DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.005
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2188 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)24-2188-03

小鼠MIP-3α基因在Lewis肺癌中的放射诱导表达

邹 岚[1],朱 波[2],陈 敬[2],杜剑平[2],陈正堂[2] (第三军医大学:[1]西南医院肿瘤科,重庆 400038,[2]新桥医院全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037)

提 要:目的 构建pEgr-1-MIP-3α(pEM)质粒,探讨辐射对被转染的Lewis肺癌细胞中MIP-3α表达的影响。方法 用定向克隆方法,构建pEM重组表达质粒,脂质体介导转染Lewis肺癌细胞,用RT-PCR和ELISA方法检测不同剂量电子线照射后的MIP-3α表达水平。结果 本实验构建的重组质粒pEM中MIP-3α cDNA正确插入表达载体;各照射组在不同剂量电子线照射后,MIP-3α表达均高于未转染组和假照射组。结论 Egr-1启动子具有辐射启动和诱导下游MIP-3α基因在Lewis肺癌中增强表达的功能,为pEM用于放射—基因治疗的体内研究,提供了实验基础。

关键词:巨噬细胞炎症蛋白-3α;早期生长反应-1启动子;树突状细胞;放射基因治疗
中图法分类号:R394-33;R73-354;R730.55 文献标识码:A

Expression of MIP-3α gene regulated by irradiation *via* Egr-1 promotor in Lewis lung cancer

ZOU Lan[1], ZHU Bo[2], CHEN Jing[2], DU Jian-ping[2], CHEN Zheng-tang[2] ([1]Department of Oncology, Southwest Hospital, [2]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct the expression vector of early growth response-1 promoter-macrophage inflammatory protein 3α (pEgr-1-MIP-3α, pEM) to study MIP-3α expression in transfected Lewis lung cancer cells. **Methods** MIP-3α cDNA was inserted into plasmid with Egr-1 promoter by directional cloning. The vectors were transfected into Lewis lung cancer cells with liposomes. The expression of MIP-3α in transfected Lewis lung cancer cells induced by electron ray irradiation at different doses were confirmed by RT-PCR and Western blotting. **Results** The recombinant vector was sequenced, and the result indicated the correct insertion in the expression vector. After electron ray irradiation at different doses, MIP-3α expression in the transfected Lewis lung cancer cells increased significantly. **Conclusion** Electron ray can enhance the expression of MIP-3α in Lewis lung cancer cells. This has laid the experimental foundation for the studies of pEM for radio-genetic therapy *in vivo*.

Key words: macrophage inflammatory protein 3α; early growth response-1 promoter; dendritc cell; radio-genetic therapy

放射-基因治疗(radio-genetic therapy)是近年来提出的肿瘤治疗的新思路[1]。其原理是利用辐射诱导性基因如早期生长反应1(early growth response, Egr-1)基因启动子诱导下游目的基因表达的分子机制[2],将Egr-1基因启动子与目的基因连接起来,有效地调控目的基因在肿瘤局部表达,通过射线与基因的双重作用杀伤肿瘤,提高放疗疗效,减轻副作用,以达到更好地抑制肿瘤的生长和转移的目的。目的基因的选择是提高放疗基因治疗疗效的重要因素之一。由于近年来研究显示电离辐射可诱发树突状细胞(dendritc cell, DC)介导的抗原特异的免疫反应,本研究设想将Egr-1启动的DC趋化因子——巨噬细胞炎症蛋白-3α(MIP-3α)的表达载体导入Lewis肺癌细胞,通过电子线辐射诱导,使肿瘤细胞中MIP-3α表达增强,以期达到有效趋化DC产生抗肿瘤治疗效应,对放射—基因治疗进行一种新的尝试。

1 材料与方法

1.1 重组质粒的构建及鉴定

pEO(6114 bp)质粒系用PCI-noe(Promega)构建的含有600 bp人Egr-1启动子序列(切去CMV启动子)和抑瘤素M(oncostatin

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300150)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300150)
作者简介:邹 岚(1969—),女,湖南省南县人,博士,主治医师,主要从事肿瘤化疗和生物治疗方面的研究,电话:(023)66733743,E-mail:danny-0808@hotmail.com
通信作者:陈正堂,电话:(023)68755626,E-mail:czt56@sohu.com
收稿日期:2004-03-19;修回日期:2004-11-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

M, OSM)基因的重组质粒, 由第三军医大学新桥医院诊治中心王卫东博士惠赠。pmLARC 质粒(5 804 bp)为基于 pCI-neo 质粒构建的含有 332 bp 小鼠 MIP-3α 基因序列质粒, 西班牙马德里 Autonoma 大学 Zaballos A 博士惠赠。用 *Nhe* Ⅰ + *Eco*R Ⅰ (MBI)分别双酶切上述两个质粒, 电泳鉴定, 0.6%琼脂糖凝胶分别回收线性化载体和 MIP-3α 基因片段, 用 T4 DNA 连接酶(MBI)将 MIP-3α 片段与线性化载体相连接, 得到重组子 pEgr-1-MIP-3α-OMS, 记为 pEMO。再以 *Eco*R Ⅰ + *Xba* Ⅰ 双酶切, 切去 OSM 基因, 胶回收载体, 用 Klenow(MBI)补平末端, T4 DNA 连接酶使载体自连, 得到 pEgr-1-MIP-3α-neo 重组质粒, 记为 pEM 质粒。用 *Nhe* Ⅰ + *Eco*RⅠ 双酶切鉴定重组质粒中的 MIP-3α 序列。测序由上海 Seagon 完成, 测序结果用 DNAstar 软件与已知序列进行比对。重组质粒在 JM109 工程菌中扩增。

1.2　重组质粒的转染

Lewis 肺癌细胞(LLC, 四川大学华西医学中心肿瘤研究所), 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基(Hyclone), 5% CO_2, 37 ℃培养。以每个培养皿细胞数 6×10^5 接种直径 60 mm 培养皿, 待生长至 80%融合时开始转染: 每个培养皿取 DOTAP 脂质体(Roche) 30 μl (1 μg/μl), 加入 HBS(HEPES-buffered saline, 20 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4)中定容至 100 μl, 另取 5 μg 质粒加入 HBS 中定容至 50 μl, 两液体混匀, 室温放置 15 min。用无血清 1640 洗细胞 2 次, 将质粒/DOTAP 混合液与 5 ml 无血清 1640 混匀, 轻轻覆盖细胞表面, 5% CO_2, 37 ℃继续培养, 8 h 后更换无血清的 1640 培养液继续培养。转染 48 h 后加 G418 600 mg/ml 筛选 15 代。筛选出的阳性细胞为 LLC/pEM。

1.3　照射条件

将 LLC/pEM 分组接受 6 Mev 电子线(美国 Varian 2300 C/D 型直线加速器, 剂量率 5 Gy/min 2、4、6、8 和 10 Gy 和假照射(0 Gy)[1]。照前更换无血清培养基, 照后继续培养 24 h 收集培养上清及细胞。

1.4　RT-PCR 检测 LLC 细胞 MIP-3α mRNA 表达

收集培养液, 用 PBS 冲洗细胞 2 次, 每培养皿加 1 ml Tripure 液(Roche), 将细胞刮下, 收集至离心管中, 按 Tripure 说明书提取细胞 RNA。RT: 按 AMV 逆转录酶(Promega)说明书步骤合成 cDNA; PCR: MIP-3α 上游引物: 5′-TGCTCTAGAATGGCCTGCGGTGGCAAGCGTC-3′, 下游引物: 5′-CATGCCATGGTTATTACATCTTCTTGACTCTTA-3′; 内参照β-actin(产物为 462 bp)上游引物: 5′-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3′, 下游引物: 5′-GGTCTTACGGATGTCAAGG-3′(上海 Seagon 合成)。反应条件: 50 μl 体系中, 含 cDNA 5 μl, dNTP 10 mmol(上海 Seagon), *Taq* 3U(Promega), 10× Buffer 5 μl(含 15 mmol/L $MgCl_2$, Promega), 上下游引物各 20 pmol。95 ℃ 5 min 变性; 94 ℃ 30 s→55 ℃ 30 s→72 ℃ 30 s, 共 35 个循环; 72 ℃延伸 10 min。用 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.5　ELISA 检测培养液中分泌型 MIP-3α 蛋白表达量

用间接法 ELISA 检测, 方法见文献[3]。以包被液(碳酸盐缓冲液 pH 9.6)为阴性对照, 细胞培养上清 1∶2 稀释包被酶标检测板 4 ℃过夜, 一抗为 1∶1 000 稀释大鼠抗小鼠 MIP-3α 单克隆抗体(B&D), 二抗 1∶10 000 稀释 HRP 标记羊抗大鼠 IgG(北京中山, 进口分装)。用 Bio-Rad 公司 550 型酶联检测仪读取 450 nm 波长下 *A* 值; 每个样品设复孔取平均数。

2　结果

2.1　重组质粒的构建及鉴定

pEM 重组质粒构建过程见图 1。pEM 质粒的酶切鉴定见图 2。重组质粒用 *Nhe* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切, 得到 300 bp 左右的特异片段, 与 PCR 扩增的片段相同。测序结果经 DNAstar 比对, 与已知序列一致, 说明 pEM 重组质粒构建正确。

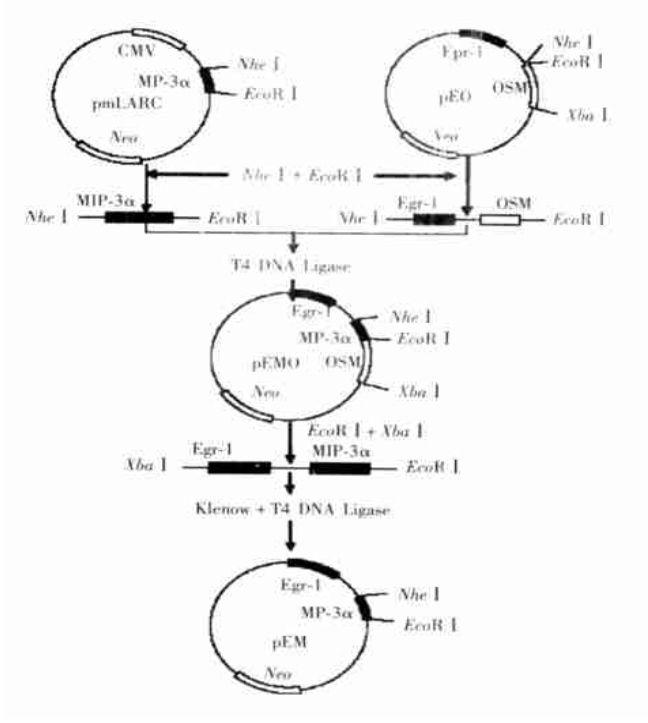


图 1　pEM 质粒的构建

Fig 1　Construction of pEM plasmid



1: Plasmid; 2: *Nhe* Ⅰ; 3: *Eco*RⅠ cut; 4: *Nhe* Ⅰ + *Eco*RⅠ; 5: PCR product of MIP-3α; 6: DGL2000 marker

图 2　pEM 质粒的酶切鉴定

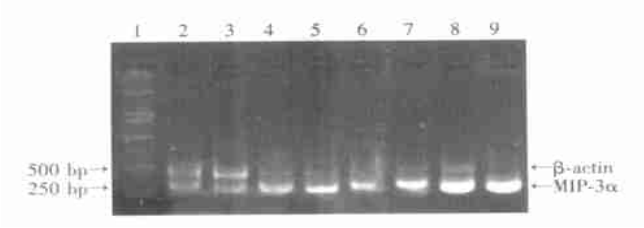
Fig 2　Identification of pEgr-MIP-3α

2.2　不同剂量电子线照射的 LLC/pEM MIP-3α mRNA 表达

用 RT-PCR 方法检测 LLC/pEM 细胞中 MIP-3α 转录水平, 如图 3 所示, 经 2~10 Gy 电子线照射后, 各照射组 MIP-3α mRNA

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表达量均高于未转染组及 0 Gy 组。说明辐射能诱导重组质粒转染后的 Lewis 肺癌细胞的 MIP-3α 转录明显增加。



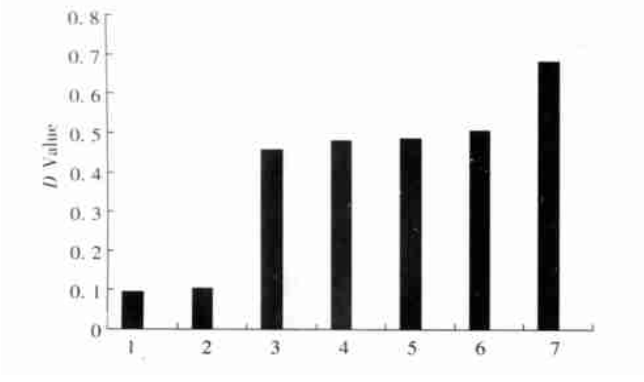
1: DGL2000 marker; 2: LLC; 3: LLC/pEM (0 Gy); 4: LLC/pEM (2 Gy); 5: LLC/pEM (4 Gy); 6: LLC/pEM (6 Gy); 7: LLC/pEM (8 Gy); 8: LLC/pEM (10 Gy); 9: pEM plasmid PCR

图 3 RT-PCR 检测转染后 Lewis 肺癌细胞 MIP-3α 的 mRNA 表达

Fig 3 Expression of MIP-3α mRNA in transfected LLC by RT-PCR

2.3 不同剂量电子线照射下 LLC/pEM 细胞培养上清中 MIP-3α 水平的变化

ELISA 检测 LLC/pEM 细胞培养上清中 MIP-3α 蛋白表达水平，如图 4 所示，经 2～10 Gy 电子线照射后，各照射组细胞培养上清中 MIP-3α 水平均高于未转染组及 0 Gy 照射组。说明辐射能诱导重组质粒转染后的 Lewis 肺癌细胞的分泌 MIP-3α 蛋白明显增高。



1: LLC; 2: LLC/pEM (0 Gy); 3: LLC/pEM (2 Gy); 4: LLC/pEM (4 Gy); 5: LLC/pEM (6 Gy); 6: LLC/pEM (8 Gy); 7: LLC/pEM (10 Gy)

图 4 LLC/pEM 细胞培养上清中 MIP-3α 水平

Fig 4 Levels of MIP-3α in the supernatant of LLC/pEM

3 讨论

放射治疗一直是恶性肿瘤的主要治疗方法之一，但是多年来无论治疗的条件如何优化，其疗效始终难有突破性的提高。Weichselbaum 等[4] 于 1994 年首先将基因治疗与放射治疗有机地结合起来，提出放射－基因治疗的思路，他们将 Egr-1 启动子与 TNFα 基因连接，转入肿瘤细胞，接受电离辐射作用，由于启动了 Egr-1 而启动下游基因的表达，不仅提高放疗疗效，而且减少了放疗和细胞因子全身治疗的副作用。但是由于尚处于起步阶段，放射－基因治疗还存在一些明显的不足，比如目前用于放射－基因治疗的目的基因多为对肿瘤有杀伤作用的基因（如 TNFα 基因、OSM 基因等[5]），由于在常规放疗剂量刺激下，Egr-1 启动子诱导的治疗基因表达水平低且持续短暂，使得治疗基因表达还不能满足在体内治疗肿瘤的需要，直接影响了疗效。因此，目的基因的选择对于放射－基因治疗的疗效至关重要。

近年来研究表明电离辐射具有启动 DC 介导的抗原特异的免疫反应的能力[6]。放射－基因治疗研究的进展，为放射治疗和免疫治疗的结合提供了更好的方法。MIP-3α 是一种 DC 趋化因子，对 DC 在体内的直接迁移起重要作用。国外有研究者用腺病毒携带 MIP-3α 基因的小鼠黑色素瘤进行基因治疗，结果抑制了肿瘤的生长和转移[7]。因此我们设想，可在 Egr-1 下游引入 MIP-3α 基因，以期在对肿瘤放疗的同时诱导 MIP-3α 表达，增强对 DC 的趋化作用，激发和增强 DC 介导的抗肿瘤免疫应答，从而可能达到双重杀伤肿瘤的疗效。基于以上设想，本研究首先构建了以 Egr-1 为启动子的 MIP-3α 基因的真核表达载体 pEM，用其转染 Lewis 肺癌细胞，从 mRNA 水平和蛋白质水平证实，不同剂量的电子线照射均可有效诱导 MIP-3α 基因在 Lewis 肺癌细胞内的表达。结果提示，本实验所构建的重组质粒具有在常规的放射剂量（2～10 Gy）放射下诱导 MIP-3α 在肿瘤细胞中表达增强的功能，为进一步的 pEM 用于放射－基因的体内研究，提供了实验基础。

参考文献：

[1] Kufe D, Weichselbaum R. Radiation therapy: activation for gene transcription and the development of genetic radiotherapy-therapeutic strategies in oncology[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2(4): 326－329.

[2] Meyer R G, Kupper J H, Kandolf R, *et al*. Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells *in vitro*[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(1): 337－346.

[3] 李永明，赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京：科学出版社，1998. 360－362.

[4] Weichselbaum R R, Hallahan D E, Beckett M A, *et al*. Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitized tumor cells[J]. Cancer Res, 1994, 54(16): 4266－4269.

[5] 吕 星，邢瑞云，路 萍，等. OSM 对黑色素瘤的抑制作用与基因-放射治疗效果[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2001, 8(1): 27－30.

[6] Friedman E J. Immune modulation by ionizing radiation and its implications for cancer immunotherapy[J]. Curr Pharm Des, 2002, 8(19): 1765－1780.

[7] Fushimi T, Kojima A, Moore M A, *et al*. Macrophage inflammatory protein 3α transgene attracts dendritic cells to established murine tumors and suppresses tumor growth[J]. J Clin Invest, 2002, 105(10): 1383－1393.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net