DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.003

粒-巨噬细胞集落刺激因子 cDNA在造血祖细胞中的表达

杜 楠* 王庆余 (第三军医大学附属新桥医院血液科)重庆,400037
刘 昕 章 波 纪贤文 (第三军医大学基础医学部分子生物学教研室)重庆,400038

提 要 目的:探索逆转录病毒介导的 GM-CSF cDNA在造血祖细胞中转移与表达。方法:采用电穿孔法将小鼠 GM-CSFcDNA重组逆转录病毒 pLXSN/GM和空载体 pLXSN转染病毒包装细胞 PA317,再将含有 GM-CSF重组逆转录病毒的细胞培养上清液感染富含造血干祖细胞群体,采用 PCR和 Southern blot分析培养细胞基因组中外源基因的整合,用 Dexter培养体系检测培养3周的各组细胞增殖数。结果:在含 G418的体外半固体造血祖细胞培养中,转染细胞表现出较多的抗 G418的粒-巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM),用 PCR和 Southern blot方法分别检测出转染细胞基因组中整合有 NeoR基因和 GM-CSF cDNA,在 Dexter培养中,GM-CSF修饰组的成熟非粘附细胞计数明显高于对照组($P<0.05$)。结论:GM-CSF重组逆转录病毒成功地转入造血祖细胞并获得了表达,为下一步体内基因治疗奠定基础。

关键词 逆转录病毒载体;基因转移;造血祖细胞;NeoR基因;粒-巨噬细胞集落刺激因子
中图法分类号 R551;Q75

逆转录病毒介导的基因转移是近年来发展起来的高效率基因转移技术,它是进行基因治疗、细胞增殖与分化等调控研究的主要技术之一。自从80年代以来,许多研究都致力于将造血生长因子基因导入造血细胞,试图治疗难治性血液系疾患[1]。本研究旨在将粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)cDNA逆转录病毒经 PA317细胞包装再感染造血祖细胞,用以研究其 GM-CSF基因治疗的可能性。

1 材料与方法

1.1 小鼠 GM-CSF cDNA逆转录病毒载体(pLXSN/GM)

由本室构建,参见文献[2]。

1.2 转染和病毒滴度测定

参见文献[2]的方法。

1.3 造血祖细胞的基因转移

将 BALB/c小鼠注射 150 mg/kg 5-氟脲嘧啶,4 d后进行颈椎脱臼法处死,无菌取股骨,用 RPMI1640培养液冲出骨髓细胞并经4号针头过滤,制成单个细胞悬液,用 Ficoll氏分层液(比重 1.075,pH5.1)密度梯度离心并分离,收集低密度的富含造血干、祖细胞群体[3]。培养 24 h后接种于含 20%小牛血清、15%小鼠肺条件培养液、25 ng/ml mIL-3和 mGM-CSF 4μg/ml Polybrene(Sigma)、PA317/GM-CSF和 PA317/pLXSN两组病毒上清液各 100μl及 RPMI1640(Gibco)培养液中培养 48 h,收集悬浮细胞,接种于半固体甲基纤维素培养基中。

1.4 CFU-GM 检测

采用甲基纤维素培养法进行 CFU-GM 培养,培养体系为 0.9%甲基纤维素、20%小牛血清、15%小鼠肺条件培养液、400 μg/ml G418、5×10⁵骨髓单个核细胞及 RPMI1640培养液,取 1 ml加至 3 cm平皿中,两组各重复9皿,对照组为无 G418组和未用 PA317转染组,37℃,5% CO_2培养 7 d,倒置显微镜下计数集落。转染效率=G418抗性集落数/未用 G418的集落数×100%。

1.5 长期骨髓细胞培养[4]

按1.3方法制备骨髓细胞液,将 2×10⁷有核细胞接种于含 12.5%小牛血清、12.5%马血清、10^{-6} mol/L氢化可的松及 10^{-4} mol/L 2-巯基乙醇的 RPMI1640中培养 10 d,以后3~5 d换液,去除悬浮细胞,待3~4周经传代培养,瓶底可见均匀贴避的骨髓基质细胞(BMS),用 0.25%胰酶消化,取 2×10⁵ BMS和 5×10⁴转染的骨髓细胞接种于 8 ml/6 cm皿含 15%小鼠肺条件培养液的上述液体中(称为实验组),对照组为 5×10⁴未转染的骨髓细胞,每周半量换液,第21天收集非粘附细胞(NAC)计数并瑞氏染色。

1.6 细胞基因组 DNA提取与外源基因整合鉴定

参见文献[2]的方法。

2 结果

2.1 逆转录病毒滴度测定

将重组质粒和空载体用电穿孔法转染 PA317细胞,经 G418筛选2周的克隆,培养扩增,收集不含 G418的上清液,两组上清液均使3T3细胞受感染而表现出大量 G418抗性克隆,计算病毒滴度,PA317/GM-CSF为 1.3×10⁵ CFU/ml,PA317/pLXSN为 5.2×10⁵ CFU/ml,结果表明重组质粒转染 PA317细胞后包装出具有感染靶细胞能力的病毒,并可介导其基因转移。

* 杜 楠 男,34岁,主治医师,博士研究生

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

2.2 造血祖细胞的基因转移

采用体外克隆生成实验检测造血细胞基因转染效率,将病毒上清液与骨髓细胞共同培养后,接种于含400μg/ml G418半固体培养基中,2周后可见形成的 CFU-GM 集落,而未经转染的造血细胞则无抗性克隆生成,计算逆转录病毒在骨髓细胞中的相对转移效率,见表1,表明重组质粒成功地转染了造血祖细胞。

表1 逆转录病毒在造血祖细胞中的基因转移效率($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Transfective efficiency of retrovirus into CFU-GM ($\bar{x}\pm s$)

Group	G418 colonies/colonies without G418	Transfective efficiency(%)
PA317/GM-CSF	74± 12/205± 47	36± 7
PA317/pLXSN	68± 14/211± 51	32± 5
PA317	0/194± 38	0

2.3 骨髓细胞长期培养

第2天对培养的各组 NAC进行计数,经 GM-CSF修饰的骨髓细胞组为(3.2± 0.6)× 10^6 NAC,对照组为(2.1± 0.4)× 10^6 NAC,两组相比差异有显著性($P<0.05$)。瑞氏染色主要为中性粒细胞和单核细胞,形态学变化不大。

2.4 外源基因在造血祖细胞基因组中的整合

应用 PCR和 Southern blot分别对转染的造血祖细胞 DNA进行 NeoR基因和 GM-CSF cDNA的特异性分析,结果可见 NeoR基因170 bp的 PCR产物电泳带和 NC膜上 GM-CSF cDNA的550 bp的杂交带,见图1、2,表明转染的造血祖细胞基因组中整合有重组逆转录病毒的 NeoR基因和 GM-CSF cDNA。

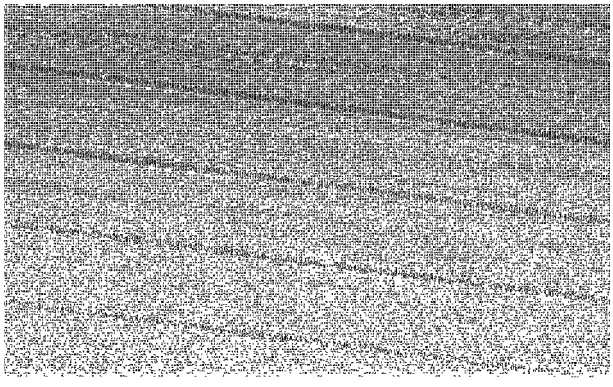


图1 **PCR检测 NeoR基因**

Fig 1 PCR analysis for NeoR gene

1. not transduced cells DNA
2, 3. transduced cells DNA
4. Marker PBR322-HinfⅠ

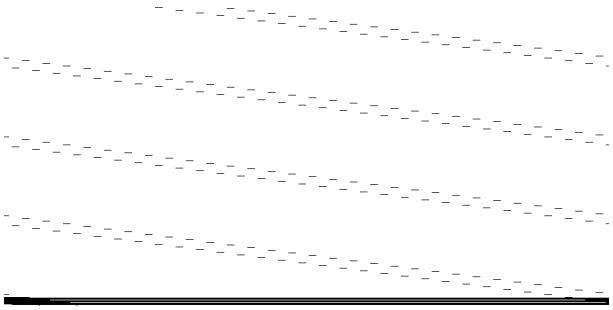


图2 **Southern blot检测细胞基因组中 GM-CSF cDNA**

Fig 2 Detection of the integrated GM-CSF cDNA in transduced cells by Southern bot analysis

1. pLXSN
2, 3. not transduced cells DNA
4. transduced cells DNA

3 讨论

现代研究表明 GM-CSF不仅具有促进多系祖细胞分化成熟并使外周血细胞增多作用,而且具有明显的抗辐射和耐受化疗作用[5],而放化疗引起的骨髓损伤直接限制了肿瘤的治疗。为了使 GM-CSF更好地发挥作用,克服 GM-CSF全身应用时需长期大剂量维持疗效且有副作用等缺点,因此,将 GM-CSF基因导入正常骨髓细胞可望达到骨髓保护的目的。然而,最初 Metcalf等[6]将 GM-CSF cDNA导入其依赖细胞 FD-CP1,再输入小鼠体内则出现白血病,推测由于 FD-CP1为基因异常的白血病前期细胞,导入 GM-CSF cDNA后表现出异常的自分泌现象而引起的白血病,随后,Chang等[7]将 GM-CSF cDNA导入骨髓细胞,然后输入体内,结果使外周血细胞明显增多,更重要的是没有恶性变。为此,Metcalf[9]修正了原来的观点,认为单独 GM-CSF修饰的造血细胞不足以诱导白血病。本实验利用5-FU对造血干细胞不敏感的特点,诱导 G_0期干细胞进入细胞周期,杀死已分化的细胞,增加了造血干祖细胞密度。利用造血干细胞的密度差异,通过密度梯度离心富集造血干、祖细胞群体。延长骨髓细胞与病毒上清液的共同培养时间,同时添加 mIL-3和 mGM-CSF以进一步提高感染效率。逆转录病毒感染后筛选出的 G418抗性克隆,表明了骨髓细胞整合有载体 NeoR基因并表达 NeoR基因的 G418抗性,经 PCR

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

和 Southern blot证实转染的造血细胞基因组中持续整合有外源 NeoR基因和 GM-CSF cDNA, Fraser等[9]用含 NeoR基因的逆转录病毒转染骨髓细胞,经 Dexter体系培养 4周,再输给致死剂量照射的小鼠, 7个月后取其骨髓可检测到 NeoR基因,表明 Dexter培养完全保持了造血干细胞的体内造血重建能力,并使之传代。本实验采用 Dexter培养体系,结果表明经 GM-CSF修饰的造血细胞组较未修饰组显示出有更强的促进造血细胞分化的作用,提示导入的 GM-CSF cDNA获得了表达 为下一步体内实验奠定了基础。

参考文献

1 Villeval J L, Rouver-Fessard P, Blumenfeld N *et al*. Retrovirus-mediated transfer of the erythropoietin gene in hematopoietic cells improves the erythrocyte phenotype in murine beta-thalassemia. Blood, 1994, 84(6): 928

2 杜　楠,刘　昕,王庆余等.小鼠 GM-CSF逆转录病毒载体的构建及在成纤维细胞中的表达.第三军医大学学报, 1996, 18(6): 518

3 Vsser J W N, Van Bekkum D W. Purification of pluripotent hemopoietic stem cells: past and present. Exp Hematol, 1990, 18(3): 248

4 Szilvassy S J, Cory S. Efficient retroviral gene transfer to purified long-term repopulating hematopoietic stem cells. Blood, 1994, 84(1): 74

5 Thierry D, Gourmelon P, Parmentier C *et al*. Haematopoietic growth factors in the treatment of therapeutic and accidenta irradiation-induced bone morrow aplasia. Int J Radiat Biol, 1995, 67(2): 257

6 Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood, 1986, 67(3): 257

7 Chang J M, Johnson G R. Effects on spleen colong-forming unit self-renewal after retroviral-mediated gene transfer of multi-colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, or granulocyte colony-stimulating factor. Exp Hematol, 1991, 19(4): 602

8 Metcalf D. Hemopoietic regulators. TIBS, 1992, 17(1): 286

9 Fraser C C, Szilvassy S J, Eaves C J *et al*. Proliferation of totitent hematopoietic stem cells *in vitro* with retention of long-term competitive *in vivo* reconstituting ability. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(9): 1968

(收稿: 1997-03-12;修回: 1997-08-11)

(编辑　张大春)

Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cDNA in the hematopoietic progenitor cells

Du Nan, Liu Xin, Wang Qingyu, Zhang Bo, Ji Xianwen (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To investigate the transfer and expression of retrovirus-mediated GM-CSF cDNA in the hematopoietic progenitor cells. Methods: Murine GM-CSF cDNA recombinant retrovirus pLXSN/GM was transferred into retrovirus-packaging cell line PA317 using electroporation and supernatant of cultured G418 resistant clones was used to infecto hematopoietic progenitor cells rich population. Transfection efficiency of NeoR gene was detected with G418 resistant CFU-GM test. NeoR gene and GM-CSF cDNA in the genome of the transforming cells were analyzed with PCR and Southern blot hybridization and the number of mature nonadherent cells was counted was counted in Dexter culture system. Results: Transfection efficiency of the retrovirus into CFU-GM was 36%. In the genome of the infected target cells, integrated NeoRgene and GM-CSF cDNA were successfully identified with PCR and Southern blot hybridization respectively. In Dexter culture system, the count of mature nonadherent cells was significantly higher in the GM-CSF-modified group than in the control. Conclusion: The recombinant plasmids are successfully transfected into and express well in the hematopoietic progenitor cells, which might provide a experimental basis for further studies on gene therapy.

Key words retrovirus; gene transfer; NeoR gene; hematopoietic progenitor cell; granulocyte-macrophage colony stimulating factor; mouse

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