

Egr-IFN γ 重组质粒的构建和在 B16 细胞中的辐射诱导表达

吴丛梅¹ 李修义² 田梅² 刘树铮²

¹ (汕头大学医学院 汕头 515031)

² (吉林大学放射生物重点实验室 长春 130021)

摘要 小鼠 IFN γ cDNA 基因连接到 Egr-1 启动子的下游构建成 Egr-IFN γ 重组质粒, 利用脂质体介导转染 B16 细胞, 用 ELISA 方法检测 X 射线照射后 IFN γ 表达的剂量效应和时程。结果表明, 实验组的表达水平明显高于对照组, 其中 20Gy 和 2Gy 照射组高于其它实验组 ($p < 0.01$)。2Gy 照射后 6h IFN γ 表达量最高 ($p < 0.01$)。转染后的 B16 细胞每隔 24h 接受 2Gy X 射线照射, 结果显示第一次照射后表达量最高 ($p < 0.01$), 然后逐渐降低。结果提示电离辐射可激活 Egr-IFN γ 重组质粒, 并调节 IFN γ 基因表达, 这项研究可能对肿瘤治疗的研究有一定的意义。

关键词 Egr-1 启动子, X 射线照射, IFN γ 表达, ELISA

中图分类号 R146

研究证实, 早期生长反应基因-1 (Early growth response gene-1, Egr-1) 的启动子中有 6 个 CArG[CC(A+T-rich)₆GG]顺式作用元件, 它们在辐射诱导 Egr-1 基因转录的过程中起重要作用^[1]。Weichselbaum 等根据 Egr-1 启动子的特性提出了肿瘤基因-放射治疗的新理论, 并将 Egr-TNF α 基因导入人肿瘤细胞, 其研究结果证实 Egr-TNF α 基因结合放射治疗可明显抑制肿瘤的生长^[2]。本研究将 IFN γ cDNA 基因连接到 Egr-1 启动子下游, 构建 Egr-IFN γ 重组质粒, 以探讨 Egr-IFN γ 重组质粒在小鼠 B16 细胞中的辐射诱导表达特性。

1 材料与方法

1.1 细胞的培养和转染

B16 细胞用含 10 % 小牛血清的 RPMI1640 培养, 3×10^5 个细胞/接种 6 孔板, 待生长至 80 % 融合时开始转染。用无血清 RPMI1640 洗细胞 2 次, 取脂质体 (GIBICO 公司) 20 μ L (1 μ g / μ L), 加入 500

μ L 无血清 RPMI1640 培养液中, 另取 5 μ g 重组质粒加入 500 μ L 无血清 RPMI1640 培养液中, 两液体混匀, 室温放置 30 min, 轻轻覆盖细胞表面, 置于 5 % CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养, 6h 后更换含 10 % 小牛血清的 RPMI1640 培养液。

1.2 照射条件

用国产 X 射线机进行照射, 电压 200kV, 电流 10mA, 滤板 0.5mmCu 和 1.0mmAl。球靶距 50cm, 剂量率为 0.287Gy $\cdot$ min⁻¹。

1.3 统计学处理

采用 *t* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 Egr-IFN γ 的构建和鉴定

Egr-IFN γ 质粒的构建如图 1 所示: Egr-1 启动子替代 pcDNA3.1+ 质粒的 CMV 启动子, IFN γ cDNA 基因连接到 Egr-1 启动子的下游。重组质粒的鉴定如图 2 所示, 电泳结果显示构建正确。

国家自然科学基金(39970229)资助

第一作者: 吴丛梅, 女, 1970 年 4 月出生, 2001 年毕业于吉林大学卫生部放射生物重点实验室, 博士/讲师, 现在汕头大学读细胞生物学博士后

收稿日期: 初稿 2002-06-08, 修回 2003-06-05

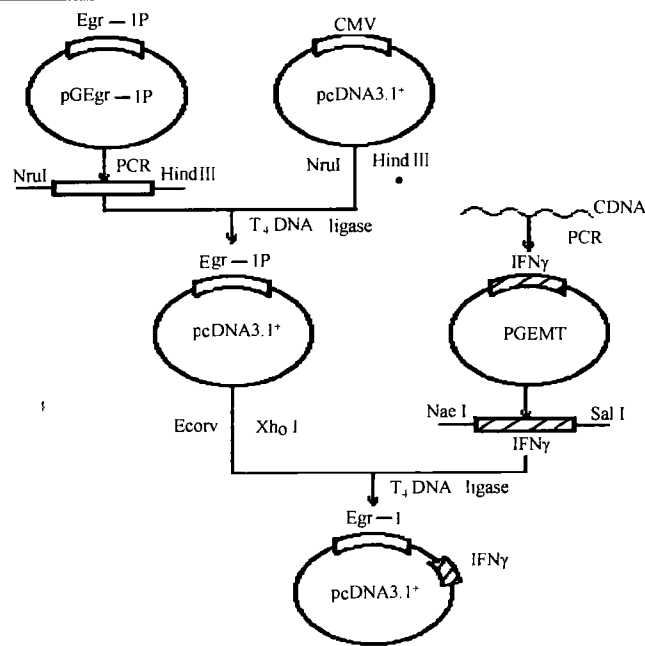


Fig. 1 Construction of Egr-IFN γ plasmid.

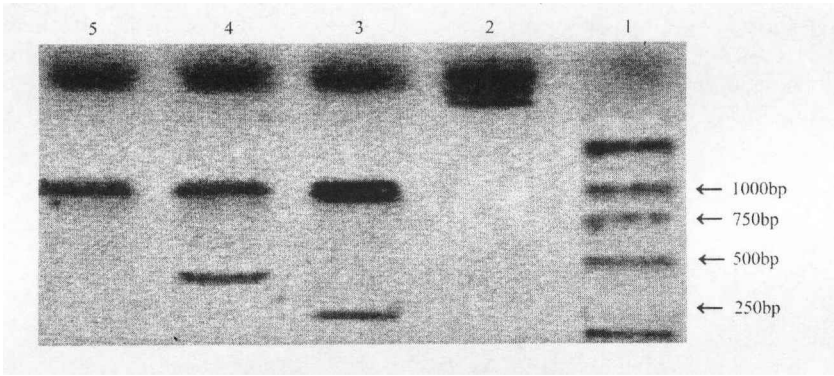


Fig. 2 Identification of Egr-IFN γ plasmid.

1. DL 200 Marker, 2. Egr- IFN γ plasmid, 3. Sma I cat, 4. Bam HI cat, 5. Xba I cat.

2.2 不同剂量 X 射线照射后 IFN γ 的表达

Egr-IFN γ 质粒由脂质体包裹转染 B16 细胞，36h 后接受不同剂量 X 射线照射，照射后 6h 用

ELISA 试剂盒检测 IFN γ 的表达。结果显示 5—20Gy 照射组是对照组的 1.85—2.2 倍 ($p<0.05$ — 0.01) (见图 3)。

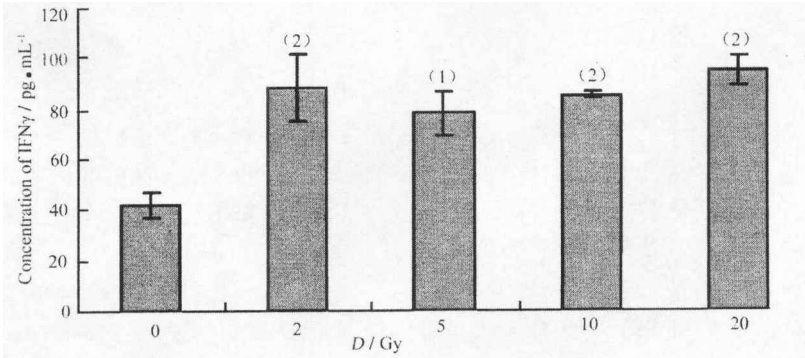


Fig. 3 Expression of IFN γ in B16 cells 6h after X-ray irradiation of different doses $\bar{x} \pm s$, $n=3$, ⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$, vs 0Gy group.

2.3 2Gy X 射线照射后的表达时程

Egr-IFN γ 质粒由脂质体包裹转染 B16 细胞, 36h 后接受 2Gy X 射线照射, 照射后不同时间检测

IFN γ 的表达量。结果显示照射后 4h IFN γ 的表达量是对照组的 1.4 倍, 照射后 6h 是对照组的 1.8 倍。然后表达量降低 (见图 4)。

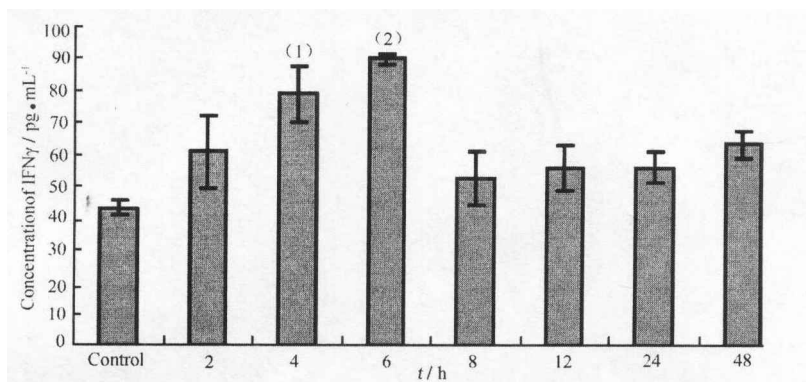


Fig. 4 Expression time course of IFN γ in B16 cells after 2 Gy X-ray irradiation $\bar{x} \pm s$, $n=3$, ⁽¹⁾ $p<0.01$, ⁽²⁾ $p<0.001$, vs control group.

2.4 X 射线多次照射后 IFN γ 的表达

Egr-IFN γ 质粒转染 B16 细胞 36h 后, 接受 2Gy X 射线照射, 同时对对照组假照射。6h 后检测

IFN γ 的表达。间隔 24h 重复实验, 共 5 次, 结果显示, 第一次照射后 IFN γ 的表达最高, 然后逐渐降低, 第一、第二次照射后的表达量是对照组的 1.6—2.5 倍 ($p<0.01-0.001$) (见图 5)。

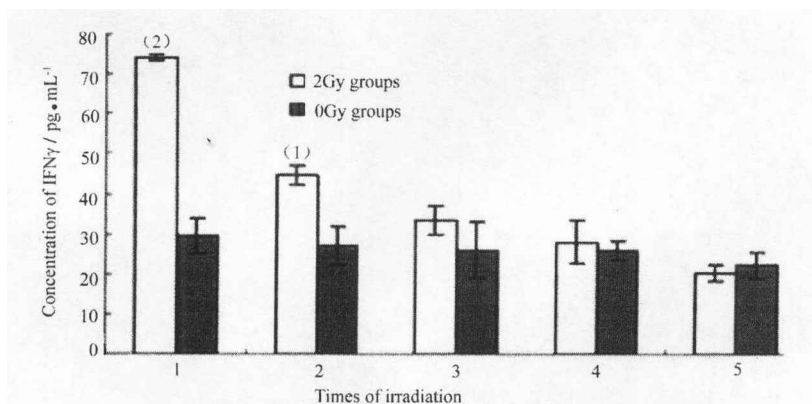


Fig. 5 Expression of IFN γ in B16 cells after X-ray irradiations on different days $\bar{x} \pm s$, $n=3$, ⁽¹⁾ $p<0.01$, ⁽²⁾ $p<0.001$, vs 0Gy groups.

3 讨论

肿瘤的基因-放射治疗的设想, 其含义是将同时具有肿瘤杀伤和辐射诱导特性的基因转入体内, 在对肿瘤实施局部放疗时诱导肿瘤杀伤基因表达, 造成射线和基因对肿瘤的双重杀伤作用。这样一方面可以相对降低等效照射剂量, 缓解正常组织的损伤; 另一方面通过射线的局部照射来实现肿瘤杀伤基因的定位表达^[3, 4]。

美国哈佛大学和芝加哥大学的研究者在深入研

究 Egr-1 基因启动子辐射诱导特性的基础上, 首先利用 Egr-1 基因启动子和 TNF α 基因构建成表达质粒 Δ pEgr-TNF, 将转染该质粒的靶细胞注入对辐射具有抗性的异种移植瘤, 肿瘤局部给予 X 射线照射后, 瘤体内 TNF α 水平较未照射组明显增加, 肿瘤生长受到明显抑制, 未见明显的局部和全身副作用^[2]。随后, 国内外学者构建了不同的质粒, 用于不同肿瘤的基因-放射治疗。研究结果均表明在电离辐射诱导下, 与 Egr-1 启动子连接的治疗基因均有较明显的表达和提高放疗疗效的作用^[5, 6]。

在以上研究的基础上, 我们根据 IFN γ 的抗肿瘤作用, 构建了 Egr-IFN γ 质粒, 并通过脂质体介导转染法, 将 Egr-IFN γ 质粒转入小鼠 B16 细胞中, 利用 X 射线诱导, 研究其表达特性。研究结果证实, 实验组 IFN γ 的表达水平明显高于对照组 ($p<0.05-0.01$), 其中 20Gy 和 2Gy 照射组高于其它实验组。2Gy 照射后 2—6h IFN γ 表达高于对照组, 6h IFN γ 表达量最高 ($p<0.001$)。转染后的 B16 细胞每隔 24h 接受 2Gy X 射线照射, 结果显示第一、第二次照射后表达量明显高于对照组 ($p<0.01-0.001$), 然后逐渐降低。结果提示所构建的 Egr-IFN γ 重组质粒可被 X 射线照射激活, 并增强 IFN γ 基因表达, 这项研究可能对肿瘤基因-放射治疗的进一步研究有一定的意义。

参考文献

- 1 Datta R, Taneja N, Sukhatme V P. Proc Natl Acad Sci USA. 1993, **90** (6): 2419-2422
- 2 Weichselbaum R R, Halahan D E, Sukhatme V P *et al.* Int J Radiat T Oncol Biol Phys, 1992, **24**(3): 565-567
- 3 Stackhouse M A, Buchsbaum D J. Gene Ther, 2000, **7**(13): 1085-1086
- 4 Marples B, Scott S D, Hendry J H *et al.* Gene Ther, 2000, **7**(6): 511-517
- 5 Weichselbaum R R, Hallahan D E, Becktt M A *et al.* Cancer Res, 1994, **54** (16): 4266-4269
- 6 Hallahan D E, Vokes E E, Rubin S J *et al.* Cancer J Sci Am, 1995, **1**(3): 204-209

Construction of Egr-IFN γ and it's expression in B16 cells induced by ionizing irradiation

WU Congmei¹ LI Xiuyi² TIAN Mei² LIU Shuzheng²

¹(Department of Biology, Shantou University Medical college, Shantou 515031)

² (MH Radiobiology Research Unit, School of Preventive Medicine Jilin University, Changchun 130021)

ABSTRACT Mouse IFN γ cDNA was ligated to downstream of Egr-1 promoter to construct Egr-IFN γ plasmid. The recombinant plasmids were transfected into B16 cells with liposome, then the expression of IFN γ after different doses of X-ray irradiation and the time course of expression were detected by ELISA. The results showed that the expression levels in experimental groups were higher than that in the control group obviously ($p<0.01$); 6h after 2Gy X-ray irradiation, the expression of IFN γ was highest ($p<0.01$); The B16 cells transfected were given 2Gy X-ray irradiation every 24h, the expression level was highest after first irradiation ($p<0.01$) and then decrease gradually. The results indicated that ionizing irradiation can activate the Egr-IFN γ recombinant plasmid and regulate the expression of IFN γ gene in B16 cells. The observation may be of potential significance in tumor therapy.

KEYWORDS Egr-1 promoter, X-ray irradiation, IFN γ expression, ELISA

CLC R146