DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.035

细胞组成的免疫屏障。机械屏障的完整和免疫屏障功能的正常发挥及两方面作用的相互协调是维持粘膜屏障有效性的基础。放射及其它各种创伤以及粘膜疾病都会影响屏障功能的正常发挥,导致肠源性感染的发生。如何维持粘膜免疫功能的正常发挥,并促进肠上皮细胞的修复,成为防治肠源性感染的关键问题。上皮内淋巴细胞(Intraepithelial lymphocyte, IEL)在粘膜免疫中具有独特的作用,其所在位置是整个免疫系统中与肠腔抗原最接近的免疫细胞,同时 IEL和上及细胞毗邻,与粘膜免疫状态及肠上皮再生修复之间存在密不可分的关系。近来发现 IEL与肠上皮细胞间存在双向的免疫生理调节。由此本研究希望通过了解射线对 IEL的结构和功能造成怎样的损伤,进一步研究其对肠上皮细胞的影响,探寻改善粘膜免疫促进损伤肠上皮细胞修复的途径。

实验采用昆明种小鼠,^{60}Co r射线一次性全身照射 3、8、12 Gy为模型,时相点选择受照后 8、24、48、72 h以及 7和 15 d,采用病理学、免疫学和分子生物学方法,进行了 4个部分的研究:① 全身照射后小肠粘膜上皮细胞及 IEL的数量和病理形态变化特点;② 全身照射后小肠粘膜 IEL功能变化的动态观察;③ 射线对影响上皮生长的相关基因 TNF-α和 TNFβ$_2$ mRNA表达的影响;④ IEL培养上清对小肠上皮细胞株生长的影响。主要结果和结论如下:① 全身照射使 IEL数量减少,3种剂量均呈现出伤后 8 h下降,48~ 72 h达最低值,7 d回升,至 15 d至正常的变化过程。各剂量组无显著组间差异,但 8 Gy组较 3 Gy组恢复慢,12 Gy组未待回升动物死亡;② 肠上皮发生符合于骨髓型和轻型肠型放射病的病理变化,电镜观察发现 IEL与肠上皮细胞相互紧贴,有些部位呈"犬牙交错"状,IEL可以"芽突"伸入肠上皮细胞内,这是两种细胞密切关联的超微结构基础;12 Gy照射后 IEL在受损以至坏死的过程中可能损害与之相紧贴的肠上皮细胞(溶解胞膜使胞浆融接);③ 全身照射后 IEL功能受抑,表现为增殖活力和细胞毒力下降,其变化过程和数量减少一致。正常小鼠分离的 IEL受 1~ 10 Gy离体照射后也发生增殖活力的明显抑制,1 Gy照射后即显著下降,3~ 8 Gy间呈相对低值平台区;④ 全身照射后 IEL分泌 TNF-α和 TGFβ增多,也呈现为 8 h升高,48~ 72 h达高峰,15 d仍未下降至正常值的过程。以斑点杂交图像分析扫描研究发现,这两种因子在蛋白质 mRNA转录水平上增高,这是 IEL分泌 TNF-α和 TNFβ增多的分子基础。⑤ 受照小鼠 IEL培养上清能抑制体外培养的正常肠上皮细胞的生长,对受照肠上皮细胞的抑制更为加重,产生抑制作用最强的时间于 3 Gy和 8 Gy组为伤后 72 h,12 Gy组提前为 48 h这与 IEL功能受抑的最低点时间相吻合。

综上所述,放射损伤引致 IEL数量减少,结构破坏,功能降低,从而造成肠粘膜免疫功能的下降,受损 IEL并能抑制肠上皮细胞的生长,从而共同导致肠道屏障功能的削弱。TNF-α和 TGFβ基因可能参与其中。可见深入研究粘膜免疫和上皮再生修复的关系,将有助于揭示粘膜免疫对肠上皮细胞的免疫生理调节,对多种肠道损伤(放射、放射复合伤、腹部放疗等)疾病状态下促进肠上皮细胞修复,防治肠源性感染,均具有重要的理论和实践意义。

关键词 放射损伤;肠上皮细胞;肠源性感染;粘膜免疫;细胞因子;上皮内淋巴细胞;细胞增殖;细胞毒力;基因表达;IEC-6;TNF-α;TGFβ

中图法分类号 R818.02

(收稿: 1997-12-05;修回: 1997-12-15)

(编辑 冷怀明)

癌细胞 mtDNA一级结构及 mtDNA片段核内自发整合效应的研究*

Studies of the primary structure of mitochondrial DNA from carcinoma cells and the effects of mitochondrial DNA fragments auto-integrated into nuclear genome

胡义德** 钱桂生 陈维中 李淑平 王关嵩 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆,400037

线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)缺乏组蛋白保护,其损伤修复系统也不完善,因此,它是各种致癌物作用的特异性靶分子。关于癌细胞 mtDNA形态、数量及功能变化的研究已有报道。但至今还没有发现 mtDNA与细胞癌变直接相关的有力证据。为了进一步了解 mtDNA损伤与突变在细胞癌变中的地位和作用机制,本实验采用限制片段长度多态性(RFLP)分析、聚合酶链反应-RFLP(PCR-RFLP)分析及 PCR产物直接序列分析方法,对癌细胞 mtDNA一级结构的变化规律进行了探讨;同时,采用荧光原位杂交(FISH)和基因转染方法,探讨了 mtDNA片段转染后诱发小鼠胚胎纤维母细胞 NIH3T3(NIH3T3)恶性转化的效应和作用机制。研究结果如下:

(1)建立了简便、快速制备各种单细胞及组织 mtDNA的方法(称为一步法)。用该方法所得 mtDNA样品的限制酶切图谱与人 mtDNA剑桥序列各相应酶切图谱相一致,而且 mtDNA的产量高,无核 DNA污染,可以满足酶切、PCR测序及转染等工作的需要。

(2)用 HindⅢ、EcoRⅠ、XhoⅠ、BstEⅡ、PvuⅡ、BclⅠ、Pst

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39500173

** 胡义德,男,32岁,主治医师,讲师,博士研究生

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

Ⅰ、XbaⅠ、EcoRⅤ、HpaⅠ、ScaⅠ共 11种限制性内切酶,分析了包括人肺腺癌 SPC-A-1、A531、PLA-801D、A549,人肝细胞癌 SMMC-7721和人膀胱上皮癌 EJ共 6个癌细胞系 mtDNA的 RFLP变化,并根据双酶切结果,构建了 SPC-A-1细胞 mtDNA限制酶切图谱。结果发现,6个癌细胞系其 mtDNA基因编码区的 32个酶切位点均无变异,而有 3个癌细胞系在其 mtDNA非编码区第 16276位核苷酸处出现了 EcoRⅤ新的酶切位点。

(3) mtDNA基因编码区的细胞色素氧化酶亚单位Ⅱ(CoⅡ)和 ATP酶亚单位 8加 6(ATPase8+6)基因 PCR产物 RFLP(HaeⅢ)分析,与 16例患者外周血白细胞 mtDNA相应基因 PCR-RFLP分析结果对比,发现 6个癌细胞系其 mtDNA该基因核酸片段均未出现明显多态性。

(4)测序结果显示,癌细胞 mtDNA基因编码区碱基突变率为 0.58%,显著低于正常人群突变率(0.9%);而基因非编码区碱基突变率为 3.39%,尤其是 SPC-A-1、A531、SMMC-7721共 3个癌细胞系和 2例肺癌患者白细胞,其 mtDNA非编码区的重链复制起点及其相邻的 D环区碱基突变率达 6.43%,并发现了多个 C→T核苷酸突变和 GGCC序列。

(5) FISH分析结果显示,在 6个癌细胞系的部分中期染色体或间期细胞核中,检测出了 mtDNA探针的阳性杂交信号,而原代培养人皮肤成纤维细胞无阳性杂交信号。

(6)将 mtDNA 1626 bp目的基因片段导入 NIH3T3细胞胞质中,在转染后 1周的部分培养细胞核中发现有目的基因探针的阳性杂交信号;转染后 2周的培养细胞获得了在裸小鼠皮下形成移植瘤的能力;病理观察发现移植瘤的病理表现与纤维母细胞肉瘤的特征相一致。

结果表明:① 本组癌细胞系的 mtDNA基因编码区核苷酸序列非常保守,而主要的核苷酸变异则位于其非编码区,尤其是 mtDNA非编码区重链复制起点及其相邻的 D环区碱基序列的特征性突变可能与细胞癌变或癌的易感性有关。② 癌细胞核基因组中存在 mtDNA的同源序列,这些同源序列的出现可能与细胞癌变密切相关。③ 基因转染实验进一步证明了 mtDNA片段在核基因组中的自发整合是促发细胞癌变的又一因素。

关键词 线粒体 DNA;结构;突变;自发整合;核 DNA;恶性转化

中图法分类号 R73-3

(收稿: 1997-11-06;修回: 1997-12-14)

(编辑 王 红)

单克隆抗体 3D3轻重链可变区基因克隆及其在 E. coli中表达*

Cloning and expression in E. Coli of the VH/VL gene of monodonal antibody 3D3

史依仁** 郭先健 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所)重庆,400037

从鼠抗人肺癌单克隆抗体 3D3杂交瘤细胞中分离出其轻重链可变区基因,并表达制备其 ScFv融合蛋白,为进一步研究其结构功能及应用奠定基础。单克隆抗体 3D3(McAb3D3)重链可变区基因 cDNA克隆及测序:以 McAb3D3杂交瘤细胞总 RNA为模板,以设计合成引物 VH For、VH Back进行逆转录 PCR扩增,电洗脱法回收扩增特异± 360 bp DNA片段,以 SmaⅠ XbaⅠ双酶切 VHcDNA及 puc18/puc19,电穿孔法转染 JM109菌,筛选、鉴定,双脱氧末端终止法对重组质粒 puc18 H/puc19 H进行测序;以相同方法,以设计合成轻链可变区引物 VLFor、VLBack,扩增轻链可变区基因 cDNA(VLcDNA),以粘末端方式将 VLcDNA克隆至 puc18,双脱氧末端终止法对重组 puc18L进行三轮测序;表达载体 pIgscFV构建及其在 BL21菌中表达:① SmaⅠ XbaⅠ分别消化 puc18 H及 pIg20质粒,以粘末端方式,将 VHcDNA克隆至 pIg20质粒,电穿孔法转染 BL21菌,筛选、鉴定,阳性子命名为 pIg VH;② 以 BglⅡ、NcdⅠ分别酶切 pIg VH及 VLcDNA,将 BglⅡ-VLcDNA-NcdⅠ片段克隆至 pIg VH,构建 pIgScFv表达载体,筛选,鉴定;③ 电穿孔法,将 pIgScFv转染 BL21菌,IPTG诱导培养,超声破菌法分级分离表达产物,SDS-PAGE电泳对表达产物进行检测,间接免疫荧光法对表达 ScFV融合蛋白活性进行检测。

双脱氧末端终止法测序结果显示: McAb3D3 VHcDNA全长序列为 354bp,编码 118个氨基酸,CDR1、CDR2、CDR3分别有 5、17、9个氨基酸残基,同源性分析显示: VHcDNA与小鼠 Ig重链可变区基因有较高同源性,与其它基因不存在显著意义同源,VHcDNA编码氨基酸序列与小鼠 Ig重链可变区Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ组同源性分别为 40%、71%、49%、60%,进一步比较与小鼠 IgⅡ(A)、Ⅱ(B)、Ⅱ(C)亚组同源性分别为 60%、63%、78%,JH基因编码氨基酸序列符合 JH_2基因编码氨基酸序列特点。因此,McAb3D3 VH基因是由 VH-D-JH_2基因重排而成;VLcDNA全长序列为 330 bp,编码 110个氨基酸,同源性检索显示,VLcDNA与小鼠免疫球蛋白轻链可变区基因同源性达 75%~85%,与其它基因无显著意义同源,其 CDR1、CDR2、CDR3分别有 11、6、9个氨基酸残基,其编码氨基酸序列与小鼠 Ig轻链各亚组Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ同源性分别为 50%、54%、55%、57%、73%,其 JK基因编码氨基酸序列符合 JK_2组氨基酸序列特点。因此,McAb3D3 VL基因系 V_K-JK_2基因重排而成,属小鼠免疫球蛋白 VL基因Ⅴ亚组;含 pIgScFv载体 BL21菌,经 IPTG诱导培养,分级分离产物 SDS-PAGE电泳见有 35 kD左右蛋白泳

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39300015

** 史依仁,男,31岁,住院医师,博士研究生

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