

实验研究

转 γ -干扰素基因大鼠肝细胞模型的建立^①

王坤 郭英 闵军 陈积圣

(中山大学孙逸仙纪念医院外科; 广州, 510120)

摘要 目的: 使用多聚阳离子脂质体载体(lipofectAMINE)在体外建立转 γ -干扰素(IFN- γ)基因的大鼠肝细胞模型。方法: 利用 lipofectAMINE 在体外将 IFN- γ 基因转染大鼠肝细胞。分别以 RT-PCR 和 ELISA 方法检测所转 IFN- γ 基因在大鼠肝细胞的转录和表达情况。结果: 以 lipofectAMINE 为载体的 IFN- γ 基因转染大鼠肝细胞后, 可被有效的转录并产生具有生物活性的 IFN- γ 。结论: IFN- γ 基因可被成功转染入大鼠肝细胞并可有效表达。这可能为细胞因子的免疫治疗提供一种新途径。

主题词 转染; 脂质体; 干扰素 II 型

中图分类号 Q 785

The Construction of Murine Hepatic Model Transferred with Interferon- γ Gene

Wang Kun Guo Ying Min Jun Cheng Jisheng

(Department of Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

Abstract Objective: To investigate interferon- γ (IFN- γ) gene transfer and expression in BRL murine hepatocyte with lipofectAMINE vector *in vitro*. **Methods:** IFN- γ gene was transferred and expressed in BRL murine hepatocyte with lipofectAMINE vector *in vitro*. Its mRNA transcription and protein concentration were determined by RT-PCR and ELISA assay respectively. **Results:** The IFN- γ gene that was transferred with lipofectAMINE vector *in vitro* can be transcribed in the BRL murine hepatocyte continuously. **Conclusion:** IFN- γ can be transferred successfully and expressed efficiently in BRL murine hepatocyte. This may lead to a new therapeutic methods for cytokine immunological therapy.

Subject headings transfection; liposomes; interferon type II

γ -干扰素(IFN- γ)为体内一种重要的细胞因子, 主要由 TH 细胞产生, 能够诱导和调节免疫反应以及多种其它细胞因子的分泌^[1]。近年来的研究发现, IFN- γ 亦具有抑制 Ito 细胞和防治肝纤维化的作用。本实验是通过基因转染技术, 建立能够分泌 IFN- γ 的肝细胞模型。

1 材料和方法

1.1 主要材料

BRL 大鼠肝细胞株(购自中科院上海细胞库), pcDNA3IFN- γ 和 pcDNA3 质粒(由本院分子医学中心提供), 总 RNA 提取试剂盒(Promega 公司),

ELISA 试剂盒(Endogen 公司), G418(Gibco/BRL 公司), RT-PCR 反应所需的各种酶和试剂(均为 Promega 公司)。

1.2 基因转染

将无血清无双抗的 RPMI 1640 培养液分别加入 3 μ g pcDNA3IFN- γ 和 20 μ L 脂质体中, 使终量分别达到 100 μ L, 混合二液。室温放置 30 min 后, 加入 1.8 mL RPMI 1640 无血清无双抗培养液。在经无血清培养液漂洗的约 50% 细胞汇合的 25 cm² 培养瓶中加入上述混合液, 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% 的 CO₂ 温箱孵育 5 h 后, 吸出转染液, 加入含体积分数为 15% 的小牛血清及双抗的 RPMI 1640 培养液, 在 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% 的 CO₂ 条件下继续培养。以

上述同样方法将 pcDNA3 空载体转染大鼠肝细胞株。

1.3 RT-PCR

将转染后细胞在 37 °C, 体积分数为 5% 的 CO₂ 条件下以含体积分数为 15% 的小牛血清的 RPMI 1640 培养液培养, 并按 400 mg/L 加入 G418, 待细胞 70% 汇合后, 按照说明书的方法及要求分别提取转染 pcDNA3 IFN- γ 和 pcDNA3 空载体细胞的总 RNA。反转录过程: 5 μ g RNA, 20 pmol Oligo(dT) 15, 5 mmol dNTP, 20 U RNasin, 5 \times PCR 缓冲液 4 μ L, 50 U AMV 反转录酶混合后加入无 RNA 酶水, 总体积达 20 μ L。在 42 °C 下反应 1 h 后, 95 °C 加热 10 min 灭活逆转录酶。PCR 扩增: 反转录产物 5 μ L, 引物各 100 pmol, dNTP 10 mmol, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L 加入 7.9 μ L 无 RNA 酶水中, 最后加入 Taq 酶 2.5 U。以 β -actin 为内对照。90 °C 1 min, 52 °C 2 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环。循环结束后, 取样加入 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳中分析。

IFN- γ 基因的引物序列^[2]: 5'端: GGCTTTTCAGC TCIGCAT; 3'端: GGATGCTCTTCGACCTCG; β -actin 基因引物序列为: 5'端: CTCCTTGATGTCACGCACGAT TTC; 3'端: GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA。

1.4 ELISA 检测

将转染后细胞培养至 50% 汇合, 按有限稀释法单克隆至 96 孔板内, 在 37 °C, 体积分数为 5% 的 CO₂ 温箱内孵育, 将生长良好之单克隆导至 24 孔板内, 并按 400 mg/L 的量加入 G418 继续培养。待细胞 70% 汇合后, 收集 24 h 培养液, 同时做细胞计数。根据说明书进行 ELISA 检测, 依据所绘制标准曲线测出每个克隆的表达量。

2 结果

以 lipofectAMINE 为载体将 IFN- γ 基因转染大鼠肝细胞, 经 G418 抗性筛选后, 成功获得具有抗性的细胞株, 从而初步证明转染成功。

RT-PCR 反应显示, IFN- γ 基因只在转染 pcDNA3 IFN- γ 的细胞内转录, 而作为对照的转染 pcDNA3 空载体细胞内无转录, 作为内对照的 β -actin 基因在所有细胞中均有转录(图 1)。因此可以证实, IFN- γ 基因已成功转染大鼠肝细胞, 并有效地由 DNA 转录为 mRNA。

ELISA 检测发现, 转染 pcDNA3 IFN- γ 细胞能分泌具有生物活性的 IFN- γ , 培养 24 h 后各个孔(约

1 \times 10⁵ 个细胞)的分泌量为 70 ~ 110 ng/L, 而转染 pcDNA3 空载体的细胞未测出能够分泌具有生物活性的 IFN- γ 。这进一步证实 IFN- γ 基因已成功转染大鼠肝细胞, 能够有效表达, 并产生具有生物活性的 IFN- γ 。

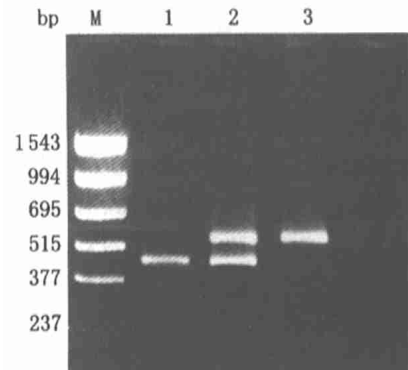


图 1 转基因 RT-PCR 检测

Fig. 1 The transferred gene was determined by RT-PCR

M: PCR marker 1: IFN- γ plasmid 2: Cells transfected pcDNA3IFN- γ 3: Cells transfected pcDNA3

3 讨论

病毒性肝炎及肝炎后肝硬化为常见病, 多发病。在我国约有 1.2 亿人为乙肝病毒表面抗原阳性, 慢性肝炎超过 3 000 万人, 其中 25.4% 终将发展成为肝硬化或肝癌^[3]。而肝纤维化是各种致病因素所致肝硬化的共同病理基础和发生途径。因此, 对肝纤维化的治疗成为防治肝硬化的发生和发展的重要手段。近年来发现, IFN- γ 具有良好的抑制肝纤维化的作用^[4]。但由于其半衰期短, 全身及局部副作用使其在应用上受到很大限制^[5]。

如何安全、高效、重复转染目的基因是基因治疗中的关键问题。各种不同的基因转染技术均有一定的缺陷: 裸 DNA 转染虽然安全, 但转染效率很低, 一般仅 1%, 难以达到理想的治疗效果; 腺病毒介导的基因转染, 虽然效率可达到 80%, 但由于较强的免疫原性, 无法重复使用。而脂质体载体与其它载体相比较, 具有制备方便、应用广泛、无毒性、且可与抗体相连以进行 DNA 定向导入等特点^[6]。自从 Wilson^[7] 等将脊髓灰质炎病毒通过脂质体带进 Hela 细胞, 便开始了脂质体作为基因工程载体的研究。阳离子脂质体与带负电荷的质粒 DNA 可形成呈正电性的复合物, 该复合物极易与负电性细

胞膜结合,并经内吞作用进入细胞,因而有较高的转染效率。本实验所使用的 lipofectAMINE 系多聚阳离子脂质体,具有较多的正电荷,增强了其与 DNA 及靶细胞的亲合能力,并使其能在形成较多复合物颗粒的前提下携带较多的 DNA 分子进入靶细胞。因此较其它阳离子脂质体具有更理想的转染效率。

本实验以 RT-PCR 方法证实, IFN- γ 基因转染后可成功实现由 DNA 到 mRNA 的转录;经 ELISA 检测证实,转染 IFN- γ 基因的细胞可表达具有活性的蛋白质产物。同时筛选出高表达细胞株为下一步体内移植抗肝纤维化的研究打下了基础。这可为细胞因子的免疫治疗提供一种新途径。

参 考 文 献

- 1 Farrar M A, Schreiber R D. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu Rev Immunol*, 1993, 11: 571
- 2 Padzarka J, Ramaassar V, Enns S *et al.* The use of poly-

- merase chain reaction (PCR) for assessing interferon- γ mRNA levels in human lymphocytes. *Transplant Prog* 1990, 23(5): 241
- 3 蒋月荣. 阻断及逆转肝纤维化的研究取得了突破性进展. *中华医学信息导报*, 1997, 12(24): 8
- 4 Saez Royuela F, Porres J C, Moreno A, *et al.* High doses of recombinant α -interferon or α -interferon for chronic hepatitis C: a randomized controlled trial. *Hepatology*, 1991, 13(2): 327
- 5 Jaffe H A, Buhl R, Mastrangeli A, *et al.* Organ specific cytokine therapy: local activation of mononuclear phagocytes by delivery of an aerosol of recombinant interferon-gamma to the human lung. *J Clin Invest* 1991, 88(1): 297
- 6 刘启堂, 吴 昊. 脂质体作为基因工程载体的研究. *生物化学与生物物理进展*, 1989, 16(6): 426
- 7 Wilson T, Papahadjopoulos D, Taber R. Biological properties of poliovirus encapsulated in lipid vehicles; antibody resistance and infectivity in virus-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(8): 3471

(1999-03-17 收稿 1999-06-08 修回)

简 讯

博士后高劲松的研究为肿瘤快速诊断及防治研究提供有效手段

中山医科大学博士后高劲松在站研究中成功建立了一种闭管式荧光定量检测 MDRI 基因表达的方法和建立了一种检测端粒酶活性的改进方法,为肿瘤快速诊断及防治研究提供了有效手段。

博士后高劲松在合作导师何蕴韶教授指导下,完成了2年的在站研究工作,根据肿瘤患者经常出现的多药耐药性问题,成功建立荧光定量 RT-PCR 检测 MDRI 基因表达方法,该法具有简便、快捷、特异、敏感、可靠、稳定、准确等优点,尤其是闭管检测,完全杜绝了 PCR 产物污染引起的假阳性问题,检测结果用绝对拷贝数表示,有利于标准统一,对耐药和不耐药 K562 细胞株的检测表明,耐药株的 MDRI 拷贝数较不耐药株高 80 倍;高博士还根据多种常见的恶性肿瘤患者中 85% 以上存在端粒酶活性的问题,建立改进端粒重复系列扩增方案 (TRAP),设计加长下游引物,避免引物二聚体的形成,使端粒酶的孵育与 PCR 反应一步完成。方法简单快捷,无需两次添加引物,有效识别假阴性,银染显色快速灵敏,条带清晰,可广泛应用于肿瘤标本的端粒酶检测,具有很好的应用价值。在高博士出站报告会上,专家评议组认为该研究工作达到国内领先水平。

(冯世容)