DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.031
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0073-03

论著

大鼠γ-干扰素基因转染大鼠肺泡巨噬细胞和气道上皮细胞的实验研究

黄桂君[1],农 江[2],马 壮[1],钱桂生[1],李淑萍[1],陈维中[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037;[2]解放军第303医院病理科,南宁 530021)

提 要:目的 构建重组大鼠γ-干扰素真核表达载体,探讨其转染大鼠肺泡巨噬细胞(AM)和气道上皮细胞的可行性及表达水平。方法 采用RT-PCR技术克隆了大鼠γ-干扰素,并将其定向克隆到逆转录病毒载体pLXSN上,构成真核表达重组载体。将重组载体转染培养的AM和气道上皮细胞。用PCR法鉴定重组载体整合在细胞基因组DNA中。并检测细胞培养上清中γ-干扰素浓度和活性。结果 DNA测序证明,构建的重组载体中γ-干扰素的基因方向正确,DNA序列与Gene Bank中大鼠的γ-干扰素cDNA序列相同。转染后AM和气道上皮细胞基因组DNA的PCR产物电泳可见转染的重组载体DNA片段条带。pLXSN-IFN载体组的AM和气道上皮细胞培养上清中大鼠γ-干扰素浓度和活性显著高于pLXSN空载体组($P<0.01$)。结论 本研究构建的大鼠γ-干扰素重组表达载体可成功地转染大鼠AM和气道上皮细胞,整合入基因组DNA,并分泌有活性的γ-干扰素,为进一步的体内基因转染研究奠定基础。

关键词:γ-干扰素;基因转染;肺泡巨噬细胞;气道上皮细胞
中图法分类号:R322.35;R394-33;R394.2 文献标识码:A

Transfection of recombined rat IFN-γ into rat alveolar macrophage and airway epithelial cells *in vitro*

HUANG Gui-jun, LONG Jiang, MA Zhuang, QIAN Gui-sheng, LI Shu-ping, CHEN Wei-zhong (Institute of Respiratory Diseases, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To recombine IFN-γ expression vector and study its expression in alveolar macrophage (AM) and airway epithelial cells of Wistar rats after transfection *in vitro*. Methods IFN-γ gene was cloned from Wistar rats with RT-PCR, and then inserted into pLXSN vector with DNA sequencing. The vector was transfected into AM and airway epithelial cells in cell culture by using cationic liposomes. The integration of pLXSN-IFN and pLXSN with the genomic DNA of the transfected cells was detected with PCR. And the expression level and activity of IFN-γ in the supernatant were investigated with ELISA and L929 cytopathogenicity inhibition assay. Results DNA sequencing proved that the sequence of the cloned IFN-γ gene was identical to its counterpart in GenBank and the recombinant pLXSN-IFN expression vector was successfully constructed. A PCR product of 620 bp in the cells with pLXSN-IFN transfection and one of 140 bp in pLXSN-transfected cells were demonstrated in agrose gel with eletrophoresis. The levels and activity of IFN-γ in the culture supernatant after pLXSN-IFN transfection were markedly higher than those of the cells transfected with pLXSN ($P<0.01$). Conclusion The recombinant IFN-γ gene expression vector is successfully transfected into AM and airway epithelial cells *in vitro*. It can integrate with the genomic DNA of the cells, and express active IFN-γ, which is useful for further investigation *in vivo*.

Key words: IFN-γ; gene transfection; alveolar macrophage; airway epithelial cells

细胞因子是调节机体细胞免疫的重要物质。已有实验证实机体局部补充γ-干扰素可调节免疫低下宿主肺部细胞免疫功能,从而明显增强其抵抗感染的能力[1]。在分子遗传学等基础学科快速发展的今天,研究肺部基因转染的方法补充细胞因子,以弥补局部补充(如雾化吸入)γ-干扰素的不足,具有重要的应用前景。本研究旨在构建重组大鼠γ-干扰素真核表达载体,并进行体外基因转染实验,为进一步的体内研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂和仪器

逆转录病毒真核表达载体pLXSN和大肠杆菌XL_1-blue为我所保存。雄性Wistar大鼠(150~180 g)购自本校实验动物中心。Tripure分离液和Hepes购自BOEHRINGER MANNHEM公司。Lipofectin、LipofectAMINE、DMEM、Opti-MEM、蛋白酶14、上皮生长因子、转铁蛋白、霍乱毒素、胰岛素购于Gibico公司。氢化考的松、磷酸乙醇胺、乙醇胺购于Sigma公司。F12购于Hyclone公司。大鼠γ-干扰素ELISA检测试剂盒购于DIACLONE公司。PCR产物纯化试剂盒购自Promega公司。EcoRI(10 u/μl)、BamHI(10 u/μl)、T4 DNA连接酶(5 u/μl)购自MBI公司。Lambda Bio-20紫外分光光度仪为美国PE公司、PTC-200 DNA扩增仪为美国MJ公司、Gene-pluser电穿孔仪为美国Bio-Rad公司、SX-100凝胶成像分析系统为上海四星公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 重组大鼠γ-干扰素真核表达载体的构建 目的基因片段从大鼠肺组织经RT-PCR方法扩增获得。带有*EcoR*Ⅰ、*BamH*Ⅰ酶切位点和保护碱基序列的γ-干扰素(506bp)引物序列为Forward 5′ CGGAATTCATCCATGAGTGCTACACGC 3′;Reverse 5′ TAGGATCCCTCTCTACCCCAGAATCAG 3′。反应条件为95 ℃ 3 min,冰浴。94 ℃ 45 min,57 ℃ 50 s,72 ℃ 90 s,35循环,72 ℃ 10 min。RT-PCR产物经PCR产物纯化试剂盒纯化后,采用双酶切

基金项目:全军"十五"攻关课题面上项目(01MB001)
作者简介:黄桂君(1964—),男,广西省南宁市人,博士,副研究员,主要从事疾病基因克隆和基因治疗方面的研究,发表文章20余篇。(023)68755644
收稿日期:2001-06-07;修回日期:2001-09-04

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

定向克隆的方法进行 pLXSN-IFN 真核表达载体的构建[2]。用电穿孔转化方法[3]将 pLXSN-IFN 真核表达载体导入大肠杆菌 XL_1-blue，扩增和提取重组质粒[4]后用四色荧光法测序鉴定。

1.2.2 大鼠肺泡巨噬细胞的获取及培养 将正常大鼠用戊巴比妥钠麻醉，分离气管，并插入气管插管、固定套管。用支气管肺泡灌洗获取肺泡巨噬细胞(AM)，5% CO_2、37 ℃条件下贴壁 2 h。弃上清，回收贴壁的 AM，台盼蓝染色蓝染的 AM< 5%可使用。用含10%小牛血清的 DMEM/F12 培养基将 AM 浓度调整为 1×10^6/ml，以每只大鼠 AM 配对加入 35 mm 聚苯乙烯培养皿中，每个培养皿中加入 1×10^6 个 AM，5% CO_2、37 ℃条件下过夜培养。

1.2.3 大鼠气道上皮细胞的获取及培养 将正常大鼠用戊巴比妥钠麻醉，分离气管，置 1%蛋白酶 14 的 F12 培养基中4 ℃消化 24 h。用含 20%小牛血清并含 10 μg/ml 胰岛素、0.1 μg/ml 氢化考的松、0.1 μg/ml 霍乱毒素、5 μg/ml 转铁蛋白、50 μmol/L 磷酸乙醇胺、80 μmol/L 乙醇胺、25 ng/ml 上皮生长因子、50 U/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素 的 DMEM/F12 培养基冲刷气管内壁，将气道上皮细胞冲洗下来，并浓度调整为 5×10^5/ml，以每只大鼠气道上皮细胞配对加入二个 35 mm 聚苯乙烯培养皿中，每个培养皿中加入 5×10^5 个气道上皮细胞，5% CO_2、37 ℃条件下培养。待气道上皮细胞融合，覆盖 70%培养皿时进行基因转染[5]。

1.2.4 基因转染 将培养皿中上清弃掉，并用 Opti-MEM 洗涤1次，吸尽洗液。每个 AM 的培养皿中加入 Lipofectin 20 μg，质粒 DNA 6 μg(分 pLXSN-IFN 组和 pLXSN 组)，每个气道上皮细胞培养皿中加入 LipofectAMINE 40 μg，质粒 DNA 8 μg(分 pLXSN-IFN 组和 pLXSN 组)，5% CO_2、37 ℃条件下反应 5 h。吸尽转染液，用 Opti-MEM 洗涤 1 次，吸尽洗液。AM 的培养皿中加入含 20%小牛血清的 DMEM/F12 培养基 2 ml，气道上皮细胞培养皿中加入含 20%小牛血清并含上述辅助成分的 DMEM/F12 培养基 2 ml，5% CO_2、37 ℃条件下继续培养 48 h[6,7]。

1.2.5 外源基因转染、整合的鉴定 ①提取细胞基因组 DNA：向吸尽培养液的培养皿中加入 1 ml Tripure 液，4 ℃10 min，并用吸管吹吸，裂解细胞。加入0.2 ml 氯仿，震荡 15 s，置室温 15 min。4 ℃、12 000× g 离心 15 min，吸弃水相。加 0.3 ml 无水乙醇，充分混匀，置室温 2～3 min，4 ℃、2 000× g 离心 5 min，弃上清。加 1 ml 用10%乙醇配制的 0.1 mol/L 柠檬酸钠，充分混匀，置室温 30 min，4 ℃、2 000× g 离心 5 min，弃上清；重复 2 次。加入 1 ml 75%乙醇，置室温 10～20 min，4 ℃、2 000× g 离心 5 min，弃上清。用 10 μl 8 mmol/L NaOH 重悬，4 ℃、12 000× g 离心 10 min，将上清移入新的无菌 EP 管中。加入0.1 mol/L的 Hepes 0.66 μl。紫外测定核酸含量。②取1 μg 基因组DNA，进行PCR。上游引物：5′-CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC-3′；下游引物：5′-GAGC-CTGGGGACTTTCCACACCC-3′；该上游引物在 pLXSN 的第 1 572～1 594 位点，下游引物在 pLXSN 的第 1 711～1 689 位点。预期扩增长度为 620 bp。反应条件：95 ℃ 45 min，67 ℃ 55 s，72 ℃ 90 s，35 循环，72 ℃ 10 min。取 RT-PCR 产物 10 μl，2%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.6 AM 和气道上皮细胞培养上清大鼠 γ-干扰素含量和活性的测定 培养上清大鼠 γ-干扰素含量测定采用 ELISA 法，按试剂盒说明书进行。培养上清大鼠 γ-干扰素活性测定采用 L929 细胞病变抑制试验[8]。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 EXCEL 软件，配对 t 检验处理各组数据。

2 结果

2.1 构建重组载体的测序鉴定

IFN-γDNA 测序结果经核对与 Gene Bank 中大鼠 IFN-γ 的 cDNA 序列完全相同；而且正向插入 pLXSN 逆转录病毒载体。

2.2 转染、整合的鉴定

肺泡巨噬细胞基因组 DNA 的 PCR 产物电泳结果见图 1。气道上皮细胞基因组 DNA 的 PCR 产物电泳结果见图 2。转染 pLXSN-IFN 载体组可见 620bp 的条带；转染 pLXSN 空载体组可见 140 bp 的条带。

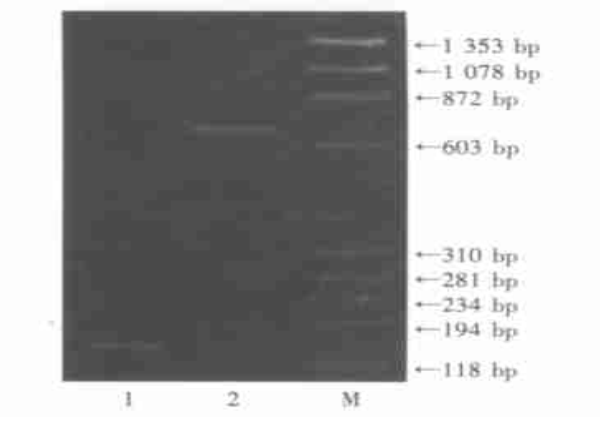


图 1 肺泡巨噬细胞基因组 DNA 的 PCR 产物电泳图

1：pLXSN 组；2：pLXSN-IFN 载体组；M：DNA Ladder

Fig 1 PCR product of genomic DNA of AM

1：pLXSN；2：pLXSN—IFN；M：DNA ladder

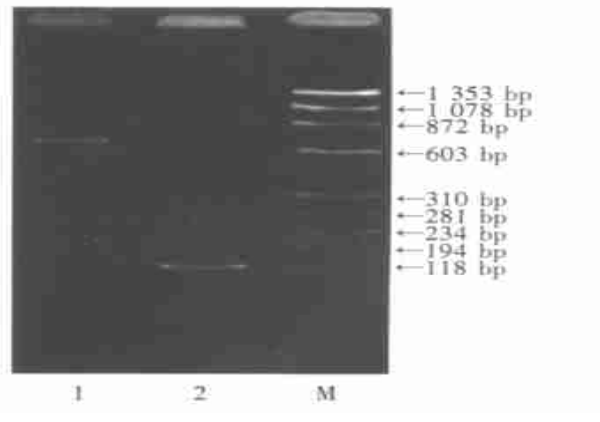


图 2 气道上皮细胞基因组 DNA 的 PCR 产物电泳结果图

1：pLXSN-IFN 组；2：pLXSN 组；M：DNA Ladder

Fig 2 PCR product of genomic DNA of airway epithelial cells

1：pLXSN；2：pLXSN-IFN；M：DNA ladder

2.3 AM 培养上清大鼠 γ-干扰素含量和活性的比较

转染 pLXSN-IFN 载体组和转染 pLXSN 空载体组 AM 培养上清大鼠γ-干扰素含量和活性见表 1。pLXSN-IFN 载体组 AM 培养上清大鼠γ-干扰素含量和活性显著高于 pLXSN 空载体组。

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

2.4　气道上皮细胞培养上清大鼠 γ-干扰素含量和活性的比较

转染 pLXSN-IFN 载体组和转染 pLXSN 空载体组 AM 培养上清大鼠γ-干扰素含量和活性见表 2。pLXSN-IFN 载体组 AM 培养上清大鼠γ-干扰素含量和活性显著高于 pLXSN 空载体组。

表 1　AM 培养上清 IFN-γ 浓度和活性

Tab 1　Tab 1 Levels and activity of IFN-γ in the AM supernatant after pLXSN-IFN or pLXSN transfection

Group	IFN-γ concentration(pg/ml)	IFN-γ activity(u/ml)
pLXSN	114.3±18.15	2 707±471.3
pLXSN-IFN	168.2±24.57 *	4 911±905.0 *

*: $P<0.01$ pLXSN-IFN *vs* pLXSN

表 2　气道上皮细胞培养上清 IFN-γ 浓度和活性

Tab 2　Levels and activity of IFN-γ in the supernatant of airway epithelial cells after pLXSN-IFN or pLXSN transfection

Group	IFN-γ concentration(pg/ml)	IFN-γ activity(u/ml)
pLXSN	244.7±38.70	5 736±882.3
pLXSN-IFN	370.9±46.20 *	8 248±988.3 *

*: $P<0.01$ pLXSN-IFN *vs* pLXSN

3　讨论

雾化吸入 γ-干扰素是预防和辅助治疗免疫低下宿主肺部感染的较好方法。但是雾化吸入 γ-干扰素也有不足之处, 例如每日多次吸入给药、长期用药易产生抗体等。因此, 构建重组 IFN-γ 真核表达载体, 进行基因治疗的研究具有重要的实用价值。

本研究中, 我们采用双酶切定向克隆技术构建重组大鼠γ-干扰素真核表达载体。虽然在酶切、连接步骤较单酶切非定向克隆麻烦, 但此方法免去了构建载体过程中插入片段的正反向筛选这一非常烦琐的步骤, 因此在实际工作中定向克隆更易被人们接受, 是目前重组载体构建常用的一种方法。研究中, 我们将构建的重组载体转导入大肠杆菌。经过氨苄青霉素筛选, 获得带有重组 pLXSN-IFN 真核表达载体的菌株。经测序分析, 证实目的基因片段插入正确, 基因序列与 Gene Bank 中大鼠 γ-干扰素的序列完全相同。说明 Wistar 大鼠重组 pLXSN-IFN 真核表达载体构建成功。

肺泡巨噬细胞是肺部防御的首要细胞, 是肺部免疫细胞的第一道防线, 占正常动物支气管肺泡灌洗液中细胞的 90%以上。肺泡巨噬细胞可单独担负起清除小量病原体(1×10^5)的入侵, 当入侵病原体在 1×10^6以上时, 中性粒细胞才加入免疫过程[9]。气道上皮细胞和肺泡Ⅰ型上皮细胞是呼吸道和肺泡气相面分布最广的细胞。如对该细胞的转染成功, 可使免疫低下宿主的整体气道和肺泡表面衬液中 γ-干扰素的含量和活性显著增加, 有利于改善免疫低下宿主呼吸系统的抗感染能力。因此我们首选对这二种细胞进行基因转染的研究。研究中我们采用前述构建的 pLXSN-IFN, 以阳离子脂质体为转染载体。结果表明转染 48 h 后, pLXSN-IFN 组和 pLXSN 组的 AM 和气道上皮细胞均检测到各自质粒的 DNA 片段, 分别为 620 bp 和 140 bp, 前者含插入基因片段。说明转染成功, 而且转染的质粒整合入基因组 DNA。AM 和气道上皮细胞培养上清的检测结果显示 pLXSN-IFN 组 IFN-γ 的浓度和活性均高于 pLXSN 组, 说明 pLXSN-IFN 不仅在被转染的 AM 和气道上皮细胞中表达, 而且被转染的 AM 和气道上皮细胞可以分泌有活性的 IFN-γ。可见用阳离子脂质体将我们构建的 pLXSN-IFN 质粒转染 AM 和气道上皮细胞是可行的。这为实现以基因转染的方法在肺局部稳定表达和产生活性 IFN-γ 的治疗思路奠定了基础。

参考文献:

[1] 马　壮, 钱桂生, 黄桂君, 等. 雾化吸入γ-干扰素增强免疫低下大鼠肺部抗白色念珠菌感染能力[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(3): 292－293.

[2] 金冬雁, 黎孟枫, 等, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 1－74.

[3] 颜子颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 23－24.

[4] 姜　泊, 张亚历, 周殿元, 主编. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 1－14.

[5] Hatsui H, Johnson L G, Randell S H, *et al*. Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells[J]. J Biol Chem, 1997, 272(2): 1 117－1 126.

[6] 李永明, 赵玉琪 主编. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 89－91.

[7] Jiang C, O'Connor S P, Fang S L, *et al*. Efficiency of cationic lipid-mediated transfection of polarized and differentiated airway epithelial cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Human Gene Ther, 1997, 8(9): 1 087－1 093.

[8] 曹雪涛, 章卫平, 顾　申, 等. 成纤维细胞介导的白介素 6 基因疗法增强机体免疫功能的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 1994, 10(1): 8－12.

[9] Lohmann-Matthes M L, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary Macrophages[J]. Eur Respir J, 1994, 7: 1 678－1 689.

（编辑　王　红）

《第三军医大学学报》电子版网址: http://dsjydxxb.periodicals.com.cn
《第三军医大学学报》电 子 信 箱: aammt@mail.tmmu.com.cn

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