文章编号:1000-5404(2006)05-0481-04

技术方法

CXCR4腺病毒表达载体的构建及其在真皮多能干细胞中的表达

宗兆文,程天民,粟永萍,李 楠,董世武,艾国平,冉新泽,王军平,徐 辉 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆,400038)

提 要:目的 构建大鼠CXCR4的腺病毒表达载体,并观察其转染真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells, dMSCs)后的表达情况。**方法** 扩增含有CXCR4的全长cDNA,然后亚克隆至穿梭质粒pAdTrack-CMV中,再与pAdEasy-1质粒在大肠杆菌BJ5183中进行同源重组产生含有CXCR4的骨架质粒(pAdEasy/CXCR4)。将验证正确的pAdEasy/CXCR4用Pac Ⅰ酶切后转染293细胞,从而包装出CXCR4的腺病毒表达载体(Adv-CXCR4)。用Adv-CXCR4转染dMSCs,并采用RT-PCR、免疫荧光细胞化学和荧光激活细胞分类计数的方法检测其表达情况。**结果** PCR、酶切和测序结果证明,成功地将CXCR4全长cDNA克隆到骨架质粒中,并包装出腺病毒表达载体。同时,Adv-CXCR4转染dMSCs后可有效地增加dMSCs中CXCR4的表达。**结论** CXCR4的腺病毒表达载体的成功构建和其在dMSCs中的表达,为研究CXCR4在干细胞移植中的应用奠定基础。

在我们研究所前期的工作中,我们分离培养鉴定了大鼠真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells, dMSCs)[1],然后将其以经尾静脉输注的方式移植到放射损伤复合皮肤创伤(放创复合伤)大鼠体内,发现移植的dMSCs可优势分布到骨髓和创面[2,3],并可明显缩短创面愈合时间,促进造血功能的恢复[4]。进一步的研究表明,放创复合伤大鼠皮肤创面和骨髓局部上调表达的基质细胞源性因子-1(stomal-derived factor-1, SDF-1)在趋化移植dMSCs向伤部的优势分布中起到重要作用(有关实验结果尚未发表)。由于静脉输注的dMSCs在伤部的含量仍相对有限(低于移植细胞总量的3%)[2,3],因而我们设想将CXCR4(SDF-1的唯一受体)的全长cDNA克隆到腺病毒表达载体中,转染dMSCs,增加dMSCs中CXCR4表达水平,从而在损伤局部高表达SDF-1的趋化下,促进移植的dMSCs更多地分布到损伤局部,以更好地促进损伤组织的修复。本实验拟构建CXCR4的腺病毒表达载体,并观察其转染dMSCs后CXCR4表达的变化情况,从而为验证我们上述的实验设想奠定基础。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目, 2005CB522605);国家自然科学基金资助项目(30500141);第三军医大学科研基金资助项目(XG200509)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522605), the National Natural Science Foundation of China (30500141) and the Research Foundation of Third Military Medical University (XG200509)

作者简介:宗兆文(1975-),男,江苏省铜山县人,博士,助理研究员,主要从事脊髓损伤修复和放创复合伤组织修复方面的研究,发表论文10篇。电话:13883506677,E-mail: zongzhaowen2004@sina.com
通讯作者:程天民,电话:(023)68752008

收稿日期:2005-10-20;**修回日期**:2006-01-19

1 材料与方法

1.1 细胞、菌株、质粒和主要试剂

穿梭质粒pAdTrack-CMV、骨架质粒pAdEasy-1和大肠杆菌BJ5183由本校解剖教研室董世武博士馈赠。大肠杆菌DH5α和293细胞株由本研究所冻存。Tripure和DOTAP脂质转染试剂盒购自Roche公司。RNA PCR Kit、DNA ligation kit和胶回收试剂盒购自TaKaRa公司。一抗兔抗CXCR4购自Santa Cruz公司,荧光二抗Anti-rabbit-R-Phycoerythrin (PE)购自Sigma-Aldrich公司。内切酶*Bgl* Ⅱ、*Eco*R Ⅴ、*Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ和*Bam*H Ⅰ购自New England公司。

1.2 CXCR4腺病毒表达载体的构建和滴度测定

1.2.1 CXCR4全长cDNA的扩增 参照试剂盒的说明书,用Tripure提取大鼠骨髓的总RNA,并以其为模板,两步法RT-PCR扩增CXCR4,1%琼脂糖凝胶电泳检查产物。设计PCR引物时,在上下游分别加入*Bgl* Ⅱ和*Eco*R Ⅴ的酶切位点及保护性碱基。PCR引物为:上游引物5′-GAAGATCT ATG GAA ATA TACACTTCGGAT-3′和下游引物5′-TGGGATATCTTAGCTG-GAGTG AAAACTTGAG-3′,产物长1 079 bp。其中,有下划线的部分为引入的酶切位点。

1.2.2 含CXCR4穿梭质粒的构建和鉴定 将RT-PCR扩增到的CXCR4基因片段回收后用*Bgl* Ⅱ和*Eco*R Ⅴ酶切,并与经同样酶切的穿梭质粒pTrack-CMV连接,转化感受态大肠杆菌DH5α。PCR和酶切鉴定并挑选阳性克隆。共设4组酶切反应:*Pac* Ⅰ,*Bam*H Ⅰ + *Eco*R Ⅴ,*Bam*H Ⅰ + *Bgl* Ⅱ和*Bgl* Ⅱ + *Eco*R Ⅴ。测序检测克隆到穿梭质粒中的CXCR4的序列是否正确。

1.2.3 含CXCR4骨架质粒的构建和鉴定 取鉴定的阳性穿梭质粒,用*Pme* Ⅰ进行单酶切线性化及去磷酸化后转化含骨架质粒pAdEasy-1的BJ5183感受态细菌,PCR和酶切鉴定并挑选阳性克隆。共设2组酶切反应:*Pac* Ⅰ和*Bgl* Ⅱ + *Eco*R Ⅴ。测序检测克隆到骨架质粒中的CXCR4的序列是否正确。

1.2.4 腺病毒载体的包装 大量扩增阳性骨架质粒，用 *Pac* Ⅰ酶切后，脂质体法转染 293 细胞。转染后不同时相点荧光显微镜监测绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）的表达情况，了解病毒包装过程。转染后约 10～13 d，GFP 表达达到高峰。此时，收集细胞，反复冻融离心收集上清，即为粗制病毒裂解液（crude virus liquid，CVL）。CVL 感染 293 细胞，扩增重组病毒载体。反复 7 轮后，收集 CVL，CsCL 密度梯度离心进行纯化后，加入 10% 甘油，－70℃保存备用。

1.2.5 CXCR4 腺病毒载体的滴度测定 采用空斑实验测定病毒滴度，具体操作如下：用 293 细胞培养液将第 7 代 CVL 稀释成 10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}和 10^{-10} 4 个稀释度。每种稀释度取 0.1 ml，铺盖 3 个含生长状态良好 293 细胞的培养皿，37 ℃ 孵育1 h 后加入 2 ml 琼脂培养基，均匀覆盖 293 细胞培养层，37 ℃/5% CO_2 孵箱继续孵育。每天计数空斑 1 次，直至空斑数目稳定不变为止。计算公式：病毒滴度 = 同一稀释度空斑均数 × 10 × 稀释度的倒数。

1.3 CXCR4 腺病毒载体转染 dMSCs 及对其 CXCR4 表达水平的影响

dMSCs 的分离培养和鉴定参见本研究所建立的方法进行[1]。用第 7 代 CVL 转染 dMSCs，转染后 6 d，分别采用 RT-PCR、免疫荧光化学和荧光激活细胞分类计数（fluorescent activated cell sorting，FACS）的方法检测 CXCR4 表达的变化情况。

1.3.1 RT-PCR Tripure 法提取转染 Adv-CXCR4 的 dMSCs 和正常 dMSCs 的总 RNA，两步法 RT-PCR 扩增 CXCR4，引物同上。RT-PCR 反应设 HPRT 为内参，其上游引物为 5′-TCATCAGCGAAAGTGGAAA-3′，下游引物为 5′-TGTCTGTCTCACAAGGGAAGT-3′，产物为 270 bp。反应结束后，将 6 μl CXCR4 扩增产物和 4 μl HPRT 扩增产物混匀，1% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.3.2 免疫荧光化学 设转染 Adv-CXCR4 的 dMSCs 实验组、正常 dMSCs 实验组以及各自不加一抗的对照组。将 dMSCs 传代至 12 孔板，细胞 70% 左右融合时用第 CVL 转染 dMSCs（6 孔）。转染后 8 d，弃培养基，加入 95% 乙醇固定 20 min，PBS 充分漂洗后加入兔抗 CXCR4，4 ℃过夜孵育。次日倾去一抗并用 PBS 充分漂洗后加入抗兔-PE。室温孵育约 30 min 后 PBS 充分漂洗，荧光显微镜下观察。

1.3.3 FACS 免疫荧光化学的操作步骤同 1.3.2，PBS 充分漂洗后，用 500 μl PBS 重悬细胞，FACS 检测红色荧光细胞的阳性率。

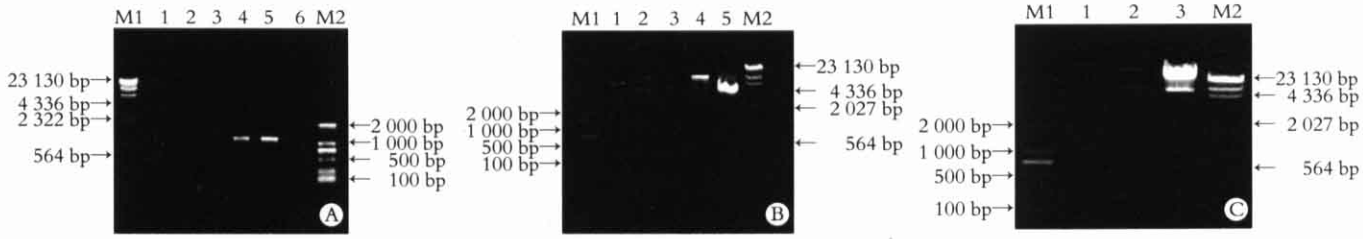
2 结果

2.1 CXCR4 腺病毒表达载体的构建

以大鼠骨髓的总 RNA 为模板，两步法 RT-PCR 可扩增 CXCR4 的全长片段，长约 1 079 bp（图 1A）；而以三蒸水为模板，则不能扩增出 CXCR4 的特异片段（图 1A）。

Bgl Ⅱ 和 *Eco*R Ⅴ 双酶切 pTrack-CMV 和扩增到的 CXCR4 全长片段，胶回收后（图 1A）连接并转化感受态大肠杆菌 DH5α，经 PCR 验证共筛选出 3 株阳性候选克隆。测序显示其中 1 株无突变。四组酶切得到预期的片段（图 1B），表明含 CXCR4 的穿梭质粒构建成功，命名为 pTrack/CXCR4。

取鉴定正确的 pTrack/CXCR4，用 Pme Ⅰ进行单酶切后转化含 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态细菌，经 PCR 反应验证共筛选到 7 株阳性候选克隆。取 2 株测序显示无突变发生。*Pac* Ⅰ酶切后可得到大小约 30 kb 和 3 kb 的预期片段，*Bgl* Ⅱ 和 *Eco*R Ⅴ双酶切后可得到长约 1 kb 的目的片段（图 1C）。结果表明，含 CXCR4 的骨架质粒构建成功，命名为 pAdEasy/CXCR4。



A：CXCR4 和 pTrack 的酶切回收；M1：DNA 标准（λ*Hind* digest）；1，2：回收酶切后的 pTrack；3，4：回收酶切后的 CXCR4；5：RT-PCR 扩增 CXCR4；6：对照；M2：DNA 标准

B：pTrack/CXCR4 酶切鉴定；M1：DNA 标准（DL2000）；1：*Pac* Ⅰ；2：*Bam*H Ⅰ + *Eco*R Ⅴ；3：*Bam*H Ⅰ + *Bgl* Ⅱ；4：*Bgl* Ⅱ 和 *Eco*R Ⅴ；5：pAdTrack/CXCR4；M2：DNA 标准（λ*Hind* Ⅲ digest）

C：pAdEasy/CXCR4 酶切鉴定；M1：DNA 标准（DL2000）；1：*Bgl* Ⅱ 和 *Eco*R Ⅴ；2：*Pac* Ⅰ；3：pAdEasy/CXCR4；M2：DNA 标准（λ*Hind* Ⅲ digest）

图 1 穿梭质粒 pTrack/CXCR4 和骨架质粒 pAdEasy/CXCR4 的构建和鉴定

Pac Ⅰ酶切多量 pAdEasy/CXCR4 后，脂质体法转染 293 细胞。转染后 5 d 天左右，出现 GFP 阳性细胞，表明转染成功。转染后 9 d，GFP 阳性细胞数量进一步增多，出现细胞病理效应（cytopathic effect，CPE），表现为细胞变圆。转染后约 13～15 d，CPE 完全形成，表现为转染细胞从培养板上脱落，细胞核占据细胞的大部分，细胞呈葡萄串状丛集分布于正常的 293 细胞上。至此，CXCR4 腺病毒载体（adeovirus vector，Adv）构建完成，命名为 Adv-CXCR4。此时，收集细胞，反复冻融离心收集上清，即为 CVL。CVL 感染 293 细胞，扩增重组病毒载体。反复 7 轮后，收集 CVL，CsCL 密度梯度离心进行纯化后，共得到约 10

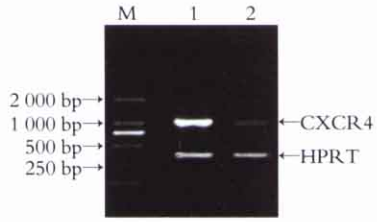
ml CVL。加入 10% 甘油，-70℃保存备用。

2.2　CXCR4 腺病毒表达载体的滴度测定

空斑实验的第 3 天，在暗背景下，细胞层内的小空斑呈现为针尖状小白点。随着空斑实验时间的延长，细胞层中的小白点逐渐变为白色的斑点，1 周时各稀释度的培养皿内形成恒定大小的白色环。此时，计算得重组腺病毒载体 Adv-CXCR4 的病毒滴度约为 $1.0\times10^{10}\sim3.3\times10^{11}$。

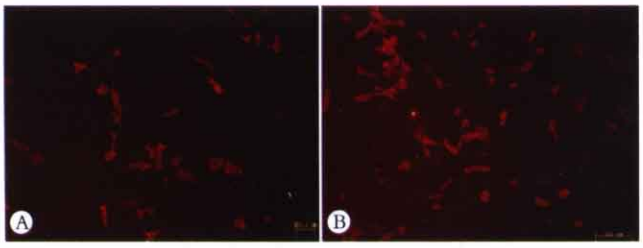
2.3　CXCR4 腺病毒载体转染 dMSCs 及对其 CXCR4 表达水平的影响

用第 7 代 CVL 转染 dMSCs，转染后 6 d 可见多量的 GFP 阳性细胞。此时，提取细胞的总 RNA，进行 RT-PCR 后可见其扩增出的片段强度明显高于没有转染病毒的 dMSCs 总 RNA（图 2）。而采用免疫荧光组织化学的结果可见转染腺病毒载体的 dMSCs 阳性细胞（红色）数目多于后者（图 3）。FACS 的结果表明未转染 Adv-CXCR4 dMSCs 的阳性率为 12.14%，而 dMSCs 在转染 Adv-CXCR4 后 8 d 的阳性率为 83% 左右，约为没有转染病毒载体 dMSCs 的 6.84 倍。上述结果表明，Adv-CXCR4 可转染哺乳动物来源的细胞 - dMSCs，并能增加 dMSCs 的 CXCR4 表达水平。



M：DNA 电泳参照物（DL2000）；1：Adv-CXCR4 转染 dDMSc 后 CXCR4 的表达情况；2：正常 dDMSc 中 CXCR4 的表达情况

图 2　RT-PCR 检测 Adv-CXCR4 在 dMSCs 中的表达



A：Adv-CXCR4 转染 dDMSc 后 CXCR4 的表达情况；B：正常 dDMSc 中 CXCR4 的表达情况

图 3　免疫荧光细胞化学检测 Adv-CXCR4 在 dMSCs 中的表达（免疫荧光 ×200）

3　讨论

成体干细胞是近年医学研究的热点之一。目前，成体干细胞已经从大多数组织被分离和鉴定，并且有大量的实验结果表明，将成体干细胞应用于损伤组织的修复，可取得良好的效果。在本研究所的前期工作中，我们发现静脉移植的 dMSCs 可优势分布到放创复合伤大鼠的骨髓和创面[2,3]，并可明显促进造血功能的恢复和创面愈合[4]。但移植 dMSCs 在伤部的含量仍相对有限[2,3]，因而有必要寻找适当的措施，增加移植的干细胞向损伤组织的分布，以进一步提高 dMSCs 的治疗效果。

SDF-1 属于 CXC 族趋化性细胞因子，CXCR4 是其唯一受体。SDF-1 与 CXCR4 之间的相互作用被证明在多种涉及细胞趋化和迁移过程中发挥作用[5-7]。胚胎发育晚期，造血干细胞在 SDF-1 的化学趋化作用下，逐渐由肝脏向骨髓和脾脏迁徙，完成了造血器官由肝脏向骨髓和脾脏的转变[5]。而巨核细胞、血小板、白细胞、单核细胞等血细胞上均有 CXCR4 表达，上述细胞均可在 SDF-1 趋化下动员入血[5]。Sordi 等[6]证实骨髓间充质干细胞表达 CXCR4，可在 SDF-1 的趋化下，分布到胰腺的胰岛。病理情况下，比如电离辐射或在 5-氟尿嘧啶作用下，骨髓局部的 SDF-1 表达上调，可吸引更多移植的造血干细胞归巢[7]。在研究移植 dMSCs 向放创复合伤大鼠伤部优势分布机制的过程中，我们发现，损伤局部上调表达的 SDF-1 在趋化移植 dMSCs 向伤部的优势分布中起到重要作用。因而我们设想将 CXCR4 的全长 cDNA 克隆到病毒载体中，转染 dMSCs，增加其 CXCR4 表达水平，从而在损伤局部高表达 SDF-1 的趋化下，促进移植的 dMSCs 更多地分布到，以更好地促进损伤组织的修复。

实验中我们选择了 pAdEasy-1 腺病毒表达载体系统来构建病毒载体，因为腺病毒表达载体有很多优点，如：①可转染多种类型的哺乳动物细胞，包括分裂不活跃的细胞类型；②产生的病毒滴度高。我们的研究发现，Adv-CXCR4 的病毒滴度可达到 $1.0\times10^{10}\sim3.3\times10^{11}$；③其 DNA 不整合到宿主基因组，对宿主的基因组表达和遗传无明显影响；④腺病毒载体转染入宿主后，表达有一定的时相性。通常，腺病毒载体表达的有效期限为 6 ~ 8 周，非常适合我们研究放创复合伤促愈效果的实验模型。同时，pAdEasy-1 系统操作方便，且穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中构建元件含有 GFP 表达盒，因此重组病毒载体在 293 细胞的包装过程中很容易通过荧光显微镜观察进行监测。正因为如此，pAdEasy-1 系统被广泛地用作真核基因的表达载体[8]。本研究中，我们成功地构建了 CXCR4 的腺病毒表达载体 Adv-CXCR4，并发现 Adv-CXCR4 可转染我们分离培养的 dMSCs，并能有效地增加 dMSCs 中 CXCR4 的表达水平，这为验证我们上述的实验设想奠定了良好的基础。

关键词：CXCR4；腺病毒表达载体；真皮多能干细胞；转染
中图法分类号：R394　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 史春梦，程天民. 大鼠真皮多能间充质干细胞的分离培养[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1068－1070.

[2] 宗兆文，程天民，冉新泽，等. 全身照射大鼠骨髓提取液对真皮多能干细胞趋化作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(4)：279－281.

[3] 宗兆文，程天民，冉新泽，等. 放创复合伤大鼠伤口液对真皮多能干细胞的趋化作用[J]. 中华放射医学与防护杂志，2005，25(2)：111－113.

[4] SHI C, CHENG T, SU Y, *et al*. Transplantation of dermal multipotent cells promotes survival and wound healing in rats with combined radiation and wound injury [J]. Radiat Res, 2004, 162(1): 56－63.

[5] HATTORI K, HEISSIG B, RAFII S. The regulation of hematopoietic stem cell and progenitor mobilization by chemokine SDF-1 [J]. Leuk Lymphoma, 2003, 44(4): 575－582.

[6] SORDI V, MALOSIO M L, MARCHESI F, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets [J]. Blood, 2005, 106(2): 419－427.

[7] PONOMARYOV T, PELED A, PETIT I, *et al*. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function [J]. J Clin Invest, 2000, 106(11): 1331－1339.

[8] 董世武，应大君，刘光久，等. 小鼠 Osf2/Cbfa1 基因的重组腺病毒构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2003，25(21)：1947－1950.

（编辑 栾 嘉）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)05-0484-01

隐匿性甲状腺癌诊断与治疗1例

樊 丽，张 毅，杨新华，姜 军 （第三军医大学西南医院乳腺中心，重庆 400038）

患者，女性，36岁，因发现右侧颈部包块2个月余，活检病理报告为右颈部淋巴结转移性乳头状癌，收入院治疗。查体：甲状腺不肿大，未扪及包块。超声示：①右颈部多个稍减弱回声，考虑淋巴结肿大；②甲状腺左叶下极下方可探及淋巴结回声；③甲状腺未探及异常。核素扫描：甲状腺右叶上份"凉结节"。其余检查未发现有远处转移现象。血清学检查 T_3：1.59 μg/L，T_4：99.71 μg/L，均正常。在局部麻醉下手术探查，术中见甲状腺约2.5 cm×2.5 cm×3.0 cm大小，质硬。颈内静脉外侧多个肿大质硬淋巴结，最大有3.5 cm×3.5 cm×3.0 cm大小。切取淋巴结送冰冻检查提示：甲状腺乳头状腺癌Ⅰ级。将右侧甲状腺、甲状腺峡部、左侧大部甲状腺切除，并行右侧颈部淋巴结清扫。术后石蜡切片提示：右甲状腺乳头状癌Ⅰ级。找见淋巴结12枚，其中6枚见癌转移。伤口愈合出院行同位素治疗。

讨论

隐匿性甲状腺癌(occult thyoid cancer)，是指甲状腺内肿瘤直径≤1 cm不能被一般检查所发现的甲状腺癌。常因其他甲状腺疾病手术切除标本中经病理检查才得以诊断，或已有颈部淋巴结转移或远处转移，经穿刺或切除转移灶病理学确诊，另一些是在尸检中发现。

国外报道隐匿性甲状腺癌占全部甲状腺癌的5.6%－35.6%，以乳头状腺癌多见，约1/3的患者可发生颈部淋巴结转移[1]。国内报道颈转移率为14%－57%。一般认为甲状腺隐匿性癌预后较佳，颈淋巴结转移不影响分化良好的甲状腺癌的预后。

隐匿性甲状腺癌原发灶难发现可能有以下原因：①甲状腺结节呈良性表现；②原发灶小，位置较深；③以同侧颈淋巴结肿大为首发临床表现。④影像学等辅助检查可能漏诊微小甲状腺癌。因此，对可疑患者详细询问病史，细致查体和选择恰当的辅助检查仍属必要，彩色超声检查可发现<0.5 cm的甲状腺病灶。有报道患甲亢者核素扫描有冷结节应除外合并甲状腺癌。对颈部淋巴结肿大推荐超声引导细针穿刺细胞学检查或切除活检。术中应细致探查甲状腺两侧叶及峡部，有可疑病灶则术中冰冻切片检查[2]。

隐匿性甲状腺癌手术方式取决于肿瘤的部位、数量、病理分型、合并的其他病变以及淋巴结转移情况。多数主张以患侧腺叶＋峡部切除；双侧者以全甲状腺叶或双甲状腺叶次全切除术。根据颈部淋巴结情况决定是否行淋巴结清扫术。对有颈淋巴结转移者则应予颈淋巴结清扫术，如未发现颈淋巴结转移、无须行预防性颈淋巴结清扫术，但应定期随访、复查[3]，发现有可疑癌组织复发征象应立即再次手术，再次手术推荐行全甲状腺叶或次全甲状腺叶切除术。术后首选甲状腺素片治疗并定期随访。

关键词：甲状腺肿瘤；诊断；手术治疗

中图法分类号：R736.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] MARTINEZ-TELLO F J, MARTINEZ-CARRUJA R, FERNANDEZ-MARTIN J, *et al*. Occult carcinoma of the thyroid. A systematic autopsy study from Spain of two series performed with two different methods [J]. Cancer, 1993, 71(12): 4022－4029.

[2] 朱精强，李 一凌，陈日行，等. 原发性甲状腺功能亢进易合并甲状腺癌的临床特点(附8例报告)[J]. 中国普外基础与临床杂志，1998，5(2)：99－101.

[3] NOGUCHI S, YAMASHITA H, MURAKAMI N, *et al*. Small carcinomas of the thyroid: a long-term follow-up of 867 patients [J]. Arch Surg, 1996, 131(2): 187－191.

（编辑 薛国文）

作者简介：樊 丽(1977－)，女，云南昆明市人，医师，主要从事乳腺甲状腺外科方面的研究；现在云南省第一人民医院胸外科。电话：(0871)6123537

收稿日期：2005-08-30；修回日期：2005-10-21