DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.01.006



# 人肿瘤坏死因子α基因cDNA直接注入小鼠骨骼肌表达的初步研究*

谭 骏 麦 跃 郭华阳** 李文维** (第三军医大学基础部分子遗传学教研室) 630038

**提 要** 本实验将带有人肿瘤坏死因子α基因(TNF-α基因)cDNA的重组表达质粒直接注入小鼠骨骼肌内,观察了外源基因在小鼠体内的表达情况。双抗体夹心法ELISA法显示,实验组小鼠肌注15 d后血浆中TNF蛋白含量逐渐增高并达高峰,然后开始下降。RNA dot blot结果显示,肌注20 d时实验组中ELISA阳性的小鼠,其肌注处肌肉组织有TNF-α基因表达。由此表明,直接将外源DNA导入骨骼肌细胞内是基因转移的又一新途径。

**关键词** 肿瘤坏死因子;基因转换;基因表达

**中图法分类号** Q343.1;Q75

肿瘤坏死因子(TNF)是由激活的巨噬/单核细胞分泌产生的一种内源性细胞因子,在体内外可发挥广泛的生物学作用。除对多种肿瘤细胞有杀伤作用外,还能通过其免疫调节功能激活巨噬细胞浸润肿瘤,增强对肿瘤的特异杀伤细胞如CTL、LAK细胞的杀伤活性等,是迄今为止所发现的直接杀伤肿瘤作用最强的一种生物活性因子,而且还能与其他许多生物学因子协同,扩大它的抗肿瘤强度和范围,有希望成为未来抗肿瘤治疗的重要生物制剂之一。目前世界上已有多家实验室已成功地将人的TNF-α基因分离克隆,并在大肠杆菌表达,生产基因工程的重组TNF蛋白,且在临床上开始应用。但是由于TNF难以克服的毒性作用,特别是在剂量加大时常常使患者难以忍受、限制了TNF的大量应用,严重影响了TNF的临床治疗效果。但是天然的TNF毒性则低或几乎无毒性[1],治疗效果好。因此如能在体内制备大量的天然TNF将是十分理想的方法。利用基因转移技术将外源基因转入哺乳动物体内获得表达已有许多报道,其技术路线多为二步法,即先将受体细胞体外培养并导入外源基因,然后再把已经遗传修饰的受体细胞输回生物体内,这种技术路线繁杂。Wolf[2]等报道将外源DNA直接注入小鼠骨骼肌肉,外源基因得到表达。表明外源基因不需先导入体外培养细胞而直接进入活体内表达是可能的。我们根据这种技术路线将带有人TNF基因cDNA的重组表达质粒直接注入小鼠骨骼肌肉,观察小鼠体内外源基因的表达情况,探讨这一方法的可行性,以期能作为体内制备大量天然TNF的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

TNF-α基因cDNA为复旦大学遗传所李昌本教授克隆;人TNF酶联免疫吸附试剂盒购自军事医学科学院四环生物公司;同位素$^{32}P$标记试剂盒购自北京福瑞公司;硝酸纤维膜为Sigma公司产品,BALB/c小鼠由本校动物所提供,雌雄不限,体重15~17 g。

### 1.2 小鼠骨骼肌注射方法

将小鼠随机分成3组:A组(实验组)10只,在每只小鼠左后肢股四头肌处注射裸露含TNF-α基因cDNA的重组表达质粒100 μl(50 μg);B组(对照组)5只,同样注射不含TNF-α基因cDNA的质粒载体100 μl(50 μg);C组(空白对照组)5只,同样注射TE缓冲液(因质粒DNA用TE溶解)100μl。注射后分笼饲养,每隔5 d由尾部采血,分离血浆约100 μl,共采血4次,最后1次由小鼠腋下剪开动脉取血。同时将小鼠肌注处肌肉分离,液氮保存,用于提取细胞RNA。

### 1.3 双抗体夹心法ELISA法测定小鼠血液中TNF含量

根据试剂盒提供方法进行,设置标准曲线,读取$OD_{490}$数值。

### 1.4 RNA Dot blot检测TNF-α基因cDNA表达的mRNA

将小鼠肌注处肌肉按微量法RNA的制备方法[3]快速提取细胞中总RNA,将提取的总RNA滴于硝酸纤维膜上,以同位素$^{32}P$缺口平移法标记的TNF-α cDNA片段作为探针,65℃杂交过夜,通过放射自显影显示杂交信号。

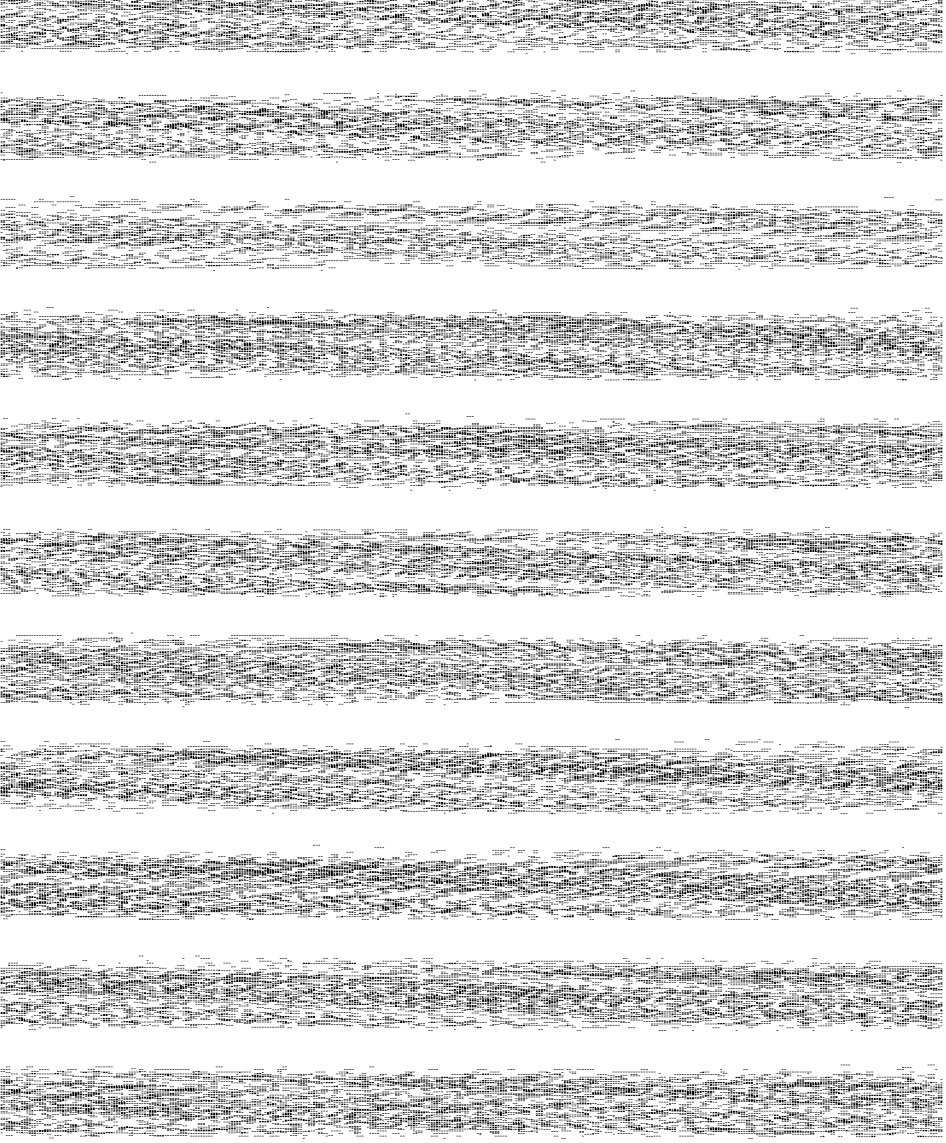
## 2 结果与讨论

ELISA检测结果:小鼠血浆中TNF蛋白含量是根

* 国家自然科学基金资助项目

** 大坪医院皮肤科

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



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

床应用带来不可估量的前景。也许那时可以用"基因药物"注射的方式来治疗肿瘤等疾病[8]。

## 参考文献


1 Katsuyuki Haranaka, Nobuko Satomi, Akiko Sakuri. Antitumor activity of muine TNF against humen tumors in nude mice. Int J Cancer, 1984, 34: 263

2 Wolf JA, Malone RW, Wiliams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science, 1990, 247: 1465

3 Davis LG, Dibner MD, Battey JF. Basic methods in molecular biology. New York: Elsevier Science Publishing Co Inc, 1986. 136

4 谭 骏，王 燕，朱锡华，等. 人凝血因子Ⅸ基因直接注入小鼠骨骼肌中表达的研究. 科学通报，1993，38：1918

5 Fearon ER, Pardoll DM, Toshiuki Itaya, et al. IL-2 production by tumor cells bypasses T helper Function in the generation of an antitumor respone. Cell, 1990, 172: 1217

6 Gansbacher B, Zier K, Daniels B, et al. IL-2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. J Exp Med, 1990, 172: 1217

7 Golumbek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI, et al. Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete IL-4. Science, 1991, 254: 713

8 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，1993，2：66


（收稿：1993-04-24；修回：1993-12-05）

# A preliminary study of the expression of TNFα gene cDNA through direct gene transfer into skeletal muscles in mice

Tan Jun, Mai Yue, Guo Huayang, Li Wenwei (Department of Molecular Genetics, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

**Abstract** It was found that an injection of the recombinant TNFα cDNA plasmid directly into the skeletal muscle of mice resulted in a significant expression of TNF gene in the muscular cells. Human TNF protein could be detected in the mice 15 days after injection with ELISA and RNA dot blot. It is concluded that direct introduction of exogenous DNA into the cells of skeletal muscles will be a new route for gene transfer.

**Key words** tumor necrosis factor; transfection; gene expression

# 严重烫伤大鼠早期主要脏器肿瘤坏死因子 mRNA 表达及细胞定位的实验研究

袁建成 肖光夏 （第三军医大学西南医院烧伤研究所）630038

严重烫伤后，肠腔内的细菌和内毒素通过受损的肠粘膜屏障入血，进而激活炎症介质的释放，炎症反应失控是导致脓毒血症、中毒性休克、脏器损伤及 MOF 的重要原因。TNF 是其中最突出的介质之一。本研究利用原位、斑点杂交技术来研究 TNF-mRNA 在烧伤后主要脏器中的表达规律及其细胞定位。

Wistar 大鼠，制作30％Ⅱ度烫伤模型。随机分为烧伤组、内毒素耐受组、多粘菌素B拮抗组及正常组。伤后3、6、12、24 h，分别检测血浆内毒素，TNF 含量。斑点杂交法检测肝、脾、肺、肾及小肠 TNF-mRNA 表达量，原位杂交定位 TNF-mRNA 表达细胞及其在脏器中的数量变化。

结果发现：烧伤组血浆内毒素、TNF 含量明显升高。伤后各脏器 TNF-mRNA 表达量急剧上升，6 h 达顶峰。其中小肠升高幅度最大，且伤后各时相点均高于其它脏器。原位杂交检测到，正常动物内脏主要是 Mφ 表达 TNF-mRNA，而烧伤后上述细胞表达明显增强，同时血管平滑肌及内皮细胞、浸润的炎细胞、脾脏中的淋巴细胞、Ⅰ型肺泡上皮细胞，肾小球囊壁层上皮细胞、肠粘膜固有层中的单核巨噬细胞，枯否氏细胞等 TNF-mRNA 都表达阳性。而耐受组，拮抗组上述变化不明显，与正常相比无明显差异。

结论：内毒素是烧伤早期 TNF-mRNA 表达的主要刺激物之一。小肠可能是 TNF 反应最强烈的器官；单核 Mφ 是 TNF 的主要分泌细胞；血管平滑肌及内皮细胞既是 TNF 的靶细胞，又是其重要的分泌细胞。

**关键词** 灼伤；肠源性感染*；肿瘤坏死因子；斑点杂交*；原位杂交*

**中图法分类号** R644

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