

重组人白细胞介素-3 真核表达质粒直接注射小鼠骨髓肌的体内表达研究

叶治家 郭华阳* 董燕麟 程天民**

(第三军医大学生物化学教研室 重庆 630038)

白细胞介素-3(interleukin-3, IL-3)是由激活的 T 淋巴种细胞产生的一种小分子糖蛋白,有广泛的生物学活性,能刺激多能造血干细胞及一些定向祖细胞的增生与分化。在临床上 IL-3 用于治疗急性放射病、各种原因引起的粒细胞减少症、白血病等。IL-3 在体内的表达受到严格限制,正常条件下几乎检测不到体内存在 IL-3 的表达^[1]。目前应用的 IL-3 主要为基因工程产品,由于 IL-3 有两个糖基化位点,在大肠杆菌中表达有生物活性的 IL-3 比较困难;在真核中表达存在表达量低、纯化工艺复杂、成本高等问题。基因直接注射法,又称裸 DNA 注射法,90 年由 Wolff 等人^[2]建立,因其操作简单、周期短等优点,其应用越来越受到重视。本研究将含有 IL-3 cDNA 的真核表达质粒直接注射到小鼠股四头肌,观察了 IL-3 在体内的表达,为 IL-3 的临床应用及基因治疗探索新途径。

材料与 方法

1. 实验动物

BALB/C 小鼠,雄性,5—7 周龄,15—18 克,由本校实验动物中心提供。

2. 主要试剂

IL-3 cDNA、rhIL-3、抗 hIL-3 血清由美国 Genetics Institute Inc 惠赠;真核表达载体 pKG₅ 由英国牛津大学 G.G. Brownlee 教授赠送;DNA 内切酶、连接酶,生物素化羊抗兔 IgG 抗体、免疫组化试剂盒购自华美生物工程公司;地高辛标记试剂盒为 Boehringer Mannheim 产品;hIL-3 依赖 TF-1 细胞株(来源于红白血病病人的骨髓细胞^[3])由北京医科大学免疫教研室赠送。³H-TdR 为中国原子能研究所产品。

其他试剂均为国产或进口分析纯。

3. 质粒构建

以 PCR 扩增 hIL-3 cDNA,以 BamHI 酶切载体 pKG₅ 补平,与 PCR 扩增的片段平端连接,筛选得到正向插入 IL-3 cDNA 的重组质粒 pKG₅-IL-3。所有操作方法参照文献^[4]。

4. 动物分组及注射方法

小鼠随机分成三组,每组 12 只。A 组:空白对照组,注射 PBS(pH 7.4) 100 μl; B 组:对照组,注射空载体质粒 pKG₅ 80 μg(100 μl); C 组:实验组,注射重组质粒 80 μg(100 μl),参照 Danko 等人的方法^[5],每只小鼠在左后肢股四头肌先注射 0.75% 吡啶啡因,注射深度为 2 mm,5 天后在同一部位再注射质粒或 PBS。Danko I 等证明预先注射 0.75% 吡啶啡因可使注射的外源基因表达量提高 4—10 倍并延长表达时间^[5]。

5. 原位杂交

以 hIL-3 cDNA 为探针,按地高辛标记试剂盒说明进行随机引物标记,杂交按文献^[6]方法进行。

6. 免疫组化

按文献方法^[6]和试剂盒说明进行。

7. ELISA 测定血液中 hIL-3 的含量

作标准品 rhIL-3 OD₄₁₀ 值的标准曲线,根据标准曲线计算血清中 hIL-3 的含量。

8. hIL-3 生物活性的检测

按文献^[7]方法,用 ³H-TdR 掺入的方法,以支持 hIL-3 依赖的 TF-1 细胞株生长能力检测血清中 hIL-3 的生物活性。

结 果

1. 原位杂交分析

C 组小鼠注射重组质粒后第 7 天,在注射

* 医学检验系临床生化教研室

** 预防医学系防原医学教研室(国家重点学科)

部位骨骼肌细胞内外出现杂交阳性信号；第14天、21天、28天杂交阳性信号全部出现在细胞内，见图1。表明重组质粒全部进入骨骼肌细胞内。其他两组注射部位细胞内外未见杂交阳性信号。

2. 免疫组化分析

C组小鼠注射重组质粒后第7天，在注射部位骨骼肌细胞内外有IL-3蛋白质存在，第14、21、28天观察到在血管周围有大量IL-3蛋白聚集，见图2。其他两组在注射部位骨骼肌细胞内外未见有IL-3蛋白存在。

3. 测定小鼠血清中IL-3的含量

每组小鼠注射质粒或PBS后第7、14、21、28天，分别用剪尾采血法取血，用ELISA法检测小鼠血清中IL-3的含量，结果见表1。C组小鼠第14、21、28天P/N值(实验组与对照组的比值)均大于2，表明C组小鼠血清中IL-3的含量与对照组比较有显著差异。从

标准曲线计算得第21天小鼠血清中IL-3的含量最高，约有67 ng/ml。

表1 C组小鼠血清IL-3的ELISA检测结果

时间(天)	小鼠血清 OD ₄₁₀ 均值	P/N 值
7	0.124±0.011	1.2
14	0.233±0.014	2.3
21	0.267±0.021	2.7
28	0.221±0.016	2.2

4. 小鼠血清中hIL-3的生物活性

C组小鼠注射重组质粒后第14、21、28天的血清刺激TF-1细胞株³H-TdR掺入率(cpm)显著高于(P<0.005)A、B组小鼠的血清及空白对照组，后三者之间没有显著差别(P>0.5)，表明C组小鼠血清中含有生物活性的rhIL-3，具有支持IL-3依赖的TF-1细胞生长的能力。

表2 小鼠血清中IL-3生物活性检测结果

组别	空白	A(天)			B(天)			C(天)		
		14	21	28	14	21	28	14	21	28
³ H-TdR 掺入率(cpm)	141±21	139 ±22	145 ±26	149 ±23	146 ±19	141 ±25	147 ±27	673 ±81*	931 ±97*	794 ±91*

*P<0.005

讨 论

基因直接注射法自从90年代初由Wolff等^[2]建立以来，为基因治疗的实验研究开辟了新的领域，标志着基因治疗的研究在向纵深发展。由于直接注射法操作简单、周期短、安全性好(外源基因以非整合的形式存在于细胞内)，因此易被临床接受。关于这方面的研究报道越来越多，已经有用基因直接注射法治疗获得性或遗传性疾病的报道^[9]。

骨骼肌由于结构上的特殊性，如横纹肌细胞有大量的横管系统和肌浆网，横管系统有大量的细胞外液，这些结构上的特殊性有可能使骨骼肌能直接摄取外源DNA并在其中表达。

骨骼肌摄取外源DNA的详细机制还不清楚，目前存在有几种假设。一种观点认为骨骼肌通过胞饮作用(endocytosis)摄取外源DNA^[9]，另一种观点认为在横纹肌上可能存在质粒DNA的受体，质粒通过与受体结合而进入横纹肌细胞内。还有一种假设认为横纹肌细胞通过细胞膜穴样内陷(caveolae)作用摄取质粒。这些假设都有待进一步的实验证明。

我们将含hIL-3 cDNA的pKG₆-IL-3真核表达质粒直接注射到小鼠骨骼肌中，第7天观察到重组质粒已有部分进入骨骼肌细胞内并检测到有IL-3蛋白的表达。第14天全部进入到骨骼肌细胞内并检测到血液中存在有生物活性的hIL-3。证明IL-3重组质粒通过某种途径

进入骨骼肌细胞内,再进入细胞核,表达IL-3。表达的IL-3分泌到细胞外,通过血液进入全身。血清中的IL-3具有生物活性。血清中IL-3的含量,第21天最多,第28、14天次之。一次注射质粒28天后血清中仍存在有活性的hIL-3。以前的研究表明,急性放射损伤后,IL-3的表达受到抑制可能是急性放射病引起造血功能障碍的原因之一。我们正在研究含鼠IL-3 cDNA的真核表达质粒直接注射小鼠骨骼肌后,鼠IL-3基因在小鼠肌肉、体内的表达及在治疗、预防急性放射病中的作用。这些结果对IL-3的临床应用及基因治疗研究有一定的指导意义。

摘 要

将含有人白细胞介素-3基因(hIL-3) cDNA的真核表达质粒直接注射小鼠骨骼肌,观察hIL-3基因在小鼠肌肉及体内的分泌表达情况。原位分子杂交及免疫组化结果显示注射重组质粒后,第14天重组质粒全部进入到骨骼肌细胞内并有IL-3的表达。ELISA结果显示,注射重组质粒DNA后,第21天小鼠血液中IL-3的含量最高,约有67 ng/ml,第14天次之,约51 ng/ml,第28天和第7天相近,约34 ng/ml。生物学活性检测结果表明,实验组小

鼠血清有维持IL-3依赖的TF-1细胞株生长的作用。表明重组质粒DNA直接注射骨骼肌后进入到肌细胞内并表达IL-3,进入血液,而且表达产物有生物学活性。

关键词: 白细胞介素-3 基因表达 DNA
注射 骨骼肌

参 考 文 献

- [1] 叶治家、董燕麟, 1995, 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 16: 106.
- [2] Wolff JA et al., 1990, *Science*, 147: 1465.
- [3] Toshio Kitamura et al., 1989, *J Cell Physiol.*, 140: 323.
- [4] Sambrook J et al, *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp: 16, 34, 56.
- [5] Danko I et al., 1994, *Gene Therapy*, 1: 114.
- [6] 蔡文琴、王伯纭, 1994, 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术, 成都: 四川科学技术出版社, 179, 385.
- [7] 叶治家等, 1996, 第三军医大学学报, 18: 16.
- [8] Jiao S, et al., 1993, *Nature*, 362: 450.
- [9] Martin E et al., 1994, A possible mechanisms of DNA uptake in skeletal muscle; *Gene therapeutics, methods and applications of direct transfer* Birkhauser press Boston, pp: 82-98.

DIRECT TRANSFERRING RHIL-3 cDNA INTO MOUSE MUSCLE AND EXPRESSION IN VIVO

YE Zhi Jia GUO Hua Yang DONG Yan Lin CHEN Tian Min
(Department of Biochemistry, Third Military Medical College, Chongqing 630038)

ABSTRACT

The naked eucaryotic expression plasmid pKG₅-IL-3 which contains hIL-3 cDNA, was directly injected into the BALB/C mice's quadriceps muscle. The results of in situ hybridization and immunohisto-chemistry showed that pKG₅-IL-3 entered the muscle cells and expressed IL-3. The assay of ELISA showed that expressed hIL-3 was secreted into blood. The highest level of IL-3 in serum was about 67 ng/ml on 21st day after pKG₅-IL-3 injection. Bioactivity assay showed that the serum of experimental groups of mice was able to support the growth of the hIL-3 dependent TF-1 cells. These results suggest that the pKG₅-IL-3 injected into mice's quadriceps muscle could enter mice's muscle cells and expressed active hIL-3.

Key Words: Interleukin-3 Gene expression DNA injection Quadriceps