

基因修饰的肝细胞脾内移植后体内分布 和基因表达的实验研究*

章卫平 曹雪涛 黄 欣 王建莉 陶 群 顾健人**

(第二军医大学免疫学教研室, 上海 200433)

摘要 为探讨基因修饰的肝细胞经脾内移植途径介导肝脏基因治疗的可行性和有效性, 体外用 NeoR 基因或 IL-2 基因修饰小鼠正常胚胎肝细胞 BNL CL.2, 经脾内移植至正常同系小鼠体内(2×10^6 /只), 观察 NeoR 和 IL-2 基因在不同脏器的表达。结果发现脾内移植 NeoR 基因修饰的肝细胞后 24 h, 即可通过 RT-PCR 在肝脏中检测出 NeoR 基因 mRNA 的表达, 持续表达 11 周以上; 此外, NeoR 基因在脾脏中短暂表达(24 h 至 1 周), 在肺组织中也有一过性表达(48~96 h)。脾内移植 IL-2 基因修饰的肝细胞后, 肝脏中可检测到稳定表达的 IL-2 mRNA(24 h 至 11 周), 外周血中维持一定水平(5~40 pg/mL)的 IL-2, 能增强肝脏 Kupffer 细胞 Ia 抗原的表达及脾细胞的 NK 杀伤活性。提示基因修饰的肝细胞脾内移植后能定向分布至肝脏, 并同化入肝组织中长期存活, 有效地表达外源基因, 可成为肝脏靶向性基因治疗的可行途径。

关键词 肝细胞 脾内移植 基因转移 基因表达 IL-2

肝脏是人体的重要代谢器官, 许多遗传性疾病与肝脏某些基因表达缺陷有关, 而且肝脏又是肿瘤的好发和易于转移的部位, 慢性乙型肝炎也是严重危害人类健康的一大疾病, 因此肝脏靶向性基因治疗是当前基因治疗研究领域中的热点之一^[1]。肝脏基因治疗的途径有多种, 其中, 以肝细胞为基因治疗受体细胞是一条比较有希望的应用途径, 已获美国 FDA 批准试用于临床治疗家族性高胆固醇血症, 并取得了肯定的疗效^[2]。近年来, 国外学者通过动物实验初步证明, 脾脏内注射的肝细胞能部分转位至肝脏, 并同化入宿主肝内长期存活^[3,4]。为了探讨基因修饰的肝细胞经脾内移植途径介导肝脏基因治疗可行性和有效性, 我们将正常胎肝细胞在体外进行新霉素抗性基因(NeoR)标记, 经脾内注射后, 观察了 NeoR 基因在体内不同器官的表达情况, 在此基础上, 我们用 IL-2 基因转染胎肝细胞, 观察了该途径介导下 IL-2 基因在体内的表达, 为其肝脏的靶向免疫基因治疗提供实验依据。

1996-07-26 收稿, 1996-09-14 收修改稿

* 国家自然科学基金优秀中青年人才专项基金资助项目

** 上海市肿瘤研究所

本文缩写: NeoR—Neomycin resistance, IL-2—Interleukin 2, RT-PCR—Reverse transcription polymerase chain reaction, ELISA—Enzyme-linked immunosorbent assay, NK—Natural killer, FACS—Fluorescent-activating cell sorter

1 材料和方法

1.1 主要试剂

磷酸钙基因转染药盒和反转录试剂盒购自 Gibco 公司, PCR 试剂盒为 PE 公司产品, Dig-16-dUTP 和磷酸酶标记的抗地高辛抗体 Fab 片段为 Boehringer 公司产品, 大鼠抗小鼠 Ia 单抗 M5/114 为宝灵曼公司产品, 抗小鼠巨噬细胞单抗 F4/80 从其杂交瘤细胞(ATCC, HB198)的荷瘤裸鼠腹水中纯化制备, 荧光标记的羊抗大鼠二抗购自 Gibco 公司, 小鼠 IL-2 的 ELISA 检测试剂盒购自 Endogen 公司, ^{51}Cr 购自 Amersham 公司, 真核表达载体 BMGNeo 由瑞士巴塞尔免疫研究所 Karasuyama 博士惠赠, 小鼠 IL-2 表达载体 BMGNeo-IL-2 详见文献 [5]; 小鼠 β -actin 基因、NeoR 基因和小鼠 IL-2 的 PCR 引物由中国科学院上海细胞生物学研究所合成。

1.2 动物和细胞株

BALB/c 小鼠(H-2^d), 6~8 周龄, 雄性, 购自上海必凯实验动物有限公司。小鼠正常胚胎肝细胞株 BNL CL.2 细胞购自美国 ATCC(TIB73), 来源于 BALB/c 小鼠, 系通过用鸟氨酸、苯丙氨酸分别代替精氨酸和酪氨酸进行选择培养而建株, 用 DMEM 和 10% FCS 培养基传代培养, 体外琼脂半固体培养不形成集落, 在免疫缺陷小鼠体内无致瘤性。小鼠 NK 敏感的 Yac-1 细胞为本室常规保存。

1.3 肝细胞的体外基因修饰

采用磷酸钙 DNA 共沉淀法^[5]将 BMGNeo 或 BMGNeo-IL-2 表达载体导入 BNL CL.2 肝细胞。经 G418(600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 抗性筛选, 2 周后出现抗性克隆, 分别命名为 BNL.Neo 和 BNL.IL-2。其 NeoR 基因与 IL-2 的表达分别用 RT-PCR 和 ELISA 检测予以证实。

1.4 肝细胞脾内注射

用胰酶消化、收集对数生长期的正常肝细胞 BNL CL.2, NeoR 基因修饰的肝细胞 BNL.Neo 或 IL-2 基因修饰的肝细胞 BNL.IL-2, Hanks 液洗两遍后配成 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 备用。乙醚麻醉 BALB/c 小鼠, 局部消毒后于左肋下做 1 cm 左右的切口, 取出脾脏, 用 1 mL 注射器、4 号针头行脾内注射 0.2 mL 细胞(2×10^6 细胞/只), 注射时可见脾脏局部发白, 注射后轻按脾脏, 以防液体渗漏, 然后缝合切口。注射后不同时间取小鼠脾、肺和肝脏等脏器(同一时间点每组 6~8 只), 液氮速冻保存或新鲜组织提取细胞总 RNA, RT-PCR 分析 NeoR 或 IL-2 基因 mRNA 的表达。

1.5 基因表达的 RT-PCR 分析

采用异硫氰酸胍一步法抽提细胞总 RNA。总 RNA 经无 RNA 酶的 DNA 酶 I 消化 DNA 模板后溶于水中, 分光光度计比色法检测纯度及浓度后, 于 -70°C 保存。反转录按试剂盒说明进行。取总 RNA 5 μg , 加入 1 μL 的 Oligo-dT, 70°C 作用 10 min 后, 加入 Superscript II 反转录酶 200U 等, 42°C 反应 50 min, 70°C 终止反应后, 用 RNaseH 消化 RNA 模板。取 2 μL 反转录模板或相应的总 RNA 样品为模板, 进行 β -actin(内参)和 NeoR 或 IL-2 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体积为 50 μL , 含上游引物和下游引物各 30 pmol, MgCl_2 1.5 mmol/L, Taq 酶 1U, PCR 参数为 94°C 1 min, 50°C 45 s, 72°C 90 s, 30 个循环, 其中最后一循环为 72°C 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂凝胶电泳分析。

表1 PCR 扩增反应的引物序列

| 扩增基因 | 引物序列(5'→3') | 扩增产物大小/bp |
|----------------|------------------------------|-----------|
| β -actin | 上游引物 GGACCTGACAGACTACCTCAT | 555 |
| | 下游引物 ACTCATCGTACTCCTGCCTGCTG | |
| NeoR | 上游引物 CAAGATGGATTGCACGCAGG | 790 |
| | 下游引物 CCCGCTCAGAAGAACTCGTC | |
| mIL-2 | 上游引物 TCCACTTCAAGCTCTACAG | 247 |
| | 下游引物 GAGTCATAAGTCCAGAACATGCC | |

1.6 肝脏 NeoR 基因表达的原位杂交检测

以 BMGNeo 为模板,采用 PCR 方法扩增地高辛标记的 NeoR 基因 DNA 探针,扩增体系中含 Dig-16-UTP. 脾内注射正常肝细胞 BNL CL.2 或 NeoR 基因修饰的肝细胞 BNL. Neo 细胞后 2 周,处死小鼠,经门静脉原位灌注 4% 多聚甲醛与 0.3% 饱和苦味酸混合液,然后取其肝脏,在同一固定液中固定过夜后,浸入 20% 蔗糖 PBS 至组织块饱和下沉. 进行冰冻切片,厚度为 50~100 μm ,用漂浮法进行原位杂交. 切片固定 5 h,用 0.1 mol/L 的甘氨酸 PBS、DNA 酶 I、含 0.4% Triton-X-100 的 PBS 分别漂洗后,用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K 37℃ 作用 30 min,经 DNA 酶、0.25% 乙酸酐作用 10 min、2×SSC 洗 10 min 后加入杂交液(含 NeoR 基因 DNA 探针,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)37℃ 过夜. SSC 漂洗后,加入 1:1 000 碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体 Fab 片段,于室温作用 4 h,加底物 NBT, BCIP(Sigma); 显色 30 min, 终止显色后凉干、脱水、透明、封片.

1.7 IL-2 的检测

采用 ELISA 方法检测,按试剂盒说明进行.

1.8 肝脏 Kupffer 细胞的分离及其 Ia 抗原表达分析

采用胶原酶原位灌注法^[6]分离肝脏 Kupffer 细胞,经抗小鼠巨噬细胞单抗 F4/80 的流式细胞仪分析,细胞纯度达 90%,台盼蓝染色表明细胞活力为 95% 以上. 5×10^5 新鲜分离的 Kupffer 细胞,悬于含 1 μg 抗小鼠 Ia 单抗的 100 μL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.6)中,4℃ 孵育 45 min 后,PBS 洗 2 遍,再加入荧光标记的抗大鼠二抗孵育 45 min, PBS 洗 2 遍后重悬于含 1% 多聚甲醛的 PBS,用流式细胞仪(Becton-Dickinson)检测分析.

1.9 脾细胞 NK 活性的检测

采用 4 h ^{51}Cr 释放法,参见文献[7].

2 实验结果

2.1 基因修饰的肝细胞的建立

用磷酸钙 DNA 共沉淀法将 NeoR 基因的真核表达载体 BMGNeo 导入 BNL CL.2 肝细胞,用 G418 抗性筛选得到的阳性克隆株,经 RT-PCR 分析证明表达 NeoR 基因 mRNA. 正常的 BNL CL.2 肝细胞并不表达 NeoR 基因,而 BNL. Neo 肝细胞经 RT-PCR 能扩增出约 790 bp 大小的 DNA 片段(图 1);为排除此 RT-PCR 产物来源于 RNA 样品中的混杂 DNA 模

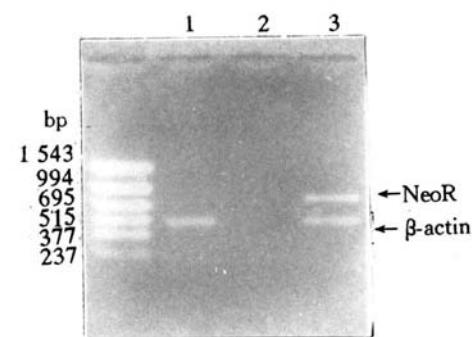


图 1 经 NeoR 基因修饰后的肝细胞 NeoR 基因表达的 RT-PCR 分析

1 为 BNL CL.2-RT; 2 为 BNL. Neo-RNA 对照;
3 为 BNL. Neo-RT

板的可能性,在制备 RNA 样品过程中用 DNA 酶 I 消化 DNA 模板,同时 RT-PCR 中设未经反转录的 RNA 样品直接进行 PCR 扩增的对照,结果未扩增出阳性条带,说明 RT-PCR 扩增到的 NeoR 基因片段来源于细胞表达的 mRNA。此株细胞体外传代 3 个月,仍稳定表达 NeoR 基因。IL-2 基因修饰的肝细胞 BNL IL-2,经 ELISA 检测分泌 58.9 ng/mL 的小鼠 IL-2,而正常肝细胞 BNL CL. 2 的培养上清液中并未检测到 IL-2(<3 pg/mL)。

2.2 NeoR 基因的体内表达分析

Rosenberg 等选择真核细胞不表达的 NeoR 基因对 TIL 细胞进行体外标记,观察了 TIL 回输至体内的分布情况^[8],我们也利用 NeoR 基因修饰的肝细胞观察其经脾内移植后在体内的分布与表达。RT-PCR 检测表明(图 2),脾内移植正常肝细胞 BNL CL. 2 的小鼠肝、脾、肺

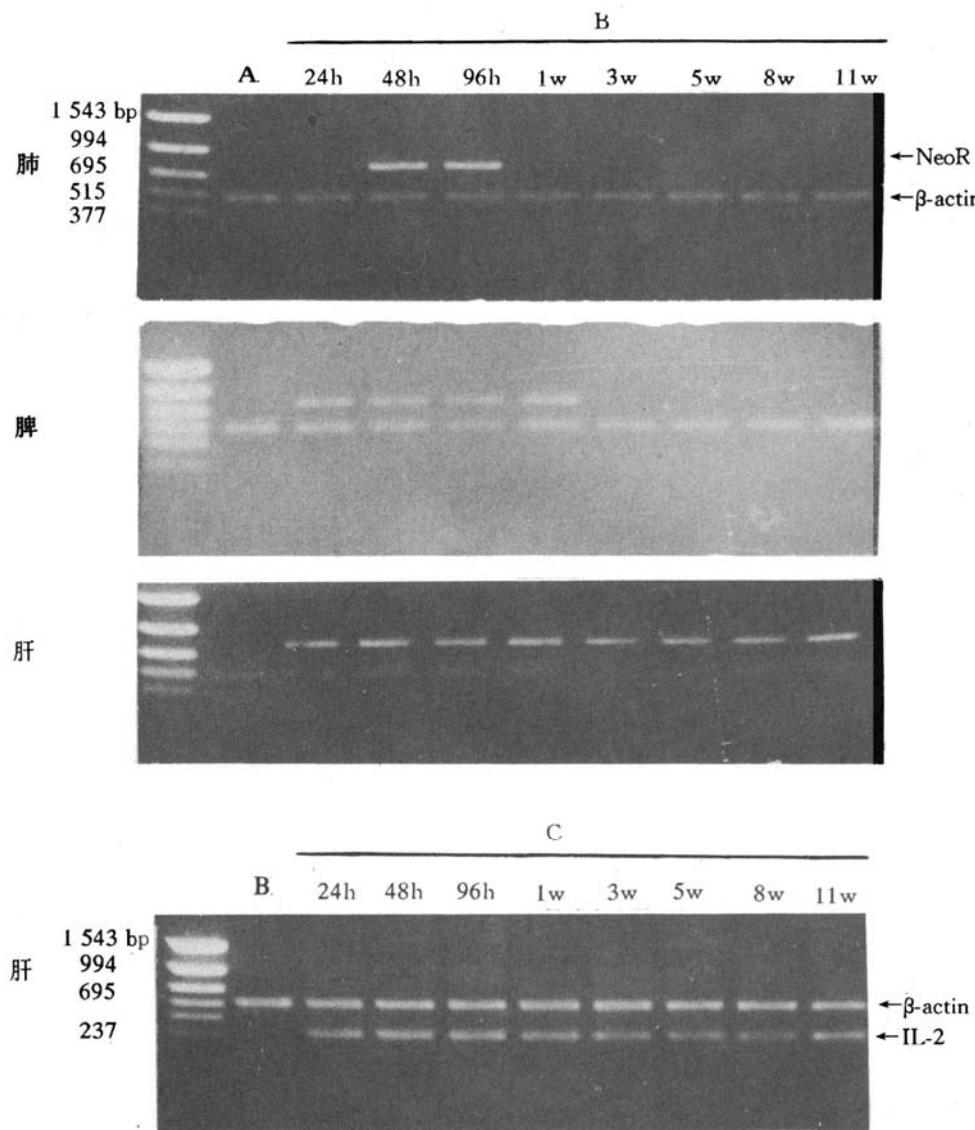


图 2 基因修饰的肝细胞脾内移植后体内基因表达的 RT-PCR 分析

A 为 BNL CL. 2; B 为 BNL. Neo; C 为 BNL IL-2

等脏器均不表达 NeoR 基因, 而脾内注射了 NeoR 基因标记的肝细胞 BNL. Neo 的小鼠, 在移植后 24 h 就可以从脾脏和肝脏中检测到 NeoR 基因 mRNA 的表达, NeoR 基因在脾脏中表达持续 1 周, 而肝脏中的表达可持续 11 周以上。此外, 脾内移植后 48~96 h, NeoR 基因在肺脏中有短暂性表达。提示经脾内移植的肝细胞能选择性地转位至肝脏, 在肝脏微环境中定居和长期存活, 并且稳定表达其携带的外源基因。

2.3 肝脏 NeoR 基因表达的原位杂交分析

图 3(a)所示, 脾内移植正常肝细胞 BNL CL. 2 的小鼠肝脏无明显杂交信号, 而脾内移植 NeoR 基因标记的 BNL. Neo 肝细胞后, 在小鼠肝脏中可观察到呈随机、散在分布的杂交信号(图 3(b))。这进一步证实脾内移植的肝细胞能同化至宿主肝脏存活, 并表达其所携带的外源基因。

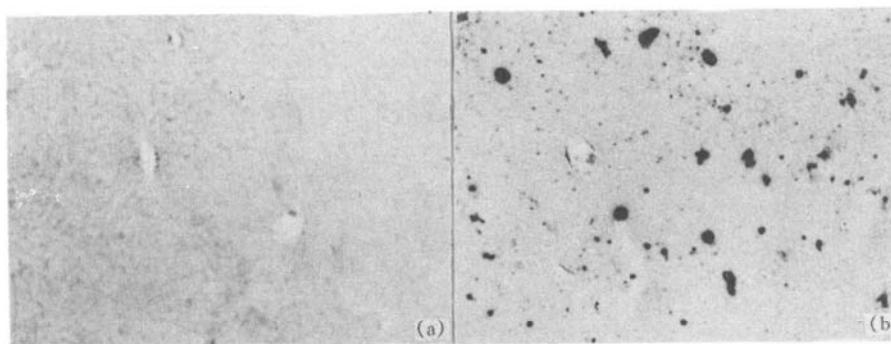


图 3 NeoR 基因修饰后的肝细胞脾内移植后肝脏表达 NeoR 基因的原位杂交分析
(a)BNL CL. 2 对照(5×4); (b)BNL. Neo(5×4)

2.4 IL-2 体内表达及其生物学效应的初步分析

在证明 NeoR 基因修饰的肝细胞经脾内移植后选择性转位至肝脏、稳定表达外源 NeoR 基因的基础上, 我们进一步探讨了 IL-2 基因修饰的肝细胞脾内移植后 IL-2 在体内的表达。结果显示, IL-2 基因修饰的肝细胞脾内移植后 24 h 至 11 周, 通过 RT-PCR 在肝脏中扩增到 247 bp 左右大小的 DNA 片段, 提示 IL-2 mRNA 在肝脏中的稳定、持续表达(图 2);脾内移植后 1 周, 用 ELISA 方法从小鼠血清中检测到 IL-2, 于移植后 3 周达到峰值(35.9 pg/mL), 一直维持 8 周(图 4), 而正常小鼠以及移植 BNL Neo 肝细胞的小鼠的肝脏与血清中均未检测出 IL-2 的表达, IL-2 基因修饰的肝细胞脾内移植后 2 周, 从肝脏中新鲜分离到的 Kupffer 细胞 Ia 抗原表达水平明显提高(图 5), 提示其抗原提呈功能得到增强;同时, 脾细胞的 NK 活力也明显高于对照组(图 6), 表明脾内移植 IL-2 基因修饰的肝细胞定位至肝脏后, 表达的 IL-2 不仅可激活肝脏局部的免疫应答, 而且也有助于改善机体全身的免疫功能。脾内移植 IL-2 基因修

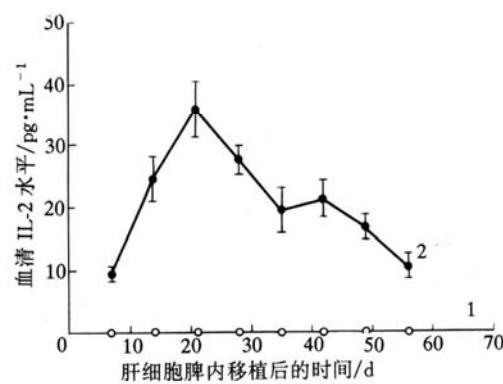


图 4 IL-2 基因修饰的肝细胞脾内移植后血清 IL-2 水平
1 为 BNL. Neo 组;2 为 BNL IL-2 组

饰的肝细胞治疗结肠癌肝转移小鼠, 能明显延长荷瘤动物的存活期, 使 20% 的荷瘤小鼠达到长期存活。

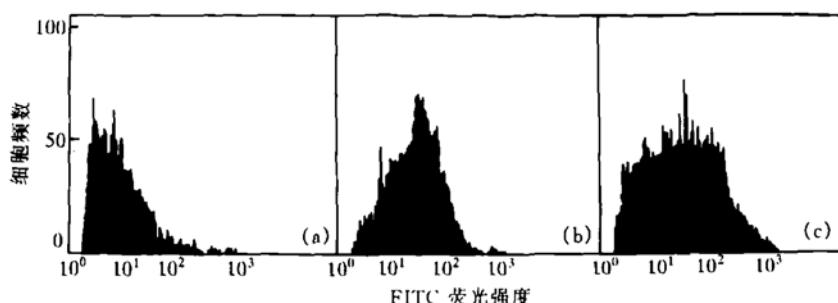


图 5 IL-2 基因修饰的肝细胞脾内移植后肝脏 Kupffer 细胞 Ia 抗原表达的 FACS 分析
(a)二抗对照;(b)BNL.Neo 对照组;(c)BNL IL-2 实验组

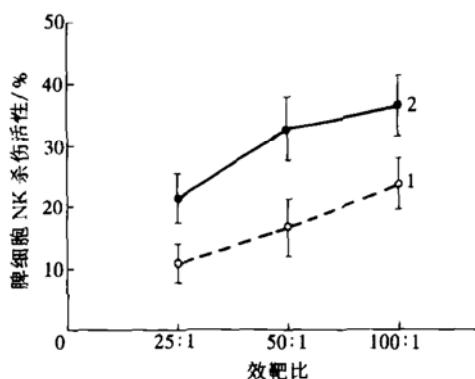


图 6 IL-2 基因修饰的肝细胞脾内移植后脾细胞的 NK 杀伤活性
1 为 BNL.Neo 组;2 为 BNL IL-2 组

3 讨论

通过多种动物模型, 学者们已经证明肝细胞移植对于多种肝脏疾病如代谢性疾病, 肝功能衰竭等有一定的疗效, 但是, 至于肝细胞移植能否有效地用于肝脏基因治疗, 除了应保证基因修饰后的肝细胞具有某种特定的生物学活性外, 还取决于这些基因修饰后的肝脏细胞体内移植后能否长期存活和发挥生物学功能, 若能通过一定的途径体内移植后肝细胞能移行至其正常部位(即肝脏)并能同化入宿主肝脏永久存活, 则意义更大。为此, 学者们探讨了多种途径的肝细胞移植, 但是以往方法中遇到的一个困难是难以从形态学上区分宿主肝脏内供者和受者的肝细胞。Gupta 等选择了可分泌 HBsAg 的 HBV 转基因小鼠肝细胞为供者细胞, 移植给同基因的正常受体小鼠, 将 HBsAg 作为移植肝细胞存活的外周定量指示, 从而证实了肝脏内移植的肝细胞可移行至脾脏外存活, 因为将受体小鼠脾脏切除后, 其血中的 HBsAg 水平没有明显变化。随后证明, 经脾内移植的肝细胞绝大多数移行至肝脏并迅速地植入肝脏微环境中, 随

机地同化入肝脏实质内^[3,4]。也有学者比较了经皮下、腹腔内和脾脏内移植肝细胞后的效果,发现只有脾脏内移植的肝细胞能在体内较好地表达外源性蛋白产物,并释放入血液循环中^[9]。本实验结果表明 NeoR 基因修饰的肝细胞在脾内移植后 24 h 就可移行至肝脏,并可在肝脏内较长期(11周)表达,尤其是可将目的基因 IL-2 携带至肝脏内并进行有效地表达,发挥其在肝脏局部乃至全身的免疫调节,对肝脏转移性肿瘤具有明显的治疗效果,表明肝细胞脾内移植是一条简便有效的肝脏靶向性基因治疗途径。

参 考 文 献

- 1 Strauss M. Liver-directed gene therapy: prospects and problems. *Gene Ther*, 1994, 1: 156~164
- 2 Wilson J M, Grossman M, Raper S E, et al. Ex vivo gene therapy of familial hypercholesterolemia. *Hum Gene Ther*, 1992, 3: 179~222
- 3 Gupta S, Aragona E, Vemuru R P, et al. Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver: implications for gene therapy and liver repopulation. *Hepatology*, 1991, 14: 144~149
- 4 Gupta S, Yerneni P R, Vemuru R P, et al. Studies on the safety of intrasplenic hepatocyte transplantation: relevance to ex vivo gene therapy and liver repopulation in acute hepatic failure. *Hum Gene Ther*, 1993, 4: 249~257
- 5 曹雪涛, 章卫平, 陶群, 等. 成纤维细胞介导的 IL-2 基因疗法免疫增强作用及其抗肿瘤效果. 中华医学杂志, 1995, 75: 521~524
- 6 Mise M, Arii S, Higashitsuji H, et al. Augmented local immunity in the liver by a streptococcal preparation, OK432, related to antitumor activity of hepatic macrophages. *Immunopharmacol*, 1994, 27: 31~41
- 7 章卫平, 曹雪涛, 顾申, 等. 人白细胞介素 6 基因转移的成纤维细胞对自然杀伤活性的增强作用. 中华血液学杂志, 1994, 15: 300~303
- 8 Rosenberg S A, Aebersold P, Cprnetta K, et al. Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*, 1990, 323: 570~578
- 9 Vemuru R P, Yermemi P, Aragona E, et al. Survival and function of hepatocytes in ectopic sites: intrasplenic delivery confers advantages. *Hepatology*, 1991, 14: 49A