

## MHC I 类基因逆转录病毒表达载体的构建及其在造血细胞中的表达

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子是机体识别自我和非我的标志性分子。从进化角度来看,多细胞生物需要有一种机制来识别自身细胞及辨认外来抗原,并以某种方式清除外来抗原。有关外来抗原如何递呈、效应细胞如何起作用的机制已经研究得较为清楚。但是随着器官移植特别是骨髓移植在医学中的应用,原本递呈其他抗原的MHC分子本身成了递呈的对象,而这在自然界中是很难出现的,此时嵌合体中免疫识别就变得非常复杂。本研究通过逆转录病毒载体介导,将BALB/c小鼠的MHC I类基因H-2D<sup>d</sup>导入到C<sub>57</sub>BL/6小鼠的骨髓造血细胞,为进一步研究MHC I类分子在移植免疫中的作用提供实验基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 动物

雌性BALB/c(H 2d)、雄性C<sub>57</sub>BL/6(H 2b)近交系小鼠,6~8周龄,体质量18~22 g,由第一军医大学实验动物中心提供。

#### 1.2 质粒

逆转录病毒载体质粒pMSCV、病毒包装细胞PT67购自Clontech公司,含H-2D<sup>d</sup> cDNA的质粒pGEM-H2D<sup>d</sup>为本课题组构建。

#### 1.3 主要试剂

脂质体、G418(geneticin)、造血细胞生长因子、DMEM培养基和限制性内切酶均购自Gibco公司。胎牛血清购自Hyclone公司。逆转录试剂盒购自Promega公司。异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗小鼠H2D<sup>d</sup>单克隆抗体购自PharMingen公司。DNA相对质量标准 DL-2000 及λ/Hind III Marker购自大连宝生物工程公司。

#### 1.4 逆转录病毒表达质粒pMSCV-H2D<sup>d</sup>的构建

EcoR I 和Xho I 双酶切质粒pGEM-H2D<sup>d</sup>后,低熔点琼脂糖凝胶回收酶切的H-2D<sup>d</sup> cDNA片段。回收的H-2D<sup>d</sup> cDNA片段与经同样双酶切的pMSCV载体用T4DNA连接酶连接,转化入JM109钙化菌中,提取重组质粒pMSCV-H2D<sup>d</sup>进行EcoR I 和Xho I 双酶切鉴定及测序。

#### 1.5 重组病毒的包装及病毒滴度的测定

参照脂质体说明书,用脂质体介导逆转录病毒表达质粒pMSCV-H2D<sup>d</sup>转染包装细胞PT67。筛选抗性克隆并用NIH3T3细胞测定病毒滴度[1]。

#### 1.6 逆转录病毒对C<sub>57</sub>BL/6小鼠造血细胞的感染

方法见文献[2],以 $1 \times 10^6$ /ml C<sub>57</sub>BL/6小鼠骨髓细胞接种到25 ml的培养瓶中。加入含20%胎牛血清的DMEM培养液,同时加入造血细胞生长因子:重组人干细胞因子(SCF) 50 ng/ml、粒系巨系集落刺激因子(GM-CSF) 200 U/ml、白细胞介素-3(IL-3) 200 U/ml。将培养瓶置37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养3 d。1 000 r/min、5 min离心收获细胞。用含20%胎牛血清的DMEM培养液重悬细胞,调整浓度至 $1 \times 10^6$ /ml。加入多聚季胺8 mg/ml、1 ml滴度为 $3.4 \times 10^6$  cfu/ml的病毒液及新鲜的造血因子。置37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养2 d。

#### 1.7 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测病毒感染后造血细胞H2D<sup>d</sup>基因的转录

根据文献[3]设计RT-PCR引物5'-TAATGAAT TCATGG GGGCGATGGCTCCG-3'和引物5'-TATC TCGAGTTATCACACACT TTACAA-3',提取病毒感染后细胞mRNA,参照逆转录试剂盒进行RT-PCR,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.8 流式细胞术检测造血细胞表面H2D<sup>d</sup>分子

病毒感染后造血细胞与FITC标记的抗小鼠H2D<sup>d</sup>单抗37 °C下孵育1 h后,上流式细胞仪检测细胞表面的H2D<sup>d</sup>表达。

### 2 结果

### 2.1 重组质粒pMSCV-H2D<sup>d</sup>的酶切及测序鉴定

根据插入片段上的EcoR I 和Xho I 位点, 用EcoR I 加Xho I 双酶切后, 琼脂糖电泳可见1 100 bp大小片段(图1), 表明目的基因插入载体, 重组成功。pMSCV-H2D<sup>d</sup>经大连宝生物工程公司测序表明, 与文献[3]报道序列完全相同, 阅读框与设计相符。

### 2.2 重组病毒的包装及病毒滴度的测定

用脂质体将pMSCV-H2D<sup>d</sup>质粒DNA转染PT67病毒包装细胞, 24 h后加500 μg/ml G418进行选择培养。3 d后细胞开始死亡, 10 d后大部分细胞死亡, 仅见散在的抗G418细胞团, 2周后逐渐形成肉眼可见的抗性细胞克隆。所得病毒滴度最高可达 $3.4 \times 10^6$  cfu/ml。

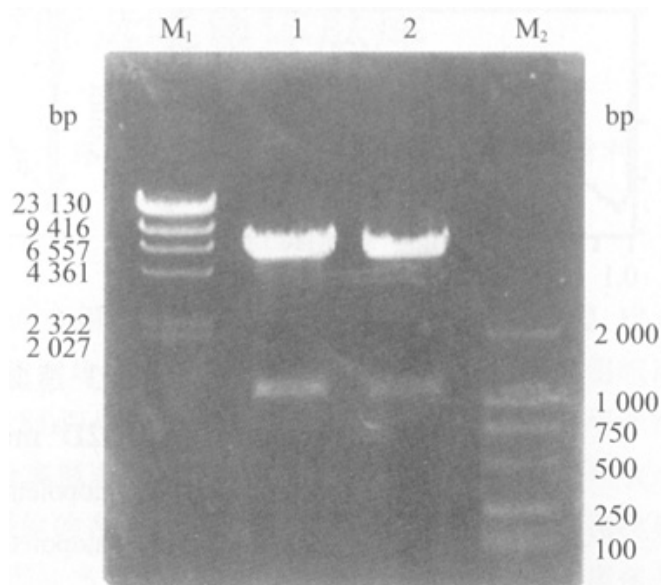


图1 重组质粒pMSCV-H2D<sup>d</sup>酶切鉴定

Fig.1 Identification of pMSCV-H2D<sup>d</sup> plasmid by EcoR I and Xho I

Line M<sub>1</sub>: DL-2000 marker; Line M<sub>2</sub>: λ/Hind III Marker; Line 1,2: pMSCV-H2D<sup>d</sup> plasmid digested by EcoR I and Xho I

### 2.3 病毒感染后C<sub>57</sub>BL/6小鼠造血细胞H2D<sup>d</sup>基因转录的检测

转染后C<sub>57</sub>BL/6小鼠造血细胞mRNA RT-PCR扩增产物为1 100 bp(图2), 说明其整合了H2D<sup>d</sup>基因, 且可以转录为mRNA。

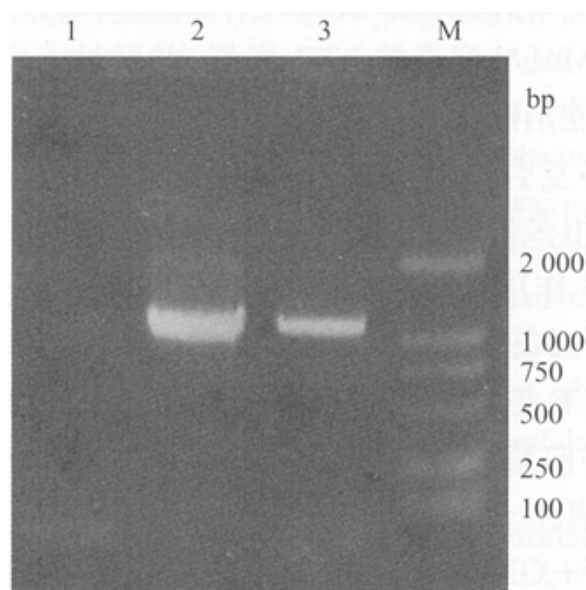


图2 RT-PCR产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the reverse transcriptase-PCR products

Line M: DL-2 000 marke; Line 1: C<sub>57</sub>BL/6 mouse hematopoietic cells infected by blank viral vector;  
Line 2,3: C<sub>57</sub>BL/6 mouse hematopoietic cells infected by reconstructed viral vector

## 2.4 流式细胞术检测细胞表面H2D<sup>d</sup>抗原的表达

空载体pMSCV转染及未转染的C<sub>57</sub>BL/6小鼠造血细胞的荧光染色分别为1.7%和1.9%，pMSCV-H2D<sup>d</sup>转染后的C<sub>57</sub>BL/6小鼠造血细胞荧光染色为47.2%(图3)。说明转染后的C<sub>57</sub>BL/6小鼠造血细胞细胞膜上有H2D<sup>d</sup>抗原的表达。

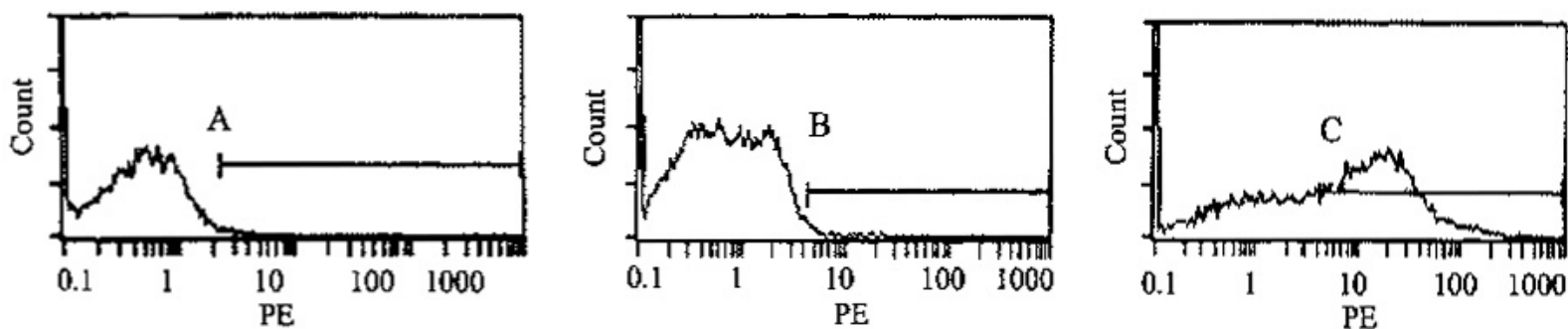


图3 造血细胞表面H-2D<sup>d</sup>的表达

Fig.3 Expression of H-2D<sup>d</sup> molecule on the surface of hematopoietic cells

A: Non-infected C<sub>57</sub>BL/6 mouse hematopoietic cells; B: C<sub>57</sub>BL/6 mouse hematopoietic cells infected by blank viral vector; C: C<sub>57</sub>BL/6 mouse hematopoietic cells infected by reconstructed viral vector with H-2D<sup>d</sup> gene

## 3 讨论

逆转录病毒载体作为携带外源DNA的工具之一，因其高效转导和稳定的特性而发展迅速，已广泛应用于基因的组织特异性转移、cDNA的表达、动物实验模型及携带人类基因等多方面的研究。但以往的逆转录病毒载体只能把克隆到的基因稳定地整合于有丝分裂相细胞的基因组中，而对一些增殖能力差的细胞，如人的造血细胞、胚胎干细胞、胚胎癌性细胞等，转导效率往往很低，这些细胞通常很难建立稳定的表达细胞系。本课题组应用的逆转录病毒MSCV克服了这些限制，MSCV是一种鼠类的干细胞逆转录病毒，pMSCV载体上构建了一段特殊的长末端重复序列(LTR)，它来自鼠类的PVMV病毒，不同于常见的MoMuLV病毒的LTR序列，并经过点突变和缺失修饰，能消除干细胞中的转录抑制现象，因此能够侵染许多复合功能的细胞[4][5]。同时，要提高转染效率，必须用多种细胞因子刺激造血细胞增殖[6]。已知重组IL-3作用于早期祖细胞，是促进多向造血祖细胞增殖所必需的生长因子。GM-CSF作用于晚期造血细胞。SCF是一种多系刺激因子，直接作用于造血干细胞和多向造血祖细胞，促进其增殖，同时还与上述造血细胞生长因子具有协同作用。本课题组用IL-3+SCF+ GM-CSF三种细胞因子可明显刺激造血细胞增殖，在骨髓造血细胞加入上述细胞因子10 d后检测发现细胞数量明显增加。实验结果显示重组逆转录病毒载体转染后的C<sub>57</sub>BL/6小鼠造血细胞能转录为mRNA，并在细胞膜上有H2D<sup>d</sup>抗原的表达，提示H2D<sup>d</sup>基因已稳定地整合进C<sub>57</sub>BL/6小鼠造血细胞的基因组内，且在造血细胞中得到稳定表达。

不少研究观察到，采用逆转录病毒载体构建的重组体被转移到受体细胞后，有时会在细胞传代10代以上后发生不明原因的和无规则性的外源基因或载体的部分丢失，往往增加了筛选工作的难度[7]。不过，本研究中细胞传代15代后仍未遇到此现象。

BALB/c小鼠的MHC基因逆转录病毒表达载体的构建成功及其在C<sub>57</sub>BL/6造血细胞中获得表达为进一步研究MHC I类分子在移植免疫中的作用奠定了基础。

### 参考文献:

[1]Karger BD, Felgner PL, Gadek TR, et al. Evaluation of procedures for transfection using lipofectin reagent[J]. Focus, 1990, 12(1): 25-9.

[2] Lu L, Ge Y, Li ZH, et al. CD34 stem/progenitor cells purified from cryopreserved normal cord blood can be transduced with high efficiency by a retroviral vector and expanded ex vivo with stable integration and expression of Fanconi anemia complementation C gene[J]. Cell Transplant, 1995, 4(5): 493-503.

[3] Margulies DH, Evens GA, Ozato K, et al. Expression of H-2D<sup>d</sup> and H-2Ld mouse major histocompatibility antigen genes in L cells after DNA-mediated gene transfer[J]. J Immunol, 1983, 130(1): 463-70.

[4]Hawley RG, Hawley TS, Fong AZ, et al. Thrombopoietic potential and serial repopulating ability of murine hematopoietic stem cells constitutively expressing interleukin 11[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(19): 10297-302.

[5] Keller G, Wall C, Fong AZ, et al. Overexpression of HOX11 leads to the immortalization of embryonic precursors with both primitive and definitive hematopoietic potential[J]. Blood, 1998, 92(3): 877-87.

[6] Nienhuis AW, McDomagh KT, Bodine DM, et al. Gene transfer into hematopoietic stem cell[J]. Cancer, 1991, 67(10 Suppl): 2700-4.

[7] Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy[J]. Pharmacol Ther 1998, 80(1): 35-47.

#### 参考文献:

[1] Karger BD, Felgner PL, Gadek TR, et al. Evaluation of procedures for transfection using lipofectin reagent[J]. Focus, 1990, 12(1): 25-9.

[2] Lu L, Ge Y, Li ZH, et al. CD34 stem/progenitor cells purified from cryopreserved normal cord blood can be transduced with high efficiency by a retroviral vector and expanded ex vivo with stable integration and expression of Fanconi anemia complementation C gene[J]. Cell Transplant, 1995, 4(5): 493-503.

[3] Margulies DH, Evens GA, Ozato K, et al. Expression of H-2D<sup>d</sup> and H-2Ld mouse major histocompatibility antigen genes in L cells after DNA-mediated gene transfer[J]. J Immunol, 1983, 130(1): 463-70.

[4] Hawley RG, Hawley TS, Fong AZ, et al. Thrombopoietic potential and serial repopulating ability of murine hematopoietic stem cells constitutively expressing interleukin 11[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(19): 10297-302.

[5] Keller G, Wall C, Fong AZ, et al. Overexpression of HOX11 leads to the immortalization of embryonic precursors with both primitive and definitive hematopoietic potential[J]. Blood, 1998, 92(3): 877-87.

[6] Nienhuis AW, McDomagh KT, Bodine DM, et al. Gene transfer into hematopoietic stem cell[J]. Cancer, 1991, 67(10 Suppl): 2700-4.

[7] Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy[J]. Pharmacol Ther 1998, 80(1): 35-47.