DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.029

论著

文章编号:1000-5404(2000)01-0068-04

基因转移人 TGF-β1 在 NIH/3T3 细胞中表达鉴定

李 勇[1],韩本立[1],王会信[2],龙建银[2],李 昆[1] ([1]第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心,重庆 400038;[2]军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)

提 要 目的:基因转移人转化生长因子β1(TGFβ1)在真核细胞系中蛋白表达。方法:借助真核质粒表达载体,将人TGFβ1转移入小鼠成纤维细胞株(NIH/3T3)细胞中,经G418筛选,克隆扩增,Southern blot、Northern blot、PCR、RT-PCR鉴定,并经水貂肺上皮细胞(CCL-64)生长抑制法,对克隆细胞分泌TGFβ1蛋白进行活性检测。结果:证实了重组人TGF-β1基因在NIH/3T3细胞基因组中的稳定重组和mRNA水平的表达,TGF-β1蛋白活性检测及流式细胞仪免疫荧光测定结果,均证实了克隆细胞表达并分泌TGF-β1蛋白。结论:通过基因转移方法成功地在NIH/3T3细胞中重组并表达人TGF-β1蛋白,PCR结果还提示NIH/3T3细胞系基因组中无人TGFβ1序列存在。

关键词 转化生长因子β1;重组;载体;成纤维细胞株
中图法分类号 R392.13;R394.2 文献标识码 A

Expression and identification of human TGF-β1 gene in NIH/3T3 cells

LI Yong, HAN Ben-li, WANG Hui-xin, LONG Jian-yin, LI Kun (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the expression of and identify human TGF-β1 in NIH/3T3 cells. **Methods**: Human recombinant TGF-β1 was transfected into NIH-3T3 cells with the karyocyte expressive vector. The clone cells were selected by G418. All the clone cells were tested with southern blot, northern blot, PCR and RT-PCR and a subclone of mink long cell line (CCL-64) was used to measure TGF-β1 activity. **Results**: Human TGF-β1 gene was stably recombined into NIH/3T3 cells and its mRNA was expressed in them. It was proved by flow cytometry and CCL-64 cell growth inhibition that clone cells secreted TGF-β1 protein. **Conclusion**: Human TGF-β1 is recombined and expressed in NIH/3T3 cells after the gene transfection. There is no human TGF-β1 sequence in wild type NIH/3T3 cells.

Key words transforming growth factor β1; recombination; vector; fibroblast strain

转化生长因子(Transforming growth factor, TGFβ1)因其功能的特异性而被广泛用于基础和临床研究[1]。天然TGF-β1自动物血小板中提取,其含量甚微,来源有限,有必要利用基因工程技术重组其蛋白[2]。本研究借助真核质粒表达载体PMAM,将人TGFβ1基因转移入小鼠成纤维细胞株(NIH/3T3)细胞系中,并对克隆细胞及对照组进行了分子生物学鉴定,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌JM109本室保存,真核质粒表达载体购自Promega公司,含有人TGFβ1,全长编码区cDNA重组质粒PMAMneoT-GFβ1本室自制[3];β-半乳糖酐酶真核质粒表达载体PSVβ1购自Promega公司。

1.2 细胞株

NIH/3T3系美国NIH研究所原株引进,选择DMEM培养基

作者简介:李 勇(1966.3),男,河南省永城市人,博士,主治医师,讲师,主要从事移植免疫耐受方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68773110

收稿日期:1998-12-18;修回日期:1999-09-03

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

添加 10%小牛血清培养,水貂肺上皮细胞株(CCL-64),引自美国 ATCC 细胞保藏中心,选择 RPMI 1640 培养基添加 10%小牛血清培养。以上两株细胞均为本室冻存。

1.3　工具酶和主要试剂

工具酶均购自 Sigma 公司, X-Gal, NP-40 和 G418 为 Sigma 产品, 人 TGFβ1 标准品购自 Promega 公司, DMEM 和 RPMI 1640 培养基为 GIBCO 产品,兔抗人 TGFβ1 多抗 LC(1-30-1),美国 Bethesda 州立肿瘤研究所 Spom 博士惠赠。脂质体转染试剂盒(Lipofectin)和磷酸钙-DNA 转染试剂盒购自 GIBCO 公司, PCR 和 RT-PCR 反转录试剂盒购于德国 BM 公司,直接酶标-化学发光自显影分子杂交试剂盒为 Amersham 产品。

1.4　重组表达载体构建及鉴定

PTGFβ1 cDNA 质粒经 *Xho*I 和 *Nco*I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳回收1.35 kb 目的片段,补平缺口,将其连接于 PMAM *Nhe*I 酶切点,然后转化受体菌 JM109,经氨苄和 X-Gal 互补筛选,获得阳性菌落,提取质粒酶切鉴定分析,得到 TGFβ1 正、反义质粒表达载体。

1.5　基因转移及克隆筛选

依据报告基因 β-半乳糖酐酶基因在 NIH/ 3T3 细胞中转移后表达比较,选取高转染率脂质体基因转移方法,按照脂质体 ∶质粒为 6.4 ∶1 混合后加入待转 NIH/ 3T3(对数生长中期)细胞中,置 37 ℃, 5%CO_2 孵育 5 ~ 8 h,换含 10%小牛血清正常 DMEM 培养液,稳定培养 48 h 后,选用 G418(450 μg/ml)培养液进行细胞传代,每 3 ~ 4 d 换 1 次培养液,约 2 周克隆形成, 分别单个克隆扩增。

1.6　克隆细胞 TGF-β1 蛋白检测和活性测定

参照文献[4] 方法将克隆细胞上清液经酸化处理后进行了 TGFβ1 活性测定; 同时对高分泌克隆及对照组细胞进行了免疫标记流式细胞仪测定, LC(1-30-1)(1 ∶10 000), IgG-FITC(1 ∶10),进一步证实克隆高表达人 TGFβ1。

1.7　基因转移分子生物学鉴定

选择高表达正义克隆, 反义克隆及正常 NIH/ 3T3 细胞扩增培养作为对照组, 细胞生长至对数生长期进行计数, 参照文献[5] 进行如下实验。

1.7.1　抽提细胞总 DNA,用于 Southern blot 检测(酶标-化学发生自显影法)。

1.7.2　抽提细胞总 mRNA(30 μg)用于 Northen blot 检测(酶标-化学发生自显影法)。

1.7.3　抽提细胞总 DNA, PCR 扩增,其作用细胞为:

正向引物 5′-GGAATTCATGGCCCTGGACACCAACTA-3′

负向引物 5′-TTATCAGCTGCACTTGCAGG-3′

依引物设计, PCR 扩增片段长度应是 360 bp。

1.7.4　抽提细胞总 mRNA, 反转录合成 cDNA, 继续 PCR 扩增,引物如上, 反应条件不变。

PCR、RT-PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳。EB 染色, 紫外灯下观察结果并拍照记录。

2　结果

2.1　重组表达载体酶切鉴定

将重组质粒转化菌株小量培养,碱裂解法提取质粒 DNA 后进行酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 结果表明, 酶切片段符合质粒载体酶切分子量理论值,说明目的片段定向克隆于质粒载体中。

2.2　克隆筛选及分泌人 TGF-β1 活性测定

在已形成的众多正义载体克隆中, 采用小滤纸片胰酶定点消化法,随机挑选 13 个克隆, 分别进行扩增,并对每个克隆定量测定上清液 TGFβ1 分泌量, 正常 NIH/ 3T3 及空载体转染(NIH/ 3T30)、反义载体转染(NIH/3T3—阴性)克隆用于对照, 见表 1。

表 1　不同克隆间分泌 TGF-β_1 水平比较

Tab 1　Comparison of TGF-β_1 levels secreted by different clones

Clone No.	Bq	TGF-β_1* ($ng \cdot ml^{-1} \cdot 48\ h^{-1}$)
NIH/3T3	3.056	38.2
NIH/3T30	3.007	45.1
NIH/3T3 -	3.083	34.5
NIH3T01 +	2.538	110.5
NIH3T02 +	2.454	122.3
NIH3T03 + **	2.206	156.8
NIH3T04 +	2.612	100.2
NIH3T05 +	2.397	130.2
NIH3T06 +	2.653	94.4
NIH3T07 +	2.297	144.1
NIH3T08 +	2.768	78.4
NIH3T09 +	2.470	120.0
NIH3T10 +	2.502	115.5
NIH3T11 +	2.626	98.2
NIH3T12 +	2.612	100.3
NIH3513 +	2.390	131.2

* :More than 100 $ng \cdot ml^{-1} \cdot 48\ h^{-1}$ were secreted by the most clones; ** :Highest level of secretion

2.3　克隆细胞 TGF-β1 蛋白表达 FCM 测定

用间接免疫标记法, 经 FCM 所测每 1 万个细胞荧光强度均值和标记率为一组, 统计学处理后比较, 见 TGFβ1, 阳性克隆荧光强度和标记率较对照组明显增强 ($P < 0.001$), 提示其 TGFβ1 蛋白表达量增加,而反义 TGFβ1 组 TGFβ1 表达减弱, 正义、反义两组间差异非常显著($P < 0.001$),见表 2, 图 1。

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

表 2 不同转移基因细胞 TGF-β_1 表达比较

Tab 2 Comparison of TGF-β_1 expression in different clones

	NIH/3T3	NIH/3T3 +	NIH/3T3 -
MFI	66.50 ± 2.258	75.33 ± 4.926 **△	63.33 ± 1.367 *
Tot%	23.37 ± 2.246	32.77 ± 2.370 **△	16.67 ± 1.283 **

MFI: Mean fluorescence intensity; Tot%: Total precentage of the positive cells; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* NIH/3T3; △: $P < 0.001$ *vs* NIH/3T3 -

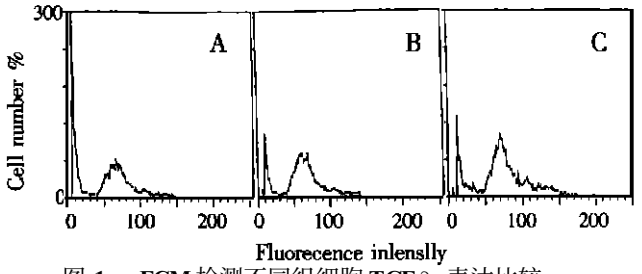


图 1 FCM 检测不同组细胞 TGFβ_1 表达比较

Fig 1 Comparison of TGFβ_1 expression in different clones by FCM

A :NIH/3T3 - ; B :NIH/3T3 ; C :NIH/3T3 +

2.4 基因转移的分子生物学鉴定

2.4.1 Southern blot 结果 转移有人 TGFβ_1 正义和反义基因的克隆细胞组 DNA 在分子量大约 6.0 kb 和 2.4 kb 处有明显杂交带，而对照组均为阴性，阳性杂交带分子量与质粒表达载体中 *BamH*Ⅰ 酶切点间片断长度一致，说明了外源 TGFβ_1 基因已稳定整合入克隆细胞基因组中。

2.4.2 Northern blot 结果 在转移有人 TGFβ_1 正义和反义基因的克隆细胞总 mRNA 中，杂交出 2.8 kb 的阳性杂交带，对照各组均为阴性，见图 2。杂交带恰好与克隆表达载体的 PMAMneoTGFβ_1 质粒的 5′MMTV-LTR 至插入片断另一端之间的长度相一致，故可以认为此条带为表达的外源人 TGFβ_1，但图像处理结果显示了正义杂交带比反义杂带强 1.9 倍。提示反义转录的 mRNA 有部分消耗，这可能与 NIH/3T3 细胞自身存在的鼠 TGFβ_1 有关。

2.4.3 PCR 与 RT-PCR NIH/3T3 +、NIH/3T3 - 正反义克隆中分别扩增出相同长度的片断 360 bp，见图 3、4，与人 TGFβ_1 引物设计目的片段长度一致，可以认为在上述两组细胞基因组 DNA 及转录出胞核的 mRNA 中，分别含有重组的人 TGFβ_1 正义和反义序列，说明了外源 TGFβ_1 基因已整合入 NIH/3T3 靶细胞基因组中并被转录，且基因的重组没有造成人 TGFβ_1 基因的缺失断裂或突变。对照组 PCR、RT-PCR 均为阳性，说明了动物品系 NIH/3T3 细胞基因组中不含有人 TGFβ_1 基因序列。

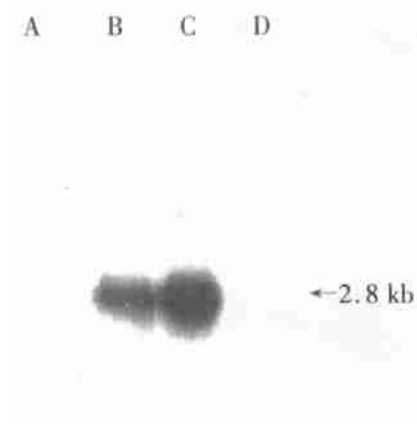


图 2 对照和转染细胞 mRNA Northern blot 杂交分析

Fig 2 Northern blot hybridization analysis of the NIH/3T3 and transfection cells lines

A : Marker ; B : 3T3 - ; C : 3T3 + ; D : 3T3



图 3 PCR 检测对照和转染细胞 TGFβ_1 DNA

Fig 3 DNA analysis of the NIH/3T3 and transfection cell lines by PCR

A : Marker ; B : 3T3 ; C : 3T3 - ; D : 3T3 +

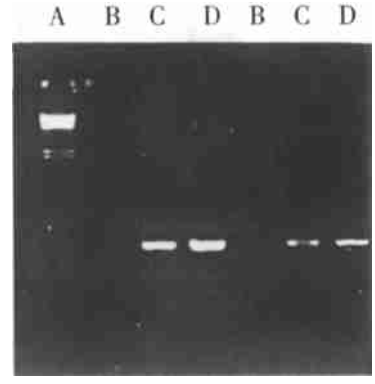


图 4 RT-PCR 检测对照和转染细胞 TGFβ_1 mRNA

Fig 4 mRNA analysis of the NIH/3T3 and transfection cell lines by RT-PCR

A : Marker ; B : 3T3 ; C : 3T3 - ; D : 3T3 +

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

3　讨论

TGFβ1 活性的维持有赖于严格的翻译后加工修饰,特别是双体分子的形成[6],原核表达系统是无法达到的,理想的重组人 TGF-β1 方案是真核细胞表达系统,此点已取得国内外学者共识。目前,国内仅有龙建银等[3] 作了真核细胞(COS-7)内 TGF-β1 短暂表达研究,尚无人 TGFβ1 重组成功的报道。

成纤维细胞株作为载体细胞有许多优点[7],如易获取和体外扩增;易受外源基因的转染并能稳定地表达外源基因;携带外源性基因后仍能稳定地植回体内并表达分泌;回植的成纤维细胞很容易被取出;成纤维细胞致瘤性低,相对其它细胞安全等。基于已有的实验条件和经验,我们选择了脂质体介导方法转移人 TGFβ1 基因至 NIH/3T3 靶细胞内,目前已有数十种疾病相关基因和细胞因子基因转移以成纤维细胞作为靶细胞。因此,以 NIH/3T3 为靶细胞重组人 TGF-β1,是今后开展 TGFβ1 体内表达研究的基础工作。

我们所开展的分子生物学鉴定工作证明了人 TGFβ1 基因随机整合 NIH/3T3 细胞基因组 DNA 中的稳定性和 mRNA 转录的完整性,结果同时还进一步证明了动物品系小鼠成纤维细胞 NIH/3T3 基因中不存在人 TGFβ1 基因序列,这就为在 NIH/3T3 细胞中重组人 TGFβ1,提供了安全保障。文献[1] 报道,人、鼠 TGF-β1 有相当高的同源性,本研究固相杂交中对照组阴性结果可能与内源 TGF-β1 基因通过 *BamH*Ⅰ 酶切后,产生大小不同的碱基片段,导致与探针同源互补率更低,经不起严格的洗脱条件,致使杂交信号丢失有关[8]。Northern 杂交结果显示正义比反义杂交带强,提示反义转录 mRNA 有部分消耗的事实也客观说明了 NIH/3T3 细胞基因组中存在一定量的鼠 TGF-β1,且与人 TGF-β1 有部分同源性。

免疫标记流式细胞仪检测法,是检测细胞表达分泌蛋白最为灵敏的方法之一,本研究采用间接免疫标记法,结合统计学处理,比较客观反映了克隆重组人 TGFβ1 在靶细胞 NIH/3T3 中的有效表达,此结果与 CCL-64 细胞生长抑制法所测克隆细胞上清液 TGF-β1 蛋白活性结果完全一致,更进一步证明了克隆表达 TGFβ1 蛋白的事实。

TBFβ1 功能广泛,它参与了胚胎的发育、损伤组织的修复、肿瘤的发生以及免疫系统自稳定和负调节作用[9];它在调控间质细胞分化、创伤愈合、肌肉、神经、骨骼、肝脏等组织器官的损伤修复方面具有较好的临床应用前景[10]。因此,我们克隆表达 rhTGFβ1 为进一步生产开发其重组产品及应用于基础和临床研究提供了资料。

参考文献

[1] Roberts A B, Sporn M B. The transforming growth factor-beta[A]. In: Sporn M B ed. Peptide growth factors and their receptors[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 417—419.

[2] Assoian R K. Purification of type-B transforming growth factor from human platelets[J]. Methods Enzymol, 1987, 146(13): 153.

[3] 龙建银,王会信,张宏权,等 . 人转化生长因子 β1 cDNA 在 COS-7 细胞中的表达[J]. 生物化学杂志, 1995, 11(4): 396—397.

[4] 李　勇,韩本立,李　昆,等 . 细胞生长抑制测定 TGFβ1 生物活性[J]. 第三军医大学学报, 1998, 21(2): 138—140.

[5] 金冬雁,黎孟枫 . 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版 . 北京:科学出版社, 1993. 350—353.

[6] Romeo D S, Park K, Roberts A B, *et al*. An element of the TGFβ1 5′-untranslated region represses translation and specifically binds a cytosolic factor[J]. Mol Endocrinol, 1993, 7(6): 759—761.

[7] 曹雪涛,章卫平,陈国友 . 肿瘤基因治疗的受体细胞研究进展[J]. 国外医学:肿瘤学分册, 1995, 28(2): 174—175.

[8] 从笑倩,夏顺汉,徐露霞,等 . 外源 TGFβ1 基因在小鼠 Es 细胞中的表达及其对细胞分化的影响[J]. 实验生物学报, 1995, 28(2): 174—176.

[9] Border W A, Ruoslahti E. TGFβ1 in disease: the dark side of tissue repair[J]. J Clin Invest, 1992, 90(1): 1—3.

[10] Rowe P M. Clinical potential for TGFβ1[J]. Lancet, 1994, 344(8 915): 72—74.

（编辑　冷怀明）

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