DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.003

论著

文章编号:1000-5404(2000)04-0310-04

Egr-1启动子序列调控造血生长因子表达的实验研究

杜 楠[1],裴雪涛[2],罗成基[1],李 梁[2],邹仲敏[1],冯 凯[2],白慈贤[2],孙 兵[1] ([1]第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038;[2]军事医学科学院二所实验血液学研究室,北京 100850)

提 要:目的 探索辐射诱导基因调控元件启动的造血生长因子表达及其对造血恢复的作用。方法 该实验将携带Egr-1调控序列启动的FLT3配基(FL)和GM-CSF双顺反子表达载体(Egr-FG)导入骨髓基质细胞系HFCL(称为HFCL/EFG)。采用RT-PCR、ELISA及细胞增殖法观察FL和GM-CSF cDNA在转染细胞中的表达及保护造血作用。结果 构建了Egr-1调控序列启动的双顺反子基因表达载体(Egr-FG);在HFCL/E-FG细胞中证实有外源性FL和GM-CSF基因的整合和表达,在辐照后16 h的HFCL/EFG细胞培养上清液中,FL和GM-CSF含量较照射前明显增高($P<0.01$);同时证实辐射后HFCL/EFG培养上清液对造血祖细胞有明显扩增作用;共培养的骨髓有核细胞和HFCL/EFG经照射后7 d计数非粘附细胞,HFCL/EFG组较对照组明显增加($P<0.05$)。结论 辐射诱导基因Egr-1调控序列启动的造血生长因子基因表达载体在辐射后表达明显增高,在体外对辐射后的造血细胞具有保护作用。

关键词:辐射诱导基因;造血生长因子;基因治疗;辐射;骨髓基质细胞
中图法分类号:R394.3 文献标识码:A

Study of the expression of hematopoietic growth factors regulated with Egr-1 promotor sequence

DU Nan, PEI Xue-tao, LUO Cheng-ji, LI Liang, ZHOU Zhong-min, FENG Kai, BAI Ci-xian, SUN Bin (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of radiation inducible gene on the regulation of the expression of hematopoietic growth factor and the restoration of hematopoiesis. **Methods** Human GM-CSF cDNA and FLT3 Ligand (FL) were linked together with IRES and inserted into the expression vector pCI-Egr-1 which was constructed with the substitution of CMV promotor in pCIneo with Egr-1 promotor (Egr-FG). The vector was transferred into human bone marrow stromal cell line HFCL with lipofectinTM. The mRNA expression of the target gene in the cells were identified with RT-PCR. The amount of FL and GM-CSF in the supernatant of HFCL-EFG cell culture was determined with ELISA. CD34+cells isolated with MACS were cultured in the medium containing the supernatant of HFCL/EFG to observe its effect on the proliferation of CD34+cells. **Results** The gene expression vector (Egr-FG) initiated with Egr-1 regulation sequence was successfully constructed. It was confirmed that there were expression of exogenous FL and GM-CSF in HFCL-EFG cells. After 16 hours of 60Co irradiation, the amount of FL and GM-CSF in the serum-free supernatant of HFCL/EFG cell culture was increased respectively ($P<0.001$). It was found that after irradiation, the supernatant of HFCL/EFG culture significantly increased its effect on the proliferation of CD34+cells. **Conclusion** These in vitro data provide an experimental basis for the in vivo use of gene therapy of hematopoietic growth foctor gene regulated by Egr-1 to protect hematopoiesis from ionizing radiation.

Key words: radiation inducible gene; hematopoietic growth factor; gene therapy; radiation; bone marrow stromal cell

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900040);国家杰出青年自然科学基金资助项目(39825111)

作者简介:杜 楠(1962—),男,河北省石家庄市人,博士,副教授,主要从事血液学和放射医学方面的研究, 发表论文20篇。 电话:(023)68752000-71552

收稿日期:1999-10-08;修回日期:1999-12-22

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

电离辐射可迅速诱导细胞中早期生长反应（Early growth response, Egr-1）基因的表达，Egr-1 基因启动子含有 6 个 CArG 元件，电离辐射通过细胞产生活性氧自由基作用于 CArG 元件，诱导 Egr-1 的表达。最近 Weichselbaum 等[1] 将该启动子诱导的基因疗法与放射治疗结合起来（Gene-radiatherapy），证明用特异的辐射诱导元件 Egr-1 启动子经辐射可诱导下游基因超强表达。现已证明造血生长因子具有抗辐射及促进造血恢复作用，GM-CSF 和 FL（FLT3 Ligand）是作用于造血细胞不同阶段的细胞因子[2]，我们设想采用 Egr-1 调控序列启动造血因子基因（GM-CSF 和 FL）的表达载体导入骨髓基质细胞，然后对其进行辐射诱导 Egr-1 启动子下游基因表达，以促进造血恢复的抗辐射作用。

1 材料与方法

1.1 重组载体的构建

将 FL cDNA（pUC18/FL 由 Indiana 大学 Dr Wang LS 提供）和 GM-CSF cDNA （pMX/ GM-CSF 由 Dr Donnell MD 惠赠），分别用 IRES（pIRES）连接，再重组于携带 Egr-1 调控元件的 pCIneo 载体上（北京放研所吕星博士惠赠）[3]，然后，构建成 pCIneo-Egr-1R-GM-CSF-IRES-FL 载体（Egr-FG）及各对照组载体。

1.2 细胞培养及转染

人骨髓基质细胞系 HFCL[4] 用含 10%小牛血清的 DMEM 培养，待细胞呈对数生长时，用无血清 DMEM 培养液洗涤 1 次，然后用脂质体介导质粒 DNA 转染，用 G418 选择阳性克隆称为 HFCL/EFG。采用免疫磁珠法（MACS, Miltenti Biotec Germany）分离 CD34+细胞[5]，在含 20%FCS、50 ng/ml SCF、20 ng/ml IL-3 及 20 ng/ml IL-6 的 IMDM（GIBCO）培养基中，均在 37℃及 5%CO2 条件下。

1.3 RT-PCR 检测[6] GM-CSF 和 FL cDNA 表达

取 HFCL/ EFG 细胞，用 RNA 提取试剂盒，按说明方法分别提取总 RNA。合成 GM-CSF、FL 及 β-actin 基因序列引物。FL 的 PCR 产物为 225 bp，P1 5′-CTT GGA CCC AGC GAC AGT CTT G-3′，P2 5′-TGC TGC TGA GCT CGG GAC TC-3′，GM-CSF 的 PCR 产物为 495 bp，P1 5′-GCG GAT CCG CTG GAG GAT GTG GCT G，P2 5′-ATGAAAC AAGAGCTAGAAACTCAGG；β-actin 引物的 PCR 产物为 249 bp，P1 5′-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT A G-3′，P2 5′-TTG TAA CCA CCT GGG ACG ATA TGG-3′；RT-PCR 用 cDNA 合成试剂盒及方法合成 cDNA，再用上述引物进行 PCR，94℃ 60 s，68℃ 60 s，72℃ 120 s 共 30 次循环。

1.4 GM-CSF 和 FL 表达量检测

取经 2.5 Gy 辐射后消化的培养细胞，按 1× 105 细胞接种于 6 孔培养板，待细胞贴壁后，用 PBS 洗涤 3 次，用无血清 IMDM 培养第 8 h 换液并收集细胞培养上清液，每种样品重复 3 孔，作时间曲线图，用人 GM-CSF ELISA 试剂盒（晶美生物工程有限公司）及 FL 多抗（Santa Cruz 公司）按常规方法测定 GM-CSF 和 FL 含量。

1.5 2.5 Gy 照射后细胞培养上清液对脐血 $CD34^+$ 细胞的体外扩增

培养体系中含 30%的 2.5 Gy 照后 16 h 的转染细胞培养上清、12.5%HS、12.5%FCS、5×10^{-6} mol/ L 氢化可的松、$CD34^+$ 细胞 5×10^3/ 孔及其它细胞因子（SCF 50 ng/ ml+IL-3 20 ng/ ml+IL-6 20 ng/ ml），阳性对照为标准品 FL（Immunex）40 ng/ ml 及无培养上清的上述体系，对照组为未照射或无细胞因子的上述培养条件，7 d 后，用流式细胞仪或荧光显微镜分析 $CD34^+$ 细胞数量。

1.6 HFCL/EFG 对 2.5 Gy 辐射后骨髓细胞的影响

取正常人肋骨骨髓分离单个核细胞（MNC），分别加入 MNC（1×10^4/ 孔）和 HFCL/ EFG（1×10^3/ 孔），其它培养体系同方法 1.5，给予 2.5 Gy ^{60}CO 照射，常规培养 7 d 计数每孔非粘附细胞。

2 结果

2.1 载体的构建及转染骨髓基质细胞

构建过程见图 1。经限制性内切酶分析鉴定证明 Egr-1 基因调控序列连接双顺反子 GM-CSF cDNA 和 FL cDNA 于携带 Egr-1 启动子的真核表达载体 pCIneo 上，并筛选出正向重组子。然后将其用脂质体转染骨髓基质细胞系 HFCL，经 G418 抗性筛选出阳性细胞克隆 HFCL/EGF。

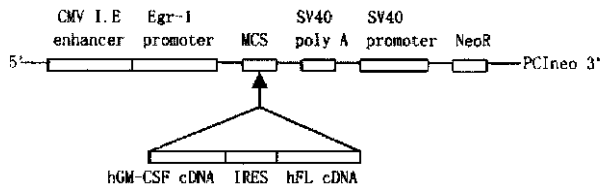


图 1　Egr-1 调控的 GM-CSF 和 FL cDNA 双顺反子表达载体的构建

Fig 1　Schematic representation of the recombinant GM-CSF and FL cDNA bicistronic eukaryotic expression vector

2.2 GM-CSF 和 FL 的含量检测

2.5 Gy 辐射后 16 h 转染细胞培养上清液 ELISA 检测显示 HFCL/ EGF 培养上清液 FL 和 GM-CSF 含量照射后明显增加，未照射组 FL 含量为（214.45±35.61）pg/ ml，GM-CSF 为（15.60±3.23）pg/ ml，照射组 FL 为（805.46±107.21）pg/ ml，GMCSF 为（485.56±81.14）pg/ ml，两组比较，$P<0.01$。

2.3 辐照后 HFCL/EFG 培养上清液对 $CD34^+$ 细胞增殖的影响

液体培养结果 FL 标准组：（207.66±34.03）$\times10^3$/ ml，照射组为（174.46±22.11）$\times10^3$/ ml，未照射组为（71.62±10.22）$\times10^3$/ ml，结果表明：FL 与其它细胞因子联合应用具有短时间内可扩增早期造血祖细胞的作用，而 HFCL/ EFG 细胞经照射后其培养上清也具有扩增祖细胞的作用，且比未照射组更强（$P<0.05$）。

2.4 照射的 HFCL/EFG 细胞对骨髓有核细胞数量的影响

HFCL/ EFG 与骨髓有核细胞共培养后，经辐射后含有 Egr1 启动子的 HFCL/ EFG 细胞较未含有该启动子的细胞对辐射损伤的造血细胞具有促进其恢复和增殖的作用（$P<0.05$），见图 2。

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

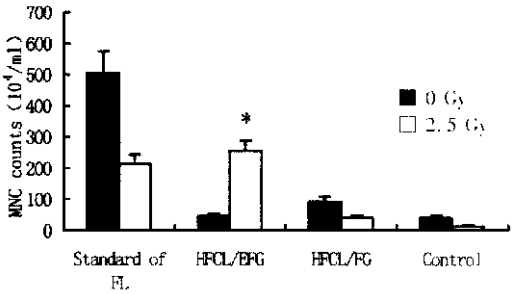


图 2 照射后 HFCL/EFG 对骨髓有核细胞(MNC)的保护作用

Fig 2 Protective effects of HFCL/EFG on MNC post-radiation

2.5 RT-PCR 检测 GM-CSF 及 FL cDNA 在细胞中的表达

用 RT-PCR 方法检测 HFCL/EFG 细胞中外源基因 mRNA 转录，见图 3。

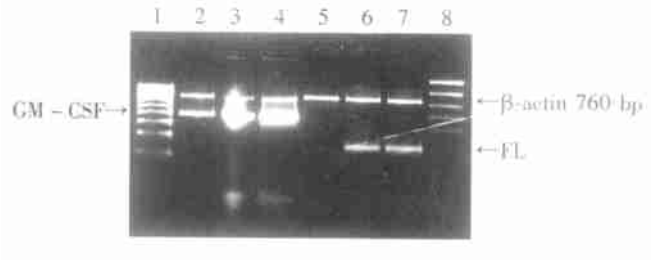


图 3 **RT-PCR 检测 HFCL/EFG 细胞中 GM-CSF 和 FL mRNA 表达**

Fig 3 RT-PCR for expressions of GM-CSF and FL mRNA in HFCL/EFG

Lane 1: Marker 100 bp DNA ladder; Lane 2, 3, 4: Expressions of FL mRNA and β-actin mRNA in HFCL/EFG; Lane 5: Expression of β-actin mRNA in HFCL; Lane 6, 7: Expression of GM-CSF mRNA and β-actin mRNA in HFCL/EFG; Lane 8: PCR Marker

3 讨论

造血干/祖细胞属于更新活跃、增殖旺盛的细胞，具有很高的辐射敏感性，电离辐射所致造血损伤的主要环节是造血祖细胞增殖能力的丧失或抑制，而造血微环境是造血调控的关键，造血微环境主要由基质细胞、细胞外基质和造血因子组成。GM-CSF 是一种具有广谱活性的造血生长因子，它不仅对多系造血祖细胞的增殖与分化是必需的，而且对多种成熟血细胞的生存和发挥其功能也必不可少，临床研究证明 GM-CSF 可提高受照患者的存活率、减轻造血组织辐射损伤，并使感染和出血易于控制。FL(FLT3 Ligand)是最近发现的一种主要促进早期造血干/祖细胞增殖的细胞因子，是一种早期造血的关键性调节因子，与 GM-CSF 协同，效果更佳，随后发现 FL 与其它细胞因子相比具有更强的辐射后造血保护作用及更广阔的临床应用前景[2]。然而它们均存在半衰期短，需大量、反复、长期应用才有效，且有一定的副作用，而造血因子基因疗法具有促进造血重建的作用且克服上述缺点。选择基因转移的靶细胞也非常重要，基质细胞是造血微环境的中心，在相当一段时间内造血微环境被认为是辐射抗性组织，而现在发现造血微环境的辐射敏感性虽低于 CFU-S，但较大剂量辐照后也足以造成造血微环境的损伤，且损伤恢复较慢[7]。基质细胞生长期长，表达时间亦长，而且一般表达载体的启动子诱导的基因表达呈组成性表达，而非依据造血需求调控表达，体内长期过量的造血生长因子表达，尤其是早期造血生长因子，则会出现多种限制使用的副作用，将辐射诱导基因调控机制与造血调控结合起来为造血系统基因调控性治疗开辟了一条新思路[8]。

Egr-1 基因是辐射早期对细胞起调控作用的转录因子，其调控序列可直接感受电离辐射等刺激而诱导下游基因表达。Manome 等[9]研究发现在靶细胞或靶组织中的 Egr-1 启动子当扳动开关(即辐射)时，基因产物呈空间和时间性表达，这种时间上的基因表达调控是指 Egr-1 启动子可以通过辐射诱导，空间调控实际上是指在某种特定组织范围内用外来一精确地传递电离辐射[10]。根据 Egr-1 基因调控元件的特性，可以看出首先 Egr-1 启动子的诱导因素即辐射本身具有治疗肿瘤作用，但对机体造血组织是损伤因素，然而，Egr-1 调控元件启动的基因表达产物则是利用辐射诱导敏感性针对辐射对造血的损伤因素起作用的；另外，Egr-1 启动子与一般启动子包括组织特异性启动子不同，一般启动子诱导的基因表达呈组成性表达，常呈持续性表达，而 Egr-1 启动子受到辐射后诱导的表达为超强表达，表达量多而作用强，当辐射反应结束，基因的超强表达又随之减弱或终止，由此可消除这种过表达带来的副作用。这种基因调控的完成有望使人们一直疑虑的辐射保护作用很强的早期造血生长因子的临床应用变成现实。

本实验将双顺反子 GM-CSF/FL cDNA 插入携带 Egr-1 启动子的真核表达载体 pCIneo 的多克隆酶切位点上。利用微小 RNA 病毒的内核糖体进入位点(IRES)构建的多顺反子载体则能将多个基因在单一启动子控制下转录形成单一 mRNA，因而避免了在转录调控水平对基因表达的影响，该实验将 Egr-FG 导入骨髓基质细胞系 HFCL，从 RT-PCR 及细胞因子含量检测证明双顺反子能很好地表达两个基因，其表达水平并不低于单个基因的载体，而且它将为研究多个因子协同作用有不同亚基组成的蛋白质提供一个简单而有效的载体。

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

在体外 HFCL/EFG 经辐射后 GM-CSF 和 FL 水平均明显升高，未转染的 HFCL 基质细胞系 RT-PCR 未扩出 FL 和 GM-CSF mRNA 扩增产物，原因不清；用 HFCL/EFG 细胞培养上清结合其它因子对 $CD34^+$ 细胞有明显扩增作用，提示 Egr-1 启动子的确可诱导 FL 超表达，为进一步摸拟造血微环境，将转染双顺反子的基质细胞与共培养的骨髓有核细胞同时照射，表明超表达细胞因子的基质细胞对造血细胞具有保护作用，由此　提示 Egr-1 启动的造血因子基因疗法具有抗辐射促进造血恢复的作用。

参考文献：

[1] Weichselbaum R R, Hallahan D E, Beckett M A, *et al*. Gene therapy targeting by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells[J]. Cancer Res, 1994, 54(7): 4 266－4 269.

[2] Gratwohl A, Johm L, Baldomero H, *et al*. FLT3 ligand provides hematopoietic protection from total body irradiation in rabbits[J]. Blood, 1998, 92(3): 765－769.

[3] 吕　星，邢瑞云，　孙志贤，　等．小鼠 Egr-1 基因调控序列的克隆及其辐射诱导特性的鉴定[J]．　中国肿瘤生物治疗杂志，1998, 5(1): 16－19.

[4] 姜学英，苏月来，杨少光，等．人骨髓基质细胞系的建立、生物学特征和功能研究[J]．中华血液学杂志，　1988, 9(11): 661－664.

[5] 裴雪涛，王立生，徐　黎，等．$CD34^+$ 造血祖细胞的定向诱导分化研究[J]．中华血液学杂志，1998, 19(6): 289－293.

[6] F．奥斯伯 著．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. 587－601.

[7] 罗成基．造血微环境基质细胞的研究概况及前景[J]．解放军医学杂志，1999, 24(1): 1－3.

[8] Keating A. A phage I study of the transplantation of genetically marked autologous bone marrow stromal cells[J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(7): 519－600.

[9] Manome Y, Kunieda T, Wen P Y, *et al*. Transgene expression in malignant glioma using a replicative adenoviral vector containing the Egr-1 promoter: Activation by ionizing radiation or uptake of radioactive iododeoxyuidine[J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(7): 1 409－1 417.

[10] Paillard F. The control of transgene expression with radiation [J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(7): 1 393－1 394.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2000)04-0313-01

经验与短篇

维胺酯、替硝唑治疗酒渣鼻的疗效观察

Observation on the therapeutic effects of Viaminate and Timidazole on rosacea

朱堂友，李文维　　（第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所皮肤科，重庆　400042）

酒渣鼻是一种好发于颜面中部的慢性皮肤损害。临床发现甲硝唑治疗治愈后复发率较高。我们观察了口服替硝唑和维胺酯治疗红斑期及丘疹脓疱酒渣鼻的疗效，文献未见报道。

1 材料和方法

1.1 临床资料

选择 60 例门诊常见的红斑期酒渣鼻和丘疹脓疱期酒渣鼻纳入本研究。

纳入标准：鼻及其周围皮肤的持久性红斑，伴或不伴毛细血管扩张；上述部位尤其是鼻尖部丘疹、脓疱、红斑，伴或不伴毛细血管扩张。

皮疹严重性的判断：丘疹和脓疱按数量计分：无：0，＜5 个：1，5～10 个：2，10～20 个：3，＞20 个：4；红斑：无红斑：0，轻度：1，中度：2，重度：3；毛细血管扩张：无：0，直径小于 2 mm，范围小于 10%面部面积：1，范围在 10%～30%面部面积：2，大于 30%面部面积：3。

作者简介：朱堂友（1969－），男，重庆市人，硕士，主治医师，主要从事银屑病方面的研究。电话：(023)68757478

收稿日期：1999-05-11；修回日期：2000-01-05

1.2 治疗前的基本情况

治疗前两组间年龄、性别、毛囊虫阳性率、皮疹严重性差异不显著（$P>0.05$）。

1.3 方法

随机数字表法分成治疗组和对照组，各 30 例。

治疗组：维胺酯胶囊 25 mg，3/d；替硝唑片 1.0 g，1/d。

对照组：甲硝唑片 0.2 g，3/d；1%甲硝唑霜外搽，2/d。10 d 为 1 疗程，连续治疗 3 个疗程，每疗程结束观察疗效。

1.4 疗效判定

治愈：红斑、丘疹、脓疱完全消退、扩张的毛细血管消退 90%以上；显效：红斑、丘疹、脓疱、毛细血管扩张消退 70%以上；有效：红斑、丘疹、脓疱、毛细血管扩张消退 50%以上；无效：红斑、丘疹、脓疱、毛细血管扩张消退 50%以下。

2 结果

治疗组 2 例失访，对照组有 3 例失访。治疗组有 2 例有口、唇干燥，其中 1 例有面部脱屑，2 例有轻度腹部不适；对照组有 5 例有轻度腹部不适。两组均无因药物不良反应而退出治疗者。治疗组丘疹、脓疱、红斑均较对照组消退快，对照组对丘疹、脓

（下转 317 页）

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