DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.020


# 小鼠 GM-CSF cDNA重组逆转录病毒的构建及在成纤维细胞中的表达

杜 楠 王庆余 (第三军医大学附属新桥医院血液内科)重庆, 630037
刘 昕 王 燕 章 波 纪贤文 (第三军医大学基础部分子生物学教研室)重庆, 630038

提 要 为探索粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)基因治疗的可能性,将小鼠 GM-CSF cDNA重组于缺陷型逆转录病毒载体 pLXSN中,重组质粒转染病毒包装细胞 PA317,经 G418筛选,用其抗性克隆培养上清液感染小鼠成纤维细胞 NIH3T3,筛选出抗 G418的转化细胞克隆,用 PCR和 Southern blot证明转化细胞的基因组中整合有 NeoR基因和 GM-CSF基因,原位杂交显示转化细胞有较强的 GM-CSF mRNA表达,用骨髓细胞增殖法和 CFU-GM检测也表明转化细胞分泌有较多的 GM-CSF,该研究为下一步在动物体内进行 GM-CSF基因治疗的研究奠定基础。

关键词 逆转录病毒载体;粒-巨噬细胞集落刺激因子;基因转移;成纤维细胞
中图法分类号 Q75

逆转录病毒载体介导的基因转移技术是当前基因治疗研究中较成熟的基因转移的方法之一[1],当前基因治疗的临床和实验研究多采用了这一体系。

粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)是具有广谱活性的造血生长因子,它不仅对造血前体细胞的增殖与分化是必需的,对成熟血细胞的生存和发挥其功能也必不可少。同时,有人发现将 GM-CSF cDNA转入肿瘤细胞表达后,可激起机体对该肿瘤细胞的免疫应答反应[2]。因此,用 GM-CSF调控机体的造血功能,或用其制备肿瘤基因疫苗,都有重大意义。本研究旨在将重组的 GM-CSF逆转录病毒载体经包装后感染小鼠成纤维细胞并证实其可以在细胞内表达,为进一步研究 GM-CSF基因治疗的可能性奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 小鼠 GM-CSF cDNA重组逆转录病毒的构建

从含完整序列的 GM-CSF cDNA的重组质粒 pEMBL8/GM(Metcalf教授惠赠)中用 BamHI酶切下 550 bp的 GM-CSF cDNA片段,经电泳洗脱法回收后与经相同酶切、回收的 5.84 kb逆转录病毒载体 pLXSN(Miller教授惠赠),按摩尔比 3∶1连接,转化 MC1061菌后,快提转化子质粒,根据分子量大小及酶切图谱鉴定阳性重组子及插入片段方向。

### 1.2 细胞培养

逆转录病毒包装细胞 PA317细胞及小鼠成纤维细胞 NIH3T3(本校分子生物学教研室提供),上述细胞均在含 10% FCS的 DMEM(Gibco)中常规培养。培养条件: 5% $CO_2$, 37℃。

### 1.3 转染

采用电穿孔法,将 pLXSN/GM和 pLXSN各 5μg与对数生长期的 1×10⁶ PA317细胞混匀后给予电击,电压为 400 V,再将其分散到 4个直径 6 cm的平皿中培养, 48 h后换含 400μg/ml G418(Sigma)的培养基, 10 d~14 d时肉眼可见白色克隆,用克隆环挑取单个克隆(PA317/GM CSF和 PA317/pLXSN)扩增并计数克隆总数,收集不含 G418的培养上清液,过滤后备用。

### 1.4 逆转录病毒效价的测定[3]

以 NIH3T3细胞为指示靶细胞, 5×10⁴个/皿,将各病毒上清液按 1∶10连续稀释 4次,并加入 6 mg/L polybrene(Sigma) 48 h后换液加 G418(400 mg/L), 2周后克隆形成, Giemsa染色后,计算病毒效价(CFU/ml)为: 每孔克隆数×上清液稀释倍数,并收集不含 G418的培养上清液于-20℃冻存备用。

### 1.5 感染靶细胞

方法同上述,并挑取阳性克隆(3T3/GM-CSF和 3T3/pLXSN),在 G418选择下,扩增培养,为使转化细胞能表达更多的 GM-CSF,对阳性克隆细胞进行了长时间重复感染。

### 1.6 外源基因在 NIH3T3细胞中整合的鉴定

按文献[4]方法提取培养细胞基因组 DNA. PCR检测 NeoR基因: NeoR基因引物(产物 170 bp)引物 1: 5′-CCAGGCGTCAAGGCGCGCATGA-3′; 引物 2: 5′-TCACGGGTAGCCAACGCTATG-3′。反应条件: 95℃ 10 min,加 Taq酶 2 u,接着 72℃ 2 min,然后在 PCR仪内进行 28个循环反应(93℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min),延伸 72℃ 10 min, PCR产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

Southern blot分析: 细胞基因组 DNA经 BamHI酶切, Southern印迹转膜后以地高辛标记的 GM-CSF cDNA片段为探针进行杂交,具体方法参照文献[4]。

### 1.7 原位杂交检测转化细胞 GM-CSF mRNA的表达

采用地高辛标记的 GM-CSF cDNA探针并按培养细胞盖玻片原位杂交方法[5]进行并应用图像扫描测定积分光密度值(A)。

### 1.8 转化细胞上清液 GM-CSF生物学活性的测定

收集 G418抗性转化细胞培养上清液,采用小鼠骨髓有核细胞 $^3$H-TdR掺入法和 CFU-GM形成法测定 GM-CSF生物学活性。

## 2 结果

### 2.1 重组逆转录病毒载体的构建

将重组子经 BamHI酶切可见一约 550 bp的 GM-CSF cDNA

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

片段见图 1,再将重组子经 PstI酶切,得到 35号正向插入子并称之为 pLXSN/GM,及 33号反向插入子,见图 2 结果表明,我们成功地将完整序列细胞的 GM-CSF cDNA克隆于 pLXSN的多克隆位点上,并受 5′-LTR调控 因此,重组子构建正确



图 1　BamHI酶切重组子

**Fig 1　Electrophoresis of recombinant plasmids digested with BamHI**

1. Marker. HindⅢ digested λ DNA
2. BamHI digested recombinant plasmids
3, 4. pLXSN



图 2　重组子插入片段方向的鉴定

**Fig 2　Characterization of direction of recombinant plasmids digested with pstI**

1. Marker. PBR 328-BamHI, BglI, HinfI
33. Antisense combinant
35. Sense combinant

## 2.2　逆转录病毒效价的测定

将 pLXSN/GM和 pLXSN用电穿孔法转染 PA317细胞,经 G418筛选并用其上清液感染 3T3细胞,计算病毒效价,PA317/GMCSF为 1.3× $10^5$ CFU/ml, PA317/pLXSN为 5.2× $10^5$ CFU/ml 结果表明 2组质粒转染 PA317细胞后均包装出具有感染靶细胞能力的病毒,并可介导其基因转移。而 3T3细胞受感染后产生 G418抗性克隆培养上清液则未能再感染 3T3细胞,表明辅助病毒的感染能力为阴性。

## 2.3　外源基因在成纤维细胞基因组中的整合

采用 PCR方法 PA317/GM-CSF和 3T3/GM-CSF细胞 DNA进行 NeoR基因分析,结果 PA317/GM-CSF和 3T3/GM-CSF组均可见到 170 bp外源性 NeoR基因的 PCR产物电泳带,见图 3 Southern blot分析,如图 4所示,3T3/GM-CSF细胞可见一约 550 bp的杂交带,以上结果表明转化的 3T3细胞基因组中整合有重组质粒的 NeoR基因和 GM-CSF cDNA

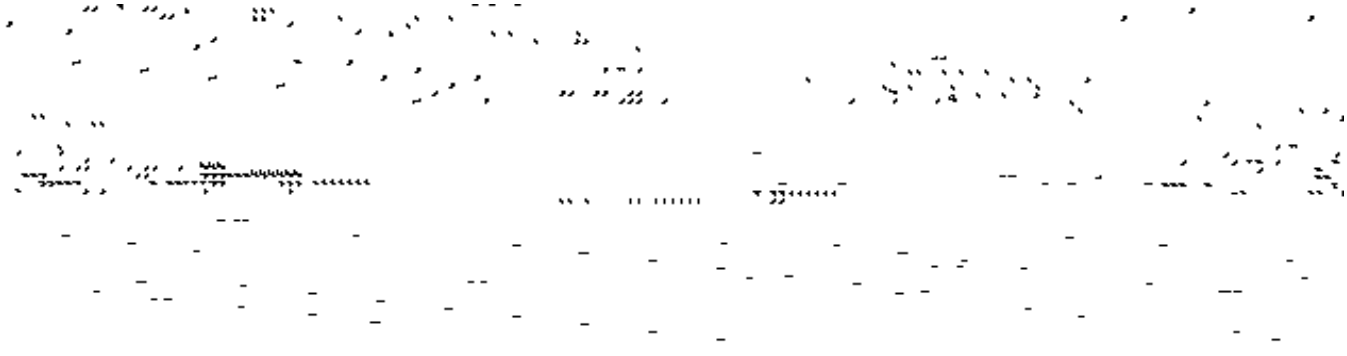


图 3　PCR检测细胞基因组外源 NeoR基因

**Fig 3　PCR analysis for NeoR gene**

1. PBR322-HinfI
2. PA317/GM-CSF DNA
3. 3T3/GM-CSF DNA
4. 3T3 cells DNA



图 4　Southern blot分析细胞基因组中 GM-CSF cDNA的整合

**Fig 4　Detection of the integration of foreign insert fragment in transfectants by Southern blot analysis**

1. 3T3/GM-CSF cell DNA
2. Position control (pLXSN/GM)
3. 3T3 cells DNA

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

### 2.4 转化细胞中 GM-CSF mRNA的表达

采用地高辛标记 GM-CSF cDNA探针进行培养细胞盖玻片原位杂交,见图5结果显示转染 GM-CSF cDNA的3T3细胞有较强的 GM-CSF mRNA表达,光镜下胞浆布满玫瑰色的颗粒状沉着,核空染,而少数未能转化的3T3细胞出现胞浆呈淡棕色沉着,图像定量分析转化细胞为(8815± 1982.43) $A$,3T3细胞为(2100± 211.10) $A$,3T3/pLXSN组为(2091.5± 177.62) $A$,3T3/GM-CSF组与对照组相比差异非常显著($P<0.01$),表明转化细胞获得 GM-CSF mRNA的表达。

### 2.5 转化细胞上清液 GM-CSF生物学活性的检测

采用 CFU-GM形成法和$^3$H-TdR掺入法检测转化细胞上清液 GM-CSF活性。结果表明转化细胞上清液 GM-CSF生物学活性明显高于对照组($P<0.01$),并且不同稀释度的上清液对骨髓细胞的增殖和 CFU-GM形成有量效关系,见附表。而3T3与3T3/pLXSN组相比差异无显著性($P>0.05$),表明 GM-CSF cDNA在靶细胞中获得 GM-CSF生物学活性的表达。

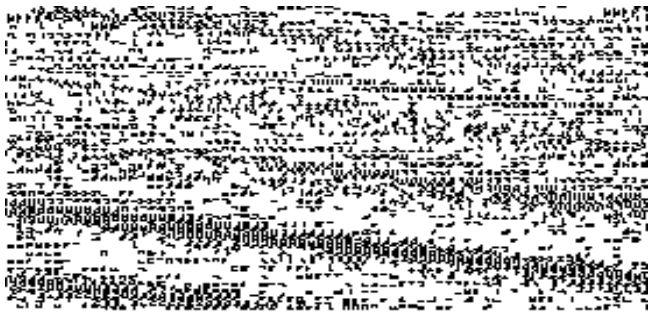


图5 原位杂交检测培养细胞 GM-CSF mRNA的表达,可见胞浆布满深玫瑰色颗粒,靠近核膜处杂交信号强,胞核空染(原位杂交× 100)

**Fig 5 Detection of the GM-CSF mRNA expression of cultured cells by in situ hybridization** ( *In situ*× 100)

附表 转化细胞培养上清液 GM-CSF生物学活性:$^3$H-TdR掺入法/CFU-GM形成法

**Table Activity of GM-CSF in cultured supernatant of transformed cells ($\bar{x}\pm s$)**

| Groups | | Dilution of supernatant | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | $4^{-1}$ | $4^{-2}$ | $4^{-3}$ | $4^{-4}$ |
| 3T3/GM-CSF | ($C_A$/Bq) | 902.42± 196.31** | 572.12± 193.69* | 281.11± 93.46** | 93.72± 53.66** |
| | (CFU-GM) | 384.67± 45.39** | 335.50± 44.92** | 265.33± 59.84** | 225.75± 49.88** |
| 3T3/pLXSN | ($C_A$/Bq) | 50.65± 15.77 | 43.01± 13.29 | 34.19± 13.86 | 23.31± 6.92 |
| | (CFU-GM) | 151.83± 42.13 | 112.33± 27.18 | 91.50± 29.50 | 60.00± 35.61 |
| NIH3T3 | ($C_A$/Bq) | 48.96± 15.64 | 45.37± 20.83 | 34.39± 13.53 | 24.21± 8.69 |
| | (CFU-GM) | 125.00± 40.13 | 105.58± 29.03 | 76.33± 37.87 | 52.25± 28.49 |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* other groups; Newman-keuls $t$ test

## 3 讨论

逆转录病毒介导的基因转移是近年来发展起来的一种高效基因转移技术。本研究所用逆转录病毒载体pLXSN,其克隆位点在5′-LTR下游,插入的目的基因受5′-LTR启动子调控,以往的工作已证实,这一启动子在成纤维细胞内可以有效地启动外源基因的表达。我们利用此载体,将小鼠 GM-CSF cDNA导入NIH3T3细胞,用原位杂交、骨髓有核细胞$^3$H-TdR掺入法和 CFU-GM检测也证实了转化的成纤维细胞转录有较多的 GM-CSF mRNA并可分泌 GM-CSF。

靶细胞的选择是基因治疗成功与否的关键之一。对于生长因子基因治疗的研究来说,这一点尤为重要,不仅要考虑目的基因表达的有效性,还要考虑目的基因的安全性。Lang等[6]将 GM-CSF cDNA转移造血细胞 FDCP,然后输入小鼠体内,结果出现白血病,他们认为这是由于转染的造血细胞异常的自分泌 GM-CSF而导致了恶性变。Dunbar等[7]将小鼠 IL-3 cDNA导入造血细胞植入体内后,也出现了类似的情况。但刘昕等[8]将小鼠 IL-3导入成纤维细胞,再植入体内,小鼠外周血白细胞最高可达600× $10^7$/L,却未见有恶性变。这些结果表明:以造血细胞为靶细胞,进行造血生长因子的基因治疗,虽可有效的刺激机体的造血功能,但有可能改变造血细胞的生物学特性;而用非造血细胞,如成纤维细胞作为靶细胞,在体内表达造血生长因子,则较为安全。同时成纤维细胞具有易取材、易培养、易基因转移并稳定表达目的基因、易植入体内并可在体内充分表达目的基因等优点,因此,选用成纤维细胞作为造血生长因子基因治疗的靶细胞是较为合适的。

提高外源基因在细胞中的拷贝数是使目的基因高

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

效表达的有效方法。目前主要有诱导基因扩增和超感染两种方法提高目的基因的拷贝数[9]。诱导基因扩增是利用药物的选择压力,使相应的耐药基因扩增,诱导相近的目的基因扩增。超感染则是利用逆转录病毒载体经包装后可重复、高效地感染靶细胞的特点,用含有目的基因的缺陷型病毒反复感染靶细胞,达到增加目的基因拷贝数的目的。我们采用了超感染的方法来提高 GM-CSF cDNA的拷贝数。用 Southern blot分析超感染 NIH3T3细胞基因组 DNA仅可见一条 550 bp的 GM-CSF cDNA杂交带,未见 GM-CSF基因杂交带,这可能是本实验的检测方法敏感性较低,不足以检出单拷贝的 GM-CSF基因,而只能检出经重复感染后的多个拷贝的 GM-CSF cDNA PCR分析也表明 PA317/GM-CSF和 3T3/GM-CSF细胞基因组中均整合有逆转录病毒载体的 NeoR基因。以上工作为下一步在动物体内进行基因治疗的研究奠定基础。

## 参考文献


1 Miller A D. Human gene therapy comes of ages. Nature, 1992; 357(4): 455

2 Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A *et al*. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90(4): 3539

3 刘　昕,朱锡华,谭　骏等.小鼠 IL-3 cDNA逆转录病毒载体的构建及在 NIH3T3细胞中的表达.免疫学杂志, 1993; 9(4): 217

4 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: 83~107

5 Dirks R W, Van der Rijke F M, Van der Ploeg M *et al*. Detection of mRNA in tissues and cultured cells by non-radioactive in situ hybridization. Histochem J, 1992; 24(3): 501

6 Lang R A, Metcalf D, Gough N M *et al*. Expression of a hemopoietic growth factor cDNA in a factor-dependent cell line results in autonomous growth and tumorigenicity. Cell, 1985; 43(12): 531

7 Dunbar C E, Browder T M, Abrams J *et al*. Cooh-terminal-modified interleukin-3 is retained intracellularly and stimulate autocrine growth. Science, 1989; 245(9): 1493

8 刘　昕,朱锡华,谭　骏等.小鼠 IL-3 cDNA转化细胞移植体内表达的初步研究.免疫学杂志, 1996, 12(11): 31

9 Tsuchiya T, Wolff J A, Wong P M C *et al*. Multi-copy introduction and high-level expression of IL-3 gene by retroviral vector superinfection. Biochem Bioph Res Comm, 1992; 158(8): 576


(收稿: 1996-03-21;修回: 1996-08-27)

(编辑　汪勤俭)

# Construction of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor cDNA recombinant retrovirus and its expression in fibroblasts of mice

Du Nan, Liu Xin, Wang Qingyu, Wang Yan, Zhang Bo, Ji Xianwen (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

**Abstract**　In order to explore the feasibility of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), murine GM-CSF cDNA was recombined with retrovirus vector pLXSN and then the recombinant plasmid was transfected into retrovirus packaging cell line PA317. After G418 screening, the supernatant of cultured G418 resistant clones was used to infect murine fibroblast NIH3T3 and the G418-resistant transforming cell clone was obtained. PCR and Southern blot hybridization demonstrated integrated NeoR and GM-CSF genes in the genome of the transforming cells and strong expression of GM-CSF mRNA was found by *in situ* hybridization. The technique of marrow cells proliferation and CFU-GM detection also confirmed that the transforming cells secreted a great deal of GM-CSF. Our study provides a basis for the further study of gene therapy of GM-CSF in animals.

**Key Words**　retroviurs vector; granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; fibroblast; expression; mouse

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