

· 论著 ·

小鼠角质细胞生长因子重组腺病毒载体的构建

陈力 张心灵 李银平 王建莉 黎檀实

【摘要】 目的 探讨构建表达小鼠角质细胞生长因子(KGF)基因重组腺病毒载体的方法。方法 提取小鼠肺组织 RNA,经逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)获得 cDNA 后,PCR 扩增目的基因片段。将获得的 KGF 基因插入载体质粒 pShuttle-CMV,构建穿梭质粒 pShuttle-CMV-KGF(pKGF)。线性化 pKGF 后,转化入含 AdEasy-1 病毒骨架的 BJ5183 细菌中。筛选正确的同源重组质粒 pAdEasy-1-pShuttle-CMV-KGF(pAd-KGF),转染 HEK293 细胞,产生病毒颗粒 AdEasy-1-pShuttle-CMV-KGF(Ad-KGF)。进一步大量扩增病毒,氯化铯梯度离心纯化,测定病毒滴度。制备病毒 Ad-GFP 为对照,显微镜下观察转染率。**结果** ①经限制性内切酶酶切和基因测序鉴定,证实 pKGF 构建成功;②限制性内切酶酶切确定穿梭质粒重组于病毒骨架;显微镜下观察 HEK293 细胞形态,证实病毒包装复制成功;③病毒滴度 3.0×10^{10} pfu/ml,达到进一步体内、外实验要求。**结论** 成功构建了重组腺病毒 Ad-KGF,为了解 KGF 在肺部疾病中的作用以及进一步的基因治疗肺纤维化方法奠定了基础。

【关键词】 角质细胞生长因子; 腺病毒; 小鼠; 肺

Construction of recombinant adenovirus vector of mouse keratinocyte growth factor CHEN Li*, ZHANG Xin-ling, LI Yin-ping, WANG Jian-li, LI Tan-shi. * Department of Emergency, the General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Corresponding author: LI Tan-shi

【Abstract】 Objective To construct a recombinant adenovirus vector expressing keratinocyte growth factor (KGF) gene in mouse. **Methods** KGF gene amplified from mouse cDNA by polymerase chain reaction (PCR). It was reverse transcribed from RNA that had been harvested from C57BL/6 mouse, and then inserted into the plasmid pShuttle-CMV to construct the shuttle plasmid pShuttle-CMV-KGF (pKGF). After linearized by restriction enzyme, the plasmid was transformed into E. Coli BJ5183 containing adenovirus backbone. The homologous recombinant pAdEasy-1-pShuttle-CMV-KGF (pAd-KGF) was identified, linearized, and then transfected into HEK293 cells using the lipofectamineTM 2000 to package the adenovirus, AdEasy-1-pShuttle-CMV-KGF (Ad-KGF), followed by further amplification, caesium chloride density gradient centrifugation purification and measurement of virus titer. Ad-GFP was used as control, and its transfection efficacy was observed. **Results** ①The shuttle plasmid pKGF was proved to be successfully constructed by gene sequencing and restriction enzyme, as well as the recombinant adenovirus plasmid. ②The cytopathic effects of HEK293 cells observed under the microscope suggested that the duplication of the virus was successful. ③The plaque titration of HEK293 cells showed virus titers were 3.0×10^{10} pfu/ml, the concentration of which was adequate for future test in vivo or in vitro. **Conclusion** The harvest of recombinant adenovirus vector of Ad-KGF, is the first step for the future test to investigate the effects of KGF in pulmonary diseases, and the possible gene therapy to treat pulmonary fibrosis.

【Key words】 keratinocyte growth factor; adenovirus; mouse; lung

角质细胞生长因子(KGF)作为一种经典的细胞生长因子,其对肺泡上皮细胞(AECs)多途径、多水平的保护作用已被广为认可。既往研究表明,KGF对多种因素诱发的急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)^[1-4]以及慢性进展的肺纤维化(PF)^[5]均有预防作用。但就其应用而言,主要存在

基金项目:全军“十一五”医药卫生科研基金资助项目(2006MA257)

作者单位:100853 北京,解放军总医院急诊科(陈力,张心灵,黎檀实);300050 天津市天和医院(李银平);200433 杭州,浙江大学免疫系(王建莉)

通讯作者:黎檀实,教授,博士生导师

作者简介:陈力(1981-),男(汉族),福建省人,医师。

如下问题:①KGF 蛋白费用昂贵,不利于基础研究及临床推广;②KGF 目前仅限于预防,而无治疗作用^[6],可能机制与肺损伤后上皮细胞表面 KGF 受体(KGFR)减少相关^[7];③KGF 参与免疫反应,与免疫细胞相关,但其作为细胞因子的作用却被忽视^[8]。因此,构建 KGF、KGFR 的重组腺病毒载体,对于探讨 KGF 和其他生长因子在肺损伤免疫进程中的作用及肺部疾病的治疗,都是一个有力的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物、质粒和细菌菌株:C57BL/6 小鼠由上海必凯实验动物有限公司提供;重组腺病毒转染包

装细胞 HEK293 细胞株(人胚肾 293 细胞)、载体质粒 pShuttle - CMV、pShuttle - IRES - hrGFP - 1 由第二军医大学免疫所提供;DH5 α 感受态细菌菌株、XL10 感受态细菌菌株、含 AdEasy - 1 腺病毒骨架的 BJ5183 细菌菌株、AdEasy - 1 腺病毒骨架(为氨苄西林抗性,无卡那霉素抗性)均购自上海生物工程公司。

1.1.2 主要试剂:RNA 快速抽提试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自日本 TOYOBO 公司;PCR 反应试剂盒、Ligation mix DNA 连接酶体系、10 \times DNA 加样缓冲液、DNA Marker 标志物、核酸内切酶 Xho I、Hind III 购自大连宝生物公司;核酸内切酶 Pme I、Pac I 购自美国 New England 公司;吸附柱式 PCR 产物回收试剂盒、吸附柱式琼脂糖胶 DNA 回收试剂盒、质粒 DNA 小量抽提小量抽提试剂盒均购自上海博光科技公司;质粒 DNA 大量抽提小量抽提试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;病毒 DNA 转染 293 细胞脂质体 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司;胎牛血清(FBS)、Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)均购自美国 PAA 公司。

1.1.3 引物设计:根据 GeneBank 公布的小鼠 KGF 基因序列(585 bp),由 Prime Premier5.0 统计软件设计一对引物,上游:5'- GCGGTACCATGGGA TTACCGTCCAC - 3', 下游:5'- CGCAAGCTTT CATGTTTTAACTGC - 3', 分别带有核酸内切酶 Xho I、Hind III 酶切位点。引物由上海帝增生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 获得小鼠肺组织细胞 cDNA:颈部脱臼处死 C57BL/6 小鼠,取肺,RNA 抽提试剂盒提取肺组织细胞 RNA,RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR,获得小鼠 cDNA。

1.2.2 PCR 扩增 KGF 基因片段:根据 PCR 试剂盒说明书要求,以获得的 cDNA、PCR 反应引物构建 PCR 反应体系,95 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 PCR 产物回收试剂盒回收反应产物中的 DNA,检测浓度后,-20 $^{\circ}$ C 下保存备用。同时取部分 PCR 纯化产物进行琼脂糖凝胶电泳,初步鉴定结果显示 DNA 片段大小与 KGF 一致(585 bp)。

1.2.3 将 KGF 基因插入载体质粒中:核酸内切酶 Xho I、Hind III 双酶切 PCR 纯化产物及载体质粒 pShuttle - CMV,胶回收大小为 585 bp(KGF)和

7.4 kb(质粒)的片段,连接胶回收产物。将连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,1:4 000 卡那霉素阳性的 Luria - Bertani 培养基(LB)平板划线涂板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取直径最大菌落,1:2 000 卡那霉素阳性的 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,小量抽提质粒 DNA。Xho I、Hind III 双酶切初步鉴定 KGF 连于载体质粒后,送上海生物工程公司进行基因测序。

1.2.4 重组腺病毒的包装:核酸内切酶 Pme I 充分酶切,线性化穿梭质粒 pShuttle - CMV - KGF(pKGF),转化含腺病毒骨架的感受态 BJ5183 细菌,铺板、挑菌过程同前,挑取直径最小的克隆。小量抽提质粒 DNA,Pac I 酶切鉴定正确后,转化 XL10 感受态细菌,大量抽提病毒质粒 pAdEasy - 1 - pShuttle - CMV - KGF(pAd - KGF)的 DNA,测定浓度后-20 $^{\circ}$ C 保存备用。转化过程中,均选用卡那霉素筛选阳性克隆。

1.2.5 重组腺病毒的制备、扩增和纯化:以 Pac I 充分酶切 pAd - KGF,暴露末端反转重复序列。酚氯仿抽提纯化酶切后的重组腺病毒质粒,取 5 μ g,以脂质体 Lipofectamine2000 转染 HEK293 细胞(25 cm 2 培养瓶),具体步骤按试剂盒说明书要求严格进行。转染后在 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO $_2$ 的培养箱中继续培养细胞 8~18 d。待细胞出现病理形态(>80%)改变后收集细胞,于-80 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次裂解细胞,离心留取上清,此为初代病毒液。病毒再次转染 HEK293 细胞,以培养瓶 25、75 和 170 cm 2 递增进行扩增。氯化铯(CsCl)梯度离心法进行病毒纯化。

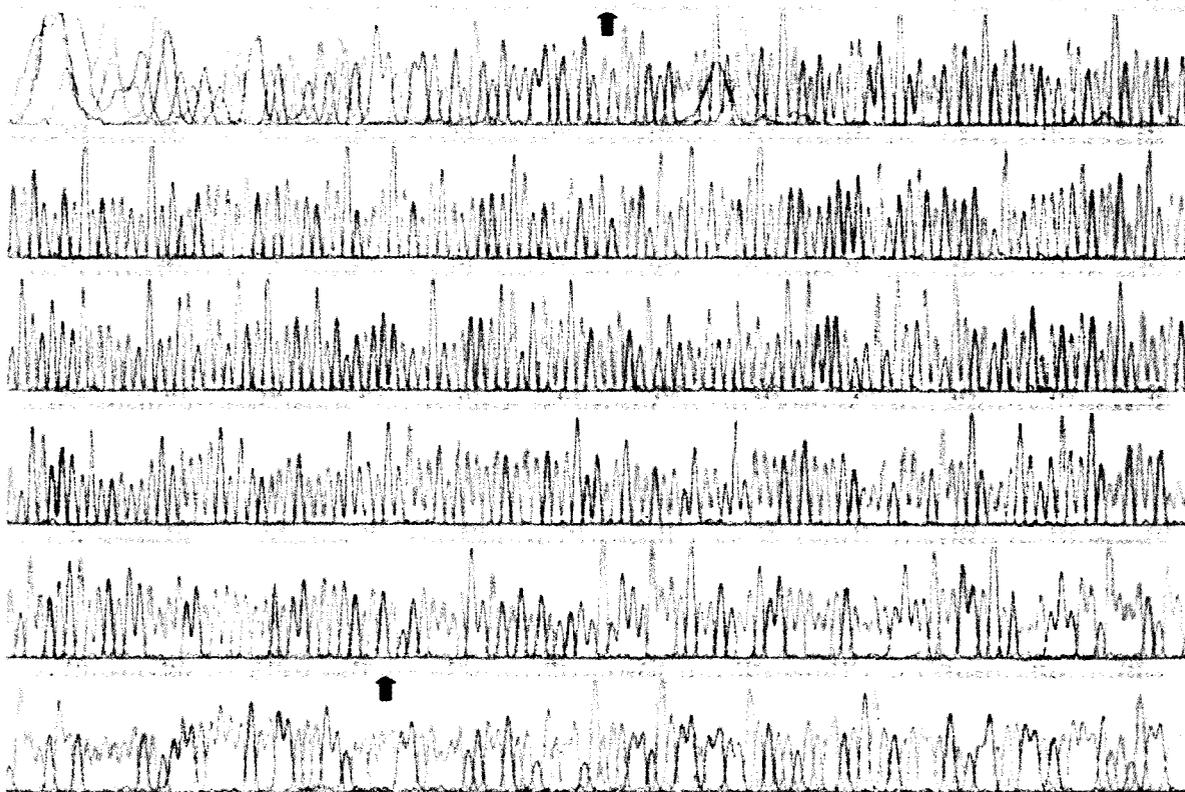
1.2.6 重组腺病毒滴度的测定:将病毒原液依次稀释 10 倍,使浓度梯度为 10 $^{-1}$ -10 $^{-12}$,将后 4 个孔的稀释液加入 6 孔板,每孔 2 ml。培养 10 d 后于显微镜下观察出现空斑的孔数。病毒滴度(pfu/ml) = (最大稀释病毒液感染时空斑数 \times 稀释倍数)/2 ml。

1.2.7 制备对照病毒 Ad - GFP:表达绿色荧光蛋白(GFP)的 pShuttle - IRES - hrGFP - 1 质粒转化含腺病毒骨架 pAdEasy - 1 的感受态 BJ5183 细菌,制备病毒 Ad - GFP(基本过程同前)作为对照,显微镜下观察转染率。

2 结果

2.1 扩增 KGF 基因片段(彩色插页图 1):琼脂糖凝胶电泳鉴定证实成功扩增了 KGF 基因片段。

2.2 成功构建穿梭质粒 pKGF(彩色插页图 2、图 3,图 4):经 Xho I/Hind III 酶切鉴定,3 个样本中均证实 KGF 基因片段已经连接于 pShuttle - CMV



注,箭头标记处为起止位点

图 4 pKGF 测序结果图

Figure 4 Gram of pKGF sequencing

载体质粒。进一步进行 DNA 测序,仅在 46~48 bp 处 AGG 突变为 AGA,考虑氨基酸翻译的简并性,表达上均为精氨酸(Arg),说明穿梭质粒 pKGF 构建成功,同时表明引物设计正确。

2.3 pKGF 重组于病毒骨架(彩色插页图 5):插入 KGF 基因的穿梭质粒与腺病毒骨架在 BJ5183 菌中进行了有效重组。载体质粒 pShuttle-CMV 为卡那霉素抗性,骨架质粒 pAdEasy-1 为氨苄西林抗性,用 Pac I 切同源重组的病毒质粒,质量分数为 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,可见 >10 kb 和 4.5 kb 两个条带,由此证实 pKGF 重组于病毒骨架。

2.4 重组腺病毒的产生(彩色插页图 6,图 7):重组腺病毒质粒在 HEK293 细胞中包装产生重组腺病毒。含重组腺病毒的质粒转染包装细胞 HEK293 在 24~48 h 左右,荧光显微镜下可见重组腺病毒 Ad-GFP 绿色荧光蛋白表达,表明开始包装病毒。培养 8 d,显微镜下观察,HEK293 细胞出现病理形态改变;10 d 出现特征性圆球状及葡萄串样聚合的细胞病变,并逐渐肿胀脱落;14 d 时病毒大量复制,细胞破坏。经多次“感染-收集-冻融”后,纯化,测滴度为 3.0×10^{10} pfu/ml。

3 讨论

KGF 是由 Rubin 等^[9]在胚胎纤维母细胞系 M426 中发现的,其蛋白纯化物是分子质量为 26~28 ku 的单体,cDNA 克隆及测序表明 KGF 属于成纤维母细胞生长因子家族成员,即成纤维细胞生长因子-7(FGF-7)。FGF-7 和其他 15 个 FGF 家族成员一样,具有同肝素结合的能力,是由中胚层来源的成纤维母细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、少量炎性细胞,如 T 细胞等的产生,并通过旁分泌方式作用于上皮细胞表面的 KGFR,刺激上皮细胞有丝分裂^[10-11]。因为 KGFR 特异性表达于上皮细胞,KGF-KGFR 的作用存在上皮特异性,对包括 II 型肺泡上皮细胞(AT II)在内的多种上皮细胞有潜在有丝分裂活性,如肝实质细胞、胃肠道细胞、尿道上皮细胞、各种鳞状上皮的角化细胞等。

影响呼吸并最终导致呼吸衰竭的多种疾病常是造成对 AECs,尤其是功能性 AT I 的损害,直接影响换气功能,导致机体供氧。AT II 则因为可以分化成为 AT I,被认为是肺脏内的祖细胞,在肺损伤修复中作用重大。因此,目前对于 KGF 在肺疾病中的地位 and 作用的认识主要集中于对 AT II 的保护,其

机制在于能够促进 AT II 成熟、增殖、分化,促进肺泡表面活性物质(SP)的合成和分泌,加强肺泡内液体清除^[10-13],调节纤维化相关基因的表达,并因此进行了大量的基础实验和临床研究。但是,这也恰恰忽视了 KGF 作为一种细胞因子在整个细胞因子网络中的可能作用。现有的研究虽然报道了 KGF 对其他炎症因子的影响^[8,14],却鲜有对其机制的深入探讨。同时,作为重要的免疫调节细胞, $\gamma\delta$ T 细胞具有分泌 KGF 的功能,在多种肺疾病的终末期 PF 时发挥了重要作用^[15]。所以,探讨其在免疫反应中的作用将是 KGF 以及其他生长因子未来研究的一个方向。因此,一种能在分子或细胞水平进行干预观察的工具将为实验所需,而重组腺病毒载体就是这样一种经济、实用的工具。

导入外源性基因的常用载体有逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、单纯疱疹病毒等。腺病毒载体因其制备和操作容易、基因结构和功能得到深入了解,是目前用途最广泛的表达载体,具有滴度高(纯化后可达 $10^{11} \sim 10^{12}$ pfu/ml)、易于插入大片段、安全性好、感染细胞范围广等优点^[16]。鉴于此,本实验采用的是 He 等^[17]建立的 AdEasy 腺病毒系统,将线性化的穿梭质粒转化含有病毒骨架质粒的大肠杆菌 BJ5183 进行细菌内同源重组,所得重组腺病毒质粒可以通过卡那霉素筛选出,并通过质粒大小和限制性内切酶分析鉴定。最后,Pac I 酶切后的重组腺病毒质粒转染 HEK293 细胞包装产生重组腺病毒。这种细菌内同源重组法与以前的细胞内同源重组法比较,同源重组效率有了较大提高,方法简便、快速、实验周期短。而感染的病毒能表达绿色荧光蛋白,有助于对转染效率的判断。

结论:本研究克隆的 KGF cDNA 大小 585 bp,与 GeneBank 一致,进一步对质粒的测序表明其序列基本正确,不影响正常翻译;Pac I 酶切、卡那霉素阳性培养基筛选阳性质粒,表明同源重组成功;包装细胞的特征性病理形态改变表明病毒复制成功,同时测得滴度符合进一步体内、体外实验要求;由此说明,在“基因”水平上 KGF 重组腺病毒载体构建成功,而产生功能性作用则需要进一步的体外细胞实验,验证在蛋白质水平上的作用。

参考文献:

- 1 Nemzek J A, Ebong S J, Kim J, et al. Keratinocyte growth factor pretreatment is associated with decreased MIP-2 concentrations and reduced neutrophil recruitment in acid aspiration lung injury [J]. Shock, 2002, 18(6): 501 - 506.
- 2 Guo J, Yi E S, Havill A M, et al. Intravenous keratinocyte growth

- factor protects against experimental pulmonary injury [J]. Am J Physiol, 1998, 275(4 Pt 1): L800 - L805.
- 3 Viget N B, Guery B P, Ader F, et al. Keratinocyte growth factor protects against *Pseudomonas aeruginosa* - induced lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(6): L1199 - L1209.
- 4 Lesur O, Hermans C, Chalifour J F, et al. Mechanical ventilation induced pneumoprotein CC-16 vascular transfer in rats: effect of KGF pretreatment [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(2): L410 - 419.
- 5 Marchand-Adam S, Plantier L, Bernuau D, et al. Keratinocyte growth factor expression by fibroblasts in pulmonary fibrosis: poor response to interleukin-1 beta [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(5): 470 - 477.
- 6 Prince L S, Karp P H, Moninger T O, et al. KGF alters gene expression in human airway epithelia: potential regulation of the inflammatory response [J]. Physiol Genomics, 2001, 6(2): 81 - 89.
- 7 Peters K, Werner X, Liao X, et al. Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung [J]. EMBO J, 1994, 13(14): 3296 - 3310.
- 8 Haddad I Y, Milla C, Yang S, et al. Surfactant protein A is a required mediator of keratinocyte growth factor after experimental marrow transplantation [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(3): L602 - 610.
- 9 Rubin J S, Osada H, Finch D W, et al. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cell [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(3): 802 - 806.
- 10 Frank L. Protective effect of keratinocyte growth factor against lung abnormalities associated with hyperoxia in prematurely born rats [J]. Biol Neonate, 2003, 83(4): 263 - 272.
- 11 Sugahara K, Tokumine J, Teruya K, et al. Alveolar epithelial cells: differentiation and lung injury [J]. Respirology, 2006(11 Suppl): S28 - 31.
- 12 Chelly N, Henrion A, Pinteut C, et al. Role of keratinocyte growth factor in the control of surfactant synthesis by fetal lung mesenchyme [J]. Endocrinology, 2001, 142(5): 1814 - 1819.
- 13 Matthay M A, Fukuda N, Frank J, et al. Alveolar epithelial barrier, role in lung fluid balance in clinical lung injury [J]. Clin Chest Med, 2000, 21(3): 477 - 490.
- 14 Panoskaltzis-Mortari A, Ingbar D H, Jung P, et al. KGF pretreatment decreases B7 and granzyme B expression and hastens repair in lungs of mice after allogeneic BMT [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278(5): L988 - 999.
- 15 Simonian P L, Roark C L, Diaz del Valle F, et al. Regulatory role of gammadelta T cells in the recruitment of CD4⁺ and CD8⁺ T cells to lung and subsequent pulmonary fibrosis [J]. J Immunol, 2006, 177(7): 4436 - 4443.
- 16 Vorburger S A, Hunt K K. Adenoviral gene therapy [J]. Oncologist, 2002, 7(1): 46 - 59.
- 17 He T C, Zhou S, da Costa L T, et al. A simplified system for generating recombinant adenovirus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509 - 2514.

(收稿日期: 2007-05-12 修回日期: 2007-09-11)

(本文编辑: 保健媛)

小鼠角质细胞生长因子重组腺病毒载体的构建

(正文见610页)

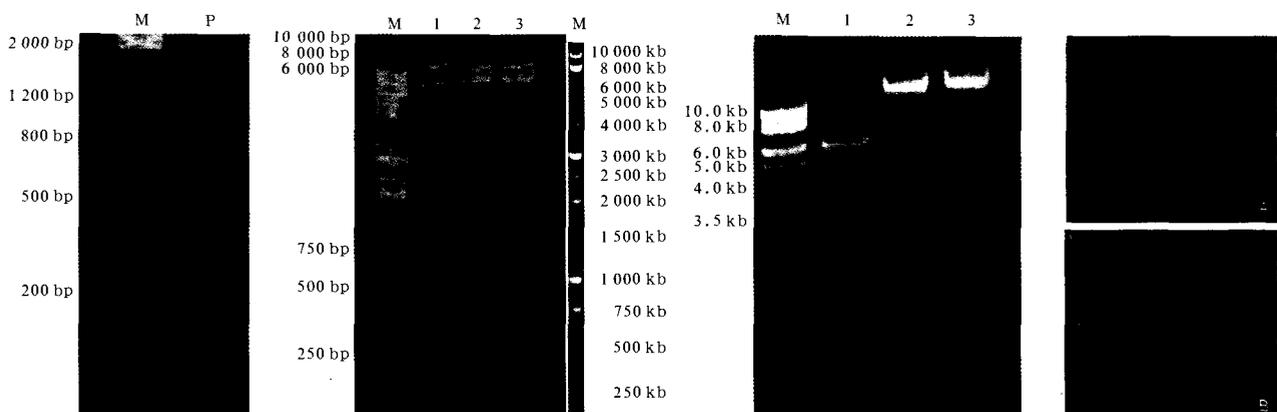


图1 PCR后小鼠肺组织cDNA电泳图
Figure 1 Electropherogram of lung cDNA of mouse after PCR

图2 pKGF双酶切后电泳图
Figure 2 Electropherogram of pKGF cut by enzymes Xho I /Hind III

图5 Pac I 酶切鉴定pAd-KGF电泳图
Figure 5 Electropherogram of pAd-KGF by Pac I

图6 重组腺病毒的产生
(荧光染色, x 200)
Figure 6 Product of recombinant adenovirus (LeiCa, x 200)

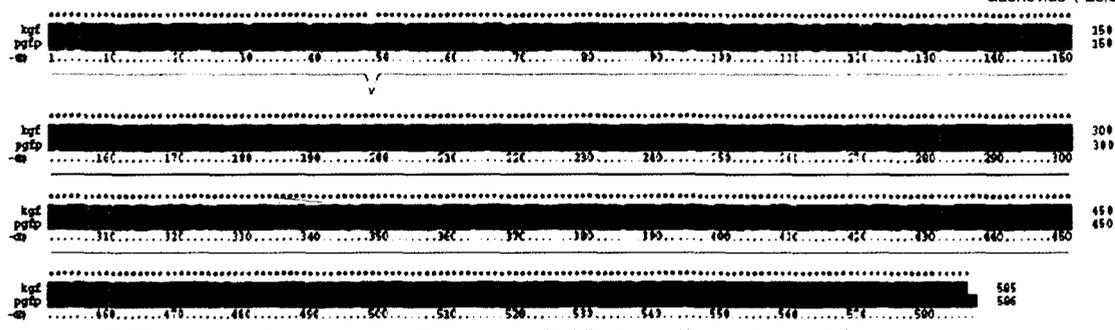


图3 pKGF测序结果与小鼠KGF基因序列的对比
Figure 3 Construct gram of pKGF gene bank and KGF gene bank of mouse



图7 显微镜下HEK293细胞感染重组腺病毒病理形态改变(TEM, x 100)
Figure 7 Pathohistological change of HEK293 cell infected by recombinant adenovirus under microscope(TEM, x 100)

脓毒症大鼠胸腺细胞凋亡及线粒体的变化

(正文见625页)

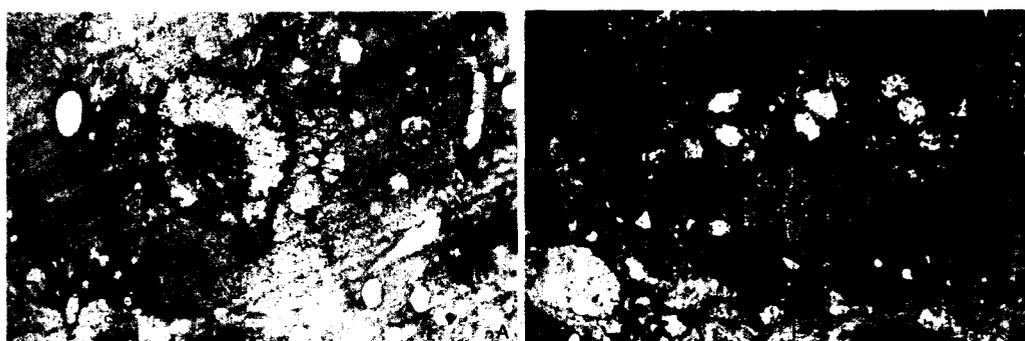


图1 CLP组线粒体超微结构改变(醋酸铀染色, x 1 000)
Figure 1 Ultrastructure change of mitochondrion in CLP group(uranium tetraacetate, x 1 000)