－erbB$_2$蛋白质表达情况进行观察，发现nm23－H_1蛋白阳性率与肿瘤级别及肌层侵袭之间具有良好的负相关($P<0.05$)。C－erbB$_2$蛋白阳性率与肿瘤级别及肌层侵袭之间具有良好的正相关($P<0.05$)。nm23－H_1的阴性表达以及C－erbB$_2$阳性表达与预后不良有关。

关键词 免疫组织化学S－P法；肿瘤转移抑制基因；nm23－H_1；癌基因；C－erbB$_2$；膀胱移行细胞癌
中图分类号 R737.14

自1988年发现nm23基因以来，大量实验证实nm23基因与人类肿瘤转移浸润有关。在乳腺癌[1]、肝癌[2]、结肠癌[3]、胃癌[4]、进展期卵巢癌[5]均发现了肿瘤远处转移或预后不良与nm23低表达有关。

本研究对膀胱移行细胞癌(Transitional Cell Carcinoma,TCC)中nm23－H_1蛋白质以及癌基因C－erbB$_2$蛋白的表达进行观察，探讨其与膀胱TCC恶性程度及预后之间的关系。

1 材料和方法

1.1 组织来源 重庆医科大学附一院1994－1996年间手术切除的膀胱TCC标本，均经HE染色确证为膀胱TCC，选

* 四川省卫生厅重点科研课题
** 女，1968－06出生，住院医师，硕士研究生