

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0148-03

人 MUC1/Y 基因真核表达载体的构建及其在 COS/7 细胞中的表达

祁 澜¹, 曲 迅², 孔北华¹, 杨美香²(1. 山东大学齐鲁医院妇产科, 济南 250012; 2. 山东大学齐鲁医院临床基础研究所, 济南 250012)

MUC1/Y 是 1994 年发现的新基因,其蛋白锚定于细胞膜。研究表明, MUC1/Y 具有膜受体的特征,可能作为一种膜表面的重要分子通过 ras 信号传导通路参与细胞的恶性转化过程;进一步的动物实验表明, MUC1/Y 的表达具有肿瘤特异性。由此推测, MUC1/Y 可能是一种肿瘤主动特异性免疫治疗的理想靶分子^[1],但迄今为止, MUC1/Y 基因及其编码蛋白的功能尚未明确,因此,构建人 MUC1/Y 全长 cDNA 的真核表达载体,将对进一步研究该基因的功能以及以 MUC1/Y 为靶点的肿瘤核酸疫苗的制备,具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 细胞、细菌与载体

Hela 细胞、COS7 细胞、*E. coli* DH5 α , JM109 由山东大学生物工程中心提供, pMD 18-T vector 为 TaKaRa 公司产品, pEGFP-N1 真核表达质粒由山东大学分子生物教研室卞继峰教授惠赠。

1.2 工具酶及试剂

RPMI-1640、DMEM 及胰蛋白酶、胰蛋白酶、酵母提取物为 GIBCO 公司产品, MMLV Reverse Transcriptase 和脂质体 Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品, PCR 试剂盒、限制性内切酶 Hind III 和 Sac II 及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, DNA 胶回收试剂盒为上海生工产品, 化学试剂均为国产分析纯。

1.3 方 法

1.3.1 细胞培养

Hela 细胞、COS7 细胞分别培养在含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640, DMEM 培养基中, 0.25% 胰蛋白酶常规传代。

1.3.2 RNA 提取及 RT-PCR

根据已知 MUC1/Y mRNA 序列用 Primer Premier 5.0 软件设计两对引物: P1(sense) 5' AATTAAGCT-TATGACACCGGGCACCCAG 3'; P2(antisense) 5' TAT-ACCGCGCAAGTTGGCAGAAGTGG 3'; P3(sense) 5' TGCTGCTCCTCACAGTGCTTAC 3' ; P4(antisense) 5' CCTGGCCTGAACCTTAATATTGG 3'; 根据人全长 β -actin mRNA 序列设计一对引物: P5 (sense) 5' GT-

GGGGCGCCCCAGGCACCA 3'; P6(antisense) 5' CTC-CTTAATGTCACGCACGATTTC 3'。其中 P1, P2 的 5' 端分别添加 Hind III 和 Sac II 酶切位点及保护碱基, 用于克隆 MUC1/Y 全长 cDNA; P3, P4 用于扩增 MUC1/Y 开放阅读框内约 256 bp 的序列; P5, P6 用于扩增人 β -actin 序列中约 539 bp 的片段; 3 对引物及 oligo(dT) 18 均由上海博亚公司合成。

收集处于对数生长期的 HeLa 细胞约 5×10^6 , 采用异硫氰酸胍-酚氯仿抽提法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 纯度及浓度, 逆转录体系为 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 60 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min; 取逆转录产物 5 μ l, 总体系 100 μ l, 行降落 PCR, 条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 每 2 个循环退火温度降 2 度, 至 51 $^{\circ}$ C, 再维持 14 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察并保存图像。

1.3.3 PCR 产物的克隆和测序

将上述 PCR 产物在紫外线灯下行胶切割回收, 纯化, 用 TaKaRa DNA Ligation Kit 中的 Solution I 将 MUC1/Y 与 pMD 18-T vector 连接后转化至 *E. coli* Competent Cell JM109 中, 克隆产物命名为 pMD 18-MUC1/Y。经氨卞青霉素抗性筛选后从转化平板上挑取阳性单菌落, LA 培养基 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜, 取菌液送 TaKaRa 公司测序。

1.3.4 真核表达载体的构建

重组质粒 pMD 18- MUC1/Y 测序正确后将 Hind III 和 Sac II 双酶切回收的 MUC1/Y 基因与预先经 Hind III 和 Sac II 双酶切的 pEGFP-N1 真核表达质粒进行连接反应, 以连接反应液转化感受态 *E. coli* DH5 α , 挑选转化菌落。LB 培养基(含卡那霉素) 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜, 碱裂解法小量提取质粒。阳性重组子命名为 pEGFP-N1/MUC1/Y, 进行双酶切鉴定。

1.3.5 质粒的制备、转染及检测

按照“分子克隆”^[2]采用碱裂解法中量提取质粒 pEGFP-N1/MUC1/Y 和 pEGFP-N1, 并用 PEG8000 纯化质粒, 紫外分光光度计检测 DNA 纯度及浓度, 转染前

24 h 接种 COS7 细胞,按照 Lipofectamine 2000 脂质体试剂盒说明书进行转染,至 37℃,5% CO₂ 孵箱中孵育。转染 18 h 后荧光显微镜下观察。转染 48 h 后 0.25% 胰酶消化 COS7,3 000 r/min 离心 10 min 收集细胞,提取总 RNA,RT-PCR 法检测转染前后 COS7 细胞 MUC1/Y 的表达。

2 结果与讨论

2.1 pEGFP-N1/MUC1/Y 真核表达载体的构建。以 HeLa 细胞总 RNA 为模板,采用 RT-PCR 法扩增的 DNA 片段,其长度约 800 bp(图 1)。

图 1 RT-PCR 法扩增的 MUC1/Y 片段

1: 1 kb DNA Ladder Mix; 2: MUC1/Y

与 pMD 18-T vector 连接后经测序,与已知 MUC1/Y mRNA 序列完全符合。测序正确后,将重组质粒 pMD 18- MUC1/Y 和真核细胞表达载体 pEGFP-N1 行 Hind III 和 Sac II 双酶切,分别得到含有 Hind III 和 Sac II 酶切位点的 MUC1/Y 全长 DNA 和 pEGFP-N1- Sac II-Hind III 中约 5 kb 的片段,经连接、转化及卡那霉素抗性筛选后,提质粒,经 Hind III 和 Sac II 双酶切鉴定连接正确(图 2)。

2.2 pEGFP-N1/MUC1/Y 真核表达载体的转染

将 pEGFP-N1/MUC1/Y 真核表达载体转染 COS7 后 18 h,即可在荧光显微镜下看到明显的绿色荧光,且定位于细胞膜,而对照组荧光位于胞浆,转染 24 h 后荧光增强,转染率达到 20% ~ 30%,转染 48 h 荧光仍无明显减弱。COS7 细胞转染后生长良好,48 h 后收集细胞,RT-PCR 检测转染 pEGFP-N1/MUC1/Y 的 COS7 细胞 MUC1/Y 阳性,而未转染组为阴性(图 3)。

2.3 讨论

近年来,卵巢癌的治疗除传统的手术以及放化疗外,生物治疗也愈来愈受到重视,但无论是基因治疗,或是免疫治疗,都缺乏特异的靶点。而新近发现的 MUC1/Y 基因在卵巢癌组织中高表达,而在癌旁组织

中不表达^[3],且与分泌型 MUC1 相比,MUC1/Y 不发生蛋白水解,不能分泌到细胞外,针对 MUC1/Y 的导向治疗,不会因外周血循环中存在大量分泌型 MUC1 蛋白而被封闭,因此 MUC1/Y 是一种理想的卵巢癌导向治疗的靶分子。

图 2 pMD18-MUC1/Y, pEGFP-N1 和 pEGFP-N1/Y 双酶切

1: DNA marker DL2 000; 2: Double digestion of pMD 18-MUC1/y; 3: Double digestion of pEGFP-N1/MUC1/Y; 4: Double digestion of pEGFP-N1; 5: DNA marker DL15 000

图 3 转染前后 COS7 细胞 MUC1/Y 的表达

1,4: β -actin(539 bp); 2: COS7 before transfection; 3: 1 kb DNA Ladder; 5: COS7 after transfection (256 bp)

鉴于以上原因,我们构建了含有人 MUC1/Y 全长 cDNA 的真核表达载体。据文献报道,人宫颈癌 HeLa 细胞系高表达 MUC1/Y,故本实验采用 RT-PCR 法由 HeLa 细胞中扩增人 MUC1/Y 全长 cDNA,为提高基因扩增的特异性,采用降落 PCR 方法,所得序列经测序与 MUC1/Y 已知序列完全相符。由于目前尚无商品化的抗 MUC1/Y 蛋白的单克隆抗体,因此为明确 MUC1/Y 蛋白的表达和细胞内定位,我们将含有起始密码子(ATG),但去除终止密码子(TAG)的 MUC1/Y 全长 cDNA 插入到含有加强绿色荧光蛋白基因的真核表达载体 pEGFP-N1 中,使二者位于同一开放阅读框内,最终能够表达带有绿色荧光的融合蛋白,便于观察。

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0150-02

FBC 方案预处理进行异基因造血干细胞移植的临床研究

黄 宁, 葛林阜, 马焕文, 刘希民, 郭 鹏 (济南军区总医院血液科, 济南 250031)

造血干细胞移植对根治恶性血液病的作用已得到充分肯定,但传统预处理方案所用的致死性放、化疗剂量对患者心、肝、肾等重要脏器有进一步损伤,致使移植相关死亡率一直居高不下^[1]。为降低预处理的毒性,我们对 14 例恶性血液病患者进行了 FBC 预处理方案的异基因造血干细胞移植。

1 材料与方 法

1.1 患者与供者

14 例患者均为住院病人,其中:男性 9 例,女性 5 例;平均年龄: 38.6 ± 12.8 岁;原发病:慢性粒细胞白血病 8 例,急性淋巴细胞白血病 1 例,急性非淋巴细胞白血病 2 例,非霍奇金氏淋巴瘤 2 例,骨髓增生异常综合征 1 例。14 例供者均为患者的兄弟姐妹或父亲,其中:男性 8 例,女性 6 例;平均年龄: 31.6 ± 12.7 岁。供、受者间 HLA 配型 A, B, DR 位点完全相合者 12 例, 5/6 相合者 1 例, 4/6 相合者 1 例。红细胞 ABO 血型相合 8 例,主要不合 2 例,次要不合 3 例,主次要均不合 1 例。

1.2 预处理方案

磷酸氟达拉滨 (Flud) $30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$, 静滴,

-5 d ~ -1 d; 白消安 (Bu) $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 口服, 6 h, -7 d ~ -4 d; 环磷酰胺 (CTX) $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 静滴, -3 d ~ -2 d。

1.3 移植方法

移植前 -13 ~ -8 d 住入层流室,进无菌饮食,服肠道消毒剂,置中心静脉导管,预处理后,0 天静脉输注供者外周血造血干细胞 9 例,单个核细胞数 (MNC) $3.7 \pm 1.9 \times 10^8/\text{kg}$; 输注骨髓悬液 5 例,有核细胞数 $2.7 \pm 1.1 \times 10^8/\text{kg}$; 6 ~ 12 d WBC 最低降至 $0 \sim 0.6 \times 10^9/\text{L}$, 加 G-CSF $5 \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 注射至 WBC 达到 $4.0 \times 10^9/\text{L}$ 以上。移植术后用 STR-PCR 定量方法检测供者细胞植入情况,若供者嵌合比率降低,则进行供者淋巴细胞输注 (DLI)^[2-3]。

1.4 术中并发症防治

1.4.1 防治感染

严格无菌操作,不预防性使用抗生素;出现感染时酌情选用抗生素,并根据细菌培养结果及时调整抗生素。

1.4.2 肝静脉阻塞综合征的预防

自预处理开始加低分子右旋糖酐每天 500 ml 静滴;7 d 后,每天改用复方丹参 20 ml 静滴至 28 d。

COS7 来源于非洲绿猴肾成纤维细胞,是一个高效的真核细胞表达系统,转染 pEGFP-N1/MUC1/Y 真核表达载体 18 h 后,即可在荧光显微镜下看到明显的绿色荧光,且定位于细胞膜,24 h 后荧光增强,转染 48 h 荧光仍无明显减弱,同时 RT-PCR 检测 MUC1/Y 表达量明显高于内对照基因 β -actin。对照组荧光位于胞浆, MUC1/Y 没有表达,这些结果分别从蛋白水平和 mRNA 水平说明转染成功,并证实 MUC1/Y 蛋白是一种跨膜蛋白。本实验中 pEGFP-N1/MUC1/Y 真核表达载体的成功构建,将为卵巢癌核酸疫苗的进一步研究和临床应用奠定实验基础。

[关键词] MUC1/Y; 真核表达载体; 真核细胞; 脂质体; 转染

[中图分类号] R730.3 [文献标识码] A

[参 考 文 献]

- [1] Schut IC, Waterfall PM, Ross M, *et al.* MUC1 expression, splice variant and short form transcription (MUC1/Z, MUC1/Y) in prostate cell lines and tissue[J]. BJU Int, 2003, 91(3): 278.
- [2] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔著, 黄培堂, 等译, 分子克隆实验指南(第 3 版)[M], 北京: 科学出版社出版, 2002. 30-32.
- [3] Obermair A, Schmid BC, Packer LM, *et al.* Expression of MUC1 splice variants in benign and malignant ovarian tumors[J]. Int J Cancer, 2002, 100(2): 166-171.

[收稿日期] 2004-09-28

[修回日期] 2005-01-26

[本文编辑] 王莹

1.4.3 出血性膀胱炎的预防

静滴 CTX 后 0, 4, 8 h 加美司钠 0.4 ~ 0.8 静注, 同时水化、碱化尿液, 强迫性利尿, 每天排尿量 > 80 ml/kg。

1.4.4 防治宿主排斥移植物反应(HVG)及移植物抗宿主病(GVHD)

-3 d 给予环孢素 A(CsA) 2 ~ 3 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 静滴及骁悉 500 mg ~ 1 000 mg, 每日 2 次口服。部分加用抗胸腺球蛋白(ATG)、赛尼哌(CD25 抗体)。一旦出现 GVHD, 立即检测 CsA 血药浓度, 调整 CSA 浓度维持血药浓度至 200 ~ 400 ng/ml, I ~ II 度仅加地塞米松 2 ~ 3 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 静注或强地松 20 mg, 每日 3 次口服; III 度予甲基强地松龙 2 ~ 3 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 静滴。当出现 HVG 或供者嵌合比率下降时, 立即 DLI。

1.5 嵌合体检测

染色体由本院细胞室采用常规 G 带检测方法。STR-PCR 定量方法检测供者细胞植入情况: 由山东省脐血造血细胞中心测定。

2 结果与讨论

14 例 WBC 分别于 4 ~ 11 d 最低降至 0.0 ~ 0.6 × 10⁹/L, WBC 升至 1.0 × 10⁹/L 以上为 11.3 ± 4.9 d; 中性粒细胞(PNC)升至 0.5 × 10⁹/L 以上为 11.8 ± 6.8 d; 血小板(Plt)升至 20 × 10⁹/L 以上为 12.1 ± 3.6 d。较传统的异基因造血干细胞移植术, 白细胞、血小板恢复时间提前, 大大提高了安全性。本组 14 例中, 8 例(57.1%) 出现急性 GVHD, 其中 I ~ II 度 6 例(42.9%), III ~ IV 度 2 例(14.3%); 5 例(35.7%) 出现慢性 GVHD, 治疗后缓解; 1 例出现 HVG, 进行 DLI 2 次, 再次达到完全供者嵌合。急、慢性移植物抗宿主病的发生较传统方案增加, 但急性重型并不增加, 宿主排斥移植物不增加, 分析原因, 认为: Flud 作为一种具有强效免疫抑制任用的嘌呤用类似物, 它可减少常规预处理方案中的化、放疗剂量, 而成功植入供体造血干细胞,

供体造血干细胞一旦成功植入, 不受 Flud 的免疫抑制, 因而能在受体内起到较明显的抗宿主及清除残余肿瘤细胞的作用, 进而达到治愈恶性血液病的目的。

本组病例随访 3 ~ 52 月, 至今仍存活 11(78.6%) 例, 3(21.4%) 例死亡, 分别死于: 复发 1 例, 急性 GVHD 2 例。除 4 例出现口腔炎外, 未出现造血性膀胱炎、肝静脉阻塞综合征等严重并发症。疗效明显好于传统的标准预处理方案和非清髓性预处理方案进行的异基因移植术。本预处理方案的特点是: 在约半量传统标准 BuCy 方案的基础上, 应用 Slavin 提出的非清髓理论, 加用 Flud, 明显抑制受体的免疫功能。比较传统标准方法, 造血功能重建时间较短, 使用抗生素及血制品减少, 副作用明显减少, 降低危险性, 移植相关死亡率减低, 尤其可适用于年龄较大, 有肝、肾等重要脏器损傻的患者。并且纯非清髓法, 由于移植前预处理中化疗剂量过小, 患者自身残留的免疫细胞和肿瘤细胞较多, 因此复发和出现排斥移植物的机率较大。本 FBC 方案较非清髓方案预处理增加了化疗剂量, 大大提高了植入率, 减少复发率, 进一步提高疗效。

[关键词] 造血干细胞移植; 异基因; 恶性血液病; 预处理方案

[中图分类号] R733.7; R457.7 [文献标识码] A

[参考文献]

- [1] 王 政, 韩明哲, 冯四洲, 等. 异基因外周血干细胞移植和异基因骨髓移植的临床疗效比较[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(8): 427-430.
- [2] Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreductive for treatment of malignant and nonmalignant hematologic disease[J]. Blood, 1998, 91(3): 756-763.
- [3] 刘启发, 周淑芸. 供者淋巴细胞输注对异基因造血干细胞移植后白血病复发的防治作用[J]. 中华血液学杂志, 2002, 23(4): 200-202

[收稿日期] 2004-07-10

[修回日期] 2004-10-20

[本文编辑] 韩 丹

欢迎浏览《中国肿瘤生物治疗杂志》网站

为了方便更多的读者浏览杂志, 向肿瘤生物治疗工作者提供一个更宽广的信息交流平台, 《中国肿瘤生物治疗杂志》开通了网站, 网站设置了期刊概况、期刊内容、出版发行、投稿指南、科研动态、政策法规等栏目, 同时有期刊检索功能, 您可以轻松浏览每期杂志内容, 了解相关的研究进展, 敬请浏览。

网站地址为: <http://www.biother.org>