

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0203-04

基因枪介导重组 hGM-CSF 转移系统的建立及其在人肿瘤细胞中的稳定表达

郑天荣¹, 郑秋红², 林贤东³, 谢云青², 龚福生²(1. 福建省肿瘤医院, 福州 350014, 2. 福建省肿瘤医院肿瘤分子室; 3. 福建省肿瘤医院免疫病理室)

[摘要] **目的:** 建立基因枪介导的基因转移系统, 为基因修饰的肿瘤细胞疫苗研究奠定实验基础。 **方法:** 采用基因枪转导的方法, 将真核表达质粒(pcDNA3.1GM-CSF)转导入人胃癌细胞株(SGC), 经 G418 筛选获得阳性克隆(SGC-GM-CSF), 通过 RT-PCR 方法鉴定, 重组载体已整合到胃癌细胞的基因组中。 **结果:** SDS-PAGE 和 Western blot 分析的 SGC-GM-CSF 上清液结果显示 rhGM-CSF 主带在 30 kD 左右, SGC-GM-CSF 在体外长期培养中保持稳定分泌, 分泌量达到 24 h 平均 247 ng/10⁶ cell。 **结论:** 建立的基因枪介导的基因转移系统安全、有效, 为应用于肿瘤基因治疗提供了实验基础。

[关键词] GM-CSF; 基因枪; 肿瘤疫苗; 基因治疗

[中图分类号] R730.54 [文献标识码] A

The Establishment of Gene Gun-Mediated Human GM-CSF Gene Transfection System and It's Stable Expression in Tumor Cells

ZHENG Tian-rong, ZHENG Qiu-hong, LIN Xian-dong, XIE Yun-qing, GONG Fu-sheng (The Tumor Hospital of Fu Jiang Province, Fuzhou, 350014 China)

[**Abstract**] **Objective:** To provide an effective hGM-CSF gene transferring vector mediated by gene gun and a basis for study of hGM-CSF gene-modified tumor cell vaccines. **Method:** The gastric tumor cell line (SGC) was transfected with eukaryotic expression plasmid deoxyribonucleic acid containing the human granulocyte-macrophage colony-stimulating (hGM-CSF) gene using the gene gun. The SGC cell clones (SGC-GM-CSF-1 ~ 5) secreting high hGM-CSF level were obtained after G418 resistance selection. The hGM-CSF gene had been integrated into chromosome of SGC by the assay of RT-PCR. **Results:** There was hGM-CSF production whose lane was about 30 kD in the culture medium of SGC-GM-CSF by the assay of SDS-PAGE and Western blot. SGC-GM-CSF had the ability of the high level of GM-CSF for a long-time (mean 247ng/(10⁶ cell · 24 h). **Conclusion:** The hGM-CSF gene transferring vector mediated by gene gun was effective and safe. These results provide a basis for study of GM-CSF gene therapy for cancer.

[**Key words**] GM-CSF; gene-gun; cancer vaccines; gene therapy

* 基因枪介导重组 hGM-CSF 转移系统的建立及其在人的肿瘤细胞中的稳定表达随着分子免疫学、肿瘤分子生物学和生物工程技术的发展, 肿瘤免疫基因治疗成为肿瘤治疗的一个研究热点。肿瘤免疫基因治疗用于临床所面临的最大问题就是如何将这些候选的治疗基因有效地导入靶组织, 使其以合适的水平表达, 达到治疗效果, 即如何建立一个安全、高效、实用、可重复的基因转移系统^[1]。目前所使用的基因转移系统有病毒介导的和非病毒介导的两大类。在病毒介导的基因转移系统中以逆转录病毒和腺病毒用得最为广泛, 但是直接用活病毒作载体带来的危险仍被人们关注。

在非病毒介导的基因转移系统中, 基因枪技术以其在间接体外实验中的转基因表达水平为其它基因转移方法如脂质体、磷酸钙和电转法的 100 倍以上而受到越来越多的研究者的注意^[2-3]。

在目前众多的细胞因子中, hGM-CSF 作为多功能细胞因子, 在机体造血调控及肿瘤免疫应答网络中起

* [基金项目] 本课题是福建省自然科学基金项目(C97067) 资助

[作者简介] 郑天荣(1949-), 男, 福建省福清市人, 教授, 主任医师, 分子病理学及肿瘤生物治疗。

[通讯作者] 林贤东

着重要作用。本研究在克隆人 GM-CSF(hGM-CSF)基础上,构建人 pcDNA3.1 GM-CSF 真核高效表达载体^[4],经基因枪介导转染胃癌细胞株(SGC);以观察肿瘤细胞产生 hGM-CSF 的能力及其稳定性,为肿瘤疫苗的制备及探索新的基因转染方法打下实验基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

SuperscriptTM试剂和 TrizolTM购于 Gibco 公司;鼠抗人 GM-CSF 单克隆抗体、Western blot kit 均购于深圳晶美公司; Human GM-CSF ELISA kit 购于 Endogen 公司; G418 购于北京邦定公司; pcDNA3.1 空载质粒购于 invitrogene 公司。

1.2 细胞系及细胞培养

人的胃癌细胞系(SGC)用含有 10% 小牛血清,青、链霉素各 100 U/ml 的 RPMI-1640,在 37℃, 5% CO₂ 孵育箱中培养。

1.3 pcDNA3.1 GM-CSF 真核表达质粒的构建和鉴定

参考文献^[5]方法进行。

1.4 用基因枪把 pcDNA 3.1 GM-CSF 质粒和 pcDNA 3.1 空载质粒(作为对照)导入 SGC 细胞。

1.4.1 基因枪子弹制备

用亚精胺-CaCl₂ 包被法^[6]将质粒包裹在直径为 1.0 μm 的金颗粒上,将金颗粒-质粒乙醇溶液吸入管中,使金颗粒沉淀在管的内表面上,吸去乙醇,用氦气将管吹干,将管切成 17.7 mm 的小段即制成子弹。每个子弹携带有 0.5 mg 金,1.25 μg DNA。

1.4.2 受体细胞 SGC 制备及 pcDNA 3.1 GM-CSF 质粒(或 pcDNA 3.1 质粒)的导入

取 100 μl 含 1 × 10⁵ 个 SGC 细胞培养液平铺在 100 mm 培养皿直径 1.5 cm 的区域内,当细胞黏附 30 min 后,培养皿中加入 10 ml 培养液,过夜培养。移去培养液,1 033.5 kPa 轰击细胞。轰击后加入 10 ml 含 1 000 μg/ml G418 新鲜培养液(含 10% 小牛血清 RPMI-1640)进行筛选。

1.5 用 G418 筛选 SGC-GM-CSF 抗性细胞克隆

以上转基因的 SGC 细胞,加入 1 000 μg/ml G418 进行选择培养,每 3 天换液 1 次,1 个月后筛选抗性克隆,再以有限稀释法使之单克隆化和扩大培养。

1.6 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析

参照文献^[7]上方法配制及操作,收集转基因细胞培养上清液,浓缩样品,PBS 缓冲液透析。使用 10% 分离胶,4% 成层胶,进行垂直电泳。电泳后,采用银染色法进行染色。标记蛋白购自 BIO-RAD 公司。Western blot 分析按试剂盒提供方法进行。

1.7 细胞总 RNA 的提取及 RT-PCR 分析

参照试剂说明,提取各抗性克隆细胞总 RNA,进行凝胶电泳,定量,应用试剂盒进行逆转录,然后将此产物作为模板,加引物进行扩增鉴定。

1.8 hGM-CSF 含量的测定

SGC-GM-CSF 细胞扩大培养,每 24 小时收集 SGC-GM-CSF 细胞培养上清液(1 × 10⁶ 个细胞), -70℃ 冷藏。采用 Endogen human GM-CSF ELISA kit。按试剂盒说明书要求操作,450 nm 处测 OD 值,在用标准品 OD 值绘出的标准曲线上查出样本浓度。

1.9 SGC-GM-CSF-3 细胞体外分泌 hGM-CSF 长期动态观察

分别于 SGC-GM-CSF-3 细胞体外培养的第 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 天收集细胞 1 × 10⁶ ml⁻¹ 培养 24 h 的上清液,测定它们 hGM-CSF 含量。

1.10 统计学处理

采用未配对计量资料 *t* 检验。

2 结 果

2.1 SGC 细胞的转染及 G418 抗性克隆的筛选

人 GM-CSF 重组质粒以 SGC 细胞作为稳定表达的宿主细胞,基因枪介导的质粒转染细胞后,经 G418 筛选,1 个月后获得阳性抗性克隆称为 SGC-GM-CSF 细胞(图 1),空载体转染的称为 SGC-neo 细胞。取 5 株生长状况良好的细胞进行有限稀释及克隆化,逐级进行扩大培养。

图 1 经 G418 筛选的 SGC-GM-CSF 抗性细胞克隆
Fig.1 G418 resistant SGC-GM-CSF cell clone (1.5 × 20)

由图 1 可见,SGC-GM-CSF 细胞生物学形态成梭形或圆形,外表光滑无泡、细胞饱满、色泽光亮,在生物学形态上与野生型 SGC 细胞无差别。

2.2 抗性克隆的 RT-PCR 分析

运用 TrizolTM试剂提取 SGC 阳性抗性克隆(SGC-GM-CSF)总的 RNA(total RNA),1% 琼脂糖凝胶电泳,

可见明显的 28S, 18S 区带(图 2)。RT-PCR 分析, 均可扩增出特异的 440 bp 左右 hGM-CSF cDNA 片断, 表明阳性克隆株(SGC-GM-CSF)内有 hGM-CSF mRNA 的转录, 而 SGC, SGC-neo 未出现任何条带。

图 2 SGC-GM-CSF 细胞总 RNA

Fig. 2 Total RNA of the SGC-GM-CSF cells

图 3 SGC-GM-CSF 克隆细胞的 RT-PCR 分析

Fig. 3 GM-CSF expression in the SGC-GM-CSF cell clones determined by RT-PCR

M: DNA marker; 1~6: SGC-GM-CSF;
7: SGC-neo; 8: SGC

2.3 细胞培养上清的 SDS-PAGE 分析和 Western blot 分析

SGC-GM-CSF 细胞与 SGC-neo 细胞及野生型 SGC 细胞在 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液内连续培养 6~8 d, 收集上清液, 电泳、银染, 银染分析结果如图 4 所示, SGC-GM-CSF 上清样品在 30 kD 处有明显条带出现(泳道 3), 而 SGC-neo 细胞(泳道 2)和 SGC 细胞(泳道 1)上清则未见任何清晰的相应染色条带, 表明 SGC-GM-CSF 细胞能够表达一种分子量为大约 30 kD 的蛋白质, 且分泌于胞外。Western blot 分析如图 5 所示, 该产物能够与鼠抗人 GM-CSF 单克隆抗体特异结合, 从而证实, 该蛋白即为 rhGM-CSF。

2.4 hGM-CSF 表达水平的 ELISA 分析

采用 ELISA kit 试剂盒, 对 SGC-GM-CSF 细胞上清液进行分析, 分析结果表明, SGC-GM-CSF 细胞上清液能够与 GM-CSF 抗体特异结合, 出现明显的酶联反应, 从而认为该上清内有 hGM-CSF 的表达, 每 24 小时表达量为 $(247 \pm 79) \text{ ng}/10^6$ 。而在 SGC 和 SGC-neo 的上

清液未检测到 hGM-CSF 的存在。

图 4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the supernature from the SGC-GM-CSF cells

M: Protein weight standard; 1: SGC;
2: SGC-neo; 3: SGC-GM-CSF

图 5 SGC-GM-CSF 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 5 Western blot analysis of the supernature from the SGC-GM-CSF cells

M: Protein weight standard; 1: SGC;
2: SGC-neo; 3: SGC-GM-CSF

2.5 SGC-GM-CSF 细胞株分泌 hGM-CSF 长期动态观察

我们选择高分泌 GM-CSF 的 3 号克隆株(Clon3)进行体外长期培养, 间断测定上清液的 hGM-CSF 含量。经过长达 120 d 体外培养, 发现该细胞克隆株经过短暂调整后, 其 hGM-CSF 分泌水平已趋向于稳定, 表明 hGM-CSF 基因已稳定整合到 SGC 细胞染色体上并有效表达。

3 讨论

基因修饰的肿瘤细胞瘤苗在动物肿瘤模型中显示出显著运用前景。现在大部分动物或人的实验都是通

过逆转录病毒转导自身肿瘤细胞来制备瘤苗。其他载体包括腺病毒、牛痘病毒以及物理方法,例如脂质体和基因枪,也都被用在瘤苗制备过程中。逆转录病毒存在着操作相对复杂、病毒载体潜在的危险性及不能转导不分裂细胞的缺点。腺病毒和牛痘病毒虽能产生高水平的基因表达,但是存在操作复杂和潜在产生抗病病毒免疫反应危险。脂质体介导的基因转染相对简单、安全,但也存在转染效率低和基因表达率低。目前看来,基因枪方法有着安全、操作简单,即使在某些不分裂细胞都能有高转染率,同时避免病毒操作危险^[8-9],所以它应该具有上述种种转基因方法所无法比拟的优点。

基因枪作为一种纯物理的基因转移方法,具有以下优点:① 高效。基因枪技术的转移效率取决于金颗粒携带目的基因的多少,每颗“子弹”包含的金属颗粒的数目以及轰击过程中氦气的压力。② 安全。该技术使用的金属颗粒不具有化学活性,对机体毒性小。③ 实用。基因枪对轰击对象无严格限制。靶细胞可以是植物细胞,也可以是动物细胞,处于静止期或分裂期细胞。而且,可直接对活体组织进行基因转移,避免传统基因转移方法需长期体外培养的缺点,更好地适应了基因治疗临床试验的需要。④ 获得高水平的共转移。可以将不同的治疗基因以需要的比例混和,共同包裹在金颗粒上,也可以构建一个包含多个治疗基因的载体,还可以在轰击时,用载有不同基因的子弹轰击同一个靶组织。Sun^[10]获得了很好的 TNF- α 和 IFN- β , IL-2 和 IFN- γ 共转移,并在小鼠肾癌模型中取得较好治疗效果。

本研究以基因枪为载体将 hGM-CSF 基因导入人胃癌细胞株 SGC 细胞,并经筛选得到 hGM-CSF 阳性克隆株(SGC-GM-CSF)。所获得阳性克隆株分泌水平基本上接近 John Seigen 报道水平^[11],明显高于以前报用逆转录病毒转导的细胞^[12]。hGM-CSF 分泌的局部浓度将对抗肿瘤反应十分重要^[13]。经过对 SGC-GM-CSF 进行 RT-PCR 分析和阳性株分泌 hGM-CSF 动态观察,表明 hGM-CSF 基因已稳定整合到染色体上并能长期、有效表达。我们还发现 SGC-GM-CSF-3 经液氮长期保存后,其分泌水平没受到明显影响。我们把 SGC-GM-CSF-3 放置液氮中冷藏,分别在 2 周和 3 个月后复苏,其上清 hGM-CSF 的含量,与冷藏前分泌水平无显著差异($P > 0.05$)。这为瘤苗的贮藏及患者长期使用创造必备条件。

基因枪作为一种纯物理的基因转移方法,已成功地介导多种目的基因的体内外转移^[10,14-16],在肿瘤基因治疗中发挥着重要作用。但也存在着一些问题;

如残留金属颗粒的安全性有待进一步研究;基因枪在机体内部器官或组织的基因治疗中使用还有一定难度,能否设计出一种内窥镜式基因枪装置有待研究。上述问题的解决,必将使基因枪技术在肿瘤基因治疗中发挥出更大临床应用前景。

[参考文献]

- [1] Harimoto K, Sugimura K, Lee CR, *et al.* *in vivo* gene transfer methods in the bladder without viral vectors [J]. *B J Urol*, 1998, 81: 870-874.
- [2] Jiao S, Cheng L, Wolff JA, *et al.* Molecular crosstalk: Will virology and growth-factor research aid cytokine drug discovery? [J]. *Biotechnology*, 1993, 11/4: 465-471.
- [3] Yang NS, Deluna C, Cheng L. In gene therapeutic: Method and application of direct gene transfer [M]. Birkhauser, Boston: Wolff JA ed. 1994. 193-209.
- [4] Zheng qihong, Xie yunqing, lu lin, *et al.* Construction of eukaryotic expression vector with granulocyte-macrophage colony-stimulating [J]. *Chin J Cancer Res*, 2000, 12 (2): 125-127.
- [5] 萨姆布鲁克 主编. 金冬雁, 黎孟枫 编译. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社: 1995. 19-23.
- [6] Mahvi DM, Burkholder JK, Turner J, *et al.* Particle-mediated gene transfer of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cDNA to tumor cells: Implications for a clinically relevant, tumor vaccine [J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 20: 1535-1542.
- [7] 李永明 主编. 实用分子生物学方法手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 325-354; 366-368.
- [8] 查园园. 一种新的基因转移技术——基因枪 [J]. 国外医学肿瘤分册, 1999, 26(4): 193-195.
- [9] 童强松, 曾浦清, 鲁功成. 基因枪技术及其在肿瘤基因治疗中的应用 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2000, 15(9): 428-430.
- [10] Sun WH, Burkholder Jk, Jian Sun, *et al.* *in vivo* cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 2889-2893.
- [11] John Seigen, Joel Turner, Jose Diaz, *et al.* A feasibility study of gene gun mediated immunotherapy for renal cell carcinoma [J]. *J Urol*, 1999, 162: 1259-1263.
- [12] Mons JW, Jaffee EM, Weher CE, *et al.* Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by *ex vivo* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 1537-1543.
- [13] Mahvi DM, Sondel PM, Yang NS, *et al.* Phase I/IB study of immunization with autologous tumor cells transfected with the GM-CSF gene by particle-mediated transfer in patients with melanoma or sarcoma [J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8: 875-883.
- [14] Wang G, Quevedo ME, Lannuttin BJ, *et al.* *In vivo* gene therapy with interleukin-12 inhibits primary vascular tumor growth and induces apoptosis in a mouse model [J]. *J Invest Deam atol*, 1999, 112: 775-781.
- [15] Rakhmileach AL, Janssen K. Cytokine gene therapy of cancer using gene gun technology superior antitumor activity of interleukin-12 [J]. *Human Gene Ther*, 1997, 8: 1303-1311.
- [16] Tuting T, Gambotto A, Baar J, *et al.* Interferon-alpha gene therapy for cancer retroviral transduction of fibroblasts and particle-mediated transfection of tumor cells are both effective strategies for gene delivery in murine tumor effective strategies for gene delivery in murine tumor models [J]. *Gene Ther*, 1997, 4: 1053-1060.