文章编号:1000-5404(2006)11-1157-04

论著

腺病毒介导 Cubilin 反义 RNA 对肾小管上皮细胞 Cubilin 蛋白诱导表达的抑制作用

梁海君,何娅妮,杨聚荣,丁涵露,李开龙,张建国,李新伦,林 静,刘 俊 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042)

提 要: 目的 构建细菌内同源重组型的 Cubilin 反义 RNA 腺病毒表达载体并研究其对肾小管上皮细胞 Cubilin 蛋白诱导表达的影响。**方法** PCR 扩增大鼠 Cubilin 起始编码区 767 bp 的 DNA 片段,与 T 载体连接,测序鉴定连接方向,通过选择反向和同向的双酶切位点与腺病毒穿梭载体 pAdtack-CMV 同时酶切和连接,构建反向插入(正向插入作为对照)的腺病毒穿梭载体。将 *Pme* Ⅰ线性化的腺病毒穿梭载体 pAdtack-ACUB 和 pAdtack-CUB 转染包含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的受体菌 BJ5183(AdEasy™XL)进行同源重组。用含有卡那霉素的 LB 平板筛选同源重组阳性的克隆,*Pac* Ⅰ酶切和测序鉴定后,转染包装细胞(293 细胞),经病毒扩增和纯化后,再以 OD 法和 GFP 法计算重组腺病毒的滴度。经免疫印迹法分析 Cubilin 反义 RNA 对 Cubilin 蛋白质诱导表达的抑制作用。**结果** 成功构建了 Cubilin 的反义 RNA 腺病毒表达载体(pAdEasy-ACUB)和对照正义 RNA 腺病毒表达载体(pAdEasy-CUB),滴度为 2.0×10^{10} pfu/ ml、1.8×10^{10} pfu/ ml;Cubilin 反义 RNA 腺病毒表达载体转染可明显抑制大鼠肾小管上皮细胞的 Cubilin 蛋白的诱导表达。**结论** Cubilin 的反义 RNA 腺病毒表达载体的成功构建以及对肾小管上皮细胞 Cubilin 蛋白诱导表达的明显抑制作用,为在基因水平的研究和治疗蛋白尿引起的肾间质损伤奠定了良好的基础。

关键词: Cubilin; 腺病毒; 反义 RNA; 肾小管上皮细胞
中图法分类号: R322.61; R373.1; R394.3 **文献标识码**: A

Inhibitory effect of Cubilin antisense RNA mediated by recombinant adenoviral vector on Cubilin protein inducible expression in renal tubular epithelial cells

LIANG Hai-jun, HE Ya-ni, YANG Ju-rong, DING Han-lu, LI Kai-long, ZHANG Jian-guo, LI Xin-lun, LIN Jing, LIU Jun (Department of Kidney, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct antisense RNA expression vector of Cubilin using the adenovirus system by homorecombination in *E. coli*. and study the effects of Cubilin antisense RNA on Cubilin protein inducible expression in renal tubular epithelial cells (RTEC). **Methods** After 767 bp DNA fragment of Cubilin gene was obtained through PCR, this DNA was ligated to the vector-pMD 18-T. The antisense RNA expression vector-pAdtack-ACUB and sense RNA expression vector-pAdtack-CUB was obtained by sequencing, digestion and ligation. The plasmid (pAdtack-ACUB, pAdtack-CUB) digested with *Pme* Ⅰ was transformed into BJ 5183 bacteria (AdEasy™XL). Positive clones were selected on LB medium with 25 μg/ml kanamycin. After digested with *Pac* Ⅰ, plasmids were transfected into packing cells – 293 cell line. The titer of antisense recombinant adnovirus-pAdEasy-ACUB and recombinant adnovirus-pAdEasy-CUB was detected by OD method and GFP method after amplification and purification. The effects of Cubilin antisense RNA on Cubilin protein inducible expression was analyzed by Western blotting. **Results** The titer of pAdEasy-ACUB and pAdEasy-CUB were 2.0×10^{10} pfu/ ml, 1.8×10^{10} pfu/ ml. Recombinant adenovirus of Cubilin antisense RNA infection significantly inhibited Cubilin protein inducible expression in RTEC. **Conclusion** The construction of Cubilin antisense RNA expression vector and the inhibitory effect on Cubilin protein inducible expression in RTEC pave the way for the study and the gene therapy of proteinuria disease.

Key words: cubilin; adenovirus; antisense RNA; RTEC

蛋白尿是肾小球疾病的共同临床表现。长期蛋白尿可引起肾小管上皮细胞生物学特性改变,使其成为放大肾小球疾病炎症瀑布效应和促肾间质纤维化的中心环节[1]。研究表明,Cubilin 是新近发现的位于肾小管上皮细胞刷状缘的多配体吞饮受体,介导白蛋白、脂

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370534)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30370534)
作者简介:梁海君(1977 –),男,吉林省通化市人,硕士研究生,医师。电话:(023)66939085
通讯作者:何娅妮, E-mail: heynmail@yahoo.com
收稿日期:2005-11-23;修回日期:2006-01-10

蛋白等成分的重吸收[2]，可能是病理状态下参与调控肾脏过渡重吸收白蛋白并引起肾间质损伤的关键环节[3,4]。因此，抑制病理状态下 Cubilin 的诱导表达，可能成为治疗或缓解蛋白尿引起肾间质炎症反应和纤维化的有效途径。

反义 RNA 技术是一种前景十分广阔的研究和治疗手段。在细胞内，反义 RNA 不仅可以互补结合靶 DNA 阻断其转录，也可以与 mRNA 结合阻断其翻译生成相应的蛋白质。本研究旨在构建可表达 Cubilin 反义 RNA 的重组腺病毒并研究其对肾小管上皮细胞 Cubilin 蛋白诱导表达的影响，为进一步研究基因治疗因蛋白尿引起的肾间质损伤创造条件。

1 材料与方法

1.1 试剂

腺病毒穿梭质粒载体 pAdtack-CMV、大肠杆菌 $DH_{5\alpha}$ 由西南医院全军烧伤研究所惠赠；*E. coli* BJ5183（AdEasy™XL）购自美国 Stratagene 公司；限制性内切酶 *Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ购自北京纽英伦生物技术有限公司；其他限制性内切酶 *Hind* Ⅲ、*Kpn* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*BamH* Ⅰ，载体 pMD 18-T Vector 均购自 TaKaRa 公司；质粒提取和琼脂糖凝胶片段回收试剂盒购自 Omega biotek 公司；PCR 引物由北京三博远志生物技术有限公司合成；山羊抗大鼠 Cubilin 多克隆抗体购自美国 Santa 公司；MC-CelLytics 购自上海申能博彩生物科技公司。

1.2 细胞系及细胞培养

人胚肾 293 细胞购自美国 Stratagene 公司，大鼠肾小管内皮细胞（rat renal tubular epithelial cells，RRTEpiC）购自美国 Sciencell 公司，培养基高糖 DMEM、FBS 均购自 Gibco 公司。Lipofectamine 2000 质粒转染试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.3 构建 Cubilin 的反义 RNA 腺病毒表达载体

1.3.1 PCR 扩增目的片段　根据大鼠 Cubilin 起始编码区的 mRNA 序列，Primer Premier 5.0 设计 PCR 引物为：（正义）5′-ATGTCCTCGCAGTTTCTCTGGG-3′；（反义）5′-AAGATTCCATTTGGCGGTGTTGTC-3′。以下述条件进行 PCR 扩增：95 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 40 s，59 ℃退火 40 s，72 ℃延伸 50 s，共 35 个循环，72 ℃ 10 min。取 5 μl PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上（含 0.5 μg/ml 溴化乙锭）电泳。

1.3.2 连接 T 载体　pMD 18-T Vector 与上述 PCR 产物 767 bp 的 Cubilin 目的片段（体积比 1∶4）混合 5 μl，再加入等量的（5 μl）Solution Ⅰ，16 ℃，过夜连接后，转化受体菌 JM109，在含有 X-gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板培养基上随机挑取 10 个白色菌落，用质粒提取试剂盒提取质粒，经内切酶 *BamH* Ⅰ单酶切后，进行琼脂糖凝胶电泳，观察是否存在 2.88 kb，0.23 kb 和 0.36 kb 左右的 3 条目的条带，将经鉴定的阳性克隆，送上海生工（M13 +/ −. M13）测序，鉴定扩增片段和连接方向。

1.3.3 构建腺病毒穿梭载体　根据测序结果选择 2 个质粒上反向的酶切位点 *Kpn* Ⅰ，*Hind* Ⅲ对穿梭质粒载体 pAdtrack-CMV 以及 pMD 18-T-CUB 酶切，琼脂糖凝胶电泳分离，采用回收试剂盒回收穿梭质粒载体与 767 bp 目的 DNA，经 T_4 DNA 连接酶，16 ℃连接过夜后，转化受体菌 $DH_{5\alpha}$，用含 50 μg/ ml 卡那霉素的 LB 固体培养基筛选，挑选连接阳性的克隆，抽提质粒，双酶切法和 PCR 法鉴定，此确定为反向插入腺病毒穿梭质粒载体 pAdtack-ACUB；作为对照，选择 2 个质粒上同向的酶切位点 *Xba* Ⅰ，*Sal* Ⅰ进行酶切、连接，构建正向插入的腺病毒穿梭质粒载体 pAdtack-CUB。

1.3.4 细菌内同源重组产生重组腺病毒质粒　收集对数期生长的受体菌 BJ 5183（AdEasy™XL），用 10 % 冰预冷的灭菌甘油于（4 ℃，3 000 r/ min，30 min）条件下洗涤 2 ~ 3 次，即为电穿孔感受态细菌。−80 ℃保存备用。穿梭载体 pAdtrack-ACUB 和 pAdtrack-CUB 以 *Pme* Ⅰ酶切线性化，琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化回收，在 2 500 V、200 Ω、25 μF 条件下，10 μl 穿梭载体电穿孔转化 100 μl 包含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的受体菌 BJ5183，25 μg/ml 卡那霉素的 LB 固体培养基筛选，抽提质粒以 *Pac* Ⅰ酶切及测序鉴定，阳性克隆质粒为重组腺病毒质粒，命名为 pAdEasy-ACUB 和 pAdEasy-CUB。

1.3.5 293 细胞内产生重组腺病毒　转染前 24 h 于 6 孔板中接种 1×10^6 个 293 细胞，生长至丰度为 70% ~ 90% 时，取 4 μg 以 *Pac* Ⅰ线性化酶切 pAdEasy-ACUB 和 pAdEasy-CUB 质粒的胶回收纯化大片段 DNA，按 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书的要求和方法进行转染，次日传代于细胞培养瓶中，每天光镜和荧光显微镜下观察细胞生长情况以及荧光表达情况。9 ~ 12 d 后，收集细胞，于 −70 ℃、37 ℃反复冻融 3 ~ 4 次，离心过滤收集病毒上清，保存于 −80 ℃。

1.3.6 重组腺病毒大规模扩增及 CsCl 密度梯度超速离心纯化　按照上述方法连续扩增病毒 5 ~ 6 轮，最后 1 次共感染大约 3×10^8 个 293 细胞，3 ~ 4 d 后收集病毒上清。制备 CsCl 低密度母液（1.2 g/ml）和高密度母液（1.46 g/ml）。将高密度母液、低密度母液以及病毒上清加至超速离心管中，以 10 000 ×*g* 于 4 ℃离心 3 ~ 4 h，侧向穿刺小心吸出病毒条带，加入透析袋中透析 12 h，其间更换透析缓冲液（10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0，1 mmol/L $MgCl_2$，10 % 甘油）3 次。透析完全后，用 2 ×病毒储存液（10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0，100 mmol/L NaCl，0.1% BSA，50% 甘油）按 1∶1 稀释病毒，0.22 μm 滤膜过滤，分装后放 −80 ℃保存。

1.3.7 病毒滴度测定　先用 OD 法初步估算：取 15 μl 纯化好的病毒用 0.435 ml H_2O 稀释，另外用 0.435 ml H_2O 稀释 15 μl高密度 CsCl 母液作为空白对照，在 260 nm 检测 OD 值［*D*(260)］，按 10^{12} VP/*D*(260) 进行换算。再以 GFP 法进行测定：将病毒储存液作不同比例的稀释，取 500 μl 稀释液加至 T-25 cm^2 培养瓶培养的 293 细胞中，于 37 ℃吸附 30 min，换新鲜培养基继续培养 36 h，在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数，按病毒滴度（pfu/ml）= GFP 阳性细胞数 × 病毒上清稀释倍数/ 0.5 ml 计算。

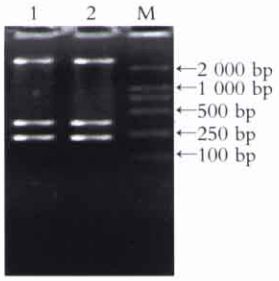
1.4 Cubilin 反义 RNA 对肾小管上皮细胞 Cubilin 蛋白质诱导表达抑制作用的检测

实验分组：分 Cubilin 反义 RNA 腺病毒载体干预组、Cubilin 正义 RNA 腺病毒载体对照组、腺病毒空载体对照组和未转染组。将 RRTEpiC 接种于 50 ml 培养瓶中，待细胞 80 % 融汇时，无血清培养 24 h，加入腺病毒（反义、正义、空载）转染液，1 h 后去除转染液，加入新鲜不含血清的 DMEM 培养液。未转染组除不转染病毒外，其余同转染组。10 g/L 浓度白蛋白刺激 24 h 后用 MC-CelLytics 抽提蛋白质，经聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭后，以山羊抗大鼠 Cubilin 多克隆抗体为一抗、生物素标记兔抗山羊 IgG 为二抗进行 Western blot 分析。

2　结果

2.1　Cubilin 目的片段的克隆及测序

PCR 扩增的 Cubilin 目的片段克隆到 T 载体上，经转化、摇菌、提质粒，用内切酶 *Bam*H Ⅰ单酶切（共有 3 个酶切位点），凝胶电泳选取阳性克隆测序。正确的 Cubilin PCR 扩增产物应含有 2 个 *Bam*H Ⅰ酶切位点（T 载体有 1 个）（图 1）。

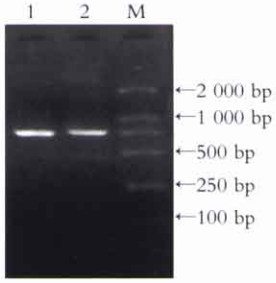


M：标准 DL2000；1，2：pMD 18-T-Cubilin 经 *Bam*H Ⅰ酶切

图 1　*Bam*H Ⅰ酶切电泳图

2.2　腺病毒穿梭载体的构建

选择 pAdtrack-CMV 以及 pMD 18-T-CUB 2 个质粒上反向的酶切位点双酶切、连接，构建反向插入的腺病毒穿梭载体 pAdtack-ACUB；反之，对照则选择 pAdtrack-CMV 以及 pMD 18-T-CUB 2 个质粒上同向的酶切位点双酶切、连接则构建正向插入的腺病毒穿梭载体 pAdtack-CUB。PCR 法鉴定见图 2。

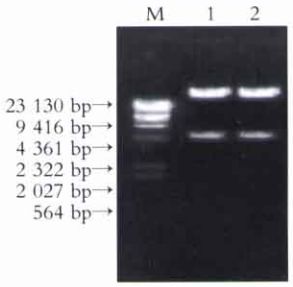


M：标准 DL2000；1：正向插入穿梭质粒为模板；2：反向插入穿梭质粒为模板

图 2　穿梭质粒 PCR 产物

2.3　细菌内重组腺病毒质粒的鉴定

线性化的穿梭质粒载体 pAdtrack-ACUB 和 pAdtrack-CUB，电穿孔转化大肠杆菌 BJ 5183（AdEasy™ XL），与该受体菌内 pAdEasy-1 的同源序列之间进行同源重组，重组后的阳性克隆只有在含有卡那霉素的 LB 平板上生长。挑取阳性克隆，以 *Pac* Ⅰ酶切，1.0% 琼脂糖凝胶电泳分别出现 4.5 kb 与 30 kb DNA 条带，确定为同源重组阳性的重组腺病毒质粒 pAdEasy-ACUB 和 pAdEasy-CUB（图 3）。同源重组阳性的 Cubilin 反义 RNA 重组腺病毒质粒 pAdEasy-ACUB 送上海生工测序，测序结果与基因库公布的 Cublin 目的片段序列完全一致。



M：λ-*Hind*Ⅲ 标准；1：正向重组腺病毒质粒；2：反向重组腺病毒质粒

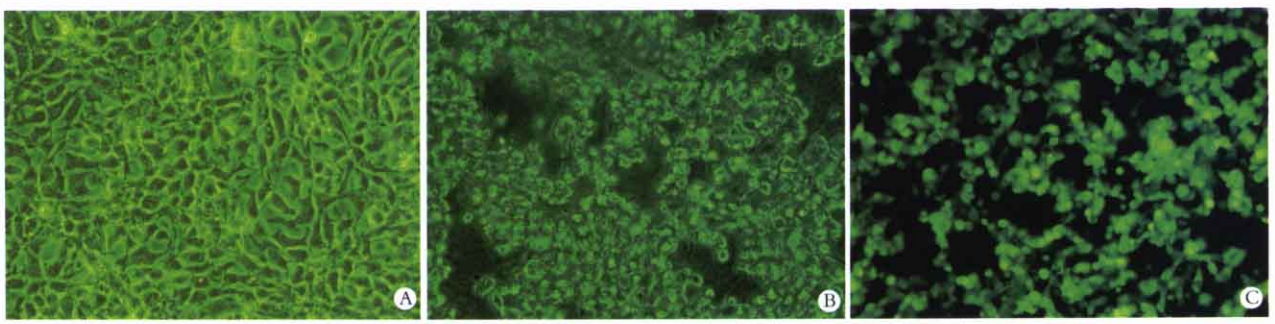
图 3　*Pac* Ⅰ酶切电泳图

2.4　293 细胞内产生重组腺病毒

重组腺病毒质粒 *Pac* Ⅰ酶切线性化后转染 293 细胞，培养 7～10 d 后可观察到细胞变圆、肿胀、呈葡萄串状积聚，并有部分细胞浮起等细胞病变效应（cytopathic effects，CPEs）（图 4）。产生的重组腺病毒命名为 pAdEasy-ACUB 和 pAdEasy-CUB，经过 5～6 轮 293 细胞内扩增，病毒 CsCl 密度梯度超速离心纯化，滴度测定 pAdEasy-ACUB 是 2.0×10^{10} pfu/ml，pAdEasy-CUB 是 1.8×10^{10} pfu/ ml。

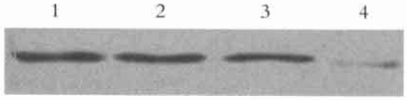
2.5　Cubilin 反义 RNA 对 Cubilin 蛋白质诱导表达抑制作用

在白蛋白刺激的条件下，RRTEpiC 中 Cubilin 蛋白明显表达；转染 Cubilin 反义 RNA 腺病毒载体可明显抑制 Cubilin 蛋白诱导表达；Cubilin 正义 RNA 腺病毒载体和腺病毒空载体转染对 Cubilin 蛋白诱导表达无明显影响（图 5）。



A：正常 293 细胞（LM×200）；B：病毒上清感染 293 细胞呈现葡萄状完全病变（LM×200）；C：病毒完全感染后的 293 细胞（荧光显微镜×200）

图 4　重组腺病毒 293 细胞病变效应



1:未转染组;2:腺病毒空载体对照组;3:Cubilin 正义 RNA 腺病毒载体对照组;4:Cubilin 反义 RNA 腺病毒载体干预组

图5 RRTEpiC 中 Cubilin 蛋白表达的 Western blot 分析

3 讨论

基因治疗的关键是载体，高效基因转移载体的选择是影响基因治疗疗效的关键因素之一。复制缺陷型腺病毒载体因其具有安全性高、感染细胞范围广、滴度高、不整合至宿主基因组且可以感染任何周期细胞等优点，成为目前基因治疗最常用的载体之一。本研究室采用的 AdEasy™XL 系列腺病毒载体是新一代简化的重组腺病毒载体，主要有以下优点：①含有大部分腺病毒基因的骨架载体为超螺旋形，避免酶对其进行切割。②利用了大肠杆菌 BJ 5183 中的高效同源重组机制而避免了产生腺病毒重组体中的额外步骤。③以卡那霉素代替传统的氨苄西林为抗生素筛选标志，避免了应用于临床时，机体对氨苄西林过敏的副作用。④可以插入高达 10 kb 的基因片段并可表达多个基因；含有绿色荧光蛋白(GFP)基因，我们可以直接观察到转染情况和感染效率。⑤产生高滴度的病毒，显著降低病毒产生的时间。

反义 RNA 技术利用基因重组技术，构建表达载体，使其表达反义 RNA ，通过碱基互补与靶 DNA 配对结合，有效地抑制靶基因的转录、翻译或诱导靶基因的降解，进而抑制靶基因的表达。已成为基因治疗的有效手段。Cubilin 是属于低密度脂蛋白(LDL)受体超家族成员的吞饮受体，广泛分布于体内多种组织上皮细胞[5]。大量研究表明，Cubilin 参与多种生物代谢产物的跨细胞转运，与生命的正常生存发育有着密不可分的关系。在肾脏，Cubilin 主要分布在近端肾小管上皮细胞的刷状缘侧，使近端肾小管对白蛋白、球蛋白、转铁蛋白等多种尿蛋白成分进行重吸收。研究表明这些配体蛋白均可直接损伤肾小管上皮细胞，加重小管-间质病变，但 Cubilin 在这些致病过程中的具体作用尚不明确[6]。在本实验中，我们采用腺病毒载体重组成功地构建了 Cubilin 反义 RNA 的重组腺病毒，并且通过对 RRTEpiC 细胞的转染成功抑制了近端肾小管上皮细胞 Cubilin 蛋白的诱导表达。我们希望能够以 Cubilin 反义 RNA 腺病毒载体为介导，进一步研究 Cubilin 基因在蛋白尿肾损害发生发展过程中的可能性致病作用，探索 Cubilin 基因作为基因治疗靶基因的价值，并为临床前研究提供实验依据。

参考文献：

[1] STEPHAN J P, MAO W, FILVAROFF E, *et al*. Albumin stimulates the accumulation of extracellular matrix in renal tubular epithelial cells [J]. Am J Nephrol, 2004, 24(1): 14 - 19.

[2] ZHAI X Y, NIELSEN R , BIRN H, *et al*. Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney[J]. Kidney Int, 2000, 58(4): 1523 - 1533.

[3] VERROUST P J, KOZYRAKI R. The roles of cubilin and megalin, two multiligand receptors, in proximal tubule function: possible implication in the progression of renal disease[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001, 10(1): 33 - 38.

[4] 何娅妮，杨聚荣，蒋建新. Cubilin 在白蛋白刺激肾小管上皮细胞表达 MCP-1 、RANTES 中的作用[J]. 中华医学杂志，2004，84(21)：1804 - 1809.

[5] KOZYRAKI R. Cubilin, a multifunctional epithelial receptor: an overview[J]. J Mol Med, 2001, 79 (4): 161 - 167.

[6] 杨聚荣，何娅妮. 肾小管重吸收白蛋白的受体蛋白与小管-间质损害[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，2003，12(2)：169 - 171，175.

(编辑 薛国文)

《现代美容整形外科学》征订启事

由著名美容整形外科专家，第三军医大学西南医院教授领衔主编，国内外数十名经验丰富的美容整形外科专家和学者编撰，系统阐述了以常见经典手术为主的各类美容整形外科手术的基本原则及操作技术等最前沿的专著《现代美容整形外科学》于2006年4月由人民军医出版社出版，全国发行。本书有以下特点：1 70余位美容整形专家共力奉献，由院士等著名权威专家主编、审定。2 系统介绍了头颈、颜面、面部、耳部、鼻部、乳房、躯体、会阴、生殖器等部位的美容整形手术的适应证、禁忌证、术前准备、麻醉与体位、手术步骤、术中注意要点、术后注意事项、术后处理以及并发症等都进行了详细阐述，并配合大量精细的局部解剖和手术操作示意图或照片。全面阐述了美容整形，整形外科，创伤美容，麻醉，皮肤色素及体表肿瘤，皮肤软组织扩张，吸脂减肥，组织移植，生物材料，组织工程，麻醉的新药和治疗的最新知识和冷冻，支架，计算机，内镜，超声，电子，纳米，微创等技术在美容整形外科的应用。根据当今美容整形外科的发展特点，特别加入了人体美学，心理学，中医医学以及医学美容法规及医疗风险的防范等内容。3 全书共计1 848页，插图1 160余幅，其中彩色插图80余幅。开本为16开，80 g双面铜版纸，彩色印刷，全书精装加封面套金。定价：680元/册

本书作者在参阅国内外大量最新文献的基础上，较全面地反映了美容整形外科学的发展水平。《现代美容整形外科学》是一部系统、全面介绍美容整形外科技术的专著，是从事美容整形外科的工作人员全方位必备参考书，是各级各类美容整形医师评审、医学院校师生、图书馆、读书室重点收藏图书。欢迎订阅

邮局汇款：重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部　　邮　编：400038

联 系 人：王　红　　电　话：(023)68752782,68752189-84