

· 论 著 ·

人颗粒溶素活性肽重组卡介苗的构建与表达*

张黎¹, 杨春², 何永林², 李娜², 徐蕾², 帖儒修²

(重庆医科大学:1 附属第一医院眼科;2 神经科学研究中心 400016)

摘要:目的 构建携带人颗粒溶素(GLS)活性肽的重组卡介苗(BCG),并鉴定该重组菌向真核细胞递呈质粒的能力。方法 以分子生物学方法构建携带 GLS 活性肽基因和分支杆菌复制子 OriM 的真核穿梭共表达质粒 pBMS,以电转化方式将 pBMS 质粒转入 BCG 构建重组 BCG,抽提质粒进行 PCR 鉴定重组菌;将重组菌感染巨噬细胞,通过 RT-PCR 了解重组菌向真核细胞递呈质粒的能力。结果 采用电转化方式可将 pBMS 导入 BCG,抽提质粒鉴定出与 GLS 基因相符的目的条带。以该重组 BCG 感染小鼠巨噬细胞,96 h 后用 RT-PCR 法可扩增出相应的基因条带。结论 成功构建含 pBMS 的重组 BCG。该重组 BCG 能向小鼠巨噬细胞递呈携带基因。

关键词:颗粒溶素;重组卡介苗;真核表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.011

中图分类号:R730.51;R446.61

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)15-1965-03

Construction and expression of recombinant Bacille Calmette-Guerin carrying human granulysin active peptide*

ZHANG Li¹, YANG Chun², HE Yong-ling², et al.

(1. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Institute of Neuroscience Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objectives To construct recombinant Bacille Calmette-Guerin(BCG) carrying human granulysin genes, and to identify the ability of recombinant BCG for submitting plasmids to eukaryotic cells. **Methods** Co-expression shuttle plasmid of pBMS, including human granulysin genes and mycobacterial replicon of Orim, was built using molecular biological approach. The pBMS was transfected to BCG competence by electroporation to construct recombinant BCG. The plasmid of recombinant BCG was extracted for PCR identification. The ability of submitting plasmids to eukaryotic cells was determined by RT-PCR. **Results** The plasmid pBMS may be transduced into BCG with electroporation. The specific bands for GLS of the recombinant BCG were detected by PCR. The specific bands for 267 bp GLS were amplified from transfected macrophages after 96 hours by RT-PCR. **Conclusion** The recombinant BCG carrying pBMS was constructed successfully. The recombinant BCG can submit the carried genes to mice macrophages.

Key words: granulysin; recombinant BCG; eukaryotic expression

恶性肿瘤是严重危害人类健康和生命的疾病之一。传统治疗方法包括放、化疗和手术治疗,但由于其局限性而促使人们寻找新的抗肿瘤治疗方法。肿瘤免疫基因治疗是继手术和化、放疗之后出现的一种新型治疗手段,已成为抗肿瘤研究的热点之一。颗粒溶素(GLS)是人体自然杀伤细胞(NK)、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)产生的一种具有抗菌、抗肿瘤的免疫效应分子^[1],重组 Mr 9000 GLS 可引起多种肿瘤细胞凋亡^[2]。卡介苗(bacille calmette-guerin, BCG)由于多年的安全载体应用经验及良好的免疫佐剂作用等特点已成为肿瘤基因治疗的理想治疗载体^[3]。本研究旨在构建含分泌肽基因 Mr 9000 GLS 的重组卡介苗,并观测其递呈治疗基因的能力,为下一步肿瘤的体内基因治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌株及质粒 E. coli Top 10、BCG(丹麦株)为本室自藏,多启动子真核共表达质粒 pBudCE4.1 购自 Invitrogen 公司,小鼠 RAW264.7 巨噬细胞株购自第三军医大学药理学教研室,含 Orim 基因的质粒 pZMO₃ 由本实验室伊正君等^[4]构建。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基干粉、Hank's 液购自美国 Gibco 公司, Middlebrook 7H9、Middlebrook 7H10 培养基干

粉、Middlebrook OADC Enrichment 购自重庆惠利试剂中心(美国 Difco 公司产品),新生小牛血清购自杭州四季青公司,胰蛋白酶购自 Amresco 公司,质粒小量抽提试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、小量胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司,逆转录试剂盒(Ver. 3.0)、DNA Marker DL 2000、DNA Marker DL 15000、高保真 Probest-Taq 酶及高效 Ex-Taq 酶、各种限制性核酸内切酶购自大连宝生物技术有限公司,Zeocin 抗生素、真核转染试剂 LipofectaminTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司,保真 Taq-plus 酶、高保真 pfu 酶、超纯 UniQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒、MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自上海生物工程有限公司。

1.3 pBudCE4.1-S9K 质粒的构建 登录 GeneBank 查找 granulysin 编码序列(NM_006433),结合 Stenger 等^[5]提供的 Mr 9000 活性肽基因片段(222 bp),将 GLS Mr 15000 前体分子基因分泌肽 45 bp 与 Mr 9000 活性片段 cDNA 端 23 bp 共 68 bp 设计为引物 P1: 5'-ATG GCT ACC TGG GCC CTC CTG CTC CTT GCA GCC ATG CTC CTG GGC GGC CGT GAC TAC AG GAC CTG TCT-3'。再根据带分泌肽 Mr 9000 GLS 的 cDNA 序列(共 267 bp)分别设计引物 P2、P3,分别含 Hind III 和 BamH I 酶切位点。引物 P2: 5'-ATA AGC TTA

* 基金项目:重庆市自然科学基金重点资助项目(2007BA5013)。

CCA TGG CTA CCT GGG CCC TCC TGC-3', 插入 Hind III 酶切位点 AAG CTT, 同时添加 ACC, 使 ATG 位于 ACC ATG G 的 KOZAK 序列中(有利于真核细胞蛋白翻译起始)^[6]; 引物 P3: 5'-AGG GAT CCT CAC CTG AGG TCC TCA CAG ATC TGC TGG-3', 插入 BamH I 酶切位点 GGA TCC 和终止密码对应序列。以 pZM 03 为模板, PCR 扩增含分泌肽 Mr 9000 GLS 基因片段, 扩增反应体系: 10×buffer 5 μL, 2.5×dNTP 8 μL, P1、P2 各 0.5 μL, P3 1 μL, Probest DNA 聚合酶 0.5 μL, DNA 模板 1 μL, 灭菌去离子水 33.5 μL, 共 50 μL; 扩增条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C、5 min。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。用 PCR 产物回收试剂盒对 PCR 产物进行回收。用 Hind III/BamH I 双酶切 PCR 产物, 并用相应酶消化载体质粒 pBudCE4.1 回收目的 DNA 片段。

根据 TakaRa 连接试剂盒说明操作, 将分泌肽 Mr 9000 GLS 活性片段基因定向克隆进载体质粒 pBudCE4.1 中, 构建含分泌肽基因片段重组 Mr 9000 GLS 真核表达质粒 pBudCE4.1-S9K。将重组质粒转化感受态大肠埃希菌 *E. coli* Top 10, 然后在含 40 μg/mL 的 Zeocin 抗生素低盐 LB 培养基中进行筛选。提取重组质粒用于鉴定。抽提重组质粒进行 PCR 和酶切鉴定, 将经双酶切鉴定的重组质粒送博亚生物技术公司测序鉴定。

1.4 pBMS 穿梭质粒的构建 用 Nhe I 分别消化质粒 pBudCE4.1-S9K 和 pZM03, 胶回收 pBudCE4.1-S9K 酶切载体大片段和 pZM03 酶切 OriM 基因小片段。用 TakaRa 公司连接试剂盒进行连接, 按说明书操作, 构建 pBMS 穿梭共表达质粒。将重组质粒转化感受态大肠埃希菌 *E. coli* Top 10, 然后在含 Zeocin 抗生素低盐 LB 培养基中进行筛选。抽提重组质粒进行 OriM 基因 PCR、酶切鉴定, 将鉴定正确的质粒命名为 pBMS。

1.5 pBMS 重组 BCG 的构建 将对数生长期 BCG 菌株以预冷 100 mL/L 甘油去离子水洗涤 3~4 次, 4 °C、4 000 r/min(离心半径 9 cm)离心 10 min, 用 10% 甘油去离子水重悬, 取 180 μL 菌液加入 20 μL 纯化 pBMS 质粒, 轻轻混匀, 冰浴 10 min, 转入预冷 2 mm 电转杯中[电转化仪(Bio-Rad ECM630)]。电转仪条件设置为“指数衰减波、2 500 V”电击 1 次, 迅速加入 600 μL Middlebrook 7H9 液体培养基。37 °C 孵育过夜后涂布于含 Zeocin 40 μg/mL 的 Middlebrook 7H10 固体平板上, 37 °C 孵育 14 d 后挑取阳性菌落增菌后抽提质粒, 同时取 1 mL 菌液, 离心弃上清液, 沉淀加入 500 μL 三蒸水, 100 °C 热裂解 8 min, 取上清液 2 μL 或质粒抽提物 1 μL 为模板, 分别作 GLS 和 OriM 的 PCR 扩增。

1.6 pBMS 重组 BCG 基因递呈能力鉴定 将重组 BCG 在含 Zeocin 40 mg/L 的 Middlebrook 7H9 液体培养基中培养、增菌, 以完全 RPMI 1640 培养液重新调整细菌浓度为 2×10^9 CFU/L 数量级备用。完全 RPMI 1640 培养液培养 RAW 264.7 细胞, 观察细胞贴壁后, 每孔加 200 μL 细菌悬液, 置细胞培养箱中 37 °C、5% CO₂ 孵育 4 h 后, 以预温不含血清 RPMI 1640 培养液洗涤培养板 3 次, 去除未被巨噬细胞吞噬的细菌后加入卡那霉素, 使其终浓度为 100 μg/mL, 置孵箱中 4 h。4 h 后换成完全 PRMI 1640 培养基, 此后每隔 12 h 以 37 °C 预温含 PMA 100 nmol/L、卡那霉素 30 μg/mL 完全 PRMI 1640 培养基换液。采用超纯 UniQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒、MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒分别于细菌感染 96 h 收集实验孔(重组 BCG)及对照孔(BCG)细胞, 提取总 RNA 进行逆

转录。以各自 cDNA 为模板, RT-PCR 检测 GLS 表达。

2 结果

2.1 GLS 基因鉴定 重组 pBudCE4.1-S9K 质粒用特异性引物进行 PCR 扩增, 可扩增出大小约 267 bp 的片段。采用 Hind III/BamH I 双酶切可切出相同大小片段。pBudCE4.1-S9K 测序结果表明基因未发生突变, 基因序列与 GenBank(NM_006433)报道完全一致(图 1、2)。

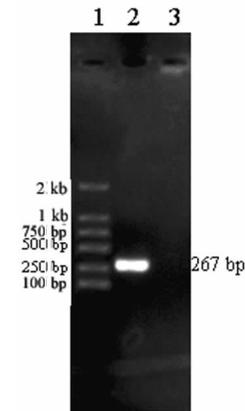


图 1 DNA 分子标准; 2: 含分泌肽基因的 Mr 9000 GLS 扩增片段; 3: 阴性对照。

图 1 含分泌肽基因 Mr 9000GLS 基因扩增结果

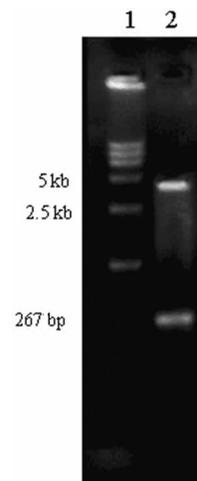


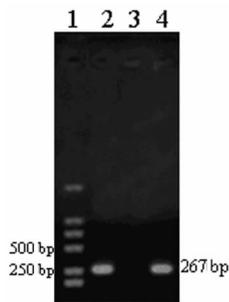
图 2 DNA 分子标准 DL 15000; 2. pBudCE4.1-S9K 以 Hind III 和 BamH I 双酶切结果。

图 2 pBudCE4.1-S9K 酶切鉴定结果

2.2 OriM 基因鉴定 重组 pBM9 质粒用特异性引物进行 PCR 扩增, 可扩增出大小约 1 914 bp 片段。用 Nhe I 酶切可切出相同大小片段。

2.3 重组 BCG 筛选鉴定 电转化后 BCG 在含 Zeocin 抗生素 Middlebrook 7H10 固体培养基中长出菌落, 而对照平板涂布无质粒转染的感受态 BCG 无菌落生长。将转化质粒 pBMS 的 BCG 命名为 pBMS 重组 BCG。重组菌能抽出质粒, 用 GLS 特异性引物扩增, 出现相应目的条带。

2.4 重组 BCG 向真核细胞递呈质粒能力鉴定 以重组 BCG 感染 RAW 264.7 细胞后进行抗酸染色观察, 可见红色抗酸菌在巨噬细胞胞浆中富集, 巨噬细胞核呈蓝色, 在细胞间隙中只有极少量散在重组 BCG 存在(封 2 图 3)。重组 BCG 感染 RAW 264.7 细胞 96 h 后, 在细胞浆中检测到 GLS 目标基因的表达(图 4)。



1:DNA 分子标准 DL 2000;2:pBMS 重组 BCG 感染 RAW 264.7 细胞 RT-PCR 鉴定结果;3:BCG 感染 RAW 264.7 细胞 RT-PCR 鉴定结果;4:阳性对照。

图 4 重组 BCG 感染 RAW 264.7 细胞的 RT-PCR 鉴定结果

3 讨 论

在以细胞免疫为主的多种疾病中,如肿瘤、胞内寄生菌、真菌、原虫感染等,免疫基因治疗已成为一种重要手段。治疗机制主要是通过细胞因子本身生物学活性及其佐剂作用优化宿主特异性免疫应答,诱导机体产生更有效的免疫保护作用,从而清除病原体。

基因治疗包括两方面要素,一是选择有效的治疗分子;二是选择合适的载体。BCG 作为载体,在疫苗研制、肿瘤基因治疗等研究方面已取得重要进展。BCG 的许多特性使其成为最有吸引力的传递外源性基因载体^[3]。首先,BCG 安全性良好,自 1948 年以来已有接近 30 亿人群接种,未发现严重的不良反应。其次,BCG 在感染宿主体内能够持续存在,有助于作为治疗性免疫目的的外源性抗原的携带。第三,BCG 是用于人类和动物的最强免疫佐剂。第四,BCG 的生产费用低,热稳定性好;重组 BCG(rBCG)的构建相对简便,采用电转化技术已能在卡介苗分枝杆菌中表达外源基因。BCG 作为非特异性免疫刺激剂,可以减慢肉瘤和癌的生长。BCG 可刺激机体的细胞免疫应答,纠正 Th1/Th2 型细胞免疫失衡,使其偏向 Th1 细胞型,或抑制 Th2 型细胞免疫应答。

GLS 是近年来新发现的免疫效应分子,主要由 NK 细胞和杀伤性 T 细胞分泌,广泛参与抗菌、抗病毒和杀伤肿瘤细胞等免疫过程。正常健康人群外周血浆中有一定浓度(3.7±3.2

ng/mL)的 GLS 分子,而在以细胞免疫功能下降为特征的肿瘤患者个体中却明显降低。目前的研究发现,GLS 不但是衡量机体细胞免疫功能的一个重要指标^[2,7],而且还参与了直接的抗肿瘤作用。GLS 有 9×10^3 和 15×10^3 两种蛋白形式, 9×10^3 为其活性形式。重组 GLS 9×10^3 多肽片段对多种肿瘤细胞系有杀伤作用,包括 Jurkat、YAC-1、K562 等^[2]。

本实验通过电转化方法,成功构建了携带分泌型 GLS 基因 pBMS 重组 BCG,并且证实该重组菌能够向真核细胞递呈质粒。本研究利用肿瘤个体免疫低下、GLS 表达降低等特点和 BCG 良好的安全性和免疫佐剂作用,将含 GLS 分泌型 Mr 9000 活性片段基因经 BCG 呈递给免疫细胞-巨噬细胞并表达,在肿瘤局部以旁分泌方式产生 GLS 来达到直接抗肿瘤的目的,增强细胞免疫功能使机体自身抗肿瘤能力得以提高。将两种治疗因子同时应用,从不同机制达到共同抗肿瘤的目的,理论上优于单一治疗因子或同一机制的两种分子联用。

参考文献:

[1] Krensky AM, Clayberger C. Granulysin: A novel host defense molecule [J]. *Am J Transplant*, 2005, 5(8): 1789.
 [2] Okada S, Li Q, Whitin JC, et al. Intracellular mediators of granulysin-induced cell death [J]. *J Immunol*, 2003, 171(5): 2556.
 [3] Mostowy S, Tsolaki AG, Small PM, et al. The in vitro evolution of BCG vaccines [J]. *Vaccine*, 2003, 21: 4270.
 [4] 伊正君, 朱道银, 陈全, 等. 人颗粒溶素与小鼠单链 IL-12 真核共表达质粒的构建及其在 RAW 264.7 细胞中的表达 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2005, 21(11): 936.
 [5] Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin [J]. *Science*, 1998, 282(5386): 121.
 [6] Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control [J]. *J Cell Biology*, 1991, 115: 887.
 [7] Kaspar AA, Okada S, Kumar J, et al. A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin [J]. *J Immunol*, 2001, 167(1): 350.

(收稿日期:2009-08-20 修回日期:2010-01-15)

(上接第 1964 页)

[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2007, 24(1): 39.
 [7] 庄心良, 曾因明, 陈伯銮. 现代麻醉学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1413.
 [8] Slavk VC, Zed PJ. Combination ketamine and propofol for procedural sedation and analgesia [J]. *Pharmacotherapy*, 2007, 27(11): 1588.
 [9] 蒋俊丹, 陈彦青, 陈晓影. 咪达唑仑、异丙酚复合琥珀胆碱用于小儿气管异物麻醉 37 例 [J]. *福建医药杂志*, 2003, 25(4): 33.
 [10] 黄辉琼, 张长成, 黄立红. 两种麻醉方法用于小儿气管异物取出术的比较 [J]. *福建医科大学学报*, 2004, 38(3): 338.
 [11] Gupta A, Kaur R, Malhotra R, et al. Comparative evaluation of different doses of propofol preceded by fentanyl on

intubating conditions and pressor response during tracheal intubation without muscle relaxants [J]. *Paediatr Anesth*, 2006, 16(4): 399.
 [12] 李平, 薛富善, 刘毅, 等. 小剂量芬太尼预防小儿直接喉镜经口气管插管心血管反应的效果 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2006, 21(15): 1031.
 [13] 刘鲲鹏, 薛富善, 许亚超, 等. 小剂量芬太尼、瑞芬太尼和舒芬太尼预防小儿经口气管插管心血管反应的比较 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22(5): 391.
 [14] 陈伯銮. 临床药理麻醉学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 301.
 [15] 朱昭琼, 余志豪, 秦榜勇. 纤维支气管镜检查对循环功能的影响 [J]. *临床医学*, 1998, 18(12): 42.

(收稿日期:2009-11-10 修回日期:2010-01-10)