DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.035

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0948-03

外源性 IL-3 cDNA 导入骨髓基质细胞及对造血的调控作用

袁良平[1],粟永萍[1],程天民[1],刘 林[1],郑华金[2],王延江[1],蒲晓允[3],艾国平[1],刘晓红[1],瞿红云[2],李 青[2] (第三军医大学:[1]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所;[3]医学检验系临床检验学教研室;重庆 400038;[2]成都军区成都总医院血液内科,成都 610083)

提 要:目的 探索将外源性 IL-3 cDNA 导入骨髓基质细胞的可能性。**方法** 将小鼠 IL-3 cDNA 克隆到逆转录病毒载体(pLXSN)上,然后将重组的 IL-3 cDNA 用脂质体转染到包装细胞 PA317 上,G418 筛选后得到抗性克隆,将含病毒的上清液转染骨髓基质细胞。用自行设计的引物,检测 pLXSN 上的 NeoR 基因及转入的 IL-3 基因。同时观察了转染 pLXSN/IL-3 的基质细胞培养上清液对小鼠骨髓 CFU-GM 形成的影响,并测定其对造血因子依赖株 NFS-60 细胞增殖活性的影响。**结果** 将含重组子 pLXSN-IL-3 和空载体 pLXSN 的病毒培养上清感染 BMS,前者用 PCR 扩增出 500 bp 和 170 bp(NeoR)的条带,后者仅扩增出 170 bp。转染 pLXSN/IL-3 的基质细胞上清液有促进小鼠骨髓 CFU-GM 增殖的作用,与空载体组及未转染组比较,有非常显著性差异($P<0.01$)。**结论** 外源性的 IL-3基因及 pLXSN 上的 NeoR 已整合到骨髓基质细胞基因组 DNA 中,并促进造血细胞增殖。

关键词: 白细胞介素-3;基质细胞;聚合酶链反应
中图法分类号: R329.28;R331.22;R392.13 **文献标识码:** A

Bone marrow stromal cells transferred by exogenous IL-3 cDNA and its regulatory effect on hematopoiesis in mice

YUAN Liang-ping, SU Yong-ping, CHENG Tian-min, LIU Lin, ZHENG Hua-jin, WANG Yan-jiang, PU Xiao-yun, AI Guo-ping, Liu Xiao-hong, QU Hong-yun, LI Qing (Department of Radiation Medicine, Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of transferring exogenous IL-3 cDNA into bone marrow stromal cells (BMS). **Methods** Mouse IL-3 cDNA was cloned to retrovirus vector pLXSN and then the recombinant IL-3 cDNA was transfected on PA317 cells with lipofectin. The cells was selected with G418 after BMS was transfected by the supernatant containing virus. NeoR gene of pLXSN and transferred IL-3 gene in BMS were identified with PCR. CFU-GM of murine BMS culture medium and proliferative activity of hematopoietic factor-dependent cell line NFS-60 were observed in the supernatant of BMS with pLXSN/IL-3. **Results** IL-3 gene and NeoR gene of pLXSN were demonstrated in BMS transfected by the supernatant that containing pLXSN/IL-3, but only NeoR gene was seen in BMS containing pLXSN. The supernatant of BMS with pLXSN/IL-3 showed significant effects on the proliferation of CFU-GM in murine bone marrow, compared wiht that of the group BMS with pLXSN and the group BMS without pLXSN/IL-3 transfection. **Conclusion** The exogenous IL-3 and NeoR gene of pLXSN can be integrated into DNA genome of BMS, and promote the proliferation of hematopoietic cells.

Key words: interleukin-3; stromal cell; polymerase chain reaction

骨髓基质细胞是造血微环境中的重要组成部分,对造血干细胞的自我更新、定向分化、繁殖及调节造血细胞在骨髓中的滞留有重要作用。IL-3 主要生物学功能是造血调控,能作用于早期造血祖细胞及干细胞,并促进其分化增殖,在骨髓造血障碍时,能加快骨髓造血重建过程。我们借助逆转录病毒载体将小鼠 IL-3 cDNA导入小鼠骨髓基质细胞,利用 PCR 检测基质细胞是否导入外源性 IL-3 基因,并观测其对造血的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

逆转录病毒载体(pLXSN)及小鼠 IL-3 cDNA 质粒由本校分子生物学教研室刘昕博士馈赠,工具酶购自宝灵曼新英格兰公司,实验所用标准 DNA 分子量 Marker 购自华美公司,BALB/c 小鼠购自本校动物中心。

1.2 重组 IL-3 cDNA 的构建[1]

用 *Xho*I 将载体 pLXSN 线性化并将 IL-3 cDNA 由 PUC-IL-3 质粒上切下(片段约 1.2 kb),经 V 型槽回收,然后用 T4 Ligase 进行连接,得到重组子 pLXSN-IL-3;用 *Hind*Ⅲ酶切鉴定 IL-3 片段插入方向。

1.3 重组逆转录病毒的产生及病毒滴液检测

利用脂质体 Dosper 将 pLXSN-IL-3 和空载体 pLXSN,分别转染入包装细胞 PA317,用 G418 筛选 PA317 的细胞克隆。用含病毒的培养上清液转染 NIH/3T3 细胞,计算每皿 G418 性细胞克隆,即为产病毒滴度,以每毫升集落形成单位(CFU/ml)表示,计算公式:抗病毒效价 = 每皿克隆数 × 上清稀释倍数。

1.4 转染小鼠骨髓基质细胞(BMS)[2]

取 BALB/c 小鼠股骨骨髓,制成单细胞悬液,取 1×10^6 个细

作者简介:袁良平(1963-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事造血重建及基因治疗等方面的研究、发表论文 12 篇。电话:(023)68752355

收稿日期:2000-06-22;修回日期:2001-01-03

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

胞在基质细胞培养体系中培养(DMEM 培养液，20% 胎牛血清，×10% 马血清，10^{-6} mol/L 氢化可的松，青、链霉素各 100 U/ml)，3 周后加含高效价病毒上清液(以不含病毒的培养液及含空载体的上清液作对照)，继续培养 48 h，G418 筛选，约 10 d 后克隆形成。挑选各组阳性克隆(BMS/pLXSN-IL-3 和 BMS/pLXSN)，培养扩增后收集细胞和上清备用。

1.5　培养基质细胞基因组 DNA 提取及基因检测

1.5.1　按 Sambrook 等[3] 方法进行培养细胞基因组 DNA 的提取，真空抽滤至接近干燥，TE 溶解后备用。

1.5.2　PCR 检测载体中 NeoR 基因及 IL-3 基因

a. 检测 NeoR 的基因引物

引物 1:5'-CCAGGCTCAAGGCGCGCATGA-3'

引物 2:3'-TCACGGGTAGCCAACGCTATG-5'

产物长度 170 bp

b. 检测 IL-3 的基因引物

引物 1:5'-CTGAATTCATGGTTCTTGCCAGC-3'

引物 2:5'-TCGTCGACTTAACATTCCACGGTTCC-3'

产物长度 500 bp

1.5.3　反应条件　　95 ℃ 10 min，冰浴后加 Taq 酶，然后进行 35 个循环(94 ℃ 90 s，55℃ 60 s，72 ℃ 60 s)。最后 72 ℃延伸 10 min，反应体系为 50 μl(10 × 反应缓冲液 5 μl，5' 及 3' 引物各 1 μl，1.25 mmol/L dNTP 各 3 μl，样品 DNA 上清液 1 μg，加 ddH_2O 至 50 μl)。

PCR 产物经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳，标准 DNA 分子量为 PCR 小分子量 Marker。

1.6　小鼠骨髓 CFU-GM 的培养

参照文献[5]的方法，稍作改良。

1.7　噻唑蓝(MTT 法)检测细胞增殖活性

NFS-60 细胞分别与基质细胞各组混合培养 24、48、72 h，加入 MTT 后检测增殖活性。

1.8　动物分组

将基因转染的骨髓基质细胞按 1×10^7/ml 浓度，每只 0.5 ml 由尾静脉输入正常小鼠和经 7 Gy ^{60}Co 照射后的 BALB/c 小鼠体内为转染组(BMS/pLXSN IL-3)，每组 25 只小鼠，分别在照射后第 1、2、3 周取外周血检查白细胞数量。以未转染的基质细胞(细胞浓度同转染组)及 DMEM 0.5 ml 作对照，为 BMS 组和 DMEM 组。

1.9　统计学方法

采用 t 检验。

2　结果

2.1　重组质粒方向鉴定

IL-3 cDNA 与逆转录载体(pLXSN)克隆后，得到重组子 pLXSN-IL-3 质粒，用 *Xho*I 酶切鉴定，证实 IL-3 cDNA 已重组到(pLXSN)上。用 *Hind* Ⅲ酶切鉴定，得 1 240 bp 和 633 bp 的 2 个片段，其中得到 1 240 bp 片段的为正向连接，633 bp 片段的为反向连接，见图 1。

2.2　病毒滴度的检测

pLXSN-IL-3 和空载体 pLXSN 经脂质体 Dosper 转染 PA317 细胞，经 G418 筛选得到产病毒细胞株，转化 NIH/3T3 细胞，测得其产病毒滴度在 10^5 CFU/ml 的上。

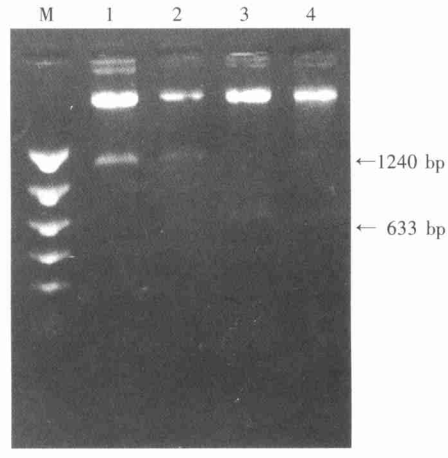


图 1　重组质粒方向鉴定

Fig 1　Identification of orientation of recombinant plasmids

M: DNA marker; 1,2: Positive recombinant plasmid; 3,4: Negative recombinant plasmid

2.3　阳性克隆筛选

将含 5% 高效价病毒的培养上清液(pLXSN-IL-3 和空载体 pLXSN)感染 BMS，G418 筛选，10 d 后均表现出大量 G418 抗性克隆，基因转移效率分别为 40.3% 和 52.2%，未转染的 BMS 组加入 G418 后 3～5 d 全部死亡。

2.4　载体构建后的鉴定

将 pLXSN-IL-3 和空载体(pLXSN)细胞的含病毒的培养上清感染 BMS，前者用 PCR 扩增出 500 bp 和 170 bp(NeoR)的条带，后者仅扩增出 170 bp；未用 pLXSN-IL-3 或(pLXSN)转染的 BMS，PCR 未扩增出条带。PCR 结果见图 2。

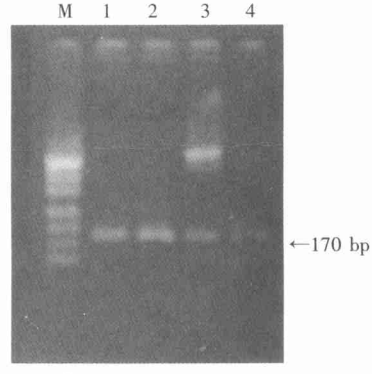


图 2　PCR 检测 NeoR 及 IL-3 基因

Fig 2　Assay of NeoR and gene by PCR

M: DNA marker; 1: pLXSN vector; 2: BMS transfected by pLXSN/IL-3; 3,4: BMS transfected by PLXSN

2.5　转染基质细胞上清生物活性检测

不同稀释度的培养上清液对小鼠骨髓 CFU-GM 的影响见表 1。结果发现，转染 pLXSN/IL-3 的基质细胞培养上清液 IL-3

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

生物活性明显高于空载体 pLXSN 组及未转染基质细胞组($P<0.01$)，空载体组与未转染组差异无显著性($P>0.05$)。空载体组与未转染组同仅加入 DMEM 组比较，差异有非常显著性($P<0.01$)。此结果表明，转染 pLXSN/IL-3 的基质细胞有明显促进小鼠骨髓 CFU-GM 增殖的作用，空载体组及未转染基质细胞组也有促进 CFU-GM 增殖的作用，但作用不及转染组。

表 1 骨髓基质细胞培养上清液的 CFU-GM 检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Biological activities of BMS cultured supernatant ($\bar{x}\pm s$)

Group	Dilution of the supernatant			
	5^{-1}	5^{-2}	5^{-3}	5^{-4}
BMS/pLXSN-IL-3	765±123.4**	603±110.4**	512±68.6**	310±58.3**
BMS/pLXSN	260.1±21.4△	245.6±26.3△	176±21.3△	121.0±25.4△
BMS	256.5±22.1△	248.2±24.2△	167±24.2△	118.4±25.6△
DMEM	40.1±6.6	38.8±7.1	38.2±6.8	34.1±5.7

**: $P<0.01$ *vs* other group; △: $P<0.01$ *vs* group DMEM

2.6 NFS-60 细胞增殖活性检测

不同细胞组与 NFS-60 混合培养对 NFS-60 细胞增殖活性的影响，见表 2。我们发现转染 pLXSN/IL-3 的基质细胞对 NSF-60 增殖有明显的促进作用，与空载体 pLXSN 组及未转染的基质细胞组比较，差异显著($P<0.01$)，而空载体组与未转染组之间差异不显著($P>0.05$)。无基质细胞混合培养的 NFS-60(亦未加入其它造血因子)培养 24 h 后大部分死亡(未加入 MTT 检测)，该结果提示基质细胞具有促进 NSF-60 细胞增殖的作用，但不及转染 pLXSN/IL-3 的基质细胞。

表 2 NFS-60 细胞增殖活性检测结果(D_{490}，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Proliferation activities of NFS-60 line (D_{490}，$\bar{x}\pm s$)

Group	Time of cultured		
	24 h	48 h	72 h
BMS/pLXSN-IL-3	0.68±0.04**	0.76±0.05**	0.70±0.05**
BMS/pLXSN	0.32±0.05	0.40±0.04	0.34±0.03
BMS	0.30±0.03	0.39±0.03	0.32±0.05

**: $P<0.01$ *vs* other group

2.7 实验小鼠外周血白细胞水平的变化

经 7 Gy ^{60}Co 照射后的 BALB/c 小鼠，外周血白细胞数急剧下降，第 1 周降低最明显，2 周左右开始逐渐回升，到第 3 周，输注 BMS/pLXSN-IL-3 组基本达到照前水平，输注 BMS 组则未到达照前水平，见表 3。单纯输 DMEM 组小鼠在 2 周内，则大部分死亡。这表明，表达 IL-3 的 BMS 及小鼠 BMS 能促进小鼠白细胞的恢复。

表 3 辐射后小鼠白细胞计数($\times10^9$/L，$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 White blood cell count of mice after irradiation ($\times10^9$/L，$x\pm s$)

Group	Before irradiation	Time after irraditation (week)		
		1	2	3
BMS/pLXSN-IL-3	6.8±1.10	2.4±0.62*	3.3±1.00*	6.1±1.40*
BMS	6.6±1.01	0.96±0.24	1.44±0.10	3.2±0.96
DMEM	6.2±0.98	0.24±0.08	dead	

*: $P<0.01$ *vs* BMC and DMEM group

3 讨论

白细胞介素-3 主要由激活的淋巴细胞及肥大细胞分泌，主要作用于造血干/祖细胞，促进其增殖、分化。正常情况下，骨髓基质细胞能少量地分泌 IL-3、IL-6、GM-CSF 等细胞因子，但浓度不稳定且非常微量。在放、化疗条件下，较高浓度 IL-3 对恢复骨髓造血有一定促进作用[4]。本实验用逆转录病毒载体将 IL-3 cDNA 导入小鼠骨髓基质中，由基质细胞分泌的 IL-3 能促进骨髓造血功能的恢复。实验结果证实，转染 pLXSN/IL-3 的基质细胞有明显促进小鼠骨髓 CFU-GM 增殖的作用，空载体组及未转染基质细胞组也有促进 CFU-GM 增殖的作用，但作用不及转染组。PCR 检测基质细胞中的外源性基因(NoeR 基因及 IL-3 基因)，方法简便，可靠，结果易于判断。我们设计了针对 NeoR 基因的一对引物，扩增出的产物长度为 170 bp；通过 Internet 网上检测，发现小鼠 IL-3 基因序列中，其读码框基因序列长度为 433 bp，针对其两端序列，设计出的一对引物，其产物长度为 500 bp，经实验得到了证实。我们在设计扩增 IL-3 的引物时，为了保证引物是特异针对 IL-3 质粒的序列，以免与基质细胞基因组 IL-3 序列产生匹配，上、下游引物位于多克隆位点与 IL-3 编码区交界处，设计引物产物长度为 500 bp。从 PCR 产物长度分析，由于质粒 IL-3 不含内含子，因而 PCR 产物长度恰好为 500 bp。假如引物与基质细胞基因组 IL-3 序列结合，因其序列中含有内含子，其产物长度应超过 500 bp。因此，从引物设计的特异性及 PCR 产物长度分析，从转染 pLXSN-IL-3 的基质细胞 DNA 中扩增出的 500 bp 片段，应是外源性 IL-3 基因，而非基质细胞基因组中的固有 IL-3 序列。

参考文献：

[1] 萨姆布鲁克 J，弗里奇 E F，曼尼阿斯蒂 T，编著. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁，黎孟枫，张德政，等 译. 第 2 版. 北京：科学出版社，1996. 1－340.

[2] Kittler E L, McGrath H, Temeles D, *et al*. Biological significance of constitutive and subliminal growth factor production by bone marrow stroma[J]. Blood, 1992, 79(12): 3 168－3 178.

[3] Sambrook J, Fritch E F, Manitatis T. Molecular cloning, a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 9－11.

[4] 李 青，曹雪涛，蔡 荣，等. 白细胞介素-3 基因疗法对同基因骨髓移植造血重建的影响[J]. 中华血液学杂志，1996，17(5)：237－239.

[5] 刘秀珍. 造血祖细胞培养技术实验手册[M]. 北京：北京出版社，1993. 45－49.

(编辑 潘式文)

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