DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.012

人凝血因子Ⅸ基因直接注射入小鼠骨骼肌内表达的进一步研究*

郭华阳** 刘 昕 王传松 王 燕 纪贤文 许平庆*** 吕银慧**** 王仁鹏*** 谭 骏 汪江华**
(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: 观察人凝血因子Ⅸ cDNA直接注入小鼠骨骼肌后的存在和表达部位。方法: 采用免疫组化和核酸杂交技术检测人Ⅸ因子 cDNA注入小鼠肌肉后的存在和表达情况。结果: 免疫组化和斑点杂交显示肌注4周时有Ⅸ因子的蛋白质和 mRNA表达。原位杂交显示肌注4周时局部肌细胞内仍有Ⅸ因子 cDNA存在。结论: Ⅸ因子 cDNA肌注4周时在局部肌细胞内仍存在并有较高的表达。

关键词 基因治疗; 人凝血因子Ⅸ
中图法分类号 R459.9

随着基因治疗技术的不断完善,人们已开始将其用于临床。国内薛京伦等[1]率先在国际上开展了血友病 B的基因治疗。目前基因治疗多采用二步法或称 ex-vivo的方法[2]。该方法技术路线较为复杂,费用较高。Wolff等[3]发现质粒 DNA直接注入小鼠骨骼肌可以获得长时间表达,这一结果使人们提出了基因治疗中应用质粒 DNA直接注射法的设想(即一步法[4])。我室曾将Ⅸ因子基因直接注入小鼠骨骼肌中,其后14 d在小鼠外周血中检测到人Ⅸ因子[5]。本研究进一步观察了注入Ⅸ因子 cDNA的表达及其存在部位。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pKG$_5$-Ⅸ由英国牛津大学 Brownlee G G赠送;鼠抗人Ⅸ因子单抗 3A6(一抗)由日本奈良医学院 Yoshioka教授赠送;生物素标记的兔抗鼠 IgG抗血清(二抗)购自美国 Vector公司; DEPC购自华美生物工程公司;地高辛配基标记及检测试剂盒和限制性内切酶均购自德国 BM公司。

1.2 小鼠骨骼肌注射方法及取材

30只小鼠,分3组,每组10只。实验组: 在每只小鼠左后肢肌注 pKG$_5$-Ⅸ质粒 50μg;对照组: 肌注空载体 pKG$_5$质粒 50μg;空白对照组: 每只小鼠左后肢注射生理盐水 200μl 注射后单笼饲养。于注射后第2l天和第28天作腹腔麻醉,心脏灌注固定后取肌肉组织。

1.3 免疫组化检测小鼠肌肉组织中人Ⅸ因子

取固定后的肌肉组织作冰冻切片(10~ 15μm),用 PBS漂洗, Triton X-100消化, BSA封闭,加 1∶2000一抗在 37℃孵育 30 min后置 4℃ 45 h,漂洗。1∶2000二抗 37℃ 30 min,漂洗后加入 ABC复合物(1∶100) 37℃ 60 min,漂洗, DAB显色。

1.4 原位杂交检测注入小鼠肌肉中的Ⅸ因子 cDNA存在部位

取固定后的肌肉组织作冰冻切片(10~ 15μm),基本参照谭骏等[6]的方法进行。漂洗后用 0.2 mol/L盐酸处理。再漂洗后用蛋白酶 K消化。漂洗后42℃预杂交 1 h, 95℃变性 10 min,迅速置冰上 5 min,然后,加含地高辛配基标记的 pKG$_5$-Ⅸ cDNA探针的杂交液,在湿盒内 42℃杂交约 16 h。

1.5 mRNA斑点杂交

按常规方法(异硫氰酸胍法)抽提肌肉组织总 RNA,以地高辛标记的Ⅸ因子 cDNA探针(1.6 kb)进行斑点杂交。

2 结果

2.1 免疫组化结果

pKG$_5$-Ⅸ注入小鼠肌肉组织 21和 28 d时,在小鼠肌肉组织切片上肌细胞内外均观察到了棕黄色的阳性信号,同时在血管周围也观察到了大量聚集的阳性信号,见图1。表明注射Ⅸ因子 cDNA 4周后,注射部位的肌肉细胞仍在合成、分泌人Ⅸ因子。阴性对照见图2。

2.2 原位杂交结果

对用免疫组化方法观察到有Ⅸ因子表达的肌肉组织切片作原位杂交,发现: 注射部位有大量表明注入的人Ⅸ因子 cDNA仍存在的阳性信号,这些阳性信号均存在于肌细胞内。肌细胞外未观察到阳性信号,见图3 阴性对照见图4。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39600175
** 郭华阳,男, 31岁,讲师,硕士,现在医学检验系临床生物化学教研室
*** 基础医学部病理学教研室 **** 中心实验室

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

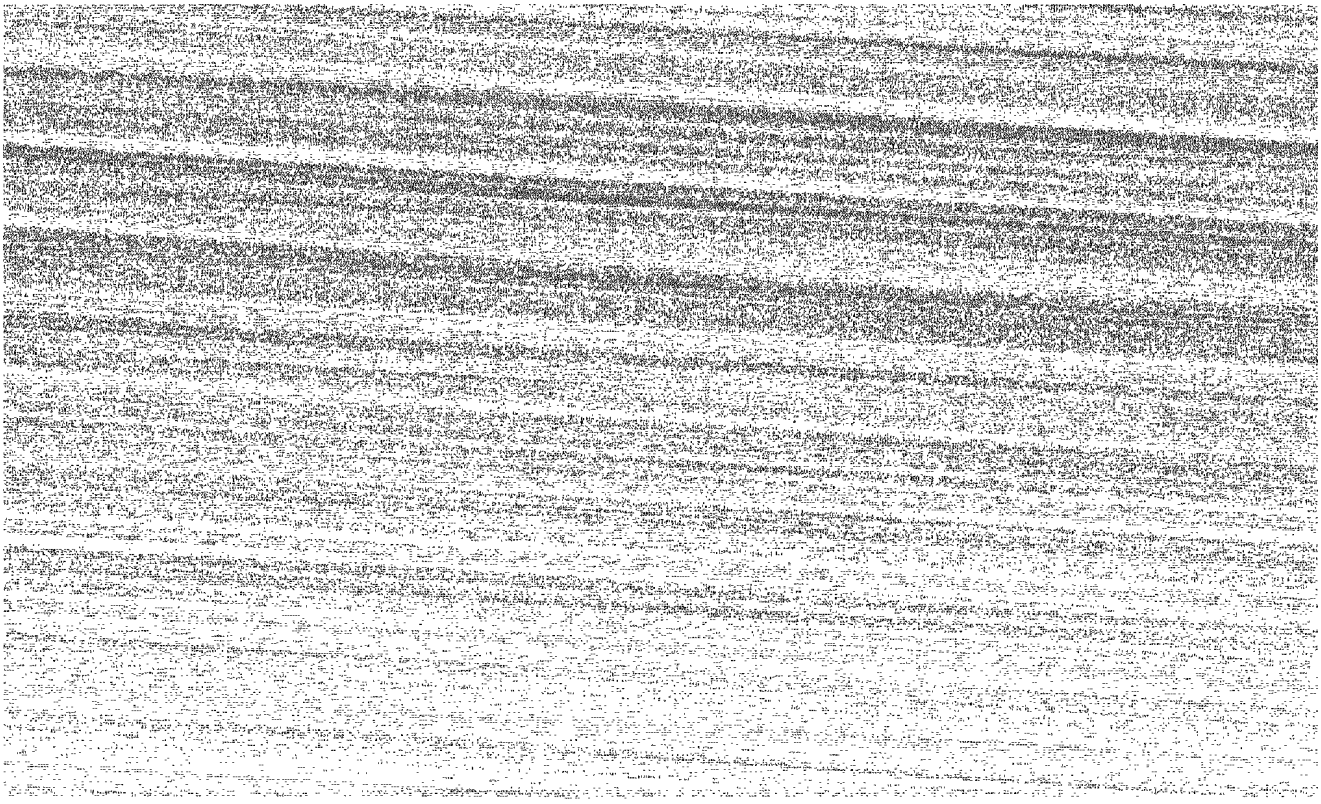


图1 注射人凝血因子Ⅸ cDNA小鼠骨骼肌切片免疫组化结果 ↑:人Ⅸ因子 (ABC× 40)

Fig 1 The human clotting factor Ⅸ (↑) presented in the mice muscles injected with the cDNA of factor Ⅸ (immunocytochemistry× 40 ABC method)

图2 正常小鼠骨骼肌切片免疫组化结果(阴性对照) (ABC× 40)

Fig 2 Negative control (immunocytochemistry× 40 ABC method)

图3 注射人凝血因子Ⅸ质粒小鼠骨骼肌切片原位杂交结果 ↑:注入的质粒 DNA(原位杂交× 100)

Fig 3 *In situ* hybridization of human clotting factor Ⅸ cDNA plasmid in the mice muscles injected (*in situ* hybridization× 100)

图4 正常小鼠骨骼肌切片 (原位杂交× 100)

Fig 4 Negative control (*in situ* hybridization× 100)

2.3 mRNA斑点杂交结果

注射后2和28 d时,注射部位的肌细胞中仍存在人Ⅸ因子cDNA转录的 mRNA(图略)。

以上结果显示,注入小鼠骨骼肌中的人Ⅸ因子 cDNA主要是进入注射局部的肌肉细胞后,在肌细胞内表达Ⅸ因子,而后分泌至细胞外。

3 讨论

与两步法相比,基因直接注射法的优越性是显而易见的:① 简便易行,易于被病人接受。② 避免使用病毒载体可能招至的副作用。③ 安全。其缺点同样也是有的:机理欠清楚,结果不易控制;表达量偏低。因此,目前人们对这一方法也持有保留的看法。从我们的实验结果来看:肌细胞的确具有摄取(或被动进入?)和表达外源 DNA的能力。但何种目的基因、何种载体适合用于这种方法?其表达水平有无可能达到治疗的要求等重要问题尚缺乏系统深入的研究。就表达时间而言,不论是从我们的结果,还是根据国外的结果来看是可以达到临床治疗的要求。Wolff等[3]曾观察到注入的报告基因在19个月后仍有表达,我们的结果也表明注射到肌肉中的质粒 DNA在注射局部存留表达的时间至少有4周。

直接注射到肌肉组织中的质粒 DNA的表达机理现在还不是很清楚[7]。可以肯定的是肌肉细胞具有接受和表达外源质粒 DNA的能力。但外源 DNA进入肌细胞的具体方式、影响因素、质粒 DNA的转录部位、转录和翻译的调控等问题均有待于进一步研究,从而

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

推动基因直接注射研究工作的发展和应用。

参考文献

1 薛京伦,卢大儒,周洁民等.成纤维细胞基因治疗血友病 B的临床I 期试验.中国科学,1993,23(1):L53

2 刘　昕,谭　骏,朱锡华.体内基因转移方法研究进展.中华医学遗传学杂志,1994,11(1):26

3 Wolff J A, Ludtke J J, Acsadi G *et al*. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. Human Molecular Genetics, 1992, 1(3): 363

4 麦　跃,谭　骏,李文维.基因治疗的新策略——外源基因直接注射法.国外医学:遗传学分册,1993,16(2):66

5 谭　骏,王　燕,薛京伦等.人凝血因子IX基因直接注入小鼠骨骼肌中瞬间表达的初步研究.科学通报,1993,38(20):1918

6 谭　骏,刘　昕.基因工程原理及实验操作技术.北京:科学技术文献出版社,1994.126~128

7 Dowty M E, Wolff J A. Possible mechanisms of DNA uptake in skeletal muscle. In: Wolff J A, Gene Therapeutics: Methods and Applications of Direct Gene Transfer. Bir Rhzauser Boston Publishing Co, 1994. 82~105

(收稿:1996-08-23;修回:1997-05-12)

(编辑　汪勤俭)

Localization and expression of human clotting factor IX cDNA after its direct injection into the skeletal muscle in mice*

Guo Huayang, Liu Xin, Wang Chuansong, Wang Yan, Ji Xianwen, Xu Pingqing, Lu Yinghui, Wang Renpeng, Tan Jun, Wang Jianghua (Department of Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To observe the location and expression of human clotting factor cDNA after its direct injection into the skeletal muscle in mice. **Methods**: Immunohistochemistry and nucleic hybridization were applied. **Results**: 4 weeks after the injection, the expression of protein and mRNA of the factor were seen and the factor still existed in the local cells. **Conclusion**: The existence and high expression of human clotting factor IX cDNA are still seen at the 4th week after its direct injection into the skeletal muscle.

Key words gene therapy; human clotting factor IX; expression; mouse

* This project was supported by the National Science Foundation of China No. 39600175

(上接414页)

患者血清效价:患者血清加 ccddee细胞效价木瓜酶法、抗球蛋白法均为64,木瓜酶积分为6分,抗球蛋白法积分为54分。同 CcDEE效价为2,积分为10分。

3 讨论

因输血产生 Rh同种抗体,以抗-D 抗-E较为常见,而抗-Ce 抗-e少见,我们在实验中发现患者除了同自身细胞不凝集外,同 ccDEE细胞也不发生凝集,血清用 ccddee细胞吸收后,放散液同 ccddee细胞发生凝集、同 CcDEE细胞也发生凝集。用 CcDEE细胞吸收后,放散液同 CcDEE细胞及 ccddee细胞均发生凝集,说明患者所产生的抗体有抗-Ce抗体。因为抗-C效价为2,我们用 CcDEE细胞吸收多次都无法吸收掉抗-C,而用1:5稀释血清,可将抗-C稀释,以致与只含 C抗原,不含 e抗原的红细胞不发生凝集,因此我们认为血清中有抗-e抗体。患者所产生的抗-Ce是否同 O型血清中的抗-AB抗体一样,具有两种特异性而结合成不可分割的抗体[1]?文献报道红细胞表面表现 Rh活性物质可能有很多可细分的亚抗原,每个基因或基因复合物决定一系列相关的表面结构,结构中某些部分比其他部分更有可能引起免疫应答。基因 R1(CDe)含有 Ce(rhi)一种顺式产物[2],我们认为是患者在输了含有 CDe顺式产物的抗原,而产生了不可分割的 Ce抗体。实验结果同杨春清[3]抗-Ce 抗-e引起配血不合1例报道相符。抗-Ce效价常不高,但该患者抗-e效价64,我们认为是输有纯合子的 CDe/CDe抗原所致,因为中国人 Rh血型 CCDee抗原占46%,纯合子抗原性较强,而且该患者在第二次住院后仍然用盐水法配血,输血后刺激肌体产生回忆性免疫应答,导致抗体效价上升。因此我们再次强调:为了临床输血安全,达到治疗目的。一定要用酶法、抗球蛋白法等配血方法,以检测不完全抗体。

关键词　抗-Ce;抗-e;疑难配血

中图法分类号　R457.11

参考文献

1 陈　患.问与答.中国输血杂志,1991,4(2):68

2 吕　鹏 主编.最新输血技术学.北京:人民卫生出版社,1994.64~65

3 杨春清.抗-Ce 抗-e引起配血不合1例报告.中国输血杂志,1992,5(1):40

(收稿1996-12-04修回:1997-02-08)

(编辑　王　红、沈锡庚)

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