

- 35.
- [5] Cheng M. et al., 1997, *Plant Physiology*, **115**: 971.
- [6] Vasil V. et al., 1992, *Biotechnology*, **10**:667.
- [7] Weeks J. T. et al., 1993, *Plant Physiology*, **102**: 1077.
- [8] Nehra N. S. et al., 1994, *The Plant Journal*, **5**: 285.
- [9] Altpeter F. et al., 1996, *Plant Cell Reports*, **16**: 12.
- [10] Vasil V. et al., 1993, *Biotechnology*, **11**:1553.
- [11] Becher D. et al., 1994, *The Plant Journal*, **5**:299.
- [12] Zhou H. et al., 1995, *Plant Cell Reports*, **15**:159.
- [13] Ortiz J. P. A. et al., 1996, *Plant Cell Reports*, **15**: 877.
- [14] Takumi S. et al., 1996, *Journal of Plant Physiology*, **149**:418.
- [15] 王小军等, 1996, *植物学报*, **38**:942.
- [16] 黄粤等, 1997, *西北植物学报*, **17**:142.
- [17] Klein T. M. et al., 1988, *Biotechnology*, **6**:559.
- [18] Daines R. J., 1990, *Biolystic Systems Newsletter*, **1**:1.
- [19] Barro F. et al., 1997, *Nature Biotechnology*, **15**: 1295.
- [20] Vain P. et al., 1993, *Plant Cell Reports*, **12**:84.
- [21] Roland B. 1993, *Plant Journal*, **4**:735.
- [22] 杜立群等, 1996, *植物学报*, **38**:921.
- [23] Grimsley N. H. et al., 1987, *Nature*, **325**:177.
- [24] Grimsley N. H. et al., 1988, *Biotechnology*, **6**:185.
- [25] Graves A. E. et al., 1988, *J. Bacteriol.*, **170**: 2395.
- [26] Mooney P. A. et al., 1991, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **25**:199.
- [27] Usami S. et al., 1987, *Mol Gen Genet*, **209**:221.
- [28] Usami S. et al., 1988, *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**:3748.
- [29] 邓万银等, 1989, *中国科学 B 辑*, **2**:171.
- [30] Hess D. et al., 1990, *Plant Sciences*, **72**:233.
- [31] Moony P. A. et al., 1991, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **25**:209.
- [32] Xu Y. et al., 1993, *Cell Research*, **3**:49.
- [33] 夏光敏等, 1999, *植物生理学报*, **25**:22.
- [34] 曾军祉等, 1993, *中国科学 B 辑*, **3**:256.
- [35] 成卓敏等, 1993, *自然科学进展—国家重点实验室通讯*, **3**:560.
- [36] 郭亮等, 1997, *遗传学报*, **24**:255.
- [37] 王兰岚等, 1995, *遗传学报*, **22**:394.
- [38] 柯遐义等, 1997, *武汉植物学研究*, **15**:103.
- [39] Srivastava V. et al., 1996, *Theor. Appl. Genet.*, **92**:1031.
- [40] Blechl A. E. et al., 1996, *Nature Biotechnology*, **14**:875.
- [41] Daniell H. et al., 1998, *Nature Biotechnology*, **16**: 345.

研究工作

逆转录病毒介导的人血血小板生成素(TPO)在骨髓基质细胞中的表达

张毅 唐佩弦 李秀森 江飞子 毛宁

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

人血血小板生成素(Thrombopoietin, TPO)是近年发现的对早期造血具有重要调控作用的细胞因子,其主要生物活性表现为维持巨核细胞增殖与分化及有功能血小板的形成,并可促进造血干/祖细胞(CD34⁺细胞)的增殖和分化^[1,2]。骨髓基质细胞作为造血微环境中的主要成分,对CD34⁺细胞的增殖与分化同样具有调节作用^[3]。鉴于基质细胞与TPO对CD34⁺细胞的作用特点,我们利用逆转录病毒介导TPO基因在人骨髓基质细胞系中表达,进一步研究转基因骨髓基

质细胞对CD34⁺细胞的体外扩增的影响及为基因治疗提供基础实验资料。

材料与方法

1. 质粒与细胞系

人全长TPO cDNA和逆转录病毒载体质粒均由本室构建与保存。PA317细胞和

本文1999年4月28日收到,7月5日接受。

本课题为国家863高科技技术重点课题基金(BH-030501)和全军95重点课题基金资助。

NIH3T3 细胞由本室保存,人骨髓基质细胞系 HFCL 由中国医学科学院血液学研究所姜学英教授提供。HFCL 细胞是由人骨髓细胞分离出的一株成纤维样细胞系,细胞呈梭形,其培养上清能刺激正常人和小鼠骨髓 CFU-GM 集落形成。TD-3 细胞株由 Lifegen 美国公司构建,沈阳三生药业有限公司提供。TD-3 是 mIL-3 依赖细胞株 BAF/BO3 转染 c-mpl 基因的 TPO 依赖细胞株(BAF3/mpl)。c-mpl 基因是病毒原癌基因 v-mpl 的细胞同源基因,其表达物 Mpl 受体表现出造血因子 TPO 受体功能,该细胞株仅对 TPO 和鼠 IL-3 有较高的灵敏度和特异性。

2. 试剂

各种限制性内切酶及工具酶购自 Progenia 公司,IMDM、RPIM1640 培养液购自 Gibco 公司,小牛血清及胎牛血清购自北京军区兽医研究所,重组人 TPO 购自英国 Preptech 公司。

3. 重组逆转录病毒载体构建

将含 TPO 基因的载体和逆转录病毒载体 pLXSN 用 EcoRI 和 XhoI 消化后,在 T4DNA 连接酶作用下进行重组连接,转化 *E. coli*,酶切鉴定阳性克隆。

4. 转染细胞与病毒滴度的测定

采用脂质体介导的方法,将重组载体 pLT-SN 和空载体 pLXSN 转染包装细胞 PA317, G418 筛选阳性克隆,收集培养上清液,应用 NIH3T3 细胞进行病毒滴度测定。具体操作见文献^[4]。

将对数生长期的 HFCL 细胞以 5×10^5 /孔接种于六孔板中,每孔加不同浓度的病毒上清及终浓度为 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ Polybrene 培养 12h,按 1:10 传代培养 48h,筛选 2 周,克隆形成后,扩大培养,接种于不含 G418 的培养基中培养 24-48h,收集上清液,过滤后 -20°C 贮存备用。

5. 外源基因 mRNA 及基因组整合情况的检测

采用 RT-PCR 法检测转染细胞中 TPO 基因 mRNA 水平的表达,具体操作按 RT-PCR 试剂盒说明书进行;基因组 DNA 提取按试剂盒

说明书进行。PCR 法检测基因组 DNA 与 Neo 基因的表达,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

TPO 基因

上游引物:

5'-CCGGAATTCATGAGCCCGGCTCTCTGCTT-3'

下游引物:

5'-CGTCTAGATGATGTGGCAGTGTCTGAGAACC-3'

Neo 基因

上游引物:5'-ACAATCGGCTGCTCTGAT-3'

下游引物:5'-CTGCTCGATGCGATGTT-3'

6. 转染细胞生长特征及上清液中蛋白生物学活性测定

细胞从瓶壁上消化后,接种于 24 孔培养板中,每孔种入 1×10^4 细胞,每天取 3 孔,消化计数,共计 7 天(7 天不换液),计算出细胞生长的倍增时间。

选用 TPO 依赖的细胞株 TD-3 细胞,以 MTT 法测定 TPO 蛋白表达与活性^[5]。传代培养的 TD-3 细胞用生理盐水洗 3 次后,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液制成细胞悬液,在 96 孔板中每孔加 5×10^4 细胞悬液,再加入按一定比例稀释的 TPO 标准品或样品,置 37°C 5% CO_2 孵箱培养 48h,每孔加 $20 \mu\text{l}$ MTT 溶液,继续培养 4h,加入裂解液,裂解生成的沉淀,酶标仪 540nm 测读。

结 果

1. 逆转录病毒载体的构建

具体构建如图 1 所示。

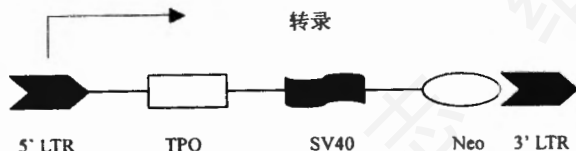


图 1 逆转录病毒载体 pLTSN 构建图

2. 病毒滴度测定及骨髓基质细胞系的转染

采用脂质体将重组质粒 pLTSN 和空载体 pLXSN 转染 HFCL 细胞,经 G418 筛选并用其上清液感染 NIH3T3 细胞,计算病毒滴度 PA317/pLTSN 为 4.2×10^5 CFU/ml, PA317/pLXSN 为 6.5×10^5 CFU/ml,同样两组上清液感染 HFCL 细胞也获得大量抗性克隆。结果表明重组载体转染 PA317 细胞后,包装出具有感染靶细胞能力的病毒,并可介导其基因转移。

3. 鉴定外源基因在 HFCL 细胞中 mRNA 表达及基因整合情况

提取培养细胞总 RNA,用 RT-PCR 方法分析转导细胞中 TPO mRNA 的表达,结果表明转染细胞中有 TPO 的 mRNA 表达。提取培养细胞基因组 DNA,用 PCR 技术进行 Neo 基因和 TPO cDNA 的特异性分析,结果显示转染细胞基因组中整合有逆转录病毒载体中的 Neo 基因和 TPO 基因(图 2)。

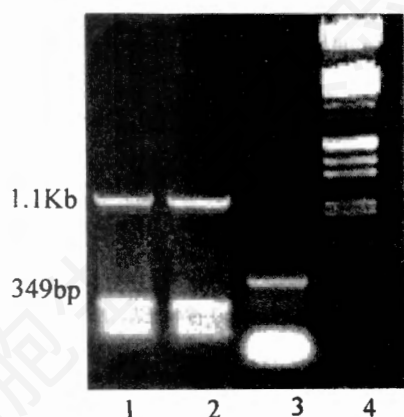


图 2 RT-PCR 和基因组 DNA PCR 检测 HFCL 细胞中 TPO 基因和 Neo 基因的表达

1. RT-PCR 检测 HFCL 细胞中 TPO 基因的表达
2. 基因组 DNA PCR 检测 HFCL 细胞中 TPO 基因的表达
3. PCR 检测 Neo 基因的表达
4. 标尺 (EcoRI + HindIII 双酶切)

4. 转染骨髓基质细胞系生长特征及培养上清液中 TPO 活性检测

转染细胞的生长曲线见图 3。细胞倍增时间约为 48h。

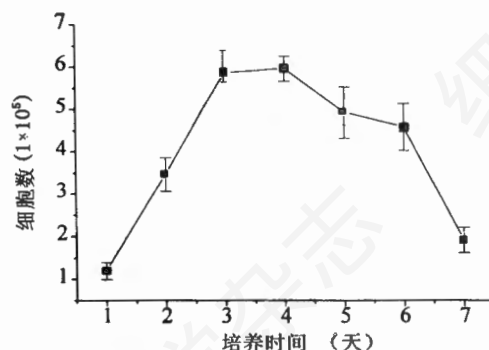


图 3 转基因骨髓基质细胞株 HFCL/pLTSN 生长曲线

TPO 依赖的细胞株 TD-3 测定 HFCL/pLTSN 的生物学活性。实验发现,不加 TPO 的 TD-3 细胞培养一天后即死亡,加 TPO 的细胞生长状态好,说明该细胞株对 TPO 具有特异的依赖性。首先我们对感染的基质细胞经传代后 TPO 的表达水平变化进行检测,结果表明,表达水平在 22.0ng/ml - 89.7ng/ml。后经多次筛选得到一稳定分泌 TPO 的基质细胞。以 TPO 纯品为标准对照,获得 TPO 标准曲线(见图 4),检测结果发现, HFCL/pLTSN 能维持 TD-3 细胞的生长,不加 rhTPO 或加入 HFCL/pLXSN 上清液均不能维持 TD-3 细胞的生长。用 MTT 法测定结果见表 1。可以看出, HFCL/pLTSN 具有较高的生物学活性。

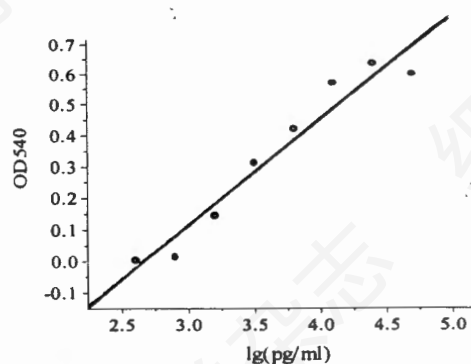


图 4 以 TD-3 细胞检测不同浓度标准 TPO 纯品获得的 TPO 标准曲线

表 1 转基因细胞培养上清 TPO 活性测定

细胞	TPO 活性 (ng/ml/5 × 10 ³ cells/48h)
HFCL	无
HFCL/pLXSN	无
HFCL/pLTSN	66.8 ± 2.4

讨 论

血小板生成素是近年发现的多肽造血生长因子,其主要生物学活性表现在促进巨核细胞的增殖、分化、成熟及血小板的生成,此外人们还发现它对造血干/祖细胞(CD34⁺细胞)的增殖与分化具有重要的调节作用。TPO 与 FL, IL-3, SCF, EPO, G-CSF 等协同作用,可促进粒系和红系祖细胞增殖。裴雪涛等^[6]研究了 TPO 与 SCF、IL-3、IL-6、EPO、G-CSF、GM-CSF 等细胞因子的不同组合对 CD34⁺细胞的扩增作用,发现 TPO 与上述细胞因子具有明显的协同效应,可使细胞总数扩增 300 余倍,CD34⁺细胞扩增 10-20 倍。对巨核系造血的刺激作用表现尤为明显,CFU-MK 刺激 2 周即可扩增 35 倍;此外,BFU-E 和 CFU-GM 分别扩增了 14.5 倍和 15 倍。Sitnicka 等发现 TPO 具有促进小鼠干细胞进入增殖周期的作用^[7]。

骨髓造血微环境中的主要成分是骨髓基质细胞,它对造血干/祖细胞的增殖和分化起重要的调控作用。其调节造血的机理是:通过与干细胞的密切接触及其分泌的造血生长因子,维持干细胞的自我更新和促进干/祖细胞的增殖与分化。Dimitri 等^[8]在研究体外扩增 CD34⁺细胞时发现,在有基质细胞存在的条件下,可使 CD34⁺细胞数目增加的同时,保持 CD34⁺细胞的生物学特性。Petzer 等报道基质细胞作为滋养层,与 TPO 等细胞因子协同作用,是 LTC-IC 生长的必需条件,并在此过程中起重要的调控作用^[9]。

基于骨髓基质细胞与 TPO 各自的生物学特征及对造血细胞的作用特点,我们采用基因重组技术,利用逆转录病毒载体具有使目的基

因在靶细胞中稳定表达、安全、低毒的优点,构建表达 TPO 的逆转录病毒载体,转染人骨髓基质细胞系 HFCL 后,RT-PCR 和基因组 PCR 分析证明 mRNA 水平有表达,基因组中整合有 TPO 基因,TPO 依赖株 TD-3 检测其在转基因基质细胞中的生物学活性,结果显示,获得了具有较高生物学活性的 TPO 表达蛋白。上述结果为进一步研究转基因骨髓基质细胞对 CD34⁺细胞体外扩增的影响及基因治疗提供了实验资料。

摘 要

为探讨逆转录病毒介导的 TPO 基因在人骨髓基质细胞系 HFCL 中的表达,利用脂质体法将含 TPO 基因的逆转录病毒载体导入 HFCL 细胞中,RT-PCR 和基因组 DNA PCR 分析证实 mRNA 水平有表达,基因组中整合有 Neo 基因和 TPO 基因。TPO 依赖细胞株 TD-3 检测生物学活性表明转染的骨髓基质细胞分泌 TPO。上述结果为进一步研究转基因骨髓基质细胞对造血细胞的调控作用提供了必要的基础资料。

关键词: 逆转录病毒载体 骨髓基质细胞系 血小板生成素 基因表达

参 考 文 献

- [1] Farese, A M. et al., 1995, *Blood*, **86**:54-59.
- [2] Sprugel, K H., et al., 1994, *Blood*, **84**:242a (suppl I).
- [3] Ku, H., et al., 1996, *Blood*, **87**:4544-4551.
- [4] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, 786-801.
- [5] Vigon, I., et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, **89** (12):5640-5644.
- [6] 裴雪涛等, 1997, *实验血液学杂志*, **5**(3):229-235.
- [7] Sitnicka, E., et al., 1996, *Blood*, **87**:4998-5005.
- [8] Dimitri, A. B., et al., 1998, *Blood*, **91**:111-117.
- [9] Petzer, A. L., et al., 1996, *J. Exp. Med.*, **183**:2551-2558.

STUDY ON THE EXPRESSION OF RETROVIRUS-MEDIATED TPO GENE TRANSFERRED INTO HUMAN BONE MARROW STROMAL CELL LINE

ZHANG Yi TANG Pei Xuan LIU Xiu Sen JIANG Fei Zi MAO Ning

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences Beijing 100850)

ABSTRACT

To study the expression of retrovirus-mediated TPO gene transfer into human bone marrow stromal cell line HFCL. Thrombopoietin(TPO)cDNA was recombined with retroviral vector pLXSN. After this recombinant plasmid was transferred into retrovirus packaging cell line PA317 by Lipofectamine, resistant clones were selected by G418 selective medium. TPO mRNA expression and Neo gene and TPO cDNA in HFCL were successfully detected by RT-PCR and genome DNA PCR. The biological activity of TPO in the cultural medium was demonstrated that HFCL transfected with cDNA could significantly secrete TPO in vitro. These results provided a basis for further study on hematopoietic regulation.

Key Words: Retroviral vector Bone marrow stromal cell line Thrombopoietin Gene expression

ATP 对中性粒细胞 H_2O_2 产生双重作用机制的研究

张煜巴图

(白求恩医科大学第一临床学院 长春 130031)

由于血小板与白细胞在血液中的密切关系,人们对血小板中的 ATP 研究越来越多。现已表明,ATP 增强白细胞表面粘附分子的表达;促进白细胞粘附于内皮细胞;促进白细胞向感染或缺血部位移动;促进白细胞释放水解酶。然而,对于白细胞呼吸爆发的作用却有不同的报道。Kuhns 等^[1]研究结果显示,ATP 增强 fMLP(甲酰基-甲硫氨基-亮氨酸-苯丙氨酸)活化的白细胞释放氧自由基。而 McGarrity 等^[2]报道则相反,ATP 抑制白细胞释放氧自由基;Naum 等^[3]研究认为,低浓度 ATP 具有增强作用,高浓度时则表现为抑制。为了解答这一差异性的结果,我们用高压液相方法测定了 ATP 的代谢。现报道如下。

材料与方法

1. 白细胞分离

取健康成年人静脉血 50mL,肝素抗凝,用 Percoll 细胞分离液,参照 Wright 法^[4]进行,离心后收集白细

胞,用 PBS 冲洗二次,蒸馏水溶解污染的红细胞。冲洗后的细胞再用 HBSS 配成理想的浓度 1×10^6 /mL,计数所得细胞,以白细胞比例 >90% (革兰氏染色)及细胞活力 >95% (台盼蓝拒染)为合格。

2. H_2O_2 的测定

采用鲁米诺依赖的全血化学发光法 (CL) 参照 Wymann 法^[5]进行,这是测定白细胞呼吸爆发非常敏感的方法。不同浓度 ATP 或和腺苷受体拮抗剂 CGS15943 ($1 \mu\text{mol/L}$) 加到含白细胞 10^6 /mL 的试管中,37℃ 条件下水浴 2 或 5min, fMLP ($1 \mu\text{mol/L}$) 激活细胞,细胞释放的 CL 用 Luminometer 测定。CL 峰值代表白细胞产生的 H_2O_2 量。数据表达采用对照组的百分比。所有药物在无细胞情况下均不影响鲁米诺系统。

3. ATP 的代谢

1×10^6 /mL 白细胞与 ATP ($10 \mu\text{mol/L}$) 在 37℃ 条件下,按规定的时间水浴后,15,000 转 (常温) 离心 1min,上清液在 85℃ 条件下再水浴 2min,15,000 转 (+4℃) 离心 10min,上清液储存在 -20℃ 下直到使用。采

本文 1999 年 1 月 18 日收到,4 月 20 日接受。